

## 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.