

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Automatické monitorování uvolnění *Metridia* luciferázy
z geneticky modifikované buněčné linie.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultant:
prof. Manuel Miró

Hradec Králové, 2022

Natali Jožičová

PROHLÁŠENÍ

„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.“

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou upřímně poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za její trpělivost, obdivuhodnou ochotu, cenné rady a podnětné připomínky při zpracování mé práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Analytické chemie

Kandidát: Natali Jožičová

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

Konzultant: prof. Manuel Miró

Název diplomové práce: Automatické monitorování uvolnění *Metridia* luciferázy z geneticky modifikované buněčné linie.

Diplomová práce se zabývá automatickým monitorováním uvolněné *Metridia* luciferázy z geneticky modifikovaných buněk v reálném čase. Během práce byla použita již dříve optimalizovaná metoda pro monitorování přirozeného přebytku luciferázy z buněk. Zároveň byl testován toxický účinek žlučových kyselin (chenodeoxycholové a deoxycholové) na změny permeability buněčné membrány. Během experimentu byly použity jaterní epitelální buňky, které byly modifikovány *Metridia* luciferázovým plazmidem. Po této genetické modifikaci byly buňky schopny syntetizovat aktivní enzym *Metridia* luciferázu. Tento enzym vykazuje po reakci se substrátem koelenterazinem luminiscenci. Emitované záření bylo následně detekováno v průtokové cele spektrofluorimetru při vlnové délce 485 nm. Měření bylo provedeno za pomoci sekvenční injekční analýzy, která byla propojena přes průtokový systém s 3D tištěnou celou, jež obsahovala insert s testovanou monovrstvou buněk. Toto propojení umožnilo automatické monitorování uvolňování luciferázy po obou stranách buněčné monovrstvy. Vzorky byly odebírány střídavě z apikálního a bazálního kompartmentu vždy s odstupem 30 minut po dobu 3 až 10 hodin. Ovlivnění permeability buněčné membrány se projevilo zvýšením chemiluminiscenčního signálu, který byl způsoben zvýšeným uvolněním luciferázy z buněk. Účinek kyselin chenodeoxycholové a deoxycholové o koncentraci 0,01 mg/ml se projevil průměrně v rozmezí po 1,5 hodině až 5 hodinách.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Analytical Chemistry

Candidate: Natali Jožičová

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

Consultant: prof. Manuel Miró

Title of the diploma thesis: Automated monitoring of *Metridia* luciferase released from genetically modified cell line.

The diploma thesis reports automatic real-time monitoring of the release of *Metridia* luciferase from genetically modified cells. A previously optimized method for monitoring the natural release of luciferase from cells was used during the experiment. At the same time, the toxic effect of bile acids (chenodeoxycholic and deoxycholic acid) on changes in cell membrane permeability was tested. Liver epithelial cell line modified with the *Metridia* luciferase plasmid were used during the experiment. After this genetic modification, the cells were able to synthesize the active *Metridia* luciferase enzyme. This enzyme generates luminescence upon reaction with substrate coelenterazine. The emitted light was detected in the flow cell of a spectrofluorometer at a wavelength of 485 nm. The measurement was taken in a sequential injection system connected to a 3D printed module containing an insert with the tested cell monolayer. This automated system allowed real-time monitoring of the luciferase release on both sides of the cell monolayer. Samples were taken alternately from the apical and basal compartments every 30 minutes for 3 to 10 hours. The influence of the permeability of the cell membrane was manifested by an increase in the chemiluminescence signal, which was caused by the increased release of luciferase from the cells. The effect of chenodeoxycholic and deoxycholic acids with a concentration of 0.01 mg/ml was noticeable on average after 1.5 hours to 5 hours.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	3
1. Úvod	4
2. Cíl a popis zadání práce	5
3. Teoretická část	6
3.1. Neseparační průtokové metody	6
3.1.1. Kontinuální průtoková analýza (CFA)	6
3.1.2. Segmentovaná průtoková analýza (SFA)	6
3.1.3. Průtoková injekční analýza (FIA)	7
3.1.4. Sekvenční injekční analýza (SIA)	8
3.2. Využití průtokových metod k monitorování dlouhotrvajících procesů	10
3.3. Bioluminiscence	12
3.4. Syntetizovaná Metridia luciferáza a Renilla Luciferase Assay systém	13
3.5. Kyselina chenodeoxycholová a deoxycholová (CDCA a DCA)	14
4. Experimentální část	16
4.1. Použité přístroje a pomůcky	16
4.2. Použité chemikálie	17
4.3. Příprava buněk a roztoků	17
4.4. Popis přístroje	18
4.5. Popis jednotlivých kroků analýzy	20

5. Výsledky a diskuze	22
5.1. Monitorování uvolňování luciferázy z buněk v závislosti na množství použitého plazmidu při transfekci.....	25
5.2. Monitorování uvolňování luciferázy z buněk v závislosti na době transfekce s přihlédnutím k množství použitého plazmidu při transfekci	28
5.3. Monitorování uvolňování luciferázy z buněk po interakci s potenciálně toxickou látkou.....	31
6. Závěr	45
7. Seznam použité literatury	47
8. Přílohy.....	52
8.1. Příloha č. 1: Reálný záznam analýzy insertu	52
8.2. Příloha č. 2: Program SIA	52

Seznam použitých zkratk

AK	Apikální kompartment
ASA	Acetylsalicylová kyselina
BK	Bazální kompartment
CDCA	Chenodeoxycholová kyselina
CFA	Kontinuální průtoková analýza
CL	Chemiluminiscence
DCA	Deoxycholová kyselina
FIA	Průtoková injekční analýza
Fluc	Luciferáza světlušek
Gluc	<i>Gaussia</i> luciferáza
Mluc	<i>Metridia</i> luciferáza
Rluc	<i>Renilla</i> luciferáza
SFA	Segmentovaná průtoková analýza
SIA	Sekvenční injekční analýza
SIC	Sekvenční injekční chromatografie
SPE	Extrakce na pevné fázi

1. Úvod

Bioluminiscence je záření, které vzniká jako forma uvolněné energie při reakci u určitých organismů. Vzniklé elektromagnetické záření viditelného spektra je možné jednoduše detekovat při chemické analýze optickými metodami. Gen kódující luciferázu (enzym katalyzující bioluminiscenční reakce) lze z organismů izolovat a modifikovat jím buňky, které jsou následně schopny exprese genu za poskytnutí aktivního enzymu. Proto lze bioluminiscenční signál využít jako citlivý senzor při různých *in vivo* i *in vitro* experimentech. Množství uvolněné luciferázy z buněk závisí mimo jiné i na stavu buněčné membrány. Proto může být množství uvolněné luciferázy využito jako identifikátor pro testování toxického vlivu látek na permeabilitu buněčné membrány. K monitorování dějů na obou stranách buněčné monovrstvy je možné využít 3D tištěné cely (již dříve vytvořené za účelem monitorování membránové permeace [1]). Automatizace odebírání vzorků po obou stranách buněčné monovrstvy je docíleno spojením se systémem sekvenční injekční analýzy.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo monitorování uvolňování luciferázy v reálném čase z geneticky modifikovaných buněk. Součástí experimentální části je aplikace optimalizované metody pro monitorování přirozeného uvolňování *Metridia* luciferázy z buněk po transfekci odpovídajícím plazmidem a testování toxického vlivu na permeabilitu membrány modelových látek odvozených od kyseliny cholové. Monitorování bylo uskutečněno systémem SIA, který byl přes selekční ventil propojen s 3D tištěnou celou obsahující buněčnou monovrstvu. Toto spojení umožnilo automatizaci odebírání vzorků z kompartmentů na obou stranách buněčné monovrstvy a sledování změn díky luminiscenčnímu signálu měřenému v reálném čase.

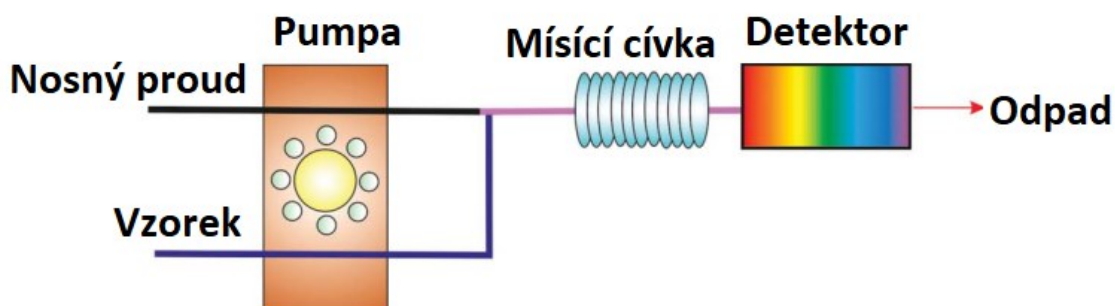
3. Teoretická část

3.1. Neseparační průtokové metody

Využití chemické analýzy v různých odvětvích s potřebou analyzování velkého množství vzorků vedlo k vývoji neseparačních průtokových metod. Rutinní manuální úkony prováděné v laboratořích jsou časově i pracovně náročné, nepřesné a používají velké objemy vzorků i činidel [2]. Tyto metody umožňují automatizaci určitých kroků analýzy, jako například dávkování vzorků, jejich úpravu i měření analytického signálu. Díky tomu analýzu zjednodušují a zvyšují její produktivitu a opakovatelnost. Miniaturizace postupů umožňuje snížení spotřeby vzorků i činidel [3-4].

3.1.1. Kontinuální průtoková analýza (CFA)

Jedná se o první neseparační průtokovou metodu. Během CFA je do průtokového systému peristaltickým čerpadlem kontinuálně dávkován nosný proud, vzorek i případná činidla. K mísení jednotlivých roztoků a k případné chemické reakci dochází přímo v průtokovém systému. Směs následně kontinuálně pokračuje do detektoru. Setrvání směsi v průtokovém systému by mělo být dostatečně dlouhé pro zajištění dosažení chemické rovnováhy reakce. Zároveň zde dochází k relativně vysoké spotřebě použitých roztoků [3].

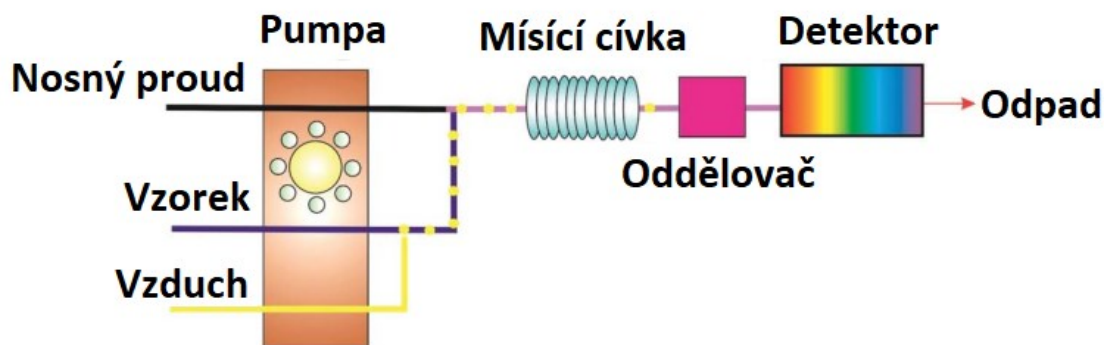


Obrázek 1: Schéma CFA [3]- přeloženo.

3.1.2. Segmentovaná průtoková analýza (SFA)

SFA je založena na kontinuálním toku nosného proudu umožněného peristaltickým čerpadlem. Z tohoto hlediska funguje na stejném principu jako CFA, s tím rozdílem, že v tomto případě jsou mezi jednotlivé vzorky nadávkovány vzduchové bubliny, které

zabrání kontaminaci mezi vzorky a zároveň částečně brání disperzi zón. Kontinuální tok vzorků ohraničených vzduchovými bublinami je dále smíchán s proudem činidla a pokračuje až k detektoru. Před dosažením průtokové cely v detektoru dochází k odstranění vzduchových bublin [3].



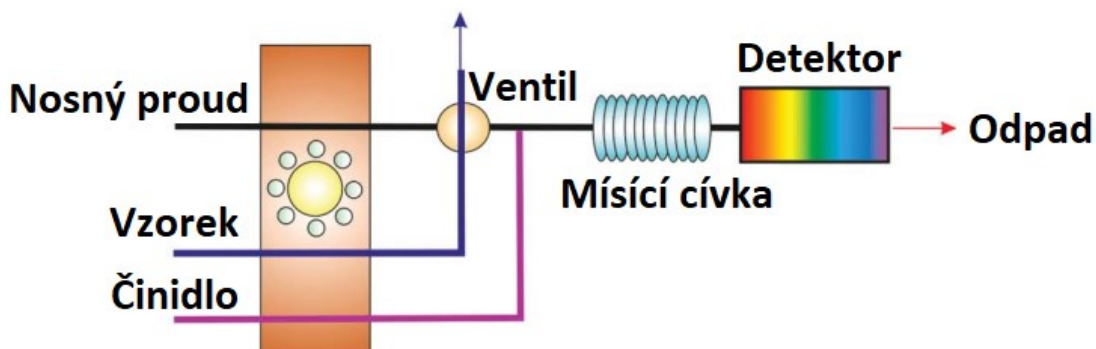
Obrázek 2: Schéma SFA [3]- přeloženo.

3.1.3. Průtoková injekční analýza (FIA)

FIA je nestacionární metoda, která je založena na kontinuálním čerpání nosného proudu, činidel a dalších pomocných látek vícekanálovým systémem opět většinou pomocí peristaltického čerpadla. Vzorek je dávkován do průtokového systému injekčním ventilem, přes který je hnán nosný proud. K mísení vzorku a činidel dochází při souvislém jednosměrném toku průtokovým systémem směrem k detektoru. Zdokonalení techniky umožnilo počítačové řízení, díky němuž jsou jednotlivé kroky analýzy programovatelné a je možná jejich synchronizace v čase. Řízený průtok umožňuje stanovení analytů i přesto, že není dosažena chemická rovnováha reakcí, a to díky tomu, že jsou vstřikované vzorky zpracovány totožným způsobem [3-6].

FIA systém je tvořen čerpadlem, soustavou hadiček, injekčním ventilem, detektorem a ovládacím programem. Nejčastěji je používán šesticestný dvoupolohový ventil, který lze mezi režimy plnění a vstřikování přepínat manuálně nebo automaticky. K pohánění toku slouží peristaltické čerpadlo, které generuje nepřetržitý průtok i v několika paralelních hadičkách zároveň. Nastavením otáček čerpadla lze snadno upravit rychlost průtoku v průtokovém systému. Jeho nevýhodou je pulzování toku a rychlé opotřebování peristaltických hadiček, které časem ztrácejí pružnost, což má za následek snížení

průtoku. Detektor je vybavený průtokovou celou, ze které po změření signálu může proud směsi plynule pokračovat do odpadu. Využívá se například detektor pro UV-VIS spektrofotometrii, ale i fluorescenci a chemiluminiscenci [3-6].



Obrázek 3: Schéma FIA [3]- přeloženo.

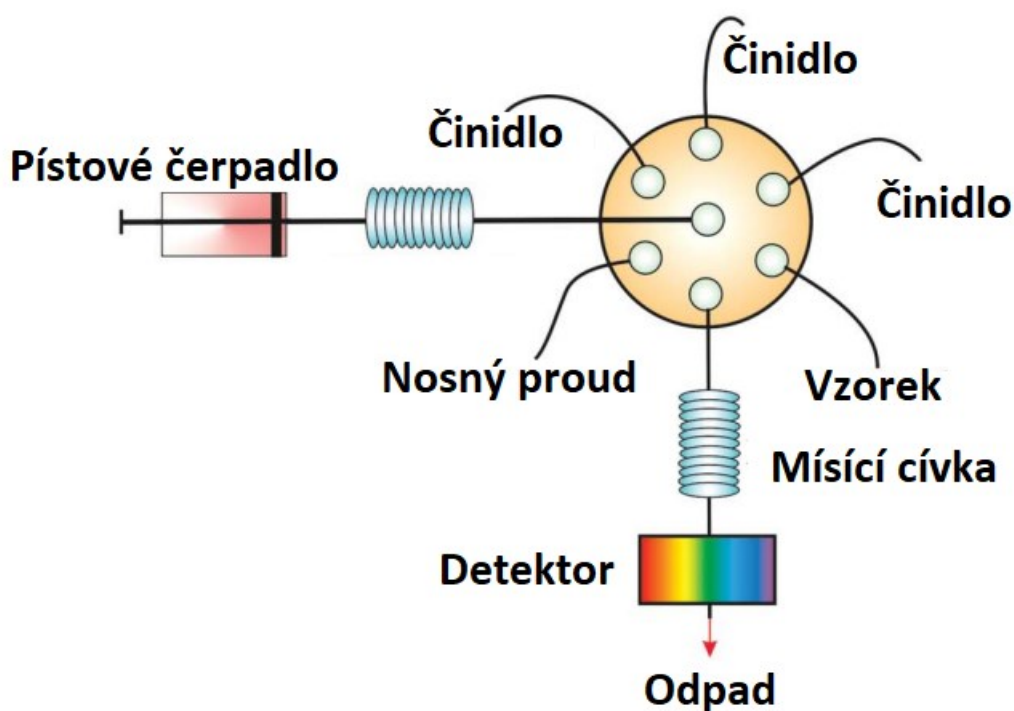
3.1.4. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Z neseparačních průtokových metod se SIA řadí mezi nejpokročilejší a nejúčinnější. Oproti výše zmíněným již nevyužívá kontinuální čerpání nosného proudu. Na rozdíl od nich však využívá změn přímého a zpětného směru toku. Nosný proud, vzorek, činidla i případné další roztoky jsou do jednobanálního průtokového systému aspirovány postupně přes vícecestný selekční ventil pomocí pístového čerpadla [3,5,7].

System SIA se skládá z pístového čerpadla, vícecestného selekčního ventilu, hadiček průtokového systému, mísící cívky a detektoru. Pístové čerpadlo je schopno generovat obousměrný nespojitý tok. Selekční ventil zajišťuje připojení všech roztoků k systému a zároveň je propojen přes průtokový systém s pístovým čerpadlem i detektorem. Nejčastěji se používá 6, 8, nebo 10-cestný ventil. Mísící cívka, sloužící k promíchání zón, se nejčastěji nachází mezi čerpadlem a selekčním ventilem. Možné je i zapojení další mísící cívky před detektor. Volba detektoru závisí na druhu chemické reakce. Často využívanými detektory jsou spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické. Jednotlivé součásti systému jsou propojeny průtokovým systémem, který nejčastěji tvoří plastové hadičky o vnitřním průměru 0,7-0,8 mm. K naprogramování pohybů pístu čerpadla a k zajištění synchronizace přepínání pozic selekčního ventilu s cílem dosáhnout reprodukovatelného postupu je nutné řízení SIA vhodným ovládacím programem [3,5,7].

Pístové čerpadlo je schopno proud posunovat oběma směry. Nejprve jsou jednotlivé roztoky aspirovány přes selekční ventil směrem k mísící cívce. Časování poloh selekčního ventilu určuje pořadí roztoků v mísící cívce. Následně po jejich aspiraci dojde k obrácení toku nosného proudu a jeho nasměrování do detektoru [3,5,7].

Možnost využití změny toku nebo jeho zastavení vedoucí k promíchání směsi, výrazně zmenšuje objemy vzorků a činidel potřebných pro analýzu. Další výhodou je, že během analýzy je možné cíleně upravovat aspirovaný objem vzorku nebo jiného roztoku délkou pohybu pístu čerpadla, zatímco u FIA je objem vzorku omezený objemem dávkovací smyčky. Na druhou stranu nutnost plnění pístu čerpadla během měření, analýzu prodlužuje v porovnání s FIA [3,5,7].



Obrázek 4: Schéma SIA [3] – přeloženo.

3.2. Využití průtokových metod k monitorování dlouhotrvajících procesů

Výhodami využití průtokových metod ke sledování dlouhotrvajících procesů je možnost jejich automatizace a tím i časová efektivita. Online odebíráním vzorků se snižuje možnost jejich kontaminace a zároveň i riziko vzniku chyb [3]. Navíc jsou informace o vzorku získány v reálném čase a je tak možné podmínky procesu v případě potřeby upravit. Následující tabulky shrnují příklady studií, při nichž byla využita průtoková metoda pro monitorování časově náročnějšího procesu. Sledovanými procesy jsou liberace, disoluce a permeace. Jedná se o procesy, které přinášejí detaily o parametrech popisujících kinetiku léčiv.

Tabulka 1: Přehled liberačních studií.

Testovaná látka	Metoda	Detekce	Celková doba analýzy	Vzorkovací interval	Citace
Kyselina salicylová	SIA + Franzova difúzní cela	Fluorimetrická	6 h	10 min	[8]
Lidokain + pilokarpin	SIC + Franzova difúzní cela	UV-Spektrofotometrická	4 h	10,5 min	[9]
Indometacin	SIA + Franzova difúzní cela	Fluorimetrická	6 h	10 min	[10]
Ciprofloxacin	SIC	UV-Spektrofotometrická + fluorimetrická	3 h	10-60 min	[11]

Tabulka 2: Přehled disolučních studií.

Testovaná látka	Metoda	Detekce	Celková doba analýzy	Vzorkovací interval	Citace
Ibuprofen	SIA + disoluční systém rotujícího košíčku	UV-Spektrofotometrická	4 a 12 h	5 min	[12]
Ergotamin tartrát	SIA + disoluční systém rotujícího košíčku	Fluorimetrická	20 min	30 s	[13]
ASA, fenacetin, kofein	SIA + disoluční systém rotujícího košíčku	UV-Spektrofotometrická	1 h	4 min	[14]
Kyselina askorbová, rutin	SIA + SPE+ disoluční systém rotujícího košíčku	UV-Spektrofotometrická	74 min	140 s	[15]
Prazosin hydrochlorid	SIA + disoluční systém rotujícího košíčku	Fluorimetrická	1 h	50 s	[16]
Reserpin	FIA + disoluční systém rotujícího pádla	Fluorimetrická	45 min	1 min	[17]
Metamizol sodný, Pseudoefedrin sulfát	SIA + disoluční systém rotujícího pádla	Potenciometrická (multiiontově selektivní elektrodový systém)	1 h	1-30 min	[18]
Kyselina aminokapronová	SIA + disoluční systém rotujícího košíčku	Fluorimetrická	41 min	3 min	[19]
Famotidin	FIA + disoluční systém rotujícího pádla	UV-Spektrofotometrická	1 h	5 min	[20]

Tabulka 3: Přehled permeačních studií.

Testovaná látka	Metoda	Detekce	Celková doba analýzy	Vzorkovací interval	Citace
Rhodamine 123	SIA + 3D permeační cela	Fluorimetrická	2 h	5 min	[1]
Rhodamine 123	SIA + Franzova difúzní cela	Fluorimetrická	2-4 h	10 min	[21]
Fluorescein sodný	SIA + permeační cela	Fluorimetrická	5 h	5 a 30 min	[22]
Kofein	SIC + Franzova difúzní cela	UV-Spektrofotometrická	2 h	5 min	[23]

3.3. Bioluminescence

Luminiscence vzniká během přechodu elektronu z vyšších energetických hladin do nižších, kdy dochází k emisi záření molekulami, u kterých došlo k excitaci díky elektromagnetickému vlnění [24]. Jedním z typů luminiscence je chemiluminiscence, kdy excitace elektronů je vyvolaná chemickou reakcí. Pokud chemiluminiscenci vztáhneme pouze na případy, kdy k emisi světla dochází u živých organismů, jedná se o bioluminiscenci neboli enzymaticky podmíněnou chemiluminiscenci. Obecně lze tuto reakci popsat jako oxidaci substrátu luciferinu katalyzovanou enzymem luciferáza [25]. Po přechodu molekuly do excitovaného stavu netrvá déle než několik nanosekund, než dojde k uvolnění energie ve formě fotonu [26]. Rozsah vlnových délek vyzařovaného světla se pohybuje mezi 400 a 720 nm. Existuje více druhů organismů, které jsou schopny produkovat světlo. Jednotlivé organismy se mohou lišit rozdílnou strukturou luciferázy i luciferinu a mít jiný mechanismus bioluminiscence. Z mořských organismů schopných bioluminiscence lze nalézt zástupce bakterií, řas, měkkýšů, korýšů, ryb a žraloků. U suchozemských organismů se jedná převážně o zástupce hub, ale lze tento jev

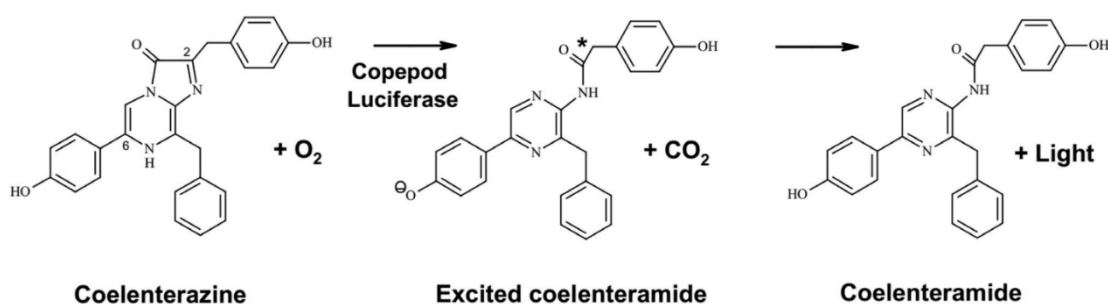
pozorovat i u některých zvířat (hlístice, členovci – z nich jsou nejznámější světlušky) [25].

Bioluminiscenční analýza je využívána díky vysoké citlivosti a možnosti neinvazivního monitorování buněčných procesů hlavně v biomedicínském výzkumu. Nejčastěji analyticky využívanou luciferázou je luciferáza ze světlušek (Fluc) a *Renilla* luciferáza (Rluc) z mořské macešky (*Renilla reniformis*). D-luciferin je substrátem reakce, která je katalyzována Fluc. Zároveň jako kofaktory reakce jsou zapotřebí ATP a Mg^{2+} . K uvolnění energie dochází emisí zeleného světla s maximem při vlnové délce 566 nm. Rluc je katalyzátorem oxidační dekarboxylace substrátu koelenterazinu, při které nejsou zapotřebí žádné další kofaktory reakce. Zde je emise modrého světla s maximem při 482 nm [27]. Emise světla může mít charakter kontinuální záře nebo jednotlivých záblesků světla [25]. Gluc a Rluc katalyzují reakci při níž dochází k poklesu intenzity záření jenom pár sekund od přidání substrátu při *in vitro* experimentech, zatímco Fluc katalyzuje reakci, při níž vniká signál, který je relativně stabilní a dlouhotrvající [28]. Organismy *Gaussia princeps* a *Metridia longa* z podtřídy klanonožců obsahují luciferázu Gluc a Mluc, které jsou také koelenterazin dependentní jako Rluc. Tito zástupci byli první z třídy klanonožců, u nichž byly izolovány geny kódující luciferázu. Expresí genu klanonožců zodpovědného za luciferázu proběhla úspěšně s poskytnutím aktivního proteinu ve všech typech buněk včetně bakteriálních, mykobakteriálních, kvasinkových, řasových, hmyzích a savčích. Sekretované luciferázy klanonožců mají vysokou bioluminiscenční aktivitu i stabilitu. Například v kultivačním médiu při 37 °C a 5 % CO_2 byla sekretovaná Mluc stabilní až 3 dny. Reportérový gen u *Metridia longa* a *Gaussia princeps* exprimující luciferázu je používán jako citlivý senzor při různých *in vitro* i *in vivo* experimentech. Při reakci luciferázy klanonožců dosáhne světelný signál maxima během několika sekund po přidání substrátu a následně rychle klesá [27].

3.4. Syntetizovaná *Metridia* luciferáza a *Renilla* Luciferase Assay systém

Klonování reportérového genu zodpovědného za uvolňování luciferázy u *Metridia longa* se provádí transfekcí za pomoci vektoru pMetLuc2-Control do savčích buněk jakoukoliv standardní transfekční metodou. Sekretovaná *Metridia* luciferáza o molekulové hmotnosti 24kDa se skládá ze 17 aminokyselin. Díky N-koncovému signálnímu peptidu

je umožněno uvolňování přebytku luciferázy do buněčného kultivačního media bez nutnosti lýzi buněk. Přítomnost luciferázy v mediu je následně zjištělná reakcí s luciferinem, což je v tomto případě koelenterazin za detekce emise záření, kterou tato reakce poskytuje [29]. Rluc, která není schopná přirozeného uvolňování z živých buněk, se účastní reakce se stejným substrátem (koelenterazin) jako Mluc [30]. *Renilla Luciferase Assay* systém (Promega) byl vyvinut pro rychlou a citlivou detekci aktivity *Renilla* luciferázy, ať už přirozeně se vyskytující nebo syntetické *Renilla* luciferázy [31]. Zároveň Mluc není komerčně dostupná jako proteinový standard, proto v experimentech předcházející této práci byla použita Rluc pro optimalizaci podmínek, které byly následně využity k monitorování Mluc [30].



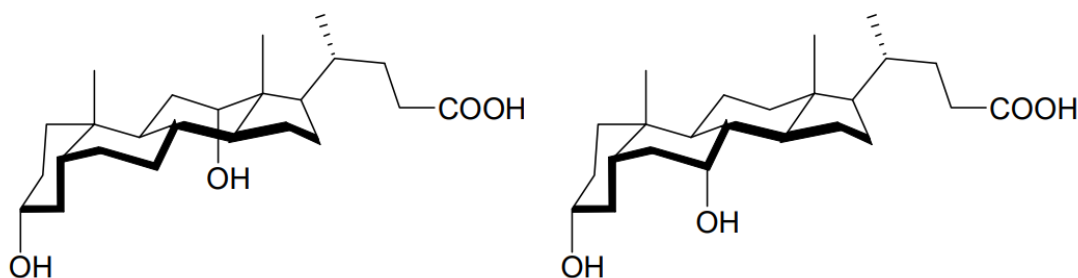
Obrázek 5: Znárodnění reakce oxidace substrátu koelenterazinu katalyzovanou luciferázou klanonožců, za vzniku teoretického meziproductu excitovaného koelenteramidu a za vzniku konečného koelenteramidu za uvolnění energie ve formě záření [27].

3.5. Kyselina chenodeoxycholová a deoxycholová (CDCA a DCA)

CDCA i DCA jsou přírodními žlučovými kyselinami. Primární žlučové kyseliny (kyselina cholová a chenodeoxycholová) vznikají metabolickou přeměnou cholesterolu v játrech. Působením střevních bakterií dochází k degradaci primárních žlučových kyselin a z chenodeoxycholové kyseliny vzniká sekundární kyselina deoxycholová [32].

Struktura žlučových kyselin se skládá ze steroidního jádra a krátkého postranního alifatického řetězce, který je u primárních a sekundárních kyselin zakončený karboxylovou kyselinou. Jejich strukturu je možné popsat dvěma stranami, kdy β -stranu tvoří hydrofobní část s methylovými substituenty, kdežto α -strana obsahuje nejčastěji jednu až tři hydrofilní hydroxylové skupiny. Ve vodném prostředí dochází ke shlukování molekul žlučových kyselin hydrofobní stranou k sobě. K této agregaci dochází při

překročení kritické micelární koncentrace, která je u dihydroxyžlučových solí 5 mM a u trihydroxyžlučových solí v rozmezí 10 mM až 15 mM. Tato agregace umožňuje solubilizaci cholesterolu a lipidů ve střevě za tvorby smíšených micel, které umožňují jejich vstřebání přes střevní stěnu [33]. Hydroxylové skupiny v polohách 3, 7 a/nebo 12 v molekule žlučových kyselin nejsou chemicky ekvivalentní. Hydrofilita žlučových solí se snižuje v pořadí kyselina cholová, CDCA a DCA. Strukturní vzorec CDCA a DCA se liší v poloze jednoho hydroxylového substituentu. CDCA má hydroxylové skupiny v poloze 3 a 7, zatímco DCA v poloze 3 a 12 [34]. CDCA je ve farmakoterapii indikována při vrozených poruchách syntézy primárních žlučových kyselin [35]. DCA je ve farmakoterapii registrována jako dermatologikum, které je injekčně aplikováno do subkutánního tuku, jehož účinkem je cytolytické narušení buněčné membrány adipocytů [36]. Obě kyseliny vykazují detergentní aktivitu, což může mít za následek ovlivnění stability lipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány buněk [30].



Obrázek 6: Vzorce kyseliny deoxycholové (vlevo) a kyseliny chenodeoxycholové (vpravo) [33].

4. Experimentální část

Automatické monitorování uvolňování *Metridia* luciferázy vychází z předchozích experimentů, ve kterých byly nalezeny optimální podmínky stanovení jako aspirované objemy vzorků a činidla, průtokové rychlosti a byl ověřen lineární rozsah kalibrace. Součástí této diplomové práce je aplikace optimalizované metody pro monitorování přirozeného uvolňování *Metridia* luciferázy z buněk po transfekci odpovídajícím plazmidem a testování toxického vlivu modelových látek odvozených od kyseliny cholové.

4.1. Použité přístroje a pomůcky

Pro měření byl použit MicroSIA systém (FIALab instruments, USA) s pístovým čerpadlem o objemu 5 ml a se šesticestným selekčním ventilem. Ty byly navzájem propojeny pomocí mísící cívky o objemu 400 μ l. Dále bylo použito peristaltické čerpadlo Miniplus 3 (Gilson, USA). Mísící cívka a další hadičky průtokového systému byly vyrobeny z fluorovaného ethylen-polymeru s vnitřním průměrem 0,75 mm (Ismatec, USA). Použité peristaltické hadičky byly vyrobeny z polyvinylchloridu o vnitřním průměru 1,02 mm (Tygron, USA). T-konektor, jenž umožňoval kontinuální proudění kultivačního média v dávkovací smyčce apikálního nebo bazálního kompartmentu, a který byl zároveň připojen na vícecestný ventil, měl vnitřní průměr 0,5 mm (Tefzel, Německo). Pro zachování konstantní teploty v 3D tištěné cele byl použit termostat Galaxy 14S (NewBrunswick, Německo). Za účelem detekce chemiluminiscence byl použit spektrofluorimetr RF 6000 (Shimadzu Europe GmbH, Německo). Vzorek byl měřen v průtokové křemenné kyvetě o objemu 120 μ l, která byla pomocí průtokového systému propojena s vícecestným ventilem i odpadem. Promíchání obsahu v 3D tištěné cele bylo zajišťováno magnetickou míchačkou s míchadélkem o velikosti 72 mm (IKA Squid, IKAMAG). Průtokový systém byl řízen softwarem FIALab pro Windows 5.0 (FIALab, USA), zatímco spektrofluorimetr (Shimadzu, Německo) získával a vyhodnocoval data pomocí LabSolutions RF v režimu Time Course.

3D tištěná cela byla vytištěna pomocí stereolitografické technologie 3D tiskárnou (Form 2, Formlabs, USA) firmou TriLAB Group s.r.o. (Hradec Králové). Byla tištěna

z materiálu Clear Resin (Formlabs), který je kombinací polyakrylátů. Testovaná monovrstva geneticky upravené buněčné linie byla kultivována na sterilním polykarbonátovém insertu s průměrem membrány 24 mm, velikosti póru 3 μm a s plochou pro kultivaci 4,67 cm^2 (Transwell).

4.2. Použité chemikálie

Jako nosný proud v SIA systému bylo použito kultivační médium Gibco Opti-MEM I (Life Technologies Corporation, USA). K promytí SIA systému byla využita ultračistá voda a ethanol. Jako základ pro chemiluminiscenční reakci byl použit roztok *Renilla Luciferase Assay Substrate* (koelenterazin) a pro jeho naředění *Renilla Luciferase Assay Buffer* (Promega, USA). V průběhu testování bylo sledováno uvolňování *Metridia* luciferázy, která poskytuje luminiscenční signál po reakci se substrátem (koelenterazinem), který byl obsažen ve výše zmíněném *Renilla Luciferase Assay Substrate*. V rámci analýzy byly zkoumány vlivy modelových toxických látek, které způsobují poškození buněčné membrány. Testovány byly kyselina chenodeoxycholová ($\geq 98,0 \%$) (Sigma Aldrich, Praha, ČR) a kyselina deoxycholová ($\geq 99,0 \%$) (Sigma Aldrich, Praha, ČR).

4.3. Příprava buněk a roztoků

V rámci měření byly použity HepG2 lidské jaterní epiteliální buňky, které byly kultivovány na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK v HK. Kultivace probíhala na Transwell polykarbonátovém insertu s průměrem membrány 24 mm, velikosti póru 3 μm a s plochou pro kultivaci 4,67 cm^2 (Baria, Praha, Česká republika) v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), které bylo obohaceno 10% fetálním bovinním sérem a 1% pyruvátem sodným. K zajištění optimálních podmínek, byla kultivace realizována v inkubátoru při 37°C s relativní vlhkostí 95 % a obsahem CO_2 ve vzduchu 5 %. Po vytvoření souvislé monovrstvy buněk byla provedena transfekce *Metridia* luciferase plazmidem (pMetLuck-control vector, Clontech/Takara, Göteborg, Sweden) za pomoci transfekčního činidla Lipofectamine® 3000.

Připravené roztoky Rluc substrátu a pufru byly uchovávány ve tmě při teplotě -80°C . V den měření byly tyto roztoky rozmrazeny a následně bylo 50 μl substrátu naředěno v 5 ml pufru. Finální roztok byl během měření uchován ve vialce vyrobené z tmavého skla k zajištění ochrany roztoku před světlem, čímž došlo k zvýšení jeho stability.

Během experimentu byl zkoumán vliv testovaných kyselin na kinetiku sekrece *Metridia* luciferázy uvolňované z buněk díky poškození nebo změně permeability buněčné membrány. Chenodeoxycholová kyselina byla připravena rozpuštěním 10 mg ve 40 ml fosfátového pufru. Deoxycholová kyselina byla rozpouštěna v množství 10 mg ve 40 ml ultra čištěné vody. Obě kyseliny o koncentraci 0,25 mg/ml byly následně přímo přidávány do cely tak, aby výsledná koncentrace v obou kompartmentech odpovídala 0,01 mg/ml, 0,0075 mg/ml nebo 0,005 mg/ml.

4.4. Popis přístroje

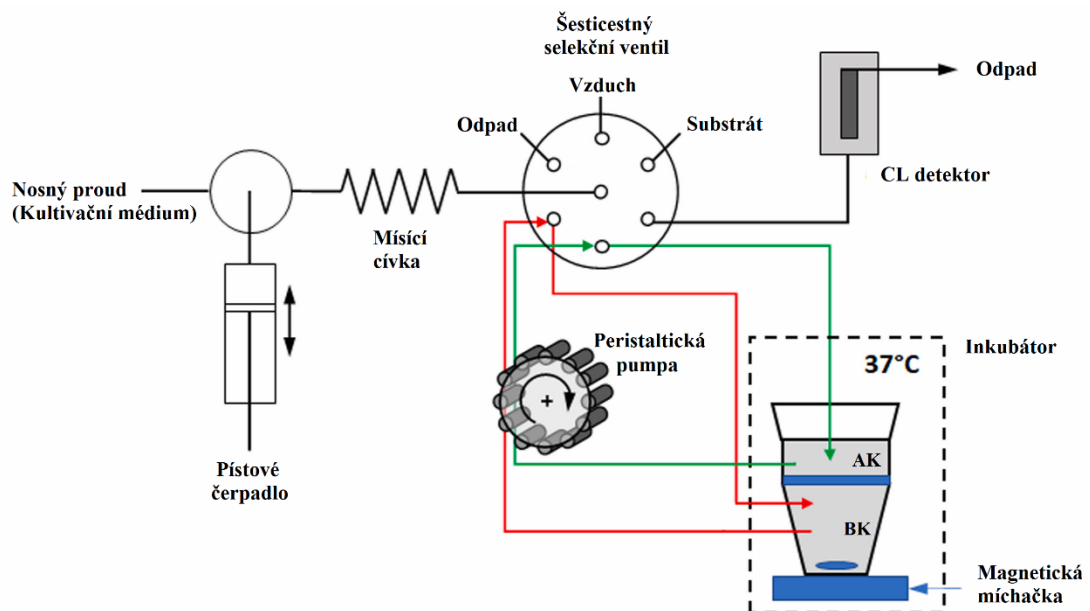
V rámci experimentu byly pro měření použity 3D tištěná cela, termostat, SIA systém a fluorescenční detektor.

Do 3D tištěné cely byl vložen insert s kultivovanou monovrstvou buněk geneticky upravených tak, aby byly schopny syntetizovat *Metridia* luciferázu. 3D tištěná cela byla uzavřena víčkem. Celá konstrukce byla následně umístěna v držáku. Na těle i ve víku 3D cely byly zkonstruovány dva a dva otvory, které umožňovaly propojení s dávkovacími smyčkami. Otvory ve víku umožňovaly odebrání vzorků z apikálního kompartmentu, zatímco otvory v těle z bazálního kompartmentu. Na dno 3D cely bylo umístěno míchadélko. Uvedená konstrukce byla vložena na magnetickou míchačku. Za účelem zachování stálé teploty 37°C , byla během měření 3D cela i s elektromagnetickou míchačkou umístěna v termostatu.

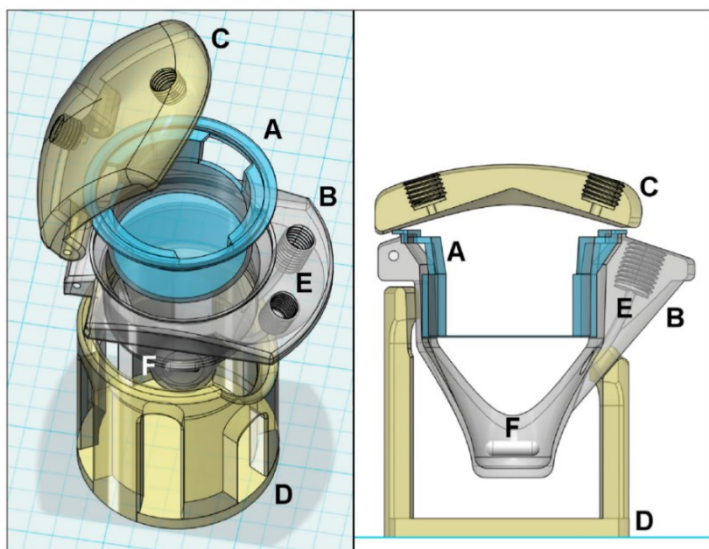
SIA systém byl složen z pístového čerpadla umožňujícího obousměrný tok nosného proudu, čerpadla, které bylo napojeno na vícecestný selekční ventil přes mísící cívku. Ventil byl dále v poloze jedna propojen s odpadem, v poloze dva bylo možno aspirovat vzduch. Následně v poloze tři bylo možno aspirovat zkoumaný vzorek z apikálního kompartmentu. V poloze čtyři byl ventil propojen s vialkou obsahující luciferáza substrát

(koelenterazin). Poloha pět vedla do detektoru a v poloze šest byl ventil napojen na bazální kompartment 3D cely. Obsah apikálního a bazálního kompartmentu byl s ventilem zároveň propojen přes peristaltické hadičky a peristaltické čerpadlo.

Pro měření luminiscenčního signálu odebíraných vzorků byl použit fluorescenční detektor. Během experimentu nebyl zapnut zdroj světla, kvůli detekci chemiluminiscence. Detektor pracoval v režimu Time Course. Tento program umožňoval měření intenzity chemiluminiscence během celé doby měření. Detekce byla prováděna při vlnové délce 485 nm v křemenné průtokové kyvetě, jež byla propojena s průtokovým systémem. V tomto případě tak byl vzorek aspirován do mísící cívky a po obrácení toku transportován přes vícecestný ventil do kyvety a dále do odpadu.



Obrázek 7: Schéma SIA propojené s 3D tištěnou celou [30]-přeloženo a dodatečně pozměněno.



Obrázek 8: Schéma 3D tištěné cely. (A – insert s monovrstvou buněk, B – tělo cely, C – víko s otvory do apikálního kompartmentu, D – držák, E – otvory do bazálního kompartmentu, F – magnetické míchadélko) [1].

4.5. Popis jednotlivých kroků analýzy

SIA systém byl řízen softwarem FIALab pro Windows 5.0. Celý průtokový systém byl před každým měřením promyt ethanolem, ultračistou vodou a nakonec též kultivačním médiem, které bylo následně použito během měření. Pro promytí systému byl použit již dříve vytvořený program.

Na začátku experimentu byl průtokový systém naplněn kultivačním médiem, které bylo použito jako nosný proud. 3D cela byla naplněna 7,5 ml kultivačního média (o teplotě 37°C, uchováno před aplikací v inkubátoru) a na dno bylo vloženo magnetické míchadélko. Po vložení insertu s monovrstvou buněk, který byl do té doby skladován v jamkové destičce při 37°C, byl naplněn 3 ml tohoto média. 3D cela byla vložena do inkubátoru na magnetickou míchačku. Dále došlo k instalaci peristaltických hadiček do peristaltického čerpadla, které bylo následovně zapnuto s rychlostí 1,3 ml/min. To umožnilo kontinuální cirkulaci, jenž byla nezbytnou podmínkou pro odběr malého množství vzorku s odpovídající koncentrací luciferázy v potřebném čase.

Na začátku experimentu byl za účelem detekce chemiluminiscence zapnut spektrofluorimetr a nastaven na snímání emisní vlnové délky 485 nm. Pro zahájení měření byl spuštěn program v softwaru FIALab. Analýza byla zahájena aspirací 100 µl roztoku z příslušného kompartmentu a jeho následným odesláním do odpadu, čímž došlo

k promytí T-korektoru. Následně analýza pokračovala aspirací 15 μl vzduchu do mísící cívky s průtokem 40 $\mu\text{l/s}$. Vzduchová bublina byla přítomna za účelem zamezení naředění substrátu nosným proudem. Dále došlo k aspiraci 90 μl substrátu, které byly v další fázi poslány do hadičky vedoucí k detektoru a poté byla část se vzduchovou bublinou odeslána do odpadu. Následně došlo k aspiraci 50 μl vzorku z bazálního kompartmentu s průtokovou rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$. Roztok byl průtokovou rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$ poslán do detekční cely spektrofluorimetru. Vzápětí byl celý proces jednou zopakován. Po aspiraci a změření vzorků byl objem v příslušném kompartmentu doplněn 250 μl čistého kultivačního média z pístového čerpadla přes selekční ventil. Vzorky z apikálního a bazálního kompartmentu byly aspirovány střídavě vždy s odstupem 30 minut. Celková doba analýzy trvala v rozmezí 3 až 10 hodin. Testované potenciálně toxické látky byly do 3D cely během experimentů přidány v rozmezí 0,7 až 5,3 hodin od počátku analýzy.

5. Výsledky a diskuze

Monitorování uvolňování *Metridia* luciferázy z modifikované jaterní epiteliální buněčné linie v reálném čase bylo provedeno s čtrnácti inserty obsahující monovrstvu buněk. Měření bylo uskutečněno během tří měsíců, a to konkrétně od dubna do června. Délka analýzy u jednoho insertu trvala v rozmezí od 3 do 10 hodin, ale s tím, že většina kroků byla plně automatizována. Manuálně bylo potřeba pouze promytí 3D cely na začátku a na konci měření, vložení insertu do cely a případně během monitorování přidání potenciálně toxické látky. Během experimentu bylo testováno různé množství *Metridia* luciferase plazmidu použitého při transfekci buněk, rozdílně dlouhá doba od transfekce po samotné měření, toxický vliv testovaných látek na membránu buněk a jejich koncentrace.

Objemy apikálního (3 ml) a bazálního (7,5 ml) kompartmentu byly rozdílné, proto bylo v rámci vyhodnocování výsledků nutné hodnoty CL signálu bazálního kompartmentu vynásobit dvaapůlkrát, aby bylo možné hodnoty z obou prostorů porovnávat.

Tabulka 4: Souhrn použitých insertů s monovrstvou buněk s uvedením množství použitého plazmidu při transfekci a časová prodleva mezi transfekcí a začátkem měření, případné použití potenciálně toxické látky během experimentu, její výsledná koncentrace v cele a čas přidání.

Insert	Plazmid [ng]	Transfekce [den]	Toxická látka	Koncentrace kyseliny [mg/ml]	Čas přidavku kyseliny [h]
1	1000	2	CDCA	0,01	1,9
2	1000	1	CDCA	0,01	5,3
3	1000	2	CDCA	0,005	1,8
4	500	2,5	-	-	-
5	500	2	CDCA	0,005	2,1
6	500	3	CDCA	0,01	2,5
7	1000	1	CDCA	0,01	1,9
8	1000	2	CDCA	0,0075	1,9
9	1000	1	DCA	0,01	1,8
10	1000	1,5	DCA	0,01	0,7
11	1000	2	DCA	0,01	0,8
12	1000	2,5	DCA	0,01	0,8
13	500	1	-	-	-
14	500	2	-	-	-

Tabulka 5: Naměřené hodnoty intenzity CL v apikálním kompartmentu a korigovaná CL intenzita v bazálním kompartmentu u prvních sedmi insertů s monovrstvou buněk používaných při experimentu.

Měření	Přibližný čas [h]	Insert č. 1	Insert č. 2	Insert č. 3	Insert č. 4	Insert č. 5	Insert č. 6	Insert č. 7
1. (BK)	0,1	3,6	-	330,9	553,3	97,6	38,5	-
2. (AK)	0,6	21,1	-	208,6	349,7	70,1	15,4	31,6
3. (BK)	1,2	59,2	-	635,8	1101,9	179,1	48,6	103,9
4. (AK)	1,7	60,1	49,5	586,5	772,3	98,8	34,2	99,1
5. (BK)	2,3	80,6	140,8	1083,8	1682,1	166,4	94,7	-
6. (AK)	2,9	33,7	71,6	868,2	1176,3	101,8	29,9	73,1
7. (BK)	3,4	106,0	166,5	1583,7		230,8	86,3	113,0
8. (AK)	4,0	51,7	87,6	1023,4		120,5	41,3	15,5
9. (BK)	4,6	123,6	183,5			277,7		174,3
10. (AK)	5,1	74,9	85,3			121,0		147,6
11. (BK)	5,7	139,2	219,7			300,7		231,2
12. (AK)	6,3	98,4	106,8			129,7		219,4
13. (BK)	6,8	412,8	265,5					223,7
14. (AK)	7,4	332,5	67,0					145,9
15. (BK)	8,0	238,7	847,0					
16. (AK)	8,5	137,5	506,8					
17. (BK)	9,1		1255,1					
18. (BK)	9,6		286,5					

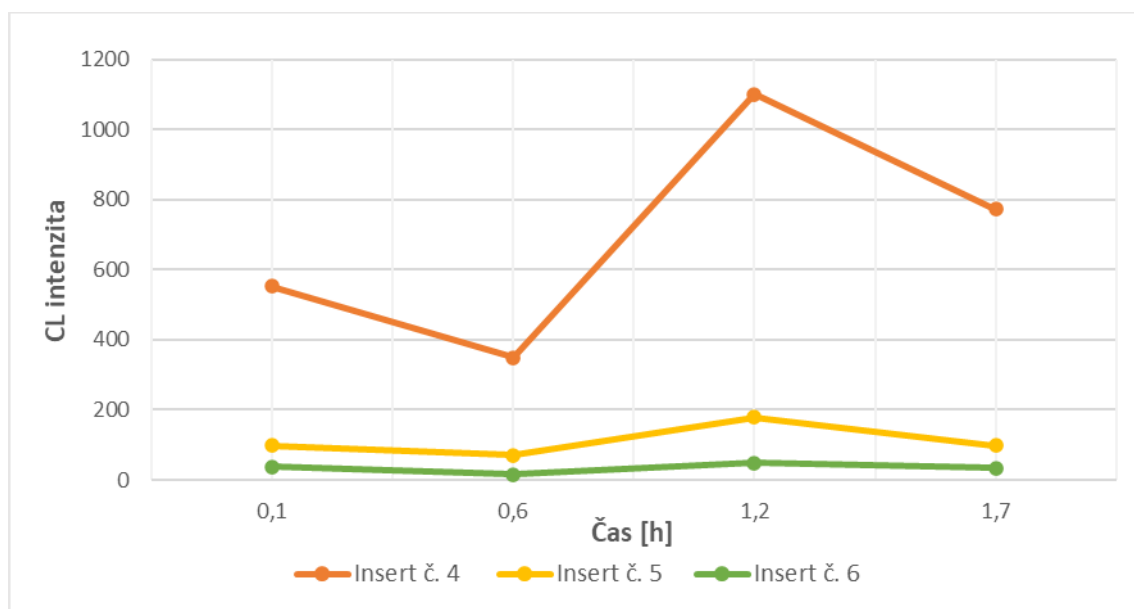
Tabulka 6: Naměřené hodnoty intenzity CL v apikálním kompartmentu a korigovaná CL intenzita v bazálním kompartmentu u dalších sedmi insertů s monovrstvou buněk používaných při experimentu.

Měření	Přibližný čas [h]	Insert č. 8	Insert č. 9	Insert č. 10	Insert č. 11	Insert č. 12	Insert č. 13	Insert č. 14
1. (BK)	0,1	-	-	397,3	1147,9	798,8	-	-
2. (AK)	0,6	-	80,9	293,9	974,6	718,8	-	-
3. (BK)	1,2	-	-	437,4	1593,3	670,2	-	-
4. (AK)	1,7	67,4	155,1	258,7	1669,3	596,9	-	-
5. (BK)	2,3	73,6	198,4	457,7	2505,1	2607,3	-	-
6. (AK)	2,9	71,4	159,7	273,4	2458,5	4916,3	-	-
7. (BK)	3,4	100,0	299,3	376,0	3141,6	3834,9	-	
8. (AK)	4,0	81,9	216,0	284,1	4101,9	4541,5	-	
9. (BK)	4,6	133,2	341,5	378,8	3976,7	1749,5	-	
10. (AK)	5,1	93,9	254,1	532,6	4579,2	2497,5	-	
11. (BK)	5,7	163,0	425,2	463,6	3363,6	325,0		
12. (AK)	6,3	110,3		1046,7	4494,0	1808,5		
13. (BK)	6,8					166,7		
14. (AK)	7,4					1383,7		
15. (BK)	8,0					115,1		
16. (AK)	8,5					1152,0		
17. (BK)	9,1					100,5		
18. (BK)	9,6					892,4		

5.1. Monitorování uvolňování luciferázy z buněk v závislosti na množství použitého plazmidu při transfekci

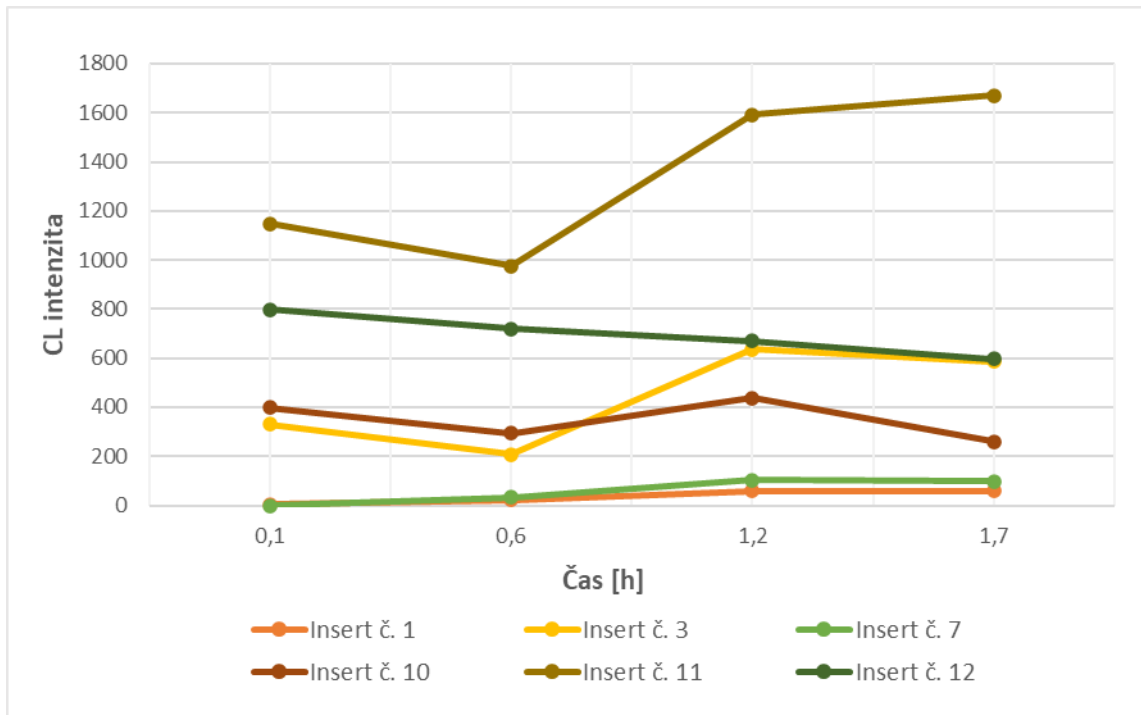
Schopnost buněk syntetizovat enzym luciferázu byla umožněna transfekcí *Metridia* luciferase plazmidem aplikovaným na kultivovanou monovrstvu buněk. Plazmid pro tento účel byl používán v množství 500 ng nebo 1000 ng. Porovnávány byly mezi sebou hodnoty získané v prvních dvou hodinách testování insertů. Jednalo se tedy o první 4 měření u každého insertu, tedy 2 hodnoty z bazálního a 2 hodnoty z apikálního kompartmentu, což je množství přirozeně uvolněného nadbytku luciferázy z buněk, které ještě nebylo ovlivněno následným přidavkem testované potenciálně toxické látky.

Hodnoty CL získané během prvních 2 hodin při analýze buněk, u kterých bylo použito 500 ng plazmidu, se pohybovaly od 15,4 do 1101,9. U dvou insertů (č. 13 a 14) nebyla detekována žádná CL intenzita. Jak je možno vidět na obrázku č. 9, hodnoty u 5. a 6. insertu byly velmi nízké, téměř na hranici detekce. U insertu č. 4 byla naměřena CL v rozmezí 349,7 a 1001,9. Z pěti insertů u kterých bylo při transfekci použito 500 ng plazmidu, vykazoval pouze jeden (insert č. 4) adekvátní hodnoty pro případné další vyhodnocování výsledků.



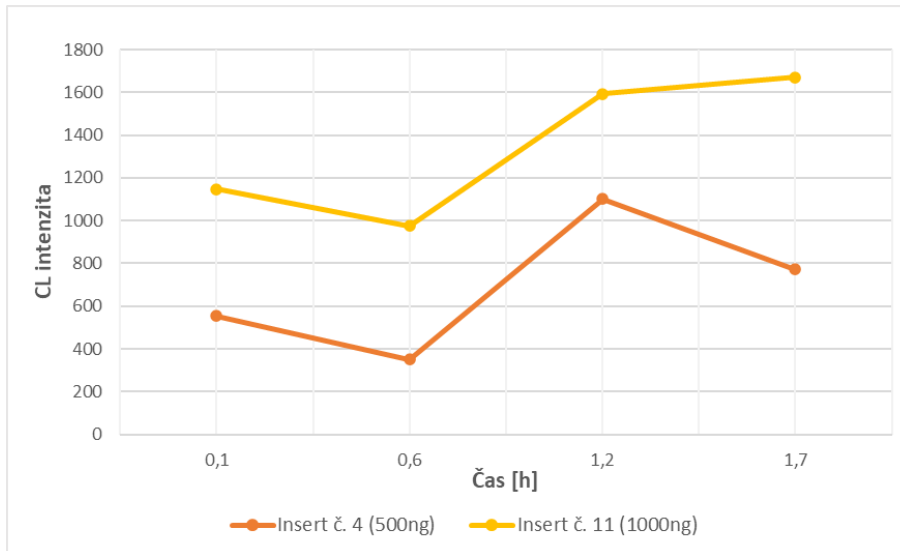
Obrázek 9: Intenzita CL naměřená během prvních čtyř měření každého insertu obsahující buněčnou monovrstvu, u které byl při transfekci použit plazmid v množství 500 ng.

Během experimentu buněčné monovrstvy transfekované plazmidem v množství 1000 ng, dosahovala intenzita CL až 1669,9. Během analýzy u čtyř insertů, z celkových devíti s 1000 ng plazmidu, byly některé hodnoty pod hranicí detekce. Jednalo se o hodnoty CL z jednoho až tří měření u daných insertů. Jak je znázorněno na obrázku č. 10, pouze ve čtyřech případech byla CL detekovaná od prvního měření.



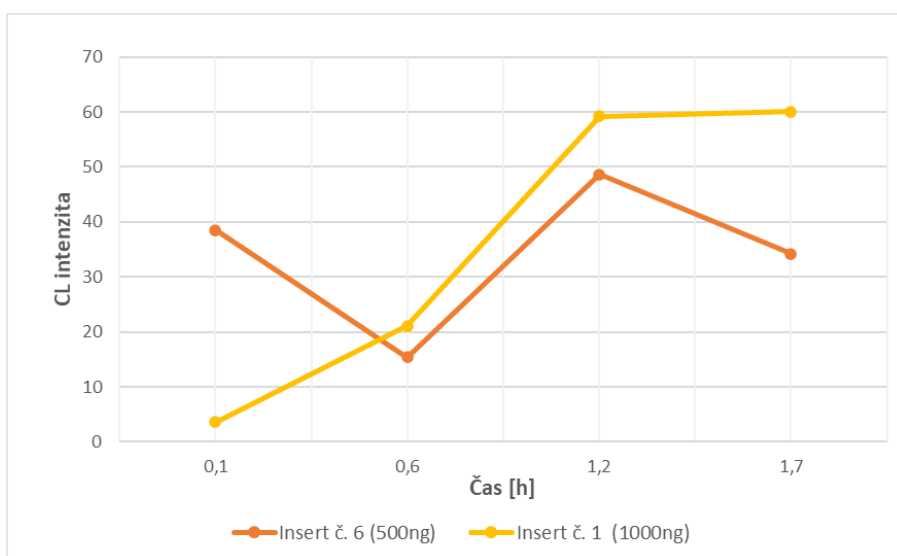
Obrázek 10: Intenzita CL naměřená během prvních čtyř měření každého insertu obsahující buněčnou monovrstvu, u které byl při transfekci použit plazmid v množství 1000 ng. (Nezahrnuje 3 inserty, které během této doby analýzy měly polovinu a více signálů pod hranicí detekce).

Při srovnání intenzity CL s nejvyššími hodnotami u insertů transfekovaných plazmidem v množství 500 ng a 1000 ng (viz obrázek č. 11), je intenzita u buněk s 1000 ng vyšší u všech 4 prvních měření. Tyto hodnoty jsou 1,4 až 2,8krát vyšší.



Obrázek 11: Nejvyšší naměřená intenzita CL u insertů s rozdílným množstvím plazmidu použitého při transfekci.

Při porovnání nejnižších hodnot, které byly nad hranicí detekce u insertů s rozdílným množstvím plazmidu použitého při transfekci, je většina hodnot CL vyšší u buněk s 1000 ng plazmidu, s výjimkou první hodnoty, která je vyšší u buněk s méně plazmidem, jak je patrné z obrázku č. 12. Tyto hodnoty jsou v průměru téměř 1,5násobně vyšší než hodnoty u buněk s 500 ng.

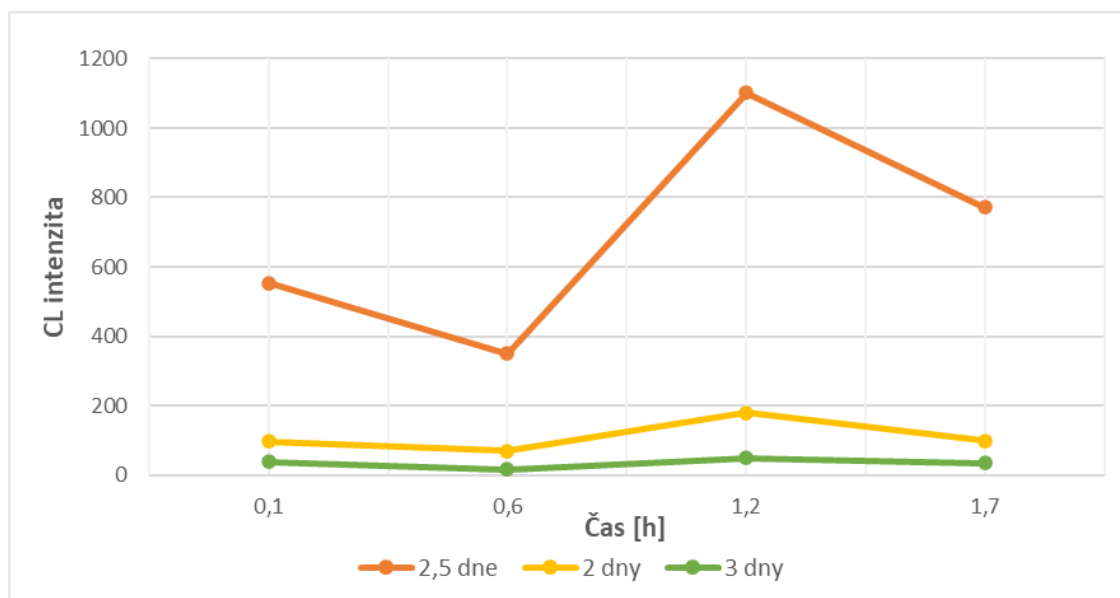


Obrázek 12: Nejnižší naměřená intenzita CL u insertů s rozdílným množstvím plazmidu použitého při transfekci.

5.2. Monitorování uvolňování luciferázy z buněk v závislosti na době transfekce s přihlédnutím k množství použitého plazmidu při transfekci

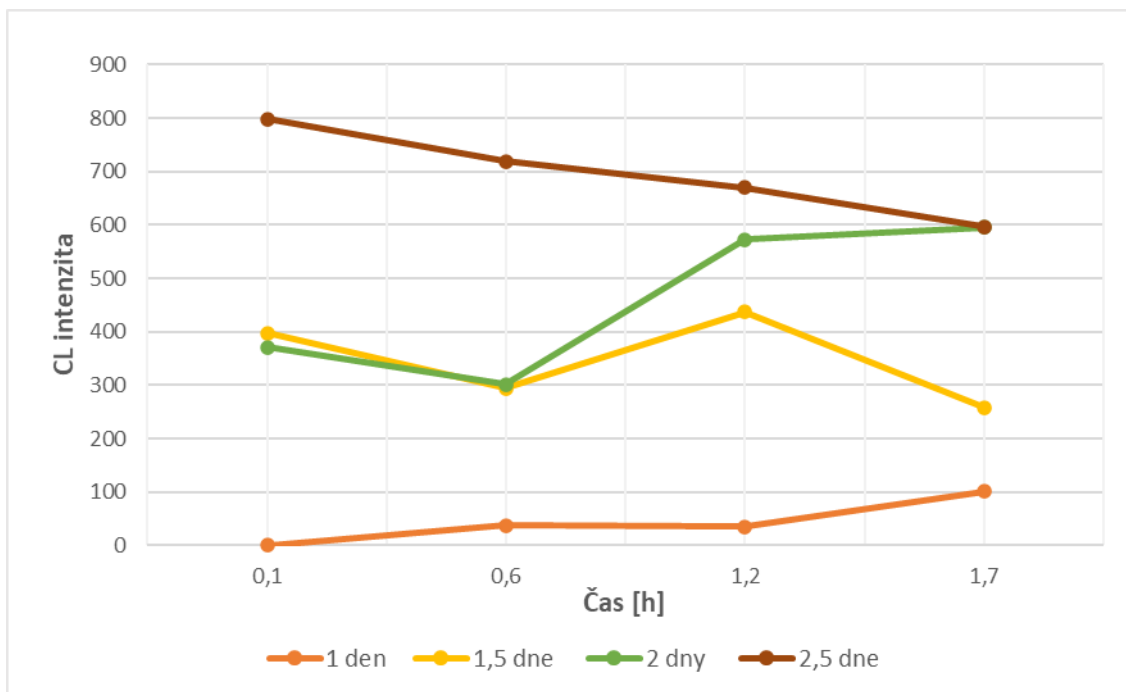
Buněčná transfekce *Metridia* luciferase plazmidem byla provedena v rozmezí jednoho až tří dnů před samotným monitorováním buněk za použití 500 ng nebo 1000 ng plazmidu. Tato závislost byla vyhodnocována vždy z prvních 4 signálů, což byly signály, které ještě nebyly ovlivněny přidavkem testované potenciálně toxické látky.

Buňky s 500 ng plazmidu byly pro experiment použity pětkrát. Zkoumaný časový úsek od transfekce po začátek měření byl od 1 dne po 3 dny. Hodnota CL po jednom dnu byla po celou dobu měření pod hranicí detekce. Po dvou dnech byla u jednoho insertu opět pod hranicí detekce a u druhého už byla slabá intenzita detekována. Po 2,5 dnech byla intenzita šestkrát vyšší oproti intenzitě po 2 dnech. Po třech dnech byla CL intenzita opět velmi nízká, téměř na hranici detekce (jak lze vidět na obrázku č. 13). Tento průběh odpovídá očekávanému odstupu transfekce a vlastní syntézy luciferázy buňkami. Minimálně jeden den trvá, než začne buňka protein syntetizovat a pak po nárůstu syntézy dochází k uvolnění nadbytku syntetizovaného proteinu, který je viditelný při monitorování CL signálu.



Obrázek 13: Závislost CL intenzity na časové prodlevě mezi transfekcí a uvolňováním luciferázy během měření z buněk, u kterých byl při transfekci použit plazmid v množství 500 ng.

Buňky s 1000 ng plazmidu byly pro měření použity vícekrát než buňky s 500 ng plazmidu. V případech měření se stejnou dobou transfekce, došlo ke zprůměrování naměřených hodnot. Následně byly porovnány hodnoty s rozdílně dlouhým časovým úsekem od transfekce. S buňkami, u kterých byla transfekce provedena jeden den před měřením, byly provedeny tři experimenty. Více než polovina hodnot CL při měření po 1 dni od transfekce byla pod hranicí detekce. Nejvyšší naměřená hodnota dosahovala 155,1 a to u insertu č. 9 po více než hodině a půl od začátku analýzy. Měření po jednom a půl dnu od transfekce bylo uskutečněno jen jednou a průměrně hodnoty dosahovaly téměř 350. Nejvíce měření bylo provedeno s buňkami, u kterých byla provedena transfekce plazmidu 2 dny před měřením, jednalo se o konkrétně 4 analýzy. V případě, kdy od transfekce uběhlo 2,5 dne, byl experiment uskutečněn jednou. Hodnoty u buněk po 2 a 2,5 dnech byly vyšší než předchozí a pohybovaly se mezi 400 a 800. Na obrázku č. 14 lze vidět, že s prodlužujícím se časem (až k 2,5 dnům) od doby transfekce se zvyšuje i množství uvolňované luciferázy.



Obrázek 14: Závislost CL intenzity na časové prodlevě mezi transfekcí a uvolňováním luciferázy během analýzy buněk u kterých byl při transfekci použit plazmid v množství 1000 ng.

Tabulka 7: Intenzita CL během rozdílné časové prodlevy mezi transfekcí a uvolňováním luciferázy během analýzy buněk, u kterých byl při transfekci použit plazmid v množství 1000 ng.

	1 den (průměr hodnot insertů č. 2, 7 a 9)	1,5 dne (insert č. 10)	2 dny (průměr hodnot insertů č. 1, 3, 8, a 11)	2,5 dne (insert č. 12)
1. měření	0,0	397,3	370,6	798,8
2. měření	37,5	293,9	301,1	718,8
3. měření	34,6	437,4	572,1	670,2
4. měření	101,2	258,7	595,8	596,9

5.3. Monitorování uvolňování luciferázy z buněk po interakci s potenciálně toxickou látkou

V rámci experimentu byl zkoumán potenciálně toxický vliv kyseliny chenodeoxycholové a kyseliny deoxycholové na buněčnou membránu. Látky nebyly přidávány hned v úvodu experimentu, ale až s časovou prodlevou. Tento čas byl zvolen po počátečním monitorování luminiscenčního signálu, který po transfekci nejprve roste díky přirozené sekreci přebytku syntetizované luciferázy, a pak teprve postupně v čase klesá. Až v tomto čase je možné sledovat vliv toxických látek, aby byl dobře odlišitelný opětovný nárůst měřené intenzity, která odpovídá sekreci luciferázy způsobené poškozením buněčné membrány nebo změnou její permeability.

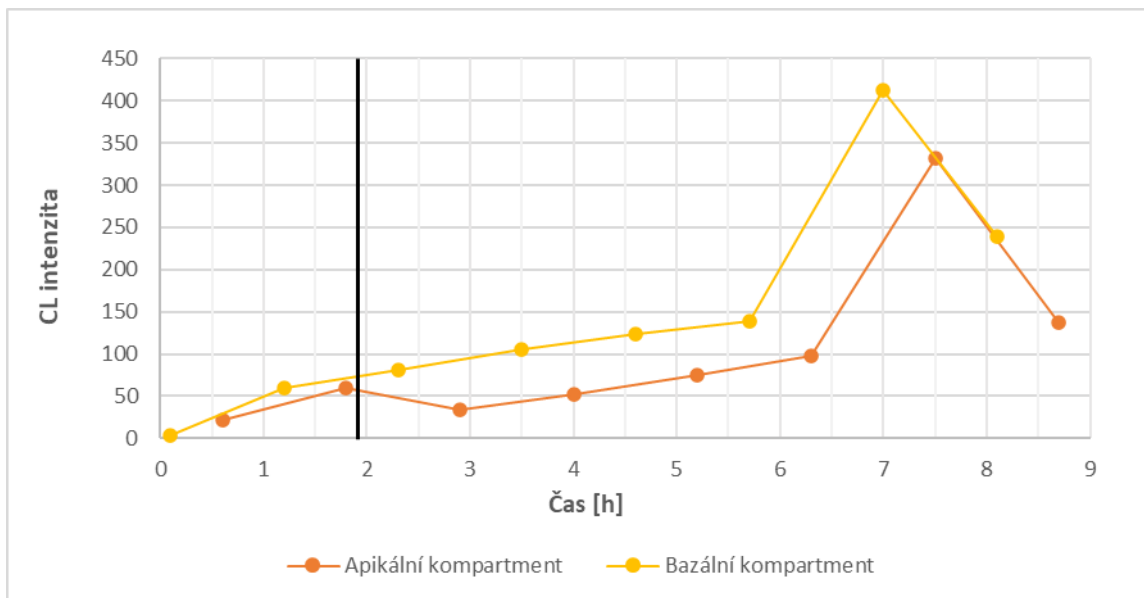
Kyseliny byly přidávány do apikálního i bazálního kompartmentu, aby byl vidět případný rozdíl chování epiteliálních jaterních buněk v obou kompartmentech při porovnání korigovaného CL signálu. Chenodeoxycholová kyselina byla nejčastěji přidávána tak, aby konečná koncentrace v cele odpovídala 0,01 mg/ml. Pouze jednou byla přidána ve výsledné koncentraci 0,0075 mg/ml a ve dvou případech v 0,005 mg/ml. Kyselina deoxycholová byla přidávána pouze ve výsledné koncentraci 0,01 mg/ml.

Vhodné výsledky pro zkoumání vlivu těchto kyselin na změnu permeability poskytly hlavně experimenty čtyř následujících insertů.

Insert č.1:

Měření bylo uskutečněno s buňkami, u kterých byla provedena transfekce dva dny před měřením s využitím 1000 ng plazmidu. Během analýzy bylo přidáno 120 μ l 0,25 mg/ml kyseliny chenodeoxycholové do apikálního kompartmentu a 300 μ l do bazálního v čase 1,9 hodin. Výsledná koncentrace v cele byla tedy 0,01 mg/ml.

K mírnému zvyšování intenzity chemiluminiscence docházelo na začátku měření. K vyššímu nárůstu CL signálu došlo s časovým odstupem 4,5 hodiny od přidavku kyseliny. Signál v bazálním kompartmentu vykazoval téměř trojnásobné hodnoty než předchozí dříve naměřené. Hodnoty před nárůstem CL intenzity odpovídaly přirozenému uvolňování přebytku syntetizované luciferázy, kdy následné zvýšení způsobila změna permeability buněčné membrány vyvolaná působením kyseliny chenodeoxycholové.



Obrázek 15: Intenzita CL u insertu č. 1. (Přídavek kyseliny CDCA v čase 1,9 hodin je znázorněn černou linií).

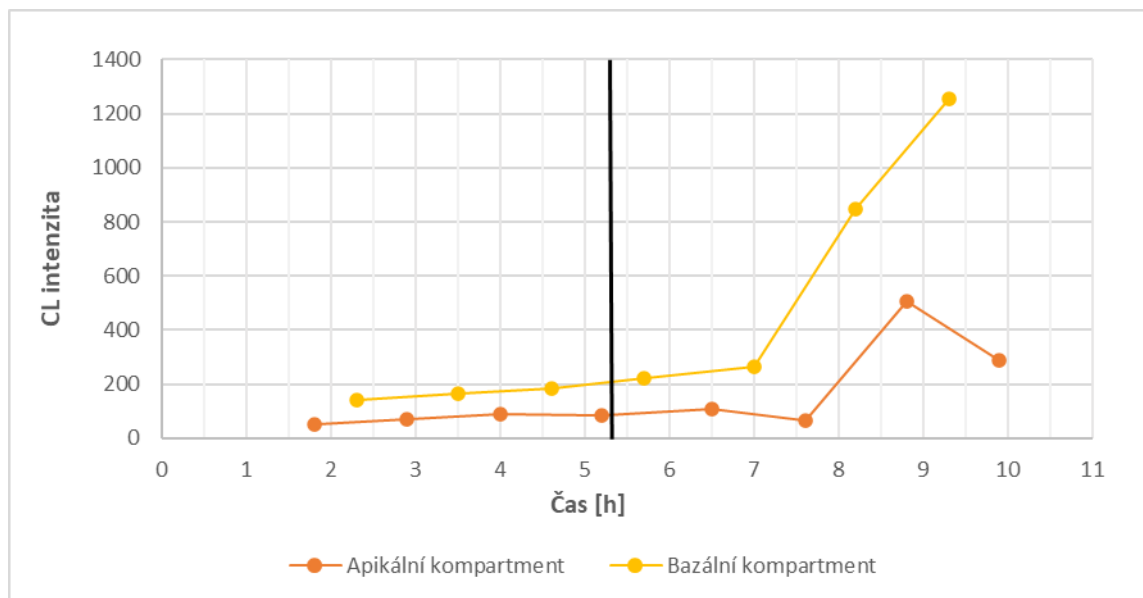
Tabulka 8: Intenzita CL naměřená u insertu č. 1.

Měření	Čas [h]	CL intenzita v apikálním kompartmentu	Korigovaná CL intenzita v bazálním kompartmentu
1.	0,1		3,6
2.	0,6	21,1	
3.	1,2		59,2
4.	1,8	60,1	
5.	2,3		80,6
6.	2,9	33,7	
7.	3,5		106,0
8.	4,0	51,7	
9.	4,6		123,6
10.	5,2	74,9	
11.	5,7		139,2
12.	6,3	98,4	
13.	7,0		412,8
14.	7,5	332,5	
15.	8,1		238,7
16.	8,7	137,5	

Insert č. 2:

Druhá analýza byla uskutečněna s buňkami, u kterých byla provedena transfekce jeden den před měřením s použitím 1000 ng plazmidu. Během analýzy bylo opět přidáno 120 μ l kyseliny chenodeoxycholové do apikálního kompartmentu a 300 μ l do bazálního (výsledná koncentrace v cele byla 0,01 mg/ml), tentokrát v čase 5,3 hodin. Delší čas před přidáním kyseliny byl použit kvůli riziku výskytu přirozené sekrece přebytku syntetizované luciferázy, která se projevuje potom, co buňky začnou po transfekci plazmidem syntetizovat daný protein. Monitorování vlivu toxické látky je vhodné provádět až po poklesu této přirozené sekrece, aby nebyl CL signál překrytý a bylo možné ho spojovat pouze s toxickým efektem dané látky.

Během tohoto měření nebyly první tři signály detekovány, vykazovaly velmi nízkou CL intenzitu, která byla pod limitem detekce. Následující signály vykazovaly relativně konstantní hodnoty v celém časovém úseku před přidáním kyseliny chenodeoxycholové, a to i po přibližně třech hodinách po jejím přidání. Následně došlo přibližně k 3,5násobnému zvýšení signálu.



Obrázek 16: Intenzita CL u insertu č. 2. (Přidávek kyseliny CDCA v čase 5,3 hodin je znázorněn černou linií).

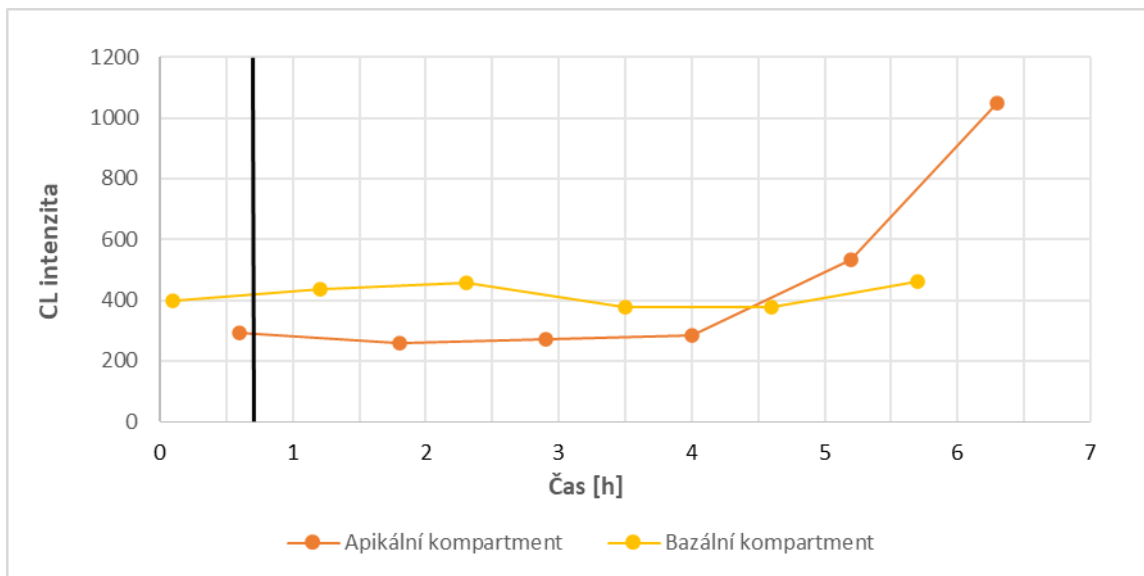
Tabulka 9: Intenzita CL naměřená u insertu č. 2.

Měření	Čas [h]	CL intenzita v apikálním kompartmentu	Korigovaná CL intenzita v bazálním kompartmentu
1.	0,1		
2.	0,6		
3.	1,2		
4.	1,8	49,5	
5.	2,3		140,8
6.	2,9	71,6	
7.	3,5		166,5
8.	4,0	87,6	
9.	4,6		183,5
10.	5,2	85,3	
11.	5,7		219,7
12.	6,5	106,8	
13.	7,0		265,5
14.	7,6	67,0	
15.	8,2		847,0
16.	8,8	506,8	
17.	9,3		1255,1
18.	9,9	286,5	

Insert č. 10:

Desátý experiment byl uskutečněn s buňkami, u kterých byla provedena transfekce jeden a půl dne před měřením s použitím 1000 ng plazmidu. Během analýzy bylo přidáno 120 μ l kyseliny deoxycholové do apikálního kompartmentu a 300 μ l do bazálního (výsledná koncentrace v cele byla 0,01 mg/ml) v čase 0,7 hodin.

Naměřené hodnoty CL signálů byly po celou dobu relativně konstantní. K téměř dvojnásobnému nárůstu CL signálu došlo s časovým odstupem 4,5 hodin od přidání kyseliny a po následující hodině byl nárůst ještě výraznější. I v tomto případě byla velmi zřetelně viditelná reakce buněk a změna permeability buněčné membrány, ke které došlo za relativně delší dobu, ale její efekt byl velmi dobře odlišený od předchozího nižšího CL signálu.



Obrázek 17: Intenzita CL u insertu č. 10. (Přídavek kyseliny DCA v čase 0,7 hodin je znázorněn černou linií).

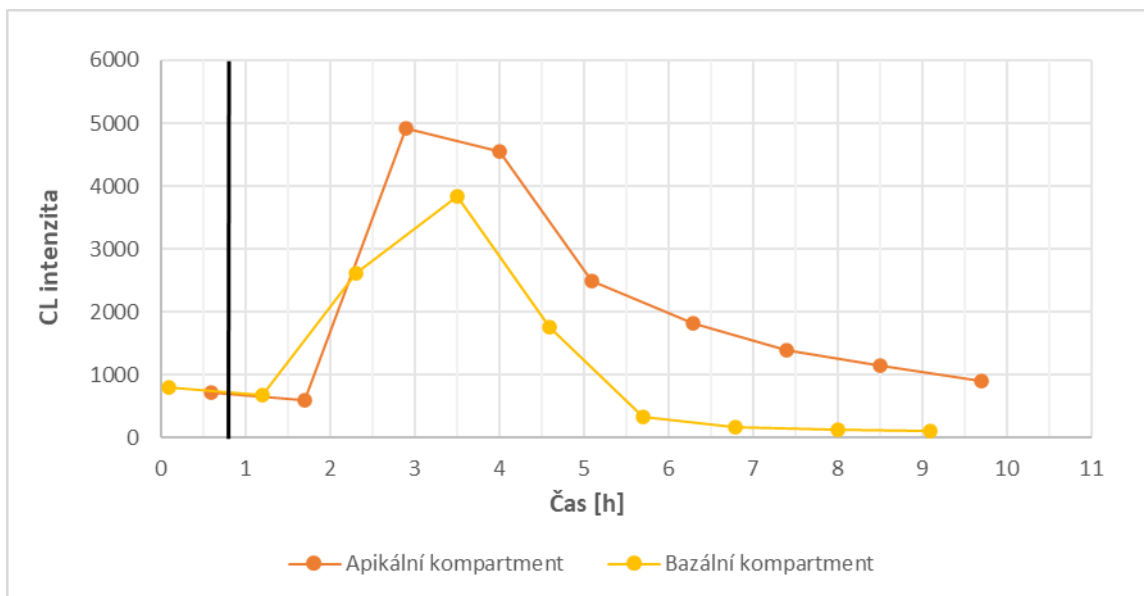
Tabulka 10: Intenzita CL naměřená u insertu č. 10.

Měření	Čas [h]	CL intenzita v apikálním kompartmentu	Korigovaná CL intenzita v bazálním kompartmentu
1.	0,1		397,3
2.	0,6	293,9	
3.	1,2		437,4
4.	1,8	258,7	
5.	2,3		457,7
6.	2,9	273,4	
7.	3,5		376,0
8.	4,0	284,1	
9.	4,6		378,8
10.	5,2	532,6	
11.	5,7		463,6
12.	6,3	1046,7	

Insert č. 12:

Dvanáctý experiment byl uskutečněn s buňkami, u kterých byla provedena transfekce dva a půl dne před měřením s použitím 1000 ng plazmidu. Během analýzy bylo přidáno opět 120 μ l kyseliny deoxycholové do apikálního kompartmentu a 300 μ l do donorového (výsledná koncentrace v cele byla 0,01 mg/ml) v čase 0,8 hodin.

V tomto případě došlo k zaznamenání výrazného nárůstu signálu po dvou a půl hodinách od začátku měření, což představuje jen půl hodinu od přidání kyseliny. Opět bylo možné odlišit vliv testované kyseliny a nárůst CL signálu byl v tomto případě poměrně rychlý v porovnání s předchozími experimenty, čímž se projevila větší variabilita testů s živou buněčnou linií.



Obrázek 18: Intenzita CL u insertu č. 12. (Přídavek kyseliny DCA v čase 0,8 hodin je znázorněn černou linií).

Tabulka 11: Intenzita CL naměřená u insertu č. 12.

Měření	Čas [h]	CL intenzita v apikálním kompartmentu	Korigovaná CL intenzita v bazálním kompartmentu
1.	0,1		798,8
2.	0,6	718,8	
3.	1,2		670,2
4.	1,7	596,9	
5.	2,3		2607,3
6.	2,9	4916,3	
7.	3,5		3834,9
8.	4,0	4541,5	
9.	4,6		1749,5
10.	5,1	2497,5	
11.	5,7		325,0
12.	6,3	1808,5	
13.	6,8		166,7
14.	7,4	1383,7	
15.	8,0		115,1
16.	8,5	1152,0	
17.	9,1		100,5
18.	9,7	892,4	

Ostatní experimenty neposkytly dostatečná data k tomu, aby bylo možné podrobněji vyhodnotit vliv toxické látky na buněčnou membránu. Důvody u některých insertů byly rozdílné.

Analýza insertu č. 3 probíhala pravděpodobně příliš krátký čas, a to konkrétně jen 2,2 hodiny od přidání CDCA kyseliny a zároveň zde byla přidávána v nižší koncentraci (0,005 mg/ml).

Po přidání CDCA kyseliny u insertu č. 5 došlo k poklesu, ale i následnému pozvolnému nárůstu CL signálu, který nebyl tak výrazný jako v předchozích experimentech s vyšší koncentrací kyseliny. Kyselina zde byla v konečné koncentraci 0,005 mg/ml. Experiment od přidání kyseliny probíhal 4,2 hodiny.

U insertu č. 6 bylo uvolňované množství luciferázy na hranici detekce. Nízký CL signál by mohl být vysvětlen dlouhou časovou prodlevou mezi transfekcí a samotným experimentem (3 dny), jelikož aktivita luciferázy je krátkodobá. Ani po přidání CDCA kyseliny nedošlo k jejímu většímu uvolňování.

Insert č. 7 vykazoval vyšší uvolnění luciferázy po přibližně třech hodinách od přidání kyseliny CDCA. Toto zvýšení ale nebylo porovnávané s ostatními kvůli technickým problémům, které nastaly během měření, kdy během pátého měření nebyla detekována žádná hodnota a během osmého jen velmi slabá z důvodu ucpání hadiček průtokového systému, které pravděpodobně zapříčinilo špatné promytí cely před experimentem.

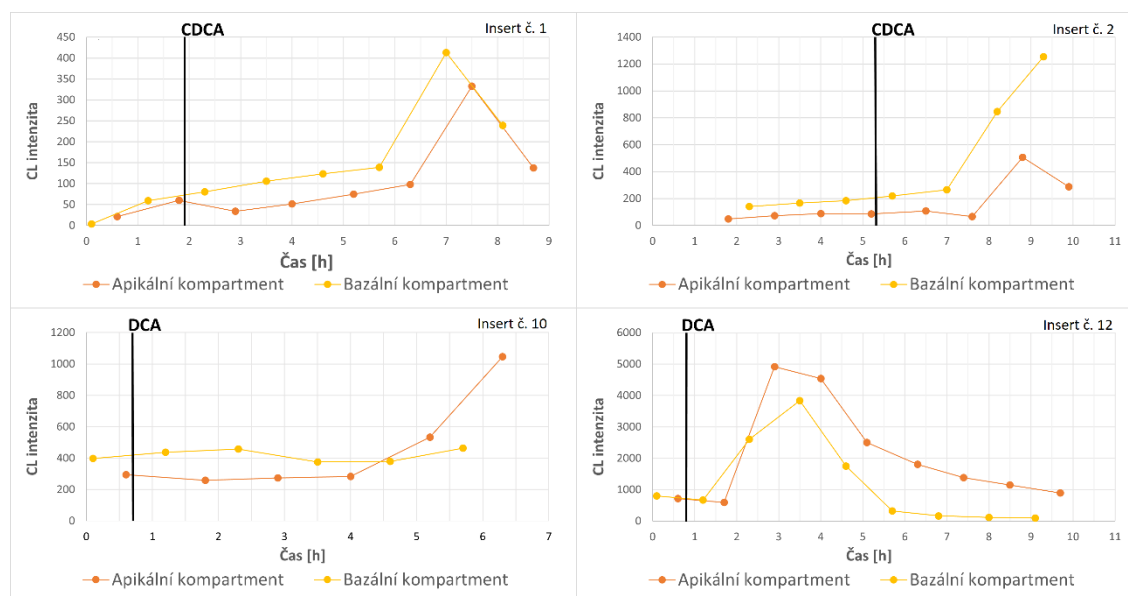
Experiment u insertu č. 8 byl prováděn s kyselinou o konečné koncentraci 0,0075 mg/ml. První detekovatelná hodnota byla až ze čtvrtého měření, tj. po přibližně 1,7 hodiny, následně byla přidána CDCA kyselina a byl pozorovatelný mírný pozvolný nárůst hodnot, nicméně nedošlo ke strmému nárůstu CL hodnot, tak jako v předchozích experimentech s vyšší koncentrací kyseliny.

Vliv DCA kyseliny u insertu č. 9 byl tentokrát spíše pozvolný, kdy došlo k postupnému nárůstu CL signálu. V tomto případě ale nelze odlišit přirozenou sekreci luciferázy od zvýšeného uvolňování z důvodu ovlivnění permeability membrány toxickou látkou.

Během měření u insertu č. 11 došlo k znatelnému zvyšování signálu již od začátku záznamu hodnot. Po čtyřech hodinách od počátku měření, tj. třech hodinách od přidání kyseliny, došlo k lehce výraznějšímu zvýšení CL signálu oproti předchozím hodnotám. V tomto případě ale opět nebylo možné odlišit toxický vliv testované kyseliny od přirozené sekrece luciferázy.

Naměřené hodnoty, které byly vhodné pro hodnocení vlivu potenciálně toxické látky, byly získány z analýzy 4 insertů. U všech v určitém čase došlo k signifikantnímu nárůstu detekovaného signálu, kdy bylo možné odlišit toxický vliv kyseliny od přirozené sekrece luciferázy. Při transfekci pro všechny tyto inserty byl použit plazmid v množství 1000 ng. Doba, která uplynula od transfekce, byla v rozmezí 1 den až 2,5 dne. V polovině případů byla použita kyselina chenodeoxycholová a v druhé deoxycholová o výsledné koncentraci v cele 0,01 mg/ml.

K zvýšenému uvolnění luciferázy došlo za určitý čas po přidání CDCA i DCA. Rozdílem bylo, že po přidání CDCA došlo k vyššímu uvolnění luciferázy do BK než do AK, tak jako tomu bylo i před přidávkou toxických látek v případě přirozeného uvolňování přebytku luciferázy. DCA způsobila vyšší uvolnění luciferázy do AK. Tento průběh lze vidět na obrázku č.19.

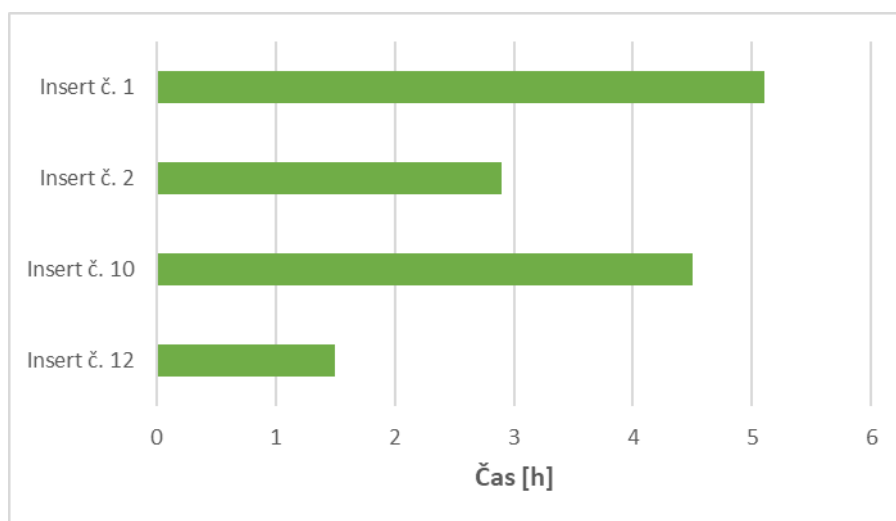


Obrázek 19: Souhrnné zobrazení intenzit CL u insertů č. 1, 2, 10 a 12. (Přídavek kyseliny je znázorněn černou linií nad kterou je daná kyselina uvedena.).

Časové rozmezí, během kterého se projevil vliv toxické látky na permeabilitu buněčné membrány je od 1,5 hodiny po přibližně 5 hodin. Byla zde pozorována větší variabilita, nicméně při porovnání zprůměrovaných časů, kdy k nárůstu došlo u jednotlivých kyselin, je doba, kdy nastaly změny permeability buněčné membrány o jednu hodinu nižší u deoxycholové kyseliny než u kyseliny chenodeoxycholové.

Tabulka 12: Souhrn časových údajů souvisejících s použitými kyselinami.

	Insert č. 1	Insert č. 2	Insert č. 10	Insert č. 12
Toxická látka	CDCA	CDCA	DCA	DCA
Výsledná koncentrace kyseliny v cele [mg/ml]	0,01	0,01	0,01	0,01
Čas přidavku kyseliny [h]	1,9	5,3	0,7	0,8
Čas nárůstu CL intenzity [h]	7,0	8,2	5,2	2,3
Čas od přidání kyseliny po nárůst CL intenzity [h]	5,1	2,9	4,5	1,5



Obrázek 20: Časová prodleva mezi přidáním kyseliny do cely a nárůstem CL intenzity.

Porovnáván byl i poměr hodnot intenzity CL. Prvním poměrem byla hodnota CL intenzity nárůstu ku poslední hodnotě stejného kompartmentu, která nárůstu předcházela. Druhým poměrem byla opět první výrazně zvýšená hodnota, tentokrát ale ku intenzitě stejného

kompartmentu před tím, než byla do cely přidána toxická látka. Záměrem bylo určit, zdali je tento poměr v jednotlivých měřeních podobný a jestli umožní relativizovat získané výsledky, které se v jednotlivých experimentech výrazně liší konkrétními hodnotami CL intenzity v závislosti na efektivitě transfekce a také díky variabilitě při experimentech s živou buněčnou linií.

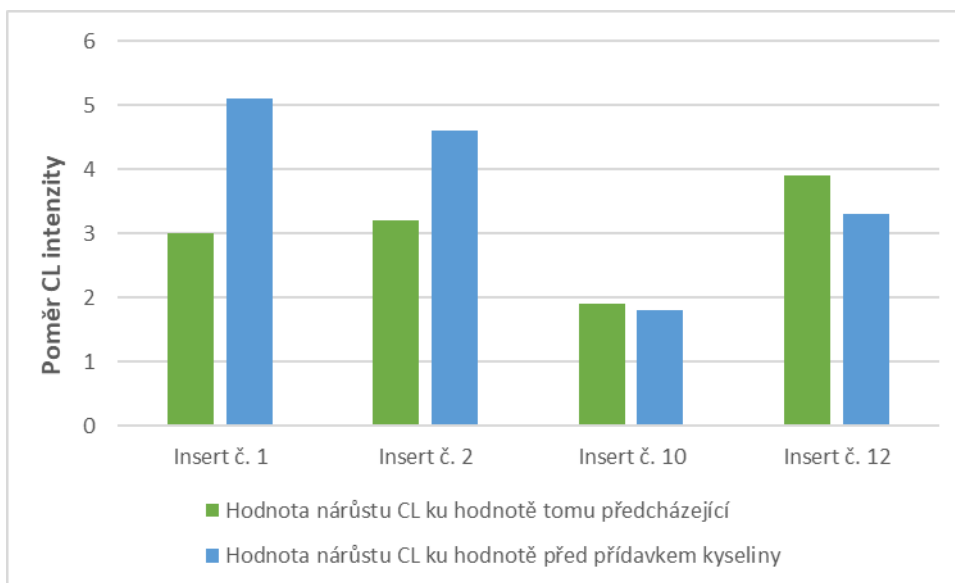
U prvních dvou insertů, na kterých byl zkoumán vliv CDCA, byly hodnoty podobné. Zvýšení signálu oproti hodnotě, která tomu předcházela, bylo trojnásobné, zatímco zvýšení oproti hodnotě CL před přidáním kyseliny, bylo přibližně pětinasobné.

U DCA bylo zvýšení CL intenzity u jednotlivých insertů více rozdílné. Jednotlivé poměry hodnot CL signálu po jeho zvýšení ku poslední hodnotě bez větší změny byly téměř 2 a 4, zatímco poměry vycházející z hodnot před přidáním kyseliny byly 1,8 a 3,3. Je tedy patrná větší variabilita experimentů, nicméně stále je nárůst CL dobře odlišitelný od přirozené sekrece luciferázy.

Při srovnání hodnot u CDCA a zprůměrovaných hodnot u DCA došlo ke zvýšení CL přibližně v obou případech o přibližně trojnásobek vzhledem k posledním hodnotám CL bez výrazného nárůstu.

Tabulka 13: Hodnoty CL intenzity před přidáním kyseliny, před nárůstem intenzity a při nárůstu a jejich poměry.

	Insert č. 1	Insert č. 2	Insert č. 10	Insert č. 12
Toxická látka	CDCA	CDCA	DCA	DCA
Výsledná koncentrace kyseliny v cele [mg/ml]	0,01	0,01	0,01	0,01
Intenzita CL před přidáním kyseliny	80,6	183,5	293,9	798,8
Poslední intenzita CL před jejím nárůstem	139,2	265,5	284,1	670,2
Intenzita nárůstu CL	412,8	847,0	532,6	2607,3
Poměr intenzity nárůstu CL ku intenzitě před jejím nárůstem	3,0	3,2	1,9	3,9
Poměr intenzity nárůstu CL ku intenzitě před přidáním kyseliny	5,1	4,6	1,8	3,3



Obrázek 21: Poměry intenzity nárůstu CL ku intenzitě před jejím nárůstem a intenzitě před přidáním kyseliny.

Při experimentech s CDCA ve výsledné koncentraci 0,01 mg/ml byl pozorován výrazný nárůst CL intenzity, který byl způsobený změnou permeability buněčné membrány. Během monitorování, v nichž byla CDCA použita v nižší koncentraci, tento výrazný nárůst pozorován nebyl. Byla uskutečněna dvě monitorování s kyselinou v konečné koncentraci 0,005 mg/ml a jedno v konečné koncentraci 0,0075 mg/ml. Během testování s CDCA o koncentraci 0,005 mg/ml nedošlo k žádné výraznější změně intenzity CL po přidání kyseliny. Od tohoto přídatku analýza probíhala pouze 2,2 a 2,8 h, což ale mohl být příliš krátký čas na to, aby se projevil toxický vliv kyseliny na permeabilitu buněčné membrány, jelikož z naměřených hodnot pro tuto kyselinu ve vyšší koncentraci (0,01 mg/ml) byla průměrná doba potřebná pro ovlivnění permeability 3 hodiny. Monitorování s CDCA o konečné koncentraci 0,0075 mg/ml probíhalo po přidání kyseliny ještě přibližně 4,5 h. Za tuto dobu nedošlo k výraznému nárůstu intenzity CL. Docházelo pouze k pozvolnému nárůstu hodnot. Možné mírnější změny v podobě postupného nárůstu uvolněné luciferázy od přirozeného uvolňování přebytku luciferázy v tomto případě nelze jistě odlišit.

6. Závěr

Spojení sekvenční injekční analýzy a 3D tištěné cely, ve které byly umístěné geneticky modifikované buňky, umožnilo automatické monitorování uvolněné luciferázy přes apikální i bazální membránu buněk v reálném čase.

Při sledování přirozeného uvolňování luciferázy se zpravidla intenzita zvyšovala od buněk, u kterých byla transfekce *Metridia* luciferase plazmidem provedena jeden den před měřením až po buňky s transfekcí 2,5 dne před měřením. Následně intenzita klesla u buněk, u kterých byla transfekce provedena před 3 dny. Postupné zvyšování odpovídá očekávanému odstupu transfekce a vlastní syntézy luciferázy buňkami. Hodnoty intenzity luminiscence byly vyšší při použití dvojnásobného množství daného plazmidu během transfekce než u odpovídajících měření, u kterých bylo použito plazmidu méně.

Intenzita signálu chemiluminiscence v jednotlivých kompartmentech nebyla souhlasná, ani po korekci rozdílných objemů apikálního a bazálního kompartment, což pravděpodobně naznačuje, že vylučování luciferázy není stejné oběma směry. Během přirozené sekrece přebytku luciferázy dochází k vyššímu uvolňování do bazálního kompartmentu.

Testování toxického vlivu chenodeoxycholové a deoxycholové kyseliny o konečné koncentraci v cele 0,01 mg/ml potvrdilo ovlivnění změny permeability buněčné membrány u obou kyselin. Permeabilita membrány nicméně nebyla ovlivněna kyselinami ihned. K vyššímu uvolnění luciferázy došlo průměrně v rozmezí 1,5 až 5 hodin po přidání kyselin.

Hlavním rozdílem mezi působením kyselin, ke kterému došlo během experimentů, byla skutečnost, že chenodeoxycholová kyselina způsobila zvýšené uvolňování luciferázy s maximem hodnot v bazálním kompartmentu (hodnoty chemiluminiscence v tomto kompartmentu byly vyšší i při přirozeném uvolňování přebytku luciferázy z buněk), kdežto při projevení účinku deoxycholové kyseliny dosahovaly maximální hodnoty chemiluminiscence v apikálním kompartmentu.

Po ovlivnění permeability membrány toxickou látkou nebyly porovnávány mezi sebou přímo hodnoty nárůstu chemiluminiscence, kvůli zkreslení v závislosti na efektivitě transfekce a možné variabilitě s živou buněčnou linií. Místo toho byly mezi sebou porovnávány poměry chemiluminiscence. Jednalo se o hodnoty nárůstu chemiluminiscence vzhledem k hodnotě před nárůstem nebo vzhledem k hodnotě před přidáním kyseliny.

Chenodeoxycholová kyselina způsobila přibližně trojnásobný nárůst chemiluminiscence oproti hodnotě před nárůstem a pětinašobně oproti hodnotě chemiluminiscence před přidáním kyseliny. Kdežto u deoxycholové kyseliny byl první poměr také v průměru 3 a druhý přibližně 2,5.

Chenodeoxycholová kyselina byla zkoumaná i v nižších koncentracích. V těchto případech ale nedošlo k výraznému nárůstu chemiluminiscence, která by mohla jednoznačně prokázat vliv kyseliny na permeabilitu membrány.

I přes možnou variabilitu výsledků z důvodů experimentů přímo na živé buněčné linii, bylo možné monitorovat sekreci přirozeného přebytku luciferázy, a zároveň stejně tak i změny tohoto uvolňování způsobeného toxickým vlivem látek na buněčnou membránu. Spojení sekvenční injekční analýzy s 3D tištěnou celou umožnilo automatické odebírání vzorků z apikálního i bazálního kompartmentu v předem nastavených časových intervalech, což umožnilo monitorování v reálném čase včetně směru uvolňování luciferázy.

7. Seznam použité literatury

- [1] H. Sklenářová , M. Rosecká, B. Horstkotte, P. Pávek, M. Miró a P. Solich, 3D printed permeation module to monitor interaction of cell membrane transporters with exogenic compounds in real-time, *Analytica Chimica Acta* 1153 (2021).
- [2] J. Růžička, Flow injection tutorial: Automation by Flow Injection. <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.1.3.%20Automation%20by%20Flow%20Injection.html>.2019. [cit.2022-08-24]
- [3] C. Vakh, M. Falkova, I. Timofeeva, A. Moskvín, L. Moskvín a A. Bulatov, Flow analysis: A novel approach for classification, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46 (2016) 374-388.
- [4] J. Růžička, Flow injection tutorial: Flow injection. <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.0%20Flow%20Injection.html>. [cit.2022-08-24].
- [5] H. Paseková, M. Polášek a P. Solich, Sekvenční injekční analýza, *Chemické listy* 93 (1999) 354-359.
- [6] J. Růžička, Flow injection analysis. From test tube to integrated microconduits, *Analytical Chemistry* 55 (1983) 1040A-1053A.
- [7] J. Růžička, Flow injection tutorial: Sequential injection. <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.0%20Sequential%20Injection.html>. [cit.2022-08-24].
- [8] J. Klimundová, H. Sklenářová, U. Schaefer a P. Solich, Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 893-898.

- [9] J. Klimundova, D. Šatinský, H. Sklenářová a P. Solich, Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell, *Talanta* 69 (2006) 730-735.
- [10] P. Solich, H. Sklenářová, J. Huclová, D. Šatinský a U. F. Schaefer, Fully automated drug liberation apparatus for semisolid preparations based on sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 499 (2003) 9-16.
- [11] C. K. Zacharis, G. A. Theodoridis, A. Podgornik a A. N. Voulgaropoulos, Incorporation of a monolithic column into sequential injection system for drug-protein binding studies, *Journal of Chromatography* 1121 (2006) 46-54.
- [12] X.-Z. Liu a Z.-L. Fang, Sequential-injection system for drug-dissolution studies of ibuprofen tablets and sustained-release formulations, *Analytica Chimica Acta* 358 (1998) 103-110.
- [13] Z. Legnerová, H. Sklenářová a P. Solich, Automated sequential injection fluorimetric determination and dissolution studies of Ergotamine Tartrate in pharmaceuticals, *Talanta* 58 (2002) 1151-1155.
- [14] X.-Z. Liu, S.-S. Liu, J.-F. Wu a Z.-L. Fang, Simultaneous monitoring of aspirin, phenacetin and caffeine in compound aspirin tablets using a sequential injection drug-dissolution testing system with partial least squares calibration, *Analytica Chimica Acta* 392 (1999) 273-280.
- [15] Z. Legnerová, D. Šatinský a P. Solich, Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 497 (2003) 165-174.
- [16] Z. Legnerová, J. Huclová, R. Thun a P. Solich, Sensitive fluorimetric method based on sequential injection analysis technique used for dissolution studies and quality control of prazosin hydrochloride in tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2004) 115-121.

- [17] H. Chen a Q. He, Flow injection spectrofluorimetric determination of reserpine in tablets by on-line acetone sensitized photochemical reaction, *Talanta* 53 (2000) 463-469.
- [18] M. Wesoły, M. Zabadaj, K. Cal, P. Ciosek-Skibińska a W. Wróblewski, Zissolution studies of metamizole sodium and pseudoephedrine sulphate dosage forms – comparison and correlation of electronic tongue results with reference studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 149 (2018) 242-248.
- [19] L. Saraiva, J. Lima a P. Paula, Fluorimetric determination of aminocaproic acid in pharmaceutical formulations using a sequential injection analysis system, *Talanta* 68 (2006) 857-862.
- [20] Optimization and validation of a dissolution test for famotidine tablets using flow injection analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 437-441.
- [21] L. Zelená , S. S. Marques, M. A. Segundo, M. Miró, P. Pávek, H. Sklenářová a P. Solich, Fully automatic flow-based device for monitoring of drug permeation across a cell monolayer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (2016) 971-981.
- [22] M. Muendoerfer , U. F. Schaefer, P. Koenig, J. S. Walk, P. Loos, S. Balbach, T. Eichinger a C.-M. Lehra, Online monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing, *International Journal of Pharmaceutics* 392 (2010) 134-140.
- [23] A. C. Alves, I. I. Ramos, C. Nunes, L. M. Magalhães, H. Sklenářová, M. A. Segundo, J. L. Lima a S. Reis, On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography, *Talanta* 146 (2016) 369-374.
- [24] K. Rolf, *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha, 2013, 217.
- [25] T. Kahlke a K. Umbers, Bioluminescence, *Current Biology* 26 (2016) R313-R314.

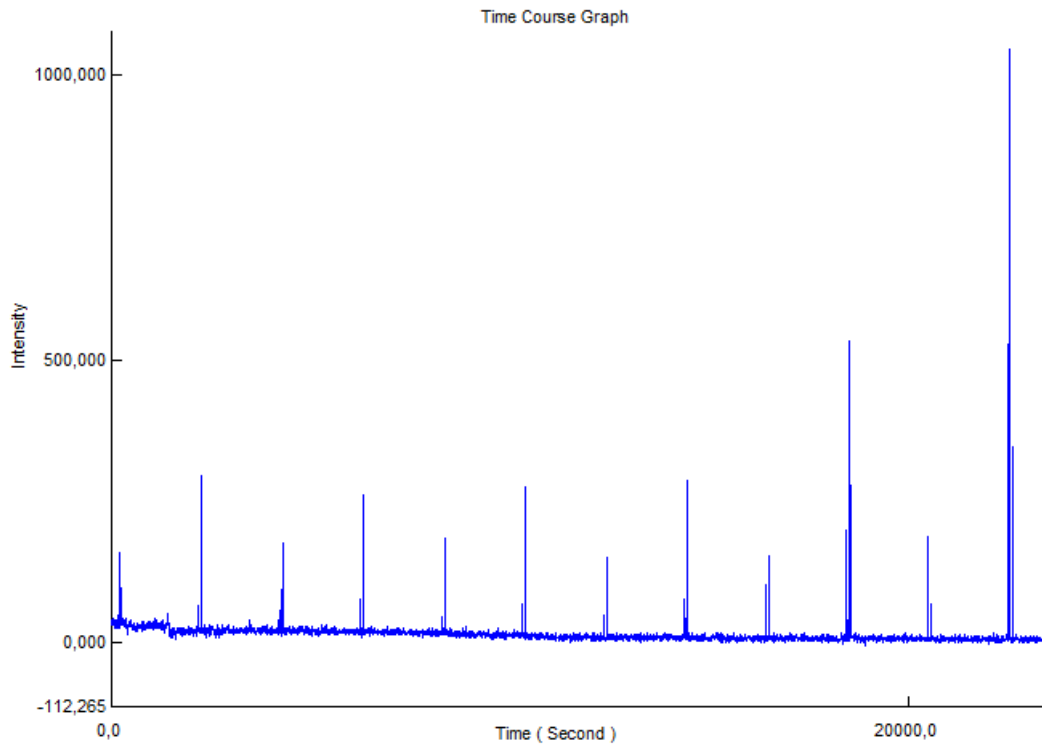
- [26] T. Wilson a W. Hastings, *Bioluminescence*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14 (1998) 197-230.
- [27] S. V. Markova, M. D. Larionova a E. S. Vysotski, *Shining Light on the Secreted Luciferases of Marine Copepods: Current Knowledge and Applications*, *Photochemistry and Photobiology* 95 (2018) 705-721.
- [28] C. E. Badr a B. A. Tannous, *Bioluminescence imaging: progress and applications*, *Trends in Biotechnology* 29 (2011) 624-633.
- [29] Clontech Laboratories Inc, *pMetLuc2-Control Vector Information*. <https://www.takarabio.com/documents/Vector%20Documents/pMetLuc2-Control%20Vector%20Information.pdf>. [cit.2022-08-24].
- [30] M. V. A. Martínez, N. Jožičová, J. Dušek, B. Horstkotte, P. Pávek, M. Miró a H. Sklenářová, *Real-time monitoring of Metridia luciferase release from cells upon interaction with model toxic substances by a fully automatic flow setup – A proof of concept*, *Talanta* 245 (2022) 123465.
- [31] Promega Corporation, *Renilla Luciferase Assay System Technical Manual*. https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/renilla-luciferase-assay-system-protocol.pdf?rev=7f714ce0ccfb4513921aaf1473d6af5a&sc_lang=en. [cit.2022-08-24].
- [32] A. Žák a J. Macášek, *Ateroskleróza: nové pohledy*, Grada, Praha, 2011, 125.
- [33] S. Mukhopadhyay a U. Maitra, *Chemistry and Biology of Bile Acids*, *Current Science* 87 (2004) 1666–1683.
- [34] M. J. Monte, J. J. Marin, A. Antelo a J. Vazquez-Tato, *Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology*, *World Journal of Gastroenterology* 15 (2009) 804-816.

[35] Leadiant GmbH, Státní ústav pro kontrolu léčiv: SPC chenodeoxycholic acid leadiant. <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0222116&tab=texts>. [cit.2022-08-24].

[36] Allergan Pharmaceuticals International Ltd., Státní ústav pro kontrolu léčiv: SPC Belkyra. <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0131371&tab=texts>. [cit.2022-08-24].

8. Přílohy

8.1. Příloha č. 1: Reálný záznam analýzy insertu



Obrázek 22: Reálný záznam analýzy insertu č. 10

8.2. Příloha č. 2: Program SIA

Loop Start (#) 6

'aspiration of carrier

Syringe Pump Command (?) KOR

Syringe Pump Valve In

'peristaltic pump on

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70

Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000

Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of the sample for washing

Syringe Pump Valve Out
Multiposition Valve port 6
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 100
Syringe Pump Delay Until Done

'first send to WASTE

Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Empty
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of carrier

Syringe Pump Command (?) KOR
Syringe Pump Valve In
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1500
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of the sample first time

Syringe Pump Valve Out
Multiposition Valve port 2
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 15
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 4

Syringe Pump Aspirate (microliter) 90
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 80
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1
Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 100
Syringe Pump Delay Until Done

Analyte New Sample

Multiposition Valve port 6
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Aspirate (microliter) 50
Syringe Pump Delay Until Done

'PMT Scanning

'first send to Detector

Multiposition Valve port 5
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Empty
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of carrier

Syringe Pump Command (?) KOR

Syringe Pump Valve In
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1500
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of the sample second time

Syringe Pump Valve Out
Multiposition Valve port 2
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 15
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 4
Syringe Pump Aspirate (microliter) 90
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 80
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1
Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 100
Syringe Pump Delay Until Done

Analyte New Sample

Multiposition Valve port 6
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Aspirate (microliter) 50
Syringe Pump Delay Until Done

'PMT Scanning

'second send to Detector

Multiposition Valve port 5
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Empty
Syringe Pump Delay Until Done

'refilling

Syringe Pump Valve In
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 50
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 280
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Valve Out
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 6
Syringe Pump Dispense (microliter) 250
Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1800

'aspiration of carrier

Syringe Pump Command (?) KOR
Syringe Pump Valve In
'peristaltic pump on
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of the sample for washing
Syringe Pump Valve Out
Multiposition Valve port 3
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 100
Syringe Pump Delay Until Done

'first send to WASTE

Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Empty
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of carrier

Syringe Pump Command (?) KOR
Syringe Pump Valve In
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1500
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of the sample first time

Syringe Pump Valve Out
Multiposition Valve port 2
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 15
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 4
Syringe Pump Aspirate (microliter) 90

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Dispense (microliter) 80

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1

Multiposition Valve port 1

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Dispense (microliter) 100

Syringe Pump Delay Until Done

Analyte New Sample

Multiposition Valve port 3

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Aspirate (microliter) 50

Syringe Pump Delay Until Done

'PMT Scanning

'first send to Detector

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of carrier

Syringe Pump Command (?) KOR

Syringe Pump Valve In

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70

Syringe Pump Aspirate (microliter) 1500
Syringe Pump Delay Until Done

'aspiration of the sample second time

Syringe Pump Valve Out
Multiposition Valve port 2
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 15
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 4
Syringe Pump Aspirate (microliter) 90
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Multiposition Valve port 5
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 80
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1
Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 100
Syringe Pump Delay Until Done

Analyte New Sample

Multiposition Valve port 3
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Aspirate (microliter) 50
Syringe Pump Delay Until Done

'PMT Scanning

'second send to Detector

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

'Refilling

Syringe Pump Valve In

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 50

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate (microliter) 280

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Valve Out

Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve port 3

Syringe Pump Dispense (microliter) 250

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1800

Loop End