

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Kristýna Dostálová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vysokokapacitní skríníng biologicky účinných látek
pomocí testů na buněčných liniích**

Diplomová práce

Kristýna Dostálová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Ing. Soňa Gurská, PhD.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Soni Gurské, PhD. a s pomocí citované literatury.

V Olomouci dne: Podpis:

Souhrn

Vysokokapacitní skríníng je jednou z nejnovějších technik, která je široce využívána pro objev léků ve farmaceutickém průmyslu. Ve srovnání s tradičními metodami pro skríníng léků vyniká svojí jednoduchostí, rychlostí, nízkými náklady a vysokou účinností. Slouží ke stanovení aktivity velkého počtu látek vůči různým biologickým cílům. Využívá roboty, detektory a software, které regulují celý proces a umožňují sérii analýz chemických látek.

V této práci byla provedena validace MTS testu cytotoxicity v HTS laboratoři. Testování komerčních chemických knihoven LOPAC se provádělo u nádorových i nenádorových buněčných linií v 384- a 1536- jamkovém formátu. Získaná data byla zpracována v programu Dotmatics a statisticky vyhodnocena.

Summary

High-throughput screening is one of the latest techniques, which are widely used for drug discovery in the pharmaceutical industry. Compared with traditional methods for screening drugs stands out for its simplicity, speed, low cost and high efficiency. HTS is used to determine the activity of a large number of substances to various biological targets. HTS uses robots, detectors and software that regulate the process and enables the analysis of chemical substances.

In this Thesis were validated the MTS cytotoxicity assay in HTS laboratory. Testing of commercial chemical libraries LOPAC was performed in tumor and non-tumor cell lines in 384- and 1536- well plates. The data were processed in the program Dotmatics and statistically evaluated.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí Ing. Soni Gurské, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost při vysvětlování dané problematiky a cenné rady při zpracování. Dále bych poděkovala MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za možnost vypracovat svoji práci na tomto pracovišti a všem pracovníkům Laboratoře experimentální medicíny z Ústavu molekulární a translační medicíny, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, zvláště pak Renatě Burianové. Práce byla podpořena projektem MŠMT (Národní program udržitelnosti, LO1304).

Obsah

1 Cíl práce.....	9
2 Úvod	10
3 Současný stav řešené problematiky	11
3.1 Vysokokapacitní skrínig (High-throughput screening - HTS)	11
3.1.1 Miniaturizace.....	12
3.1.2 Automatizace.....	13
3.1.3 Metody v HTS	14
3.1.3.1 Bezbuněčné testy (biochemical assays, cell-free assays).....	14
3.1.3.1.1 Inhibice enzymů.....	14
3.1.3.1.2 Receptor-ligand vazebné testy	15
3.1.3.1.3 Interakce protein-peptid/DNA	15
3.1.3.2 Buněčné testy (cell-based assays).....	15
3.1.3.2.1 Testy založené na druhých poslech (second messenger assays).....	17
3.1.3.2.2 Reportér-gen testy (reporter-gene assays)	17
3.1.3.2.3 Testy životaschopnosti buněk (cell proliferation assays)	18
3.1.3.2.3.1 Testy na bázi tetrazoliových solí.....	19
3.1.3.2.3.1.1 MTS	19
3.1.3.2.3.1.2 MTT, XTT, WST-1	20
3.1.3.2.3.2 Testy založené na redukci resazurinu a stanovení ATP.....	21
3.1.3.2.3.2.1 Redukce resazurinu	21
3.1.3.2.3.2.2 ATP test	22
3.1.4 Testování cytotoxicity v HTS	23
3.2 Chemické knihovny	25
4 Experimentální část	27
4.1 Materiál.....	27
4.1.1 Seznam a příprava použitých roztoků, chemikálie.....	27
4.1.2 Seznam a příprava použitých kultivačních médií	29
4.1.3 Přístrojové vybavení.....	30
4.1.4 Buněčné linie.....	31
4.2 Metodika	32
4.2.1 Pasážování buněčných linií	32

4.2.2 Testování mykoplasmy	33
4.2.3 Příprava buněčných linií na experiment.....	34
4.2.4 Testované látky a jejich příprava	34
4.2.5 Skríníng vhodných pozitivních kontrol pro testy cytotoxicity v HTS	35
4.2.5.1 Ovlivnění buněk pomocí cytostatik	35
4.2.5.2 MTS test	36
4.2.6 První (primární) testování LOPAC knihoven	37
4.2.6.1 Ovlivnění buněk LOPAC knihovnamí	37
4.2.6.2 MTS test	37
4.2.7 Druhé (sekundární) testování aktivních látek z LOPAC90.....	38
4.2.7.1 Ovlivnění buněk knihovnou LOPAC90	38
4.2.7.2 MTS test	38
5 Výsledky.....	39
5.1 Stanovení vhodných pozitivních kontrol pro testy cytotoxicity v HTS.....	39
5.2 První (primární) testování LOPAC knihoven.....	43
5.3 Druhé (sekundární) testování aktivních látek z LOPAC90	45
6 Diskuze	49
7 Závěr.....	51
8 Literatura	52
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	57
10 Přílohy	60

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se vysokokapacitního skríníngu biologicky účinných látek pomocí testů na buněčných liniích.

V experimentální části práce jsem se seznámila s chodem laboratoře tkáňových kultur a pracovala s lidskými nádorovými i nenádorovými buněčnými liniemi ve sterilních podmínkách. Hlavním cílem diplomové práce byla validace testu cytotoxicity MTS v HTS formátu využitím komerčních chemických knihoven LOPAC.

2 Úvod

Po celá desetiletí se pro testování cytotoxicity využívalo podávání vysokých dávek různých látek laboratorním zvířatům s cílem určit přesnou dávku a identifikovat potenciální nepříznivé účinky. Získáním první imortalizované linie HeLa v 50. letech minulého století začal rozvoj testování cytotoxicity v *in vitro* podmínkách a upustilo se od počátečních pokusů na zvířatech (Wetmore, 2015). Tlak na farmaceutické firmy, aby dokázaly otestovat velké množství látek v krátkém čase, vedl ke vzniku vysokokapacitního testovacího systému (high-throughput screening, HTS).

Jedná se o multidisciplinární obor zahrnující analytickou chemii, biologii, biochemii, syntetickou chemii, molekulární biologii, automatizační techniku a informatiku. Hlavní trendy jsou zaměřeny na vývoj neizotopových detekčních systémů a buněčných testů (Sittampalam et al., 1997). V současnosti farmakologické společnosti považují HTS za hlavní pilíř v procesu objevování nových léčiv.

Hlavním cílem HTS je identifikovat z velkého množství otestovaných sloučenin aktivní látky (Shun et al., 2011), tzv. „hity“, které jsou základem dalších specifických testování. Počet identifikovaných hitů je nejčastěji v rozmezí 0,5 až 3 % z celkového počtu otestovaných látek v závislosti na použité metodě.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Vysokokapacitní skrínig (High-throughput screening - HTS)

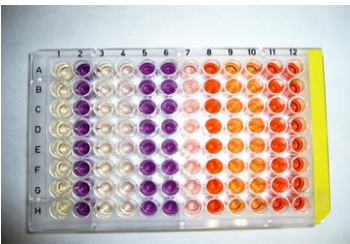
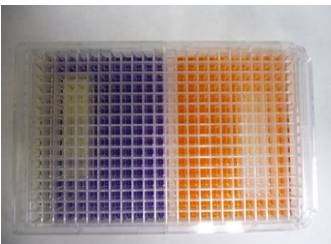
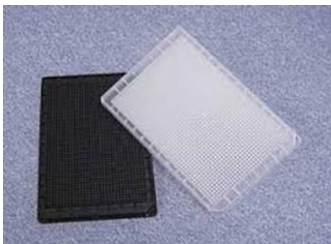
High-throughput screening neboli vysokokapacitní skrínig je proces založený na testování velkého množství chemických látek proti vybraným cílům nebo buněčným fenotypům (Shun et al., 2011). Jedná se o jednu z nejnovějších technik používaných pro objev léků ve farmaceutickém průmyslu. Začala se vyvíjet v 70. letech 20. století (Inglese et al., 2006) a pro určení výchozích bodů při hledání nových léků byla poprvé použita v 80. letech (Wigglesworth et al., 2015). Při jednom z prvních skrínigů byl objeven lék Tolvaptan, který slouží jako antagonistu receptoru vasopresinu V2, jenž se využívá k léčbě hyponatrémie (nízké hladiny sodíku v krvi), (Toda et al., 2016).

Do roku 1990 bylo pomocí HTS možné otestovat tisíce sloučenin za den (Hertzberg et Pope, 2000). Od té doby se HTS vyvinulo v plnohodnotnou disciplínu, která umožnila objev řady léčiv (Mayr et Bojanic, 2009), např. kyseliny all-trans-retinové, anti-CD20 protilátek, anti-CD34 monoklonálních protilátek nebo léků Maravirok či Eltrombopag (Liu et al., 2004). V roce 2005 byl osekvenován celý lidský genom, který se skládá z 3 000 megabází, tj. více než 100 000 genů (Mayr et Bojanic, 2009), a také řada dalších genomů různých patogenů, jako jsou mikroorganismy, bakterie a viry (Sittempalam et al., 1997). Ty dodaly stovky až tisíce nových potenciálních biologických cílů (Mayr et Bojanic, 2009, Zang et al., 2012), které bylo potřeba dále otestovat. Na druhé straně rozvoj kombinatorní chemie ve velké míře přispěl k vysokému nárůstu látek, které potřebovaly být rychle a kvalitně otestovány (Inglese et al., 2006). V současnosti HTS zvládne za den otestovat 10 000 až 100 000 sloučenin (Mayr et Bojanic, 2009) a μ HTS je definován skrínigem více než 100 000 sloučenin za den (Wölcke et Ullmann, 2001; Szymański et al., 2012). K urychlení skrínigu sloučenin došlo díky vysokému stupni automatizace a rychlé detekci (Mayr et Bojanic, 2009). HTS i μ HTS jsou považovány za klíčové prvky při hledání léků mezi chemickými sloučeninami (Mayr et Bojanic, 2009; Hertzberg et Pope, 2000).

Testy pro HTS vyžadují malý objem vzorku, vysokou výkonnost a kapacitu, ale také adekvátní citlivost, reprodukovatelnost a přesnost, aby bylo možné rozlišit obrovské množství sloučenin, které pokrývají celé spektrum aktivity (Zhang et al., 1999; Korn et Krausz, 2007). Proto miniaturizace, robotika a senzitivní metody detekce signálu patří mezi základní znaky HTS (Mayr et Bojanic, 2009).

3.1.1 Miniaturizace

Potřeba zvýšení počtu chemických sloučenin pro testování a s tím související zvýšení počtu molekulárních cílů vedla k potřebě miniaturizace HTS testů (Mayr et Bojanic, 2009). Při příchodu HTS na začátku 90. let se ve většině farmaceutických a biotechnologických společností jako hlavní skriningový formát (Sundberg, 2000; Szymański et al., 2012) využívaly mikrotitrační destičky s 96 jamkami na destičce (viz Obr. 1), (Sittampalam et al., 1997). Nicméně v posledním desetiletí byl silný tlak směrem k typům destiček, které by měly stejnou velikost (Mayr et Bojanic, 2009), ale vyšší kapacitu a nižší pracovní objem (Hertzberg et Pope, 2000).

96- jamková destička	384- jamková destička	1536- jamková destička
		
Objem/ jamka: 100-200 μ l	20-100 μ l	0,5-10 μ l
16 testovaných látek	98 testovaných látek	392 testovaných látek
8 látek DR	21 látek DR	84 látek DR
8 kontrol	21 kontrol	~ 70 kontrol

Obr. 1: Různé typy mikrotitračních destiček používaných v HTS

První vývoj vedl k 384- jamkovým destičkám (viz Obr. 1), (Sittampalam et al., 1997), které pojmu 4x více vzorků než 96- jamkové destičky, obsahují nižší objem látek (Sundberg, 2000) a tím snižují náklady na činidla (Sittampalam et al., 1997). Většina všech testů, ať už na buněčném nebo biochemickém principu může být přizpůsobena 384- jamkovému formátu bez jakýchkoliv problémů. Tento formát se využívá pro skladování nebo pro skriningové testy u většiny farmaceutických a biotechnologických společností (Mayr et Bojanic, 2009).

Několika korporacím se podařilo buď částečně, nebo celkově přizpůsobit své procesy 1536- jamkovým destičkám (viz Obr. 1), (Sittampalam et al., 1997; Sundberg, 2000). Bylo zaznamenáno několik případů biologických testů v 3456- jamkových destičkách, ale tyto testy se stále vyvíjejí a čelí řadě technických překážek (Sundberg, 2000; Mayr et Bojanic, 2009; Szymański et al., 2012). Některé společnosti od 3456- jamkového formátu upustily a raději

využívají 384- a 1536- jamkové formáty (Hertzberg et Pope, 2000). Je třeba poznamenat, že velmi nízké objemy výrazně ovlivňují poměr povrchu k objemu a občas mají dramatické důsledky pro absorpci a stabilitu činidla (Mayr et Bojanic, 2009). Některé testy mohou být v tomto formátu těžko proveditelné vzhledem k citlivosti na konečné koncentrace dimethylsulfoxidu (DMSO), (Sundberg, 2000).

3.1.2 Automatizace

Pro provádění HTS je potřeba zařízení, které umožňuje otestovat desetitisíce až statisíce sloučenin v krátkém časovém úseku (Hertzberg et Pope, 2000). Uskutečnění takového kvanta testů v reálném čase je možné díky automatizaci systému (Inglese et al., 2006), která slouží k eliminaci chyb způsobených lidským faktorem (Shaffer, 2005). Samotná automatizace zahrnuje (1) robotický manipulační systém, (2) přesné pipetovací zařízení, (3) citlivé detektory a (4) kontrolní software (Hong et al., 2009).

Robotický systém je zastoupený robotickými rameny a softwarem, který kontroluje celý proces. Robotická ramena přemísťují testovací destičky mezi jednotlivými přístroji (inkubátory, pipetovací zařízení, centrifugy, readery,...).

Vzhledem k tomu, že se většina skladovaných sloučenin vyskytuje v roztoku, je důležitou součástí HTS laboratoří přesné pipetovací zařízení (Shaffer, 2005). K běžným pipetovacím přístrojům, které prostřednictvím pipetovacích kazet dokáží pomocí peristaltické pumpy rychle pipetovat do 96-, 384- a 1536- jamkových destiček objemy v rozsahu 1-3000 μ l, patří například Multidrop Combi a BioTek EL406.

Jelikož je jedním z potenciálních zdrojů chyb manipulace s kapalinami, vznikl bezdotykový manipulátor s kapalinami Echo, který používá soustředěnou akustickou energii (ultrazvuk) k vystřelení kapky z povrchu kapaliny. Vzhledem k tomu, že je zařízení Echo bezdotykové, dochází k eliminaci kontaminace a nevzniká žádný odpad. Echo nahrazuje ostatní zásobníky, nepoužívá špičky, je velmi přesné a eliminuje spotřebu materiálu bez dopadu na životní prostředí. Přístroj Echo poskytuje tu výhodu, že kontroluje objem, výšku hladiny v jamce a koncentraci vody ve sloučeninách pomocí známé rychlosti zvukových vln skrz vodu a DMSO (Shaffer, 2005).

Pro automatizaci se využívají citlivé detektory, které jsou založeny na měření různých end pointů, jako například luminiscence, fluorescence a absorbance (EnVision, ViewLux, MicroBeta, FLIPR). Pro HighContent analýzu slouží zobrazovací vysokorychlostní systémy

s inkubátorem a konfokálním mikroskopem k výzkumu biologických reakcí v živých buňkách (CellVoyager, Operetta), (Ko et kol., 2013).

3.1.3 Metody v HTS

Metody, vhodné pro HTS musí být jednoduché, přesné, rychlé a snadno automatizovatelné (Shoemaker et al., 2002). Testy, které splňují tyto podmínky, mohou být rozděleny do dvou kategorií na bezbuněčné testy (biochemical assays, cell-free assays) a buněčné testy (cell-based assays), (Shoemaker et al., 2002; Zang et al., 2012).

3.1.3.1 Bezbuněčné testy (biochemical assays, cell-free assays)

Bezbuněčné, neboli biochemické testy, zejména inhibice enzymů a receptor-ligand vazebné testy byly dříve hlavními pilíři HTS ve farmaceutickém průmyslu, ovšem v současnosti se od těchto testů upouští. Při těchto testech se specifická vazba nebo afinita testovaných sloučenin provádí v homogenních reakcích, které umožňují transfer látek ze zkumavek do 96- nebo 384-jamkových destiček (Zang et al., 2012).

3.1.3.1.1 Inhibice enzymů

Inhibice enzymů je děj, při němž je schopnost enzymu katalyzovat reakci snížena vazbou určité látky tzv. inhibitoru. Využívá se v základní diagnostice a *in vitro* testech při studiu jevů zahrnujících lékové interakce (Hong et al., 2009).

Inhibici enzymové aktivity dělíme na reversibilní inhibitory, které nevratně blokuje enzymovou aktivitu tím, že s enzymem vytvářejí velmi pevný kovalentní komplex enzym-inhibitor a reversibilní inhibitory, které se dělí na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Při kompetitivní inhibici soutěží substrát a inhibitor o aktivní místo, při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na molekulu enzymu do jiného místa než substrát, ale nebrání tvorbě produktu, a při akompetitivní inhibici vazba substrátu na enzym předchází vazbě enzymu (teprve vazba substrátu na enzym vytváří vazebné místo pro inhibitor).

Techniky pro stanovení inhibice enzymů využívají elektrochemické metody (potenciometrie, ampérometrie, polarografie, konduktometrie), optické metody (spektrofotometrie, fluorometrie, luminiscence), manometrické a radiometrické metody nebo ostatní metody do kterých spadá například titrace nebo viskozimetrie (Zang et al., 2012).

3.1.3.1.2 Receptor-ligand vazebné testy

Interakce receptor-ligand hraje klíčovou roli v biologických systémech a měření jejich interakce je důležité ve farmaceutickém vývoji. Využívá různé testy pro skrínig a kvantifikaci interakce. Receptor-ligand vazebné testy se dělí na radioaktivní a neradioaktivní. Radioaktivní testy jsou velmi jednoduché a reprodukovatelné, ale hlavní nevýhodou je, že jsou nebezpečné pro lidské zdraví a vytvářejí radioaktivní odpad, který vyžaduje zvláštní laboratorní podmínky a jeho zpracování je poměrně drahé. To vedlo k vývoji neradioaktivních testů založených na optických metodách, jako je fluorescenční polarizace (FP), fluorescenční rezonanční přenos energie nebo povrchová plasmonová rezonance. Receptor-ligand vazebné testy mohou být využity mnoha způsoby, například pro základní výzkum, pro skrínig nových chemických entit, objev endogenních ligandů a také pro stanovení neznámého množství analytu (De Jong et al., 2005).

3.1.3.1.3 Interakce protein-peptid/DNA

Mezi nejjednodušší biochemické testy v HTS patří přímé posouzení interakcí proteinů s peptidy, při které se využívá technika fluorescenční polarizace (Shoemaker et al., 2002). FP je metoda velmi často využívaná v HTS. Jestliže je fluorescentní molekula osvětlena světlem určité vlnové délky, část světla absorbuje. Po několika nanosekundách je absorbované světlo emitováno, ale s jinou, delší vlnovou délkou. Po vazbě na makromolekulu je pozorován úbytek depolarizace ligandu, čehož se využívá pro stanovení vazebných parametrů. Stupeň polarizace emitované fluorescence závisí na délce excitovaného fotonu a mobilitě fluoroforu. Jestli bude emitované světlo polarizované či ne, závisí na možnosti fluoroforu rotovat v roztoku. Fluorescenční polarizaci je možné využít pro studium pohybu molekul v roztoku nebo pro studium interakcí na molekulové úrovni (De Jong et al., 2005; Du, 2015).

3.1.3.2 Buněčné testy (cell-based assays)

Aplikace biochemických testů jsou velmi omezené, protože ne všechny proteiny mohou být purifikovány nebo připraveny způsobem, který je vhodný pro biochemické měření (Zang et al., 2012). Biochemické testy mají své limity, protože mezi chováním léků v buněčném a bezbuněčném prostředí jsou velké rozdíly (Szymański et al., 2012). Proto testování toxicity postupně směřuje k *in vitro* testům využívajícím buňky, které poskytují včasné určení cytotoxicity (Zang et al., 2012). Buněčné testy umožňují na základě posouzení specifčnosti

a účinnosti charakterizovat potenciální léčiva pomocí vyhodnocení jejich účinků v buňkách (Szymański et al., 2012).

V současné době se tyto testy používají ve více než polovině všech HTS a tzv. ADMET (absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace a toxicita) testů v rané fázi objevu léčiv. Všechny HTS buněčné testy se provádí v multijamkových destičkách, protože mohou být snadno miniaturizovány pro získání vyšší kapacity (Zang et al., 2012). Poskytují informace o povaze farmakologicky aktivních sloučenin v určitém receptoru nebo iontovém kanálu (Szymański et al., 2012), jsou široce používány k analýze účinků sloučenin na buněčnou aktivitu, včetně velikosti jádra, mitochondriálního membránového potenciálu, intracelulární hladiny vápníku, průchodnosti membrán a počtu buněk (Zang et al., 2012). Prezentují cíle v příslušném buněčném kontextu a poskytují model transportu a sérově vázaných proteinů. Nicméně buněčné testy poskytují multiplexní molekulární cíle a tak získání „hitů“ vyžaduje další testování vymezující povahu jejich účinnosti proti cílům (Shoemaker et al., 2002).

Buněčné testy vhodné pro HTS dělíme zejména do 3 kategorií na: second messenger assays, reporter gene assays a cell proliferation assays (Sundberg, 2000; Zang et al., 2012), (viz Tab. I).

Typ testu	Mechanismus nebo metoda	Příklad
Second messenger	Sledování přenosu signálu po aktivaci receptoru na buněčném povrchu	Fluorescenční molekuly, které reagují na změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} , membránovém potenciálu, pH atd.
Reporter gene	Monitorování buněčné odpovědi na transkripci/translaci	Kvantifikace receptoru spřaženého s G-proteinem (GPCR) pomocí GPCR zeleného fluorescenčního proteinu
Cell proliferation/cytotoxicity	Monitorování celkového růstu buněk nebo smrti v reakci na vnější podněty nebo stres	Sledování virem vyvolaných cytopatických účinků na buněčnou proliferaci po redukci tetrazoliovou solí na formazan

Tab. I: Hlavní typy buněčných testů využívajících HTS při skrínungu léčiv (převzato a upraveno z: Zang et al., 2012)

3.1.3.2.1 Testy založené na druhých poslech (second messenger assays)

Tyto testy sledují přenos signálu z aktivovaných receptorů na buněčném povrchu (Sundberg, 2000), měří rychlé, přechodné fluorescenční signály (Szymański et al., 2012). Koncept druhých poslů byl vyvinut před více než 50 lety Earlem Sutherlandem, který obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu v roce 1971 za identifikaci druhého posla cAMP. Druzí poslové jsou také označováni jako intracelulární signální molekuly. Vytvářejí se uvnitř buňky po stimulaci prvního posla a jsou vysoce konzervativní v biologii a přítomny v každé buňce. Druhé posly lze manipulovat na úrovni prvních poslů aktivací odpovídajících receptorů a ligandů sloužících jako agonisté nebo blokováním prvního posla pomocí antagonistů. Jedním z nejdůležitějších současných terapeutických zásahů je modulace druhých poslů na úrovni receptorů, konkrétně GPCR (Seifert, 2015). Second messenger assays se nejčastěji používají k měření množství cAMP (cAMP assays) a vápníku (calcium assays), (Zang et al., 2012).

Testy založené na měření intracelulárního vápníku využívají různá fluorescenční barviva k měření změn koncentrace vápníku pomocí spektrofotometru (Sheth et al., 2013). Barvivo proniká přes buněčnou membránu a aktivuje se v buňce. Jakmile je barvivo aktivní, váže se na intracelulární vápník a fluoreskuje (Thomsen et al., 2005). K tomuto testu je potřeba velké množství substrátu a v důsledku odbarvování dochází ke snižování fluorescenčního signálu s časem. Proto došlo k úpravě těchto testů pomocí fluorescenční čtečky, která umožňuje menší množství substrátu a vyšší výkonnost díky využití mikrotitrační destičky (Liu et Abell, 2006).

Pro měření množství cAMP se využívá ELISA test. Tento test je založen na schopnosti rozpustného cAMP soutěžit s navázanou alkalickou fosfatázou (AP) - konjugovanou s anti-cAMP protilátkou na imobilizovaný cAMP. Povrchově vázaný, imobilizovaný komplex anti-cAMP-AP je nepřímo úměrný koncentraci cAMP v extraktu. Pro kalibraci testu se využívá známá koncentrace rozpustného cAMP (Sigma-Aldrich, 2016).

3.1.3.2.2 Reportér-gen testy (reporter-gene assays)

Sledují buněčné reakce na úrovni transkripce/translace (Sundberg, 2000) a ukazují na přítomnost nebo absenci genového produktu, který odráží změny v signálu vnitrobuněčných dějů (Szymański et al., 2012).

Jedná se o sestřih transkripční kontroly cílového genu (gen, který kontroluje biologickou expresi a funkci cílového onemocnění) se sekvencí kódující reportérový gen do vektoru. Tento vektor je pak transfekován do buněčné linie za účelem konstrukce vhodného detekčního systému, který reaguje na modulaci cíle. Příklady reportérových genů jsou enzymy jako například chloramfenykol acetyltransferáza, alkalická fosfatáza, světlušková a bakteriální luciferáza nebo P-galaktosidáza. Tyto enzymy mohou být detekovány při velmi nízkých hladinách pomocí kolorimetrických, chemiluminiscenčních, fluorescenčních nebo bioluminiscenčních produktů specifických substrátů (Sittampalam et al., 1997). U buněčných linií se nejčastěji využívá GFP protein a luciferáza.

GFP protein byl izolovaný z medúzy *Aequorea victoria* a zachovává si své fluorescenční vlastnosti, pokud je rekombinantní protein GFP exprimovaný v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách (Kanda et al., 1998). Pro expresi fluorescence nejsou potřeba žádné exogenní substráty a kofaktory (Chalfie et al., 1994). GFP proteiny jsou zaměřeny na konkrétní subcelulární orgány a struktury, včetně jádra, plazmatické membrány, cytoskeletu a Golgiho aparátu (Kanda et al., 1998) a využívají se zejména k monitorování genové exprese a lokalizace proteinů v živých organismech (Chalfie et al., 1994).

Luciferázy jsou oxidativní enzymy známé především díky své bioluminiscenci. Bioluminiscenční signály vznikají prostřednictvím monooxygenace luciferinu za využití O_2 a ATP. Nejčastěji se využívají luciferázy odvozené ze světlušky *Photinus pyralis* a mořské macešky *Renilla reniformis* (Johnson et al., 2014).

3.1.3.2.3 Testy životaschopnosti buněk (cell proliferation assays)

Tyto testy slouží ke sledování celkového/žádného růstu buněk jako odpověď na vnější podněty (Sundberg, 2000). Jsou snadné, avšak zdlouhavé v porovnání s bezbuněčnými testy (Szymański et al., 2012).

Testy životaschopnosti buněk jsou využívány při skríningu velkého množství chemických látek a určení jejich cytotoxicity na různé buňky (Tominaga et al., 1999). Tyto testy se běžně využívají pro výzkum buněčné smrti proto, že: 1. umožňují současnou analýzu velkého počtu vzorků, 2. nepotřebují speciální laboratorní vybavení, 3. jsou k dispozici kity, které často obsahují patřičné kontroly, 4. jsou poměrně hospodárné (ve srovnání s imunologickými technikami), (Galluzzi et al., 2009). Velkou výhodou těchto testů je, že nepoužívají radioaktivní látky (Tominaga et al., 1999).

3.1.3.2.3.1 Testy na bázi tetrazoliových solí

Testy životaschopnosti buněk, které využívají tetrazoliové soli se staly jedním z nejčastěji používaných metod pro měření metabolické aktivity buněk v buněčné biologii (Berridge et al., 2005). Tyto testy se používají pro testování cytotoxických účinků na sloučeniny, měření výsledků buněčné proliferace a pro multiplexing jako vnitřní kontrola při stanovení životaschopných buněk v průběhu jiných buněčných testů (Niles et al., 2009; Riss et al., 2013). Ve většině standardních kultivačních podmínek má inkubace substrátu s životaschopnými buňkami za následek signál, který je přímo úměrný počtu živých buněk. Když buňky umírají, rychle ztrácejí schopnost převést substrát na produkt. Tento rozdíl poskytuje základ pro mnoho běžně používaných testů životaschopnosti buněk (Berridge et al., 2005).

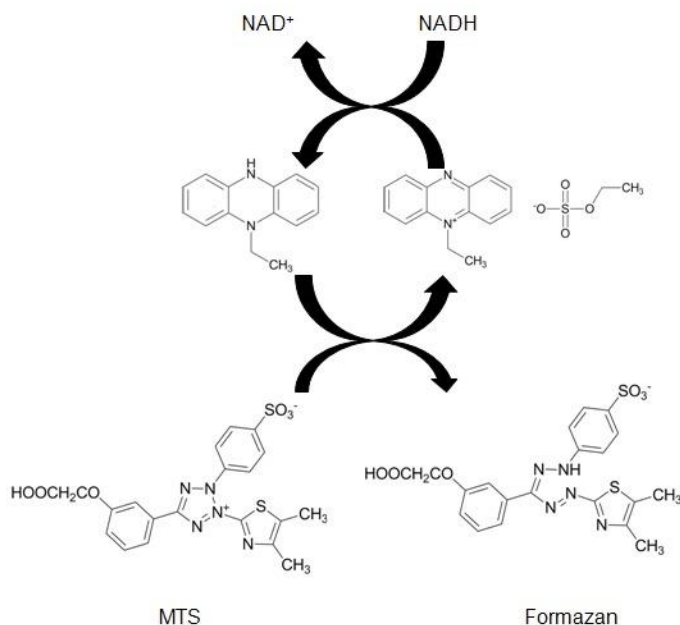
Nevýhodou těchto testů je, že přeměna sloučenin pomocí mitochondriálních enzymů může odrážet metabolické změny, které nemusí nutně korelovat s počtem životaschopných buněk. Nadměrná spotřeba média a hustota buněk jsou velmi časté situace, které vedou k výraznému potlačení mitochondriálních funkcí (Galluzzi et al., 2009).

Tyto testy (respektive sloučeniny) se dělí do 2 základních kategorií na: tetrazoliové deriváty první generace, kde patří MTT test, který obsahuje kladný náboj a snadno proniká do eukaryotických životaschopných buněk a tetrazoliové deriváty druhé generace, do kterých spadají MTS, XTT a WST-1 testy, které jsou záporně nabitě a nepronikají snadno do buněk (Berridge et al., 2005).

3.1.3.2.3.1.1 MTS

Principem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H tetrazolia (MTS) je přeměna MTS pomocí mitochondriální dehydrogenázy (při teplotě 37 °C) v metabolicky aktivních buňkách na ve vodě rozpustný formazanový produkt, který se snadno kvantifikuje pomocí spektrofotometrie (ELISA reader), (Lai et al., 2014). Při MTS testu se využívá záporný náboj formazanového produktu k rozpuštění v médiu a k omezení buněčné permeability tetrazoliem. Tetrazoliové reagentie se používají v kombinaci s meziproducty činidel akceptorů elektronu, jako jsou phenazin methylsulfát (PMS) nebo phenazin ethylsulfát (PES), které pronikají přes živé buňky a redukují buňky, které mohou převést tetrazolium na rozpustný formazan (Berridge et al., 2005; Riss et al., 2013), (viz Obr. 2). Tento formazanový produkt má maximální absorpenci při 490 nm a je přímo úměrný počtu živých buněk

v kultuře (Lai et al., 2014). Množství formazanu, které buňky produkují je závislé na různých faktorech, jako například buněčná linie, počet buněk, pH média, přítomnost séra atd. Proto je k účinné citlivosti MTS testu potřeba pečlivá optimalizace testu (Jacobsen et al., 1996).



Obr. 2: Meziprodukt elektronového akceptoru PES převádí elektrony z NADH v cytoplasmě na ve vodě rozpustný formazan (převzato z: Riss et al., 2013)

Výhodou MTS testu je snadnost použití, rychlost, spolehlivost určení toxicity a efektivita (Malich et al., 1997). Na rozdíl od MTT, který je ve vodě nerozpustný a vyžaduje rozpouštění, které je časově náročné a zvyšuje riziko mikrobiální kontaminace testu (Stevens a Olsen, 1993), jsou tetrazoliové deriváty druhé generace, jako jsou již zmíněné MTS, XTT a WST-1 metabolizovány na netoxické, ve vodě rozpustné produkty, které volně pronikají kultivačním supernatantem a neohrožují životaschopnost kultur. Tento faktor je velmi důležitý v HTS, jelikož dochází ke zjednodušení a zkracuje se doba testování (Galluzzi et al., 2009).

3.1.3.2.3.1.2 MTT, XTT, WST-1

MTT, celým názvem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid (Riss et al., 2013) funguje na principu mitochondriální dehydrogenázy, která přeměňuje žlutý, ve vodě rozpustný meziprodukt na fialový, ve vodě nerozpustný formazan (Mosmann, 1983), který se hromadí uvnitř buněk ve formě krystalů (Galluzzi et al., 2009). Proto spektrofotometrická

kvantifikace vyžaduje lýzi buněk a rozpuštění formazanových krystalů přes noc, ty jsou ovšem cytotoxické i v malých množstvích (Galluzzi et al., 2009; Lai et al., 2014). Množství vytvořeného formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk (Young et al., 2005) a měří se spektrofotometricky při 570 nm (Tada et al., 1986).

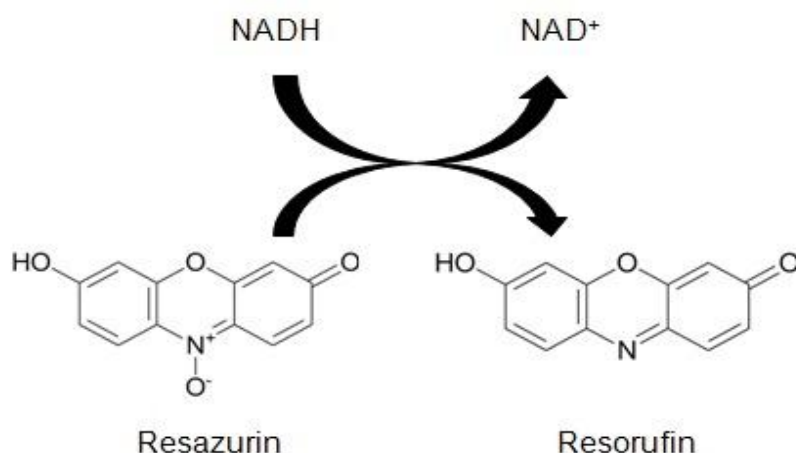
Štěpením XTT, 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxidu, pomocí dehydrogenázy v metabolicky aktivních buňkách se získá vysoce zbarvený formazanový produkt (Roehm et al., 1991), který je rozpustný ve vodě (Scudiero et al., 1988).

WST-1 je tetrazoliová sůl, která v kontaktu s metabolicky aktivními buňkami štěpí formazan pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. Formazanové barvivo je poté měřeno pomocí spektrofotometru při vlnové délce 420-480 nm. Čím tmavší je formazanové barvivo, tím větší je počet metabolicky aktivních buněk (Fritz, 2007).

3.1.3.2.3.2 Testy založené na redukci resazurinu a stanovení ATP

3.1.3.2.3.2.1 Redukce resazurinu

Resazurin je redoxní indikátor, který slouží ke sledování buněčné permeability a využívá podobné postupy, jako tetrazoliové sloučeniny. Může být rozpuštěn ve fyziologických pufrch (což má za následek modré zbarvení roztoku) a přidává se přímo do buněk v kultuře v homogenním formátu (Niles et al., 2009). Životaschopné buňky s aktivním metabolismem mohou redukovat resazurin na resorufin, který má růžové zbarvení a fluoreskuje (Riss et al., 2013), (viz Obr. 3).



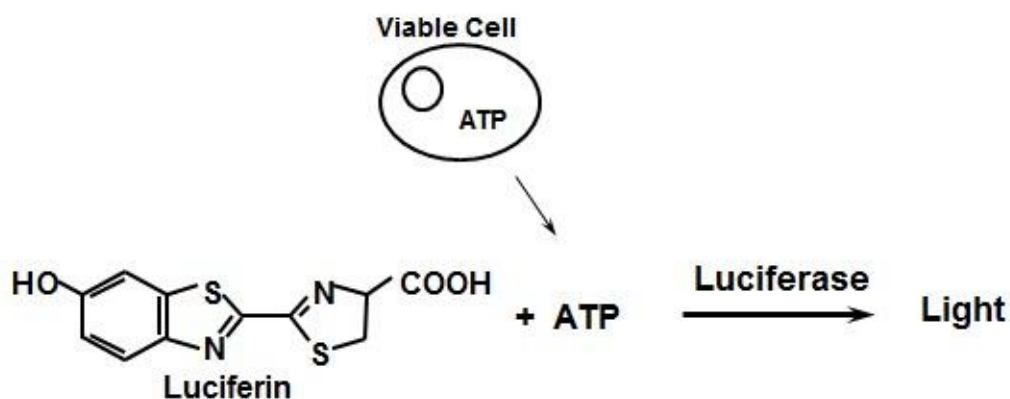
Obr. 3: Struktura resazurinu a jeho produktu resorufinu (převzato z: Riss et al., 2013)

Výhodou tohoto testu je, že je relativně levný, používá homogenní formát a je citlivější než tetrazoliové testy (Niles et al., 2009). Nevýhody zahrnují možnost fluorescenční interference z testovaných sloučenin a často přehlížené přímé toxické účinky na buňky (Riss et al., 2013).

3.1.3.2.3.2.2 ATP test

Měření ATP pomocí luciferázy je nejčastější, nejrychlejší a nejcitlivější metoda používaná pro odhad počtu živých buněk v HTS (Riss et al., 2013). Je velmi efektivní, protože téměř všechna vstupní energie se transformuje na světlo, které je přímo úměrné koncentraci ATP (Paciello et al., 2013). Princip spočívá v tom, že neživotaschopné buňky nejenže ztrácí celistvost membrány a schopnost syntetizovat ATP, ale také obsahují endogenní ATPasy, které rychle vyčerpávají stávající ATP v cytoplazmě (Riss et al., 2013). Pro kvantifikaci ATP se využívá luciferáza, která generuje luminiscenční signál, který je přímo úměrný počtu živých buněk (Niles et al., 2009), (viz Obr. 4).

Přestože byla luciferáza používaná pro měření ATP už od svého objevu v roce 1963 (Paciello et al., 2013), teprve nedávno bylo objeveno činidlo, které má po přidání do homogenního testu za následek luminiscenční signál, který svítí hodiny (Niles et al., 2009).



Obr. 4: Zjednodušené reakční schéma ukazuje ATP a luciferin jako substráty pro luciferázu, která vytváří světlo (převzato z: Riss et al., 2013)

ATP test je méně náchylný k artefaktům než jiné testovací metody a vede k vývoji stabilních testů pro HTS, které odolávají buněčné lýzi a jsou odolnější vůči luciferázovým inhibitorům (Paciello et al., 2013). Má tu výhodu, že nedochází k inkubaci životaschopných buněk se substrátem (čehož využívají tetrazoliové soli nebo resazurin) pro vznik barevné sloučeniny,

čímž dochází k eliminaci potenciálních zdrojů chyb. Tento test je také široce využíván i v 1536- jamkovém formátu (Riss et al., 2013).

3.1.4 Testování cytotoxicity v HTS

Ve farmaceutických firmách se do testování dostává velké množství látek, ze kterých je potřeba vyselektovat aktivní látky. Z tohoto důvodu se nejčastěji při prvním (primárním) testování sleduje aktivita všech látek při jedné stanovené koncentraci (Shoemaker et al., 2002; Shun et al., 2011). Při vyhodnocování tohoto typu experimentů se sleduje inhibice životaschopnosti buněk při dané koncentraci, která je vyjádřena pomocí procenta inhibice (PI). PI se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$PI = 100 - \frac{Xi - \bar{C}_{MIN}}{|\bar{C}_{MAX} - \bar{C}_{MIN}|} \times 100$$

Kde \bar{C}_{MIN} označuje průměr negativních kontrol a \bar{C}_{MAX} průměr pozitivních kontrol a Xi je nezpracované měření i -té sloučeniny. Tato metoda odstraňuje variabilitu mezi jednotlivými destičkami odečtením průměru negativních kontrol a vydělením absolutního rozdílu mezi negativními a pozitivními kontrolami. Sloučeniny, které vykazují procento inhibice větší než prahovou hodnotu (například >50 %) jsou považovány za „hit“, tedy aktivní (Shun et al., 2011).

Pokud se zkoumaná sloučenina vyhodnotí jako aktivní, tj. způsobuje víc než 50% inhibici životaschopnosti buněk, je zařazena do druhého (sekundárního) testování. V tomto kroku se pro každou aktivní látku určí hodnota IC50. Sloučeniny s malým nebo žádným účinkem jsou z dalších testů vyřazeny (TDI, 2016). IC50 látky slouží k vyhodnocení sloučenin testovaných při více koncentracích. Tento parametr je často využíván právě pro vyhodnocení testů cytotoxicity (Stepanenko et Dmitrenko, 2015). Hodnota IC50 se určuje z tzv. dose-response křivky. Na svislé ose se nachází viabilita buněk (v %) a koncentrace (log c) na ose vodorovné. Určí se maximální a minimální inhibice. IC50 je koncentrace, při které křivka prochází 50% inhibicí (růst buněčné populace je inhibován na polovinu) a vypočte se jako inflexní bod na sigmoidě (Astashkina et al., 2012).

V HTS je velmi důležité přesné provedení všech testů. Pouze testy vysoké statistické jakosti mohou být použity pro správnou analýzu dat (Mayr et Bojanic, 2009). Pro zjištění kvality testů se využívá tzv. Z' faktor. Z' faktor se vypočítá ze vzorce:

$$Z' \text{ faktor} = 1 - \frac{(3s_{MAX} + 3s_{MIN})}{|\bar{C}_{MAX} - \bar{C}_{MIN}|}$$

Kde s_{MIN} a s_{MAX} jsou standartní odchylky MIN a MAX kontrolních signálů. \bar{C}_{MIN} a \bar{C}_{MAX} označují průměr pozitivních a negativních kontrol (Shun et al., 2011). Z' faktor je bezrozměrná, statistická veličina charakteristická pro každý HTS test. Poskytuje užitečný nástroj pro vyhodnocení kvality testu, a proto se používá pro optimalizaci a validaci testu. Pokud je Z' faktor dostatečně vysoký (větší jak 0,5) za definovaných podmínek, pak může být test použit v HTS (Zhang et al., 1999).

3.2 Chemické knihovny

Chemické knihovny vznikají za pomoci kombinatorní chemie, kterou lze definovat jako systematické a opakované kovalentní spojování vhodných typů stavebních bloků různé struktury, které vedou ke vzniku velkých souborů různých chemických sloučenin-chemických knihoven. Prvními chemickými knihovnami byly knihovny peptidů připravené Merrifieldovou technikou syntézy peptidů na pevné fázi (za tuto techniku získal Merrifield v r. 1984 Nobelovu cenu za chemii). Cílené vytváření chemických knihoven se využívá především ve farmakologickém skríningu (Hampl et al., 2007).

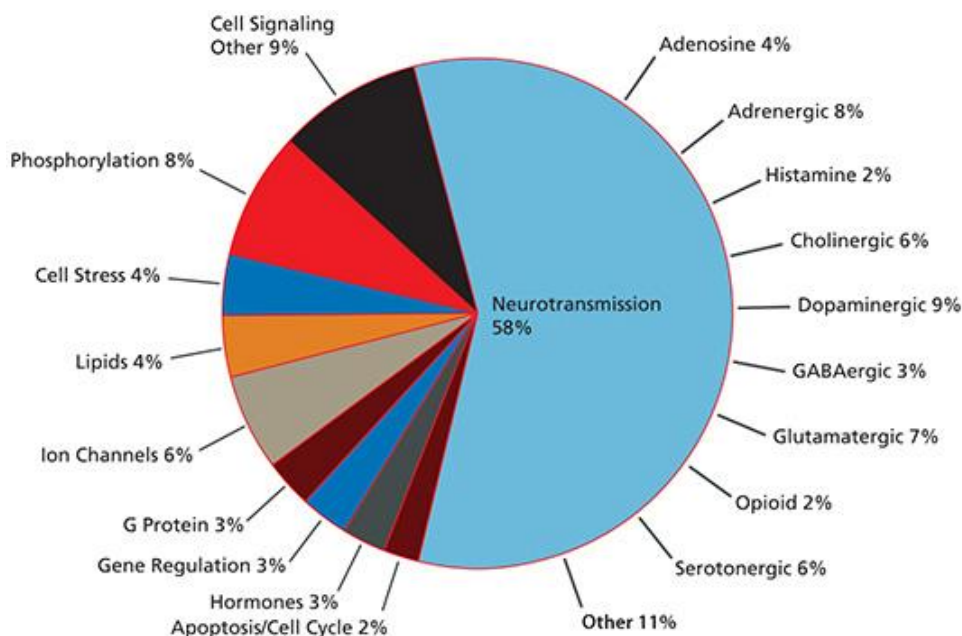
Existují dva druhy chemických knihoven: experimentální HTS knihovny (eHTS) a virtuální HTS knihovny (vHTS). Knihovny eHTS představují chemické sloučeniny, které jsou testovány v laboratoři, vHTS jsou tvořeny 3D reprezentací chemických sloučenin testovaných s použitím výpočetních metod. Konstrukce obou typů knihoven si jsou podobné a oba způsoby - experimentální i výpočetní se vzájemně doplňují při výzkumu léků.

První chemické knihovny se staly populární v polovině 90. let. Knihovny zahrnovaly až 1 milion malých molekul sloučenin, které byly testovány relativně rychle během několika dnů až týdnů. Ačkoliv tyto výsledky vedly k několika významným úspěchům, nenaplnily svá očekávání. Toto bylo nazýváno jako tzv. první generace chemických knihoven.

Během několika posledních let došlo k rozsáhlému výzkumu HTS knihoven s cílem vylepšit jejich schopnosti hledání nových léčiv, vznikla tzv. druhá generace chemických knihoven. Chemické knihovny jsou dnes mnohem složitější než v minulosti a spoléhají na různé metody používané pro výběr jednotlivých sloučenin. Volba sloučenin je založena na dvou široce používaných konstrukčních strategiích: diversity- oriented design (vytváření knihoven s velmi různorodými soubory chemických sloučenin) a target- oriented design (vytváření knihoven, které jsou zaměřeny na konkrétní chemotypy, molekuly nebo třídy sloučenin), (Casey, 2005).

Jedním z typů eHTS knihoven je komerční knihovna LOPAC (ze zkratky Library Of Pharmacologically Active Compounds). LOPAC1280 obsahuje 1280 farmakologicky účinných látek, které pokrývají široké spektrum biologických oblastí (Hirota et al., 2008). Schéma znázornění jednotlivých látek v LOPAC1280 je zobrazeno na Obr. 5. Knihovna obsahuje látky, které jsou kandidáty pro úspěšný vývoj a také tzv. „zlaté standardy“, ty jsou velmi dobře charakterizované a je známa jejich aktivita (Lai et al., 2008). Tyto látky jsou účinné v oblasti buněčné signalizace a neurotransmise. LOPAC knihovny obsahují mnoho

léků, které jsou v současné době na trhu anebo stále v klinických studiích, jako například Fluoxetin, Atorvastatin nebo Montelukast. Proto skrínigové výsledky získané z testování na lidských buňkách mohou mít významný dopad na používání těchto léčiv (Hirota et al., 2008; Tanaka et al., 2013).



Obr. 5: Procentuální zastoupení jednotlivých látek v LOPAC1280 (Sigma-Aldrich, 2014)

LOPAC90 obsahuje více než 25 volně prodávaných léků včetně Sildenafilu, Celecoxibu nebo Sunitinibu. LOPAC90 knihovny slouží k doplnění LOPAC1280, ale i jako samostatná knihovna.

Chemické knihovny kódované pomocí DNA jsou dalším typem eHTS knihoven. Představují slibné nástroje pro objevování vazebných molekul k proteinům, které nás zajímají. Jednotlivé látky z knihovny jsou připojeny k odlišným sekvencím DNA, které slouží jako identifikace amplifikovaných čárových kódů. Na rozdíl od konvenčních chemických knihoven umožňují DNA kódované knihovny skrínig velkých souborů sloučenin najednou, kdy se jednotlivé molekuly mohou jednoznačně identifikovat z velké směsi sloučenin a současně i kvantifikovat (Scheuermann et Neri, 2015).

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Seznam a příprava použitých roztoků, chemikálie

TK H₂O

- Destilovaná voda

Sterilní autoklávovaná destilovaná voda uchovávaná v chladící místnosti.

70% Ethanol

- 99% EtOH (Dr. Kulich Pharma, ČR); TK H₂O

Bylo smícháno 70 ml 99% EtOH s 29 ml TK H₂O.

10x PBS

- NaCl (Sigma-Aldrich, USA); KCl (Sigma-Aldrich, USA); Na₂HPO₄·12H₂O (Lach-Ner, s.r.o., ČR); KH₂PO₄ (Lach-Ner, s.r.o., ČR)

80 g NaCl; 2g KCl; 32,1 g Na₂HPO₄·12H₂O a 2 g KH₂PO₄ bylo rozmícháno v 800 ml destilované vody. Po dokonalém rozpuštění bylo doplněno do 1 litru destilovanou vodou. pH takto připraveného roztoku bylo upraveno na 6,8 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Zásobní roztok byl autoklávován a skladován při laboratorní teplotě.

1x PBS

- 10x PBS; sterilní TK H₂O

Ve flow boxu bylo smícháno 100 ml 10x PBS a 900 ml TK H₂O. pH 1x koncentrovaného zásobního roztoku bylo upraveno na 7,4 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl uchováván v lednici.

PMS

- PMS (Promega, USA); 1x PBS

0,1 g PMS bylo rozpuštěno ve 20 ml 1x PBS, rozdávkováno po 1 ml do mikrozkušavek a zamraženo v -14°C.

Roztok MTS

- MTS reakční pudr (Promega, USA); 1x PBS

2g MTS reakčního pudru bylo rozpuštěno v 1 litru 1x PBS za vzniku čistě žlutého roztoku s výslednou koncentrací 2 mg/ml. pH bylo upraveno na 6 – 6,5 pomocí 1N HCl. Zásobní roztok byl posléze rozdávkován po 100 ml do skleněných lahví, obalen alobalem pro zamezení styku se světlem a zamražen při -80 °C.

Aktinomycin D

- Aktinomycin D v koncentraci 0,5 mg/ml (Merck & Co. Inc., USA); DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

1 ml DMSO byl sterilní stříkačkou přenesen do lahvičky obsahující aktinomycin D a promíchán na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml. Poté byl obsah po 60 µl přenesen do mikrozkušavek a zamražen při -14 °C.

Mitomycin C

- Mitomycin C v koncentraci 10 mg/ml (NORDIC Pharma, ČR); DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

1 ml DMSO byl sterilní stříkačkou přenesen do lahvičky obsahující mitomycin C a promíchán na výslednou koncentraci 10 mg/ml. Poté byl obsah po 60 µl přenesen do mikrozkušavek a zamražen při -80 °C.

Lyzační pufr

- 1M TRIS-HCl (Sigma-Aldrich, USA); 5M KCl (Sigma-Aldrich, USA); TRITON X-100 (Sigma-Aldrich, USA)

Bylo naváženo 7,88 g 1M TRIS-HCl, rozpuštěno ve 40 ml destilované H₂O a pH upraveno na 8,3 pomocí NaOH perliček (MikroCHEM, Slovenská republika), poté byl odměrným válcem doplněn objem do 50 ml. Následně bylo naváženo 18,64 g 5M KCl a rozpuštěno ve 40 ml destilované H₂O a objem doplněn do 50 ml. Do skleněné láhve bylo přeneseno 1 ml TRIS-HCl, 1 ml KCl a 1 ml TRITON X-100 a přidáno 97 ml destilované H₂O. Takto připravený zásobní roztok byl uchováván v lednici.

Cytostatika

- Aktinomycin D (Merck & Co. Inc., USA)
- Mitomycin C (NORDIC Pharma, ČR)
- Gemcitabine hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)
- Irinotecan hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)
- Imatinib mesylate (Sigma-Aldrich, USA)
- Semi-synthetic paclitaxel (Sigma-Aldrich, USA)
- Doxorubicin hydrochloridum (DOXO), (Teva Pharmaceuticals, ČR)
- Daunorubicin hydrochloride (DNR), (Teva Pharmaceuticals, ČR)

4.1.2 Seznam a příprava použitých kultivačních médií

Všechna kultivační média byla připravena i ve variantě bez antibiotik (penicilinu a streptomycinu) pro ověření přítomnosti mykoplasmy.

McCoy médium:

- McCoy's 5A médium (Sigma-Aldrich, USA); fetální bovinní sérum (FCSI) 10% (PAN-BiotechGmbH, Německo); L-glutamin (L-glu) v koncentraci 200 mmol/l (Sigma-Aldrich, USA); penicilin (PNC) + streptomycin (STM), (Sigma-Aldrich, USA)

Sterilní kultivační médium bylo připraveno ve flow boxu smícháním 450 ml McCoy's 5A média s 50 ml FCSI, dále bylo přidáno 7,5 ml L-glu v koncentraci 200 mmol/l a 5 ml směsi PNC a STM (zředěného 100x). Vzniklý roztok byl napojen na vakuum a zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno PlasticProducts AG, Švýcarsko) do plastové láhve a uchováván v lednici k pozdějšímu použití.

RPMI-1640 médium:

- RPMI-1640 médium (Sigma-Aldrich, USA); FCSI 10% (PAN-BiotechGmbH, Německo); PNC + STM (Sigma-Aldrich, USA)

Sterilní kultivační médium bylo připraveno ve flow boxu smícháním 450 ml RPMI-1640, 50 ml FCSI a 5 ml směsi PNC + STM (zředěného 100x). Vzniklý roztok byl napojen na

vakuem a zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) do plastové láhve a uchováván v lednici k pozdějšímu použití.

Iscové médium:

- Iscove's modified dublecco's médium (Sigma-Aldrich, USA); FCSI 10% (PAN-Biotech GmbH, Německo); PNC + STM (Sigma-Aldrich, USA)

Sterilní kultivační médium bylo připraveno ve flow boxu smícháním 450 ml Iscove's modified dublecco's média, 50 ml FCSI a 5 ml směsi PNC + STM (zředěného 100x) a uchováváno v lednici k pozdějšímu použití.

Dublecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

- DMEM-Eagle s L-glutaminem (Sigma-Aldrich, USA); FCSI 10% (PAN-Biotech GmbH, Německo); PNC + STM (Sigma-Aldrich, USA)

Sterilní kultivační médium bylo připraveno ve flow boxu smícháním 450 ml DMEM-Eagle s L-glutaminem, 50 ml FCSI a 5 ml směsi PNC + STM (zředěného 100x). Vzniklý roztok byl napojen na vakuem a zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) do plastové láhve a uchováván v lednici k pozdějšímu použití.

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)

- MEM-Eagle s L-glutaminem (Sigma-Aldrich, USA), pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA), FCSI 10% (PAN-Biotech GmbH, Německo), neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, USA), PNC + STM (Sigma-Aldrich, USA)

Sterilní kultivační médium bylo připraveno ve flow boxu smícháním 450 ml MEM-Eagle, 5 ml pyruvátu sodného, 50 ml FCSI, 500 µl neesenciálních aminokyselin a 5 ml směsi PNC + STM (zředěného 100x). Vzniklý roztok byl napojen na vakuem a zfiltrován přes filtr od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) do plastové lahve a uchováván v lednici k pozdějšímu použití.

4.1.3 Přístrojové vybavení

- Flow box HeraSafe (ThermoScientific, USA)
- CO₂ inkubátor (ThermoScientific, USA)
- Světelný mikroskop (Olympus, Japonsko)

- Vortex IKA Genius 3 (P-LAB, ČR)
- Centrifuga (Eppendorf, Německo)
- Temperovaná vodní lázeň (Mettler, Německo)
- Analytické váhy (Scaltech, USA)
- pH metr (P-LAB, ČR)
- Echo 550 (LabCyte, USA)
- Echo 555 (LabCyte, USA)
- Tecan Freedom EVO (Tecan, Švýcarsko)
- Míchačka MR Hei-Tec (Heidolph Instruments GmbH, Německo)
- EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA)
- EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA)
- Biotek EL406 Washer dispenser (BioTek Instruments, USA)
- PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent Technologies, USA)
- X-peel Automated Microplate Seal Removal (Brooks Life Science Systems, USA)
- SteriStore Self-Sterilizing Automated Incubator (HighResBiosolutions, USA)
- TundraStore Automated Low Temperature Freezer (HighResBiosolutions, USA)
- Vi-cell (BeckmanCoulter, ČR)
- Robotický systém (HighResBiosolutions, USA)

4.1.4 Buněčné linie

- MRC-5 (American Tissue and Cultures Collection- ATCC,USA)
- BJ (ATCC, USA)
- A549 (ATCC,USA)
- U2OS (Dr. Martin Mistrík, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)
- HCT116 (Horizon, UK)
- HCT116 p53 -/- (Horizon, UK)
- CCRF CEM (ATCC,USA)
- CEM DNR(Laboratoř tkáňových kultur, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)
- K562 (ATCC,USA)
- K562-TAX (Laboratoř tkáňových kultur, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)

Tab. II: Přehled používaných buněčných linií

nenádorové buněčné linie	druh uspořádání	původ	kultivační médium
MRC-5	adherentní	fibroblasty	EMEM
BJ	adherentní	fibroblasty	EMEM
nádorové buněčné linie	druh uspořádání	původ	kultivační médium
A549	adherentní	adenokarcinom plic	DMEM
U2OS	adherentní	osteosarkom	McCoy médium
HCT116	adherentní	kolorektální karcinom	McCoy médium
HCT116 p53-/-	adherentní	kolorektální karcinom	McCoy médium
CCRF-CEM	suspenní	akutní lymfoblastická leukémie	RPMI-1640 médium
CEM-DNR	suspenní	akutní lymfoblastická leukémie	RPMI-1640 médium
K562	suspenní	erytromyeloblastická leukémie	Iscové médium
K562-TAX	suspenní	erytromyeloblastická leukémie	Iscové médium

4.2 Metodika

4.2.1 Pasážování buněčných linií

Buněčné linie byly uchovávány v plastových lahvích o objemech 25 ml a 50 ml (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko). Pro experimenty bylo využito 10 buněčných linií (viz Tab. II).

Buňky musí být pasážovány každý druhý den, aby nedošlo ke 100% konfluenci, při které dochází k odumírání buněk. Adherentní buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem a obsah kultivační láhve vylit do odpadu, čímž se odstranilo staré médium. Poté došlo k promytí asi 4 ml 1x PBS pufru pomocí sterilní stříkačky a vše bylo opět vylito do odpadu. Následně bylo do kultivační láhve napipetováno 1 ml TrypLE (Gibco, Life Technologies, USA). TrypLE se využívá jako náhrada enzymu trypsinu a slouží k uvolnění buněk ze dna kultivační láhve. Kultivační láhev byla uzavřena a opatrně nakláněna k dosažení rovnoměrného rozprostření TrypLE po celé ploše láhve a vložena asi na 3 minuty do termostatu nastaveném na 37 °C. Po uplynutí požadované doby byla kultivační láhev vyjmuta z termostatu a zkontrolována pod

mikroskopem, zda jsou buňky již uvolněny z podkladu. Kultivační láhev byla několikrát nakláněna, aby došlo k odlepení buněk z kultivačního podkladu. Působení TrypLE bylo zastaveno přidáním 10 ml odpovídajícího média. Poté byl obsah kultivační láhve promíchán pomocí postupného nasávání do pipety a následného vypouštění (bylo potřeba obsah láhve nenapěnit). Celý obsah kultivační láhve byl přelit do 50 ml falkony a z ní byl odebrán 1 ml do kyvety, ve které se pomocí přístroje Vi-cell určuje životaschopnost buněk, viabilitu buněk a počet buněk v 1 ml buněčné suspenze. Mezitím byla falkona s celým objemem kultivační láhve vložena do centrifugy a stočena na 5 minut při 1200 otáčkách a 20° C. Po stočení byl obsah falkony slit do odpadu, na dně zůstala tzv. peleta. Ta byla resuspendována přidáním vypočítaného množství média a opatrně postupně nasávána a vysávána z pipety. Následně bylo do kultivační láhve napipetováno 15 ml příslušného média a přidáno vypočítané množství buněčné suspenze. Kultivační láhev byla zkontrolována pod mikroskopem a vložena do dalšího pasážování do termostatu nastaveném na teplotu 37 °C a 5 % CO₂ v atmosféře.

Suspenzní buněčné linie neadherují na povrch kultivační láhve, ale nacházejí se volně rozptýlené po celé nádobě, proto nesmí být obsah kultivační láhve vylit. Kultivační láhev byla vyjmuta z termostatu a zkontrolována pod mikroskopem. Celý obsah kultivační láhve byl přelit do 50 ml falkony a z ní byl odebrán 1 ml do kyvety. Kyveta byla vložena do přístroje Vi-cell. Do kultivační láhve bylo nanášeno 15 ml příslušného média a vypočítané množství buněčné suspenze. Kultivační láhev byla zkontrolována pod mikroskopem a vložena do příštího pasážování do termostatu.

4.2.2 Testování mykoplasmy

Jednou týdně bylo potřeba buněčné linie otestovat na přítomnost mykoplasmy, která způsobuje odumírání buněk. Pro testování mykoplasmy byly buněčné linie uchovávány v médiích, která byla připravena bez použití antibiotik.

U adherentních buněčných linií bylo potřeba odlít půlku média a škrabkou seškrábnout plochu o velikosti přibližně 2x2 cm, obsah kultivační láhve byl přelit do 15 ml falkony. U suspenzních buněčných linií bylo z kultivační láhve přelito do 10 ml falkony přibližně 5 ml buněčné suspenze. Obsah kultivační láhve byl přelit do 15 ml falkony a z ní byl odebrán 1 ml do kyvety, která byla vložena do přístroje Vi-cell, který určil počet buněk v 1 ml buněčné suspenze. Na lyzát bylo zapotřebí 0,25x10⁶ buněk. Toto množství bylo vyděleno počtem buněk v 1 ml. Vypočítaný objem byl přenesen do 15 ml falkony a stočen v centrifuze na 7 min při 2500 rpm a 20 °C. Supernatant byl odsát a na dně falkony ponechána pouze peleta.

Následně bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufru, obsah byl resuspendován a přenesen do mikrozkuhavky. Do mikrozkuhavky bylo přidáno 0,5 μ l proteinázy K a vloženo do inkubátoru přes noc při teplotě 37 °C. Následně byla přítomnost mykoplasmy otestována pomocí PCR reakce.

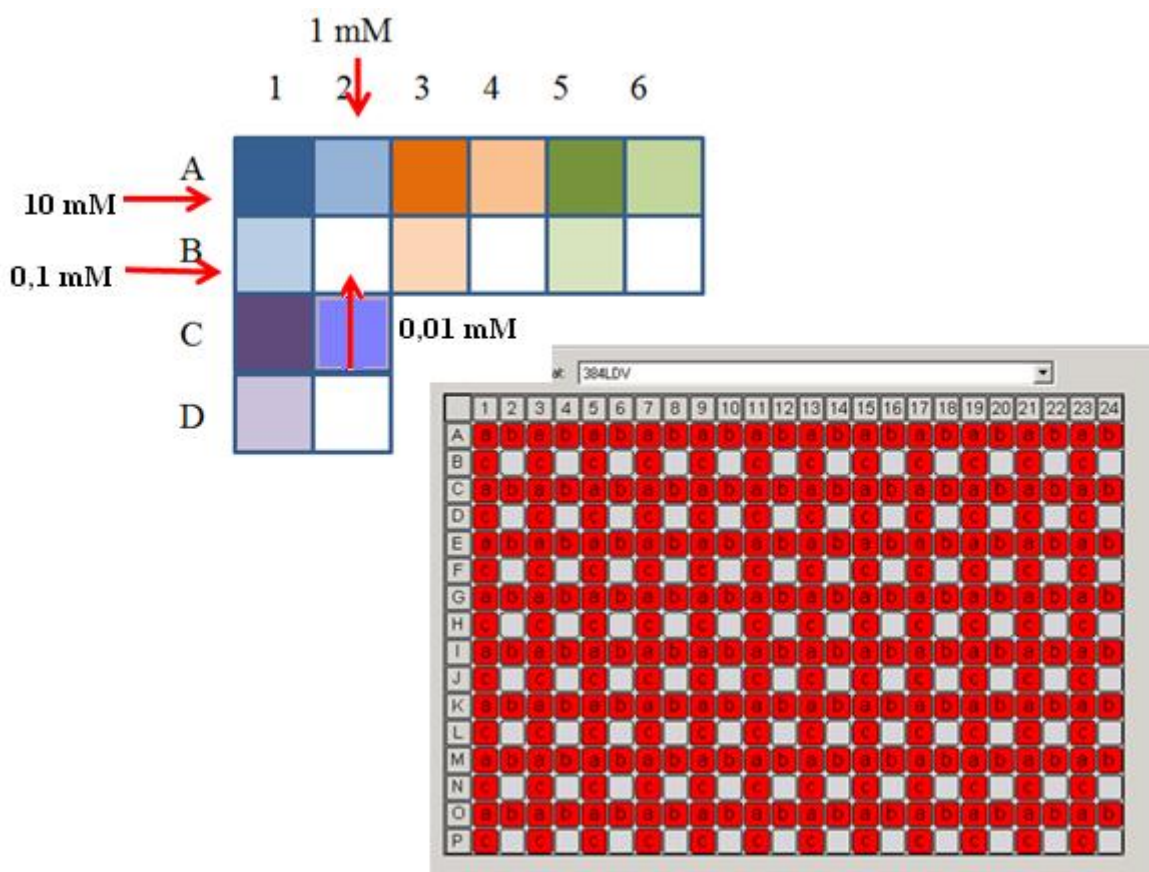
4.2.3 Příprava buněčných linií na experiment

Nejdříve proběhlo pasážování buněk, které je popsáno v kapitole 4.2.1 *Pasážování buněčných linií* až po bod, kdy došlo k vypočítání počtu buněk v 1 ml na přístroji Vi-cell a buněčná suspenze byla stočena. Experiment probíhal na deseti buněčných liniích (MRC-5, BJ, A549, U2OS, HCT116, HCT116 p53-/-, CCRF-CEM, CEM-DNR, K562, K562-TAX). Každá buněčná linie potřebovala pro experiment jiný počet buněk, který byl vypočítán z výsledku analyzáru.

Byly přichystány 384- jamkové a 1536- jamkové destičky. Každá buněčná linie byla nanášena na jeden druh destičky. Na přístroji Biotek EL406 se u 384- jamkových destiček vždy do prvního a posledního sloupce pipetovalo 30 μ l média, které sloužilo jako blank a do všech ostatních jamek 30 μ l dané buněčné suspenze. Do 1536- jamkových destiček bylo nanášeno 6 μ l blanku a 6 μ l buněčné suspenze. Aby nedošlo k promíchání jednotlivých buněčných linií mezi sebou, bylo potřeba po napipetování každé buněčné linie kazetu promýt ethanolem a médiem. Destičky byly vloženy do SteriStoru, ve kterém byla nastavena teplota 37 °C, vlhkost byla 95 % a obsah 5 % CO₂ a 20 % O₂ v atmosféře.

4.2.4 Testované látky a jejich příprava

Všechny testované látky (cytostatika, LOPAC90, LOPAC1280) byly uskladněné v 96- jamkových panelech Tube Rack se šroubovatelnými vialkami o koncentraci 10 mM v DMSO při -20 °C. Před experimentem se přichystaly 384- jamkové zdrojové (source) destičky s testovanými látkami pomocí přístroje Tecan. Na zdrojové destičce se nacházelo 96 látek ve 4 koncentracích 10; 1; 0,1 a 0,01 mM, schéma rozložení je na Obr. 6.



Obr. 6: Schéma rozložení látek ve zdrojové destičce

Takto připravené destičky byly zalepeny hliníkovou fólií na přístroji PlateLock při teplotě 157 °C a skladovány v TundraStoru při 16 °C a vlhkosti 20 %.

4.2.5 Skrining vhodných pozitivních kontrol pro testy cytotoxicity v HTS

4.2.5.1 Ovlivnění buněk pomocí cytostatik

Po 24 hodinách od nasazení byly destičky s buňkami vyjmuty ze SteriStoru a source plate s cytostatiky z TundraStoru. Source plate byla stočena na 1000 otáček, 2 min, při laboratorní teplotě. Pomocí přístroje Echo 550 byla cytostatika přenesena na 384- jamkové destičky, každé cytostatikum bylo nanášeno v dubletech a v 7 koncentracích podle tabulky č. III.

Tab. III: Objem nanesených cytostatik a jejich konečné koncentrace u 384- jamkových destiček

koncentrace zásobního roztoku [mM]	pipetovaný objem [nl]	konečná koncentrace [μ M]
10	150	50
10	37,5	12,5
10	10	3,125
1	22,5	0,781
1	5	0,195
0,1	15	0,048
0,1	5	0,012

1536- jamkové destičky byly ovlivněny na přístroji Echo 555, každá látka byla nanesena v dubletech a 7 koncentracích podle tabulky č. IV.

Tab. IV: Objem nanesených cytostatik a jejich konečné koncentrace u 1536- jamkových destiček

koncentrace zásobního roztoku [mM]	pipetovaný objem [nl]	konečná koncentrace [μ M]
10	30	50
10	7,5	12,5
1	18,75	3,125
1	4,5	0,781
0,1	11,7	0,195
0,1	3	0,048
0,01	7,2	0,012

Všechny destičky, na kterých byly nanесeny buňky, cytostatika a kontroly byly vloženy na 72 hodin do SteriStoru.

4.2.5.2 MTS test

Roztok MTS byl vyjmut z mrazáku, kde byl skladován při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vložen do temperované vodní lázně. Po rozmrazení byl do roztoku přidán 1 ml PMS. Příprava jednotlivých roztoků je uvedena v kapitole 4.1.1 *Seznam a příprava použitých roztoků, chemikálie*. Ze SteriStoru byly vyjmuty 384- a 1536- jamkové panely a pomocí přístroje Biotek EL406 bylo do všech jamek u 384- jamkových destiček nanесeno 4 μ l MTS a u 1536- jamkových destiček 1 μ l MTS. Poté

byly panely vloženy asi na 90 minut do SteriStoru. Destičky byly průběžně kontrolovány, zda již dochází k zabarvení. Jakmile byly všechny panely zabarveny, byly vyjmuty ze SteriStoru. Na přístroji EnVision Multimode Plate Reader byla změřena absorbance ve všech jamkách při vlnové délce $\lambda = 490$ nm. Výsledky byly uloženy v programu MS Office Excel 2007 a zpracovány v programu Dotmatics, kde byly získány hodnoty IC50. Následně byly vyhodnoceny průměry dat, směrodatné odchylky a proveden t test.

Každé cytostatikum a koncentrace byly na každém druhu destičky testovány ve 3 opakováních.

4.2.6 První (primární) testování LOPAC knihoven

4.2.6.1 Ovlivnění buněk LOPAC knihovny

Po 24 hodinách byly destičky s buňkami vyjmuty ze SteriStoru a source plate s látkami z TundraStoru. Source plate byla stočena na 1000 otáček, 2 min, při laboratorní teplotě. Na přístroji Echo 550 byly látky nanášeny na 384- jamkové destičky. U LOPAC90 byly látky z 1 source plate přeneseny do 1 destičky s buňkami. U LOPAC1280 knihovny byly látky z 1 source plate přeneseny do 4 destiček s buňkami. Do všech destiček bylo pipetováno 150 nl látek pro dosažení 50 μ M koncentrace a všechny byly analyzovány v dubletech.

Všechny destičky s buňkami obsahovaly pozitivní a negativní kontrolu. Jako negativní kontrola sloužil DMSO, který se uchovává při laboratorní teplotě. Jako pozitivní kontroly byla z předchozího experimentu zvolena cytostatika aktinomycin D a mitomycin C. Aktinomycin D se uchovává při -18 °C a mitomycin C při -80 °C. Všechny destičky s buňkami, látkami a kontrolami byly vloženy na 72 hodin do SteriStoru, ve kterém byla nastavena teplota 37 °C; vlhkost 95 % a 5 % CO₂ a 20 % O₂ v atmosféře.

4.2.6.2 MTS test

Barvení destiček a měření absorbance bylo provedeno stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 4.2.5.2 *MTS test*.

4.2.7 Druhé (sekundární) testování aktivních látek z LOPAC90

4.2.7.1 Ovlivnění buněk knihovnou LOPAC90

V tomto experimentu se dále testovaly látky z LOPAC90 knihovny, které byly již testovány v kapitole 4.2.6 *První (primární) testování LOPAC knihoven* při 50 μM koncentraci. Látky, které po následném vyhodnocení v programu Dotmatics vyšly jako aktivní, se dále testovaly při 7 koncentracích. Z celkem 90 testovaných látek bylo u buněčné linie A549 aktivních 31 látek, u BJ 23 látek, u MRC-5 bylo aktivních 27 látek, u HCT116p53-/- to bylo 32 látek, u U2OS 31 látek, u HCT116 31 látek, u K562-TAX 50 látek, u CCRF-CEM 46 látek, u CEM-DNR 42 látek a u K562 se dále testovalo 34 látek. Nanesení látek probíhalo stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 4.2.5.1 *Ovlivnění buněk pomocí cytostatik*. U každé buněčné linie byly pozitivní jiné látky, proto se protokoly na přístrojích Echo 550 i Echo 555 musely pro každou buněčnou linii upravit zvlášť.

Všechny destičky obsahující buňky, látky a kontroly byly vloženy na 72 hodin do SteriStoru. Každá látka byla nanesena v dubletech a 7 koncentracích.

4.2.7.2 MTS test

Barvení destiček a měření absorbance bylo provedeno stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 4.2.5.2 *MTS test*.

Většina kroků výše popsaného testování se prováděla v robotickém režimu, který byl řízený prostřednictvím programu Cellario.

5 Výsledky

Přenos jakýchkoli testů do HTS a 384- jamkového formátu vyžaduje precizní validaci, zaměřenou na biologickou a farmakologickou relevanci a robustnost metody. Z tohoto důvodu bylo na panelu 10 buněčných linií testováno nejen více cytostatik jako možné pozitivní kontroly, ale i chemická knihovna LOPAC.

5.1 Stanovení vhodných pozitivních kontrol pro testy cytotoxicity v HTS

Pro správné vyhodnocení cytotoxických účinků testovaných látek jsou důležité stabilní pozitivní a negativní kontroly, resp. minimální a maximální signál. Proto byly všechny buněčné linie ovlivněny 8 cytostatiky s různým mechanismem účinku (viz tabulka V), (Spano et al., 2007; Ensafi et al., 2014; Cavalcante et Monteiro, 2014; Bobeničová et al., 2014; Gacic et al., 2016; Barbuti et Chen, 2015; Yang et al., 2014).

Tab. V: Porovnání mechanismu účinku cytostatik

cytostatikum	mechanismus účinku
aktinomycin D	inhibice transkripce
mitomycin C	alkylace, interkalace do DNA
gemcitabine	analogue pyrimidinů
irinotecan	inhibice topoizomerázy I
imatinib	inhibice tyrosin-kinázy
paclitaxel	hyperstabilizace mikrotubulů
DNR	inhibice topoizomerázy II, interkalace do DNA
DOXO	inhibice topoizomerázy II, interkalace do DNA

Pro každé cytostatikum byla stanovena hodnota IC₅₀ a směrodatná odchylka. Ovlivnění probíhalo na 384- a 1536- jamkových destičkách. Získané hodnoty IC₅₀ pro dané cytostatikum z 384- a 1536- jamkové destičky byly porovnány využitím t testu, ke zjištění jestli jsou mezi 384- a 1536- jamkovou destičkou statistické rozdíly. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce VI a VII. Tabulka VI znázorňuje výsledky u adherentních buněčných linií a tabulka VII výsledky u suspenzních buněčných linií. Nejvíce statisticky významných rozdílů v IC₅₀ hodnotách jednotlivých cytostatik stanovených na 384- a 1536- jamkových destičkách bylo pozorované na buněčných liniích A549 a U2OS, na rozdíl od buněčných linií HCT116 a HCT116 p53^{-/-}, kde byly rozdíly nejmenší.

Ve všech buněčných liniích, nádorových i nenádorových, byl pozorovaný silný cytotoxický účinek cytostatik DNR, DOXO, aktinomycinu D a mitomycinu C. Jelikož DNR a DOXO mají fluorescenční vlastnosti, jako pozitivní kontroly (low control, minimální signál) byly zvoleny aktinomycin D a mitomycin C. Tato cytostatika byla používána jako pozitivní kontroly ve všech následujících experimentech. Jako negativní kontrola (high control, maximální signál) byl ve všech experimentech zvolen DMSO, protože v tomto rozpouštědle byly všechny látky uskladněné.

Tab. VI: Hodnoty IC50 pro testovaná cytostatika u adherentních buněčných linií

Modře jsou znázorněny výsledky získané z 384- jamkových panelů a červeně výsledky získané z 1536- jamkových panelů. Zeleně jsou podbarveny výsledky, mezi nimiž byl zjištěn statistický rozdíl. Data představují průměrné hodnoty IC50 [μM] \pm SD

	MRC-5	BJ	A549	U2OS	HCT116	HCT116 p53-/-
actinomycin D	0,006 \pm 0,0020	0,213 \pm 0,018	0,004 \pm 0,001	0,002 \pm 0,0004	0,0002 \pm 0,00004	0,0008 \pm 0,0002
	0,006 \pm 0,0007	0,002 \pm 0,0009	0,001 \pm 0,0003	0,0008 \pm 0,0003	0,0002 \pm 0,00006	0,0008 \pm 0,0001
mitomycin C	3,425 \pm 1,008	24,115 \pm 4,187	0,576 \pm 0,183	2,297 \pm 0,641	0,393 \pm 0,190	1,972 \pm 0,809
	0,673 \pm 0,022	16,691 \pm 7,475	0,294 \pm 0,155	0,893 \pm 0,421	0,464 \pm 0,300	1,689 \pm 0,462
gemcitabine	>50 \pm 0	>50 \pm 0	0,050 \pm 0,006	0,181	0,028 \pm 0,006	0,408 \pm 0,135
	>50 \pm 0	>50 \pm 0	0,177 \pm 0,148	0,055 \pm 0,029	0,040 \pm 0,028	0,189 \pm 0,129
irinotecan	46,991 \pm 2,857	>50 \pm 0	35,570 \pm 7,191	29,105 \pm 6,695	4,470 \pm 1,650	10,029 \pm 0,319
	44,210 \pm 5,399	49,838 \pm 0,456	10,461 \pm 5,217	12,007 \pm 5,344	4,517 \pm 3,819	13,831 \pm 6,104
imatinib	31,167 \pm 3,419	49,838 \pm 0,396	38,038 \pm 1,871	43,107 \pm 5,489	28,143 \pm 3,789	36,699 \pm 7,041
	28,094 \pm 4,449	49,392 \pm 1,717	44,010 \pm 6,271	30,326 \pm 4,185	37,403 \pm 13,498	27,543 \pm 4,462
paclitaxel	>50 \pm 0	>50 \pm 0	<0,0122 \pm 0	0,037 \pm 0,010	<0,00122 \pm 0	<0,00122 \pm 0
	>50 \pm 0	>50 \pm 0	0,017 \pm 0,0108	0,013 \pm 0,005	0,0067 \pm 0,005	0,015 \pm 0,013
DNR	0,813 \pm 0,109	1,026 \pm 0,237	0,242 \pm 0,045	0,149 \pm 0,032	0,042 \pm 0,014	0,122 \pm 0,041
	0,979 \pm 0,322	0,946 \pm 0,123	0,068 \pm 0,022	0,041 \pm 0,011	0,041 \pm 0,021	0,092 \pm 0,033
DOXO	2,539 \pm 0,463	1,206 \pm 0,055	0,810 \pm 0,120	0,321 \pm 0,038	0,079 \pm 0,011	0,358 \pm 0,090
	2,873 \pm 1,015	1,041 \pm 0,053	0,337 \pm 0,223	0,179 \pm 0,061	0,107 \pm 0,047	0,369 \pm 0,093

Tab. VII: Hodnoty IC50 pro testovaná cytostatika u suspenzních buněčných linií

Modře jsou znázorněny výsledky získané z 384- jamkových panelů a červeně výsledky získané z 1536- jamkových panelů. Zeleně jsou podbarveny výsledky, mezi nimiž byl zjištěn statistický rozdíl. Data představují průměrné hodnoty IC50 [μM] \pm SD

	CCRF-CEM	CEM-DNR	K562	K562-TAX
actinomycin D	0,0004 \pm 0,00007	0,005 \pm 0,0007	0,0003 \pm 0,00006	0,002 \pm 0,0002
	0,0003 \pm 0,000006	0,005 \pm 0,0023	0,0004 \pm 0,00002	0,003 \pm 0,0004
mitomycin C	0,058 \pm 0,015	0,635 \pm 0,080	0,542 \pm 0,145	0,231 \pm 0,082
	0,053 \pm 0,009	0,696 \pm 0,288	0,459 \pm 0,085	0,361 \pm 0,085
gemcitabine	0,016 \pm 0,001	0,104 \pm 0,015	0,101 \pm 0,055	0,049 \pm 0,006
	0,010 \pm 0,004	0,104 \pm 0,030	0,073 \pm 0,027	0,071 \pm 0,007
irinotecan	0,481 \pm 0,109	30,757 \pm 3,262	3,469 \pm 1,444	21,815 \pm 3,101
	0,279 \pm 0,049	31,433 \pm 6,184	1,777 \pm 0,205	23,691 \pm 3,283
imatinib	18,017 \pm 1,299	27,037 \pm 1,736	0,146 \pm 0,029	22,057 \pm 4,040
	19,171 \pm 2,787	24,182 \pm 2,460	0,118 \pm 0,009	22,261 \pm 0,880
paclitaxel	<0,00122 \pm 0	0,732 \pm 0,045	<0,00122 \pm 0	0,298 \pm 0,077
	0,003 \pm 0,0008	0,866 \pm 0,173	0,0031 \pm 0,0005	0,572 \pm 0,123
DNR	0,003 \pm 0,0007	0,658 \pm 0,027	0,019 \pm 0,005	0,202 \pm 0,063
	0,005 \pm 0,0009	0,840 \pm 0,471	0,018 \pm 0,0004	0,356 \pm 0,027
DOXO	0,011 \pm 0,002	1,064 \pm 0,156	0,071 \pm 0,035	0,316 \pm 0,099
	0,010 \pm 0,002	1,567 \pm 0,552	0,066 \pm 0,009	0,933 \pm 0,192

5.2 První (primární) testování LOPAC knihoven

V primárním testování se na všech buněčných liniích sledoval účinek látek z knihoven LOPAC90 a LOPAC1280 při jedné (50 μ M) koncentraci. Testování probíhalo na 384-jamkových destičkách (Obr. 7). Každá látka byla otestována 6x ve 2 biologických opakováních.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	B 1,1,B	C 1,1,C	L 1,1,L	L 2,1,L	L 3,1,L	L 4,1,L	L 5,1,L	L 6,1,L	L 7,1,L	H 2,1,H	H 3,1,H	H 4,1,H	H 5,1,H	H 6,1,H	H 7,1,H	H 8,1,H	C 2,1,C	C 3,1,C	C 4,1,C	C 5,1,C	C 6,1,C	C 7,1,C	C 8,1,C	B 3,1,B
B	B 1,2,B	H 1,1,H	S _{1,1}	S _{1,2}	S _{1,3}	S _{15,1}	S _{15,2}	S _{15,3}	S _{29,1}	S _{29,2}	S _{29,3}	S _{43,1}	S _{43,2}	S _{43,3}	S _{57,1}	S _{57,2}	S _{57,3}	S _{71,1}	S _{71,2}	S _{71,3}	S _{85,1}	S _{85,2}	S _{85,3}	B 3,2,B
C	B 1,3,B	H 1,2,H	S _{2,1}	S _{2,2}	S _{2,3}	S _{16,1}	S _{16,2}	S _{16,3}	S _{30,1}	S _{30,2}	S _{30,3}	S _{44,1}	S _{44,2}	S _{44,3}	S _{58,1}	S _{58,2}	S _{58,3}	S _{72,1}	S _{72,2}	S _{72,3}	S _{86,1}	S _{86,2}	S _{86,3}	B 3,3,B
D	B 1,4,B	H 1,3,H	S _{3,1}	S _{3,2}	S _{3,3}	S _{17,1}	S _{17,2}	S _{17,3}	S _{31,1}	S _{31,2}	S _{31,3}	S _{45,1}	S _{45,2}	S _{45,3}	S _{59,1}	S _{59,2}	S _{59,3}	S _{73,1}	S _{73,2}	S _{73,3}	S _{87,1}	S _{87,2}	S _{87,3}	B 3,4,B
E	B 1,5,B	H 1,4,H	S _{4,1}	S _{4,2}	S _{4,3}	S _{18,1}	S _{18,2}	S _{18,3}	S _{32,1}	S _{32,2}	S _{32,3}	S _{46,1}	S _{46,2}	S _{46,3}	S _{60,1}	S _{60,2}	S _{60,3}	S _{74,1}	S _{74,2}	S _{74,3}	S _{88,1}	S _{88,2}	S _{88,3}	B 3,5,B
F	B 1,6,B	H 1,5,H	S _{5,1}	S _{5,2}	S _{5,3}	S _{19,1}	S _{19,2}	S _{19,3}	S _{33,1}	S _{33,2}	S _{33,3}	S _{47,1}	S _{47,2}	S _{47,3}	S _{61,1}	S _{61,2}	S _{61,3}	S _{75,1}	S _{75,2}	S _{75,3}	S _{89,1}	S _{89,2}	S _{89,3}	B 3,6,B
G	B 1,7,B	H 1,6,H	S _{6,1}	S _{6,2}	S _{6,3}	S _{20,1}	S _{20,2}	S _{20,3}	S _{34,1}	S _{34,2}	S _{34,3}	S _{48,1}	S _{48,2}	S _{48,3}	S _{62,1}	S _{62,2}	S _{62,3}	S _{76,1}	S _{76,2}	S _{76,3}	S _{90,1}	S _{90,2}	S _{90,3}	B 3,7,B
H	B 1,8,B	H 1,7,H	S _{7,1}	S _{7,2}	S _{7,3}	S _{21,1}	S _{21,2}	S _{21,3}	S _{35,1}	S _{35,2}	S _{35,3}	S _{49,1}	S _{49,2}	S _{49,3}	S _{63,1}	S _{63,2}	S _{63,3}	S _{77,1}	S _{77,2}	S _{77,3}	S _{91,1}	S _{91,2}	S _{91,3}	B 3,8,B
I	L 8,1,L	L 9,1,L	S _{8,1}	S _{8,2}	S _{8,3}	S _{22,1}	S _{22,2}	S _{22,3}	S _{36,1}	S _{36,2}	S _{36,3}	S _{50,1}	S _{50,2}	S _{50,3}	S _{64,1}	S _{64,2}	S _{64,3}	S _{78,1}	S _{78,2}	S _{78,3}	S _{92,1}	S _{92,2}	S _{92,3}	B 3,9,B
J	L 8,2,L	L 9,2,L	S _{9,1}	S _{9,2}	S _{9,3}	S _{23,1}	S _{23,2}	S _{23,3}	S _{37,1}	S _{37,2}	S _{37,3}	S _{51,1}	S _{51,2}	S _{51,3}	S _{65,1}	S _{65,2}	S _{65,3}	S _{79,1}	S _{79,2}	S _{79,3}	S _{93,1}	S _{93,2}	S _{93,3}	B 3,10,B
K	L 8,3,L	L 9,3,L	S _{10,1}	S _{10,2}	S _{10,3}	S _{24,1}	S _{24,2}	S _{24,3}	S _{38,1}	S _{38,2}	S _{38,3}	S _{52,1}	S _{52,2}	S _{52,3}	S _{66,1}	S _{66,2}	S _{66,3}	S _{80,1}	S _{80,2}	S _{80,3}	S _{94,1}	S _{94,2}	S _{94,3}	B 3,11,B
L	L 8,4,L	L 9,4,L	S _{11,1}	S _{11,2}	S _{11,3}	S _{25,1}	S _{25,2}	S _{25,3}	S _{39,1}	S _{39,2}	S _{39,3}	S _{53,1}	S _{53,2}	S _{53,3}	S _{67,1}	S _{67,2}	S _{67,3}	S _{81,1}	S _{81,2}	S _{81,3}	S _{95,1}	S _{95,2}	S _{95,3}	B 3,12,B
M	L 8,5,L	L 9,5,L	S _{12,1}	S _{12,2}	S _{12,3}	S _{26,1}	S _{26,2}	S _{26,3}	S _{40,1}	S _{40,2}	S _{40,3}	S _{54,1}	S _{54,2}	S _{54,3}	S _{68,1}	S _{68,2}	S _{68,3}	S _{82,1}	S _{82,2}	S _{82,3}	S _{96,1}	S _{96,2}	S _{96,3}	B 3,13,B
N	L 8,6,L	L 9,6,L	S _{13,1}	S _{13,2}	S _{13,3}	S _{27,1}	S _{27,2}	S _{27,3}	S _{41,1}	S _{41,2}	S _{41,3}	S _{55,1}	S _{55,2}	S _{55,3}	S _{69,1}	S _{69,2}	S _{69,3}	S _{83,1}	S _{83,2}	S _{83,3}	S _{97,1}	S _{97,2}	S _{97,3}	B 3,14,B
O	L 8,7,L	L 9,7,L	S _{14,1}	S _{14,2}	S _{14,3}	S _{28,1}	S _{28,2}	S _{28,3}	S _{42,1}	S _{42,2}	S _{42,3}	S _{56,1}	S _{56,2}	S _{56,3}	S _{70,1}	S _{70,2}	S _{70,3}	S _{84,1}	S _{84,2}	S _{84,3}	S _{98,1}	S _{98,2}	S _{98,3}	B 3,15,B
P	B 2,1,B	C 9,1,C	C 10,1,C	C 11,1,C	C 12,1,C	C 13,1,C	C 14,1,C	C 15,1,C	C 16,1,C	C 17,1,C	C 18,1,C	C 19,1,C	C 20,1,C	C 21,1,C	C 22,1,C	C 23,1,C	C 24,1,C	C 25,1,C	C 26,1,C	C 27,1,C	C 28,1,C	C 29,1,C	C 30,1,C	B 3,16,B

Obr. 7: Rozložení testovaných látek na 384-jamkové destičce při primárním testování (B-blank, C- buňky bez ovlivnění, H- high control/negativní kontrola, L-low control/pozitivní kontrola, S-sample/testované látky)

V programu Dotmatics se pro každou látku stanovila hodnota PI, na základě které se látky rozdělily na aktivní (PI vyšší než 50) a neaktivní (PI nižší než 50). Z důvodu velkého množství dat je na obrázku 8 uvedený pouze zkrácený příklad vypočítaných PI hodnot náhodně zvolených látek z LOPAC knihovny pro buněčnou linii CCRF-CEM.

plate	well	sample id	PI	pass	conc	inc	✓	✗
1 (Plate 1)	B3	LEM00006641	102.86	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	B4	LEM00006641	104.52	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	B5	LEM00006641	104.76	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C3	LEM00006801	104.76	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	C4	LEM00006801	104.28	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C5	LEM00006801	105.23	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D3	LEM00006651	104.52	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	D4	LEM00006651	104.76	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D5	LEM00006651	104.76	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E3	LEM00006811	-4.8464	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	E4	LEM00006811	-2.474	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E5	LEM00006811	0.3728	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F3	LEM00006661	46.16	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	F4	LEM00006661	51.379	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F5	LEM00006661	46.16	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G3	LEM00006821	-0.8134	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	G4	LEM00006821	-4.8464	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G5	LEM00006821	-7.2188	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H3	LEM00006671	75.103	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	H4	LEM00006671	76.052	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H5	LEM00006671	75.814	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I3	LEM00006831	104.52	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	I4	LEM00006831	101.67	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I5	LEM00006831	104.99	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J3	LEM00006681	99.775	■	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	J4	LEM00006681	101.2	■	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J5	LEM00006681	100.96	■	50.0uM	+		

Obr. 8: Procento inhibice růstu CCRF-CEM buněk, příklad zobrazení výsledků v programu Dotmatics

Z obou knihoven bylo celkem otestováno 1370 látek. Nejvíce látek, které byly identifikovány jako aktivní, se nacházelo v buněčných liniích K562-TAX (480 látek) a CCRF-CEM (484 látek). Podle předpokladu se jako nejméně citlivé ukázaly být nenádorové buněčné linie BJ (128 látek) a MRC-5 (165 látek). Počet identifikovaných aktivních látek pro všechny buněčné linie je souhrnně zobrazen v tabulce VIII.

Tab. VIII: Počet identifikovaných aktivních látek u LOPAC1280 a LOPAC90

buněčná linie	počet aktivních látek LOPAC1280	počet aktivních látek LOPAC90
MRC-5	138	27
BJ	105	23
A549	199	31
U2OS	223	31
HCT116	269	31
HCT116 p53-/-	279	32
CCRF-CEM	438	46
CEM-DNR	355	42
K562	338	34
K562-TAX	430	50

5.3 Druhé (sekundární) testování aktivních látek z LOPAC90

Látky z knihovny LOPAC90, které se při primárním testování chovaly jako aktivní, postoupily do druhého (sekundárního) testování. V tomto kroku bylo cílem stanovit hodnotu IC50 pro danou látku a buněčnou linii. Testování se provádělo na 384- a 1536- jamkových destičkách. Schéma destičky je znázorněno na obrázku 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	B 1,1,B	C 1,1,C	L 3,1,L	L 4,1,L	L 5,1,L	L 6,1,L	L 7,1,L	L 8,1,L	L 9,1,L	H 2,1,H	H 3,1,H	H 4,1,H	H 5,1,H	H 6,1,H	H 7,1,H	H 8,1,H	C 3,1,C	C 4,1,C	C 5,1,C	C 6,1,C	C 7,1,C	C 8,1,C	C 9,1,C	B 3,1,B
B	B 1,2,B	H 1,1,H	S 5,1,1	S 5,1,2	S 5,1,3	S 5,1,4	S 5,1,5	S 5,1,6	S 5,1,7	S 5,15,1	S 5,15,2	S 5,15,3	S 5,15,4	S 5,15,5	S 5,15,6	S 5,15,7	S 5,29,1	S 5,29,2	S 5,29,3	S 5,29,4	S 5,29,5	S 5,29,6	S 5,29,7	B 3,2,B
C	B 1,3,B	H 1,2,H	S 5,2,1	S 5,2,2	S 5,2,3	S 5,2,4	S 5,2,5	S 5,2,6	S 5,2,7	S 5,16,1	S 5,16,2	S 5,16,3	S 5,16,4	S 5,16,5	S 5,16,6	S 5,16,7	S 5,30,1	S 5,30,2	S 5,30,3	S 5,30,4	S 5,30,5	S 5,30,6	S 5,30,7	B 3,3,B
D	B 1,4,B	H 1,3,H	S 5,3,1	S 5,3,2	S 5,3,3	S 5,3,4	S 5,3,5	S 5,3,6	S 5,3,7	S 5,17,1	S 5,17,2	S 5,17,3	S 5,17,4	S 5,17,5	S 5,17,6	S 5,17,7	S 5,31,1	S 5,31,2	S 5,31,3	S 5,31,4	S 5,31,5	S 5,31,6	S 5,31,7	B 3,4,B
E	B 1,5,B	H 1,4,H	S 5,4,1	S 5,4,2	S 5,4,3	S 5,4,4	S 5,4,5	S 5,4,6	S 5,4,7	S 5,18,1	S 5,18,2	S 5,18,3	S 5,18,4	S 5,18,5	S 5,18,6	S 5,18,7	S 5,32,1	S 5,32,2	S 5,32,3	S 5,32,4	S 5,32,5	S 5,32,6	S 5,32,7	B 3,5,B
F	B 1,6,B	H 1,5,H	S 5,5,1	S 5,5,2	S 5,5,3	S 5,5,4	S 5,5,5	S 5,5,6	S 5,5,7	S 5,19,1	S 5,19,2	S 5,19,3	S 5,19,4	S 5,19,5	S 5,19,6	S 5,19,7	S 5,33,1	S 5,33,2	S 5,33,3	S 5,33,4	S 5,33,5	S 5,33,6	S 5,33,7	B 3,6,B
G	B 1,7,B	H 1,6,H	S 5,6,1	S 5,6,2	S 5,6,3	S 5,6,4	S 5,6,5	S 5,6,6	S 5,6,7	S 5,20,1	S 5,20,2	S 5,20,3	S 5,20,4	S 5,20,5	S 5,20,6	S 5,20,7	S 5,34,1	S 5,34,2	S 5,34,3	S 5,34,4	S 5,34,5	S 5,34,6	S 5,34,7	B 3,7,B
H	B 1,8,B	H 1,7,H	S 5,7,1	S 5,7,2	S 5,7,3	S 5,7,4	S 5,7,5	S 5,7,6	S 5,7,7	S 5,21,1	S 5,21,2	S 5,21,3	S 5,21,4	S 5,21,5	S 5,21,6	S 5,21,7	S 5,35,1	S 5,35,2	S 5,35,3	S 5,35,4	S 5,35,5	S 5,35,6	S 5,35,7	B 3,8,B
I	L 1,1,L	L 2,1,L	S 5,8,1	S 5,8,2	S 5,8,3	S 5,8,4	S 5,8,5	S 5,8,6	S 5,8,7	S 5,22,1	S 5,22,2	S 5,22,3	S 5,22,4	S 5,22,5	S 5,22,6	S 5,22,7	S 5,36,1	S 5,36,2	S 5,36,3	S 5,36,4	S 5,36,5	S 5,36,6	S 5,36,7	B 3,9,B
J	L 1,2,L	L 2,2,L	S 5,9,1	S 5,9,2	S 5,9,3	S 5,9,4	S 5,9,5	S 5,9,6	S 5,9,7	S 5,23,1	S 5,23,2	S 5,23,3	S 5,23,4	S 5,23,5	S 5,23,6	S 5,23,7	S 5,37,1	S 5,37,2	S 5,37,3	S 5,37,4	S 5,37,5	S 5,37,6	S 5,37,7	B 3,10,B
K	L 1,3,L	L 2,3,L	S 5,10,1	S 5,10,2	S 5,10,3	S 5,10,4	S 5,10,5	S 5,10,6	S 5,10,7	S 5,24,1	S 5,24,2	S 5,24,3	S 5,24,4	S 5,24,5	S 5,24,6	S 5,24,7	S 5,38,1	S 5,38,2	S 5,38,3	S 5,38,4	S 5,38,5	S 5,38,6	S 5,38,7	B 3,11,B
L	L 1,4,L	L 2,4,L	S 5,11,1	S 5,11,2	S 5,11,3	S 5,11,4	S 5,11,5	S 5,11,6	S 5,11,7	S 5,25,1	S 5,25,2	S 5,25,3	S 5,25,4	S 5,25,5	S 5,25,6	S 5,25,7	S 5,39,1	S 5,39,2	S 5,39,3	S 5,39,4	S 5,39,5	S 5,39,6	S 5,39,7	B 3,12,B
M	L 1,5,L	L 2,5,L	S 5,12,1	S 5,12,2	S 5,12,3	S 5,12,4	S 5,12,5	S 5,12,6	S 5,12,7	S 5,26,1	S 5,26,2	S 5,26,3	S 5,26,4	S 5,26,5	S 5,26,6	S 5,26,7	S 5,40,1	S 5,40,2	S 5,40,3	S 5,40,4	S 5,40,5	S 5,40,6	S 5,40,7	B 3,13,B
N	L 1,6,L	L 2,6,L	S 5,13,1	S 5,13,2	S 5,13,3	S 5,13,4	S 5,13,5	S 5,13,6	S 5,13,7	S 5,27,1	S 5,27,2	S 5,27,3	S 5,27,4	S 5,27,5	S 5,27,6	S 5,27,7	S 5,41,1	S 5,41,2	S 5,41,3	S 5,41,4	S 5,41,5	S 5,41,6	S 5,41,7	B 3,14,B
O	L 1,7,L	L 2,7,L	S 5,14,1	S 5,14,2	S 5,14,3	S 5,14,4	S 5,14,5	S 5,14,6	S 5,14,7	S 5,28,1	S 5,28,2	S 5,28,3	S 5,28,4	S 5,28,5	S 5,28,6	S 5,28,7	S 5,42,1	S 5,42,2	S 5,42,3	S 5,42,4	S 5,42,5	S 5,42,6	S 5,42,7	B 3,15,B
P	B 2,1,B	C 2,1,C	C 10,1,1	C 11,1,1	C 12,1,1	C 13,1,1	C 14,1,1	C 15,1,1	C 16,1,1	C 17,1,1	C 18,1,1	C 19,1,1	C 20,1,1	C 21,1,1	C 22,1,1	C 23,1,1	C 24,1,1	C 25,1,1	C 26,1,1	C 27,1,1	C 28,1,1	C 29,1,1	C 30,1,1	B 3,16,B

Obr. 9: Rozložení testovaných látek na 384- jamkové destičce při sekundárním testování (B-blank, C- buňky bez ovlivnění, H- high control/negativní kontrola, L-low control/pozitivní kontrola, S-sample/testované látky)

Pro každou látku se koncentrační závislost sledovala ve 3 biologických experimentech a v každém biologickém experimentu měla látka 2 opakování. Všechna získaná data byla zpracována v programu Dotmatics, kde byly vypočítané průměrné hodnoty IC50 a směrodatné odchylky.

Z důvodu velkého množství látek a získaných dat jsou výsledky zobrazeny v příloze ve formě grafů. U každé buněčné linie byly z výsledných hodnot IC50 vypočteny průměry a směrodatné odchylky. Pomocí t testu byl na základě vypočítané hodnoty p (hladina statistické signifikantnosti, $p < 0,05$ *; $0,01 > p > 0,001$ **; $p < 0,001$ ***) stanovený statistický rozdíl mezi hodnotami IC50 získanými z 384- a 1536- jamkových panelů.

V grafu v příloze 1 je porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii MRC-5. Z 27 testovaných látek byl statisticky významný rozdíl vypočítaný u 10 látek. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Graf v příloze 2 znázorňuje porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii BJ. Na této buněčné linii bylo ověřováno 23 látek. U 8 látek byl stanoven statistický rozdíl mezi panely a zbývajících 15 látek bylo bez statistického rozdílu. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Graf v příloze 3 zobrazuje porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii A549. U této buněčné linie byly prováděny testy 31 látek. U 8 látek byl stanoven statistický rozdíl mezi 384- a 1536- jamkovými panely. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Graf v příloze 4 znázorňuje porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii U2OS. Na této buněčné linii bylo testováno 31 látek. Z toho u 19 látek byl stanoven statistický rozdíl mezi 384- a 1536- jamkovými panely a u 12 látek nebyl žádný statistický rozdíl. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Na grafu v příloze 5 je porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii HCT116. Na této buněčné linii bylo testováno také 31 látek. U 17 z nich byl

stanoven statistický rozdíl mezi 384- a 1536- jamkovými panely a u zbývajících 14 byl statistický rozdíl nulový. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Graf v příloze 6 znázorňuje porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii HCT116 p53-/-. Na této buněčné linii bylo testováno 32 látek. U 17 látek byl statistický rozdíl mezi 384- a 1536- jamkovými panely a u 15 látek statistický rozdíl nebyl. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Na grafu v příloze číslo 7 je znázorněno porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii CCRF-CEM. Na této buněčné linii bylo testováno 46 látek. U 23 látek byl statistický rozdíl mezi 384- a 1536- jamkovými destičkami a u zbylých 23 látek statistický rozdíl nebyl. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Graf v příloze 8 znázorňuje porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii CEM-DNR. Na této buněčné linii bylo celkem testováno 42 látek. Z nichž u 27 látek byl stanoven statistický rozdíl mezi jednotlivými typy panelů a u 15 látek statistický rozdíl nebyl. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Na grafu v příloze číslo 9 je znázorněno porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii K562. U této buněčné linie bylo testováno 34 látek. U 14 látek byla stanovena statistická odchylka a u zbylých 20 látek nebyla zjištěna statistická odchylka mezi 384- a 1536- jamkovými panely. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

Graf v příloze 10 znázorňuje porovnání IC50 hodnot získaných testováním látek z knihovny LOPAC90 na 384- (modré značky) a 1536- (červené značky) jamkových destičkách pro buněčnou linii K562-TAX. Na této linii bylo testováno celkem 50 látek. Mezi 31 látkami byl zjištěn statistický rozdíl. Na ose x jsou znázorněny LEM kódy látek a na ose y hodnoty IC50 [v μM].

V tabulce IX je uvedené procento látek, u kterých se hodnota IC50 vypočítaná z experimentů na 384- jamkové destičce významně odlišuje od hodnoty IC50 vypočítané z experimentů na 1536- jamkové destičce. Ve většině buněčných linií byl pozorovaný rozdíl v IC50 až u poloviny z celkově testovaných látek.

Tab. IX: Počet aktivních látek u LOPAC 90

buněčná linie	počet aktivních látek	statisticky rozdílné IC50 u 384- a 1536- wp [%]
MRC-5	27	37,03
BJ	23	34,78
A549	31	25,80
U2OS	31	61,29
HCT116	31	56,84
HCT116 p53-/-	32	53,13
CCRF-CEM	46	50
CEM-DNR	42	64,29
K562	34	41,18
K562-TAX	50	62

Pro každou testovanou destičku byl vypočítán Z' faktor, který vyhodnocuje kvalitu testu. Průměrné hodnoty Z' faktoru pro jednotlivé buněčné linie jsou zobrazeny v tabulce X. Nejvyšší Z' faktor byl u obou typů destiček dosažen u buněčných linií K562-TAX a CEM-DNR. Naopak nejnižší byl u MRC-5 a BJ (viz tabulka X).

Tab. X: Průměrné hodnoty Z' faktoru u 384- a 1536- jamkových destiček

buněčná linie	Z' faktor 384- wp	Z' faktor 1536- wp
MRC-5	0,620	0,632
BJ	0,563	0,742
A549	0,702	0,771
U2OS	0,683	0,749
HCT116	0,755	0,698
HCT116 p53-/-	0,670	0,672
CCRF-CEM	0,680	0,651
CEM-DNR	0,832	0,763
K562	0,784	0,700
K562-TAX	0,799	0,827

6 Diskuze

HTS testy se využívají ve farmaceutických, výzkumných a vývojových společnostech a jsou základním nástrojem vývoje léčiv. Odhaduje se, že HTS přispělo k úsporám ve výši 130 milionů dolarů a je potřeba asi o 0,8 roku méně k vývoji nového léku. To je důvod, proč jsou HTS metody tak rozšířené (Szymański et al., 2012).

Přenos jakýchkoliv metod do HTS podmínek je složitý a časově náročný proces vyžadující biologickou a farmakologickou validaci. Sleduje se stabilita reagensů, jednotnost signálu na testovací destičce a reproducibilita výsledků. V rámci testování jednotnosti signálu se měří maximální a minimální signál, který musí být zvolen tak, aby interval mezi maximálním a minimálním signálem byl dostatečný pro detekci testované látky. Při testech cytotoxicity představuje v experimentech maximální signál negativní kontrola, což bývá nejčastěji použité rozpouštědlo (např. DMSO) a minimálním signálem je pozitivní kontrola. Stanovení univerzální pozitivní kontroly pro testy cytotoxicity v HTS je náročné, protože se testování uskutečňuje na široké škále buněčných linií a byl to jeden z cílů diplomové práce. Z testovaných 8 cytostatik s různým mechanismem účinku na vybraných 10 buněčných liniích lidského původu se jako nejcitlivější cytostatika podle předpokladu ukázala být aktinomycin D a mitomycin C, které byly zvoleny jako vhodné pozitivní kontroly pro další testování. Aktinomycin D způsobuje inhibici transkripce (Szczepanik et al., 2004) a působí na všechny fáze buněčného cyklu (Spano et al., 2007) a mitomycin C funguje na principu alkylace a interkalace do DNA (Rjiba-Touati et al., 2015). Jako velmi citlivé se ukázaly být i DNR a DOXO, ale ty vykazují fluorescenci a mohou ovlivňovat naměřené hodnoty. Nízké směrodatné odchylky potvrzují reprodukovatelnost signálu v různých biologických opakováních.

Hlavním cílem diplomové práce byla validace testu cytotoxicity MTS v HTS podmínkách použitím chemických knihoven LOPAC90 a LOPAC1280. V primárním testování se na základě cytotoxických účinků látek při jedné koncentraci (50 μ M) vyseletovaly aktivní látky, při které byly v sekundárním testování stanoveny hodnoty IC₅₀. Kromě ojedinělých případů byly směrodatné odchylky hodnot IC₅₀ získaných ze 3 biologických opakování nižší než 30 % z průměrné hodnoty IC₅₀. Průměry Z' faktoru, které byly stanoveny pro každou destičku, která prošla analýzou v programu Dotmatics, neklesly pod hodnotu 0,5. Provedené testy vykazovaly podle Z' faktoru srovnatelnou kvalitu testů. U 384- jamkových formátů byla průměrná hodnota Z' faktoru 0,7088 a u 1536- jamkových formátů 0,7205.

Na základě uvedených výsledků je možné potvrdit, že MTS test cytotoxicity je vhodný pro HTS podmínky.

V dalším kroku se hodnoty IC₅₀ látek pro jednotlivé linie z 384- jamkového formátu porovnávaly s IC₅₀ hodnotami stanovenými pro 1536- jamkový formát pro zjištění, zda miniaturizací došlo ke statistickým rozdílům mezi oběma typy destiček. V budoucnosti by přesun testování cytotoxicity MTS testem z 384- do 1536- jamkových destiček zvýšil výkonnost a zároveň snížil náklady (Bosse et al., 2000) při skríningu velkých chemických knihoven. Ve všech světových laboratořích dochází k přechodu z 384- jamkového formátu na 1536- jamkový formát (Berg et al., 2000). Při miniaturizaci není dostačující, že test může být proveden v menším objemu, musí také udržet přijatelnou kvalitu dat (Bosse et al., 2000). V literatuře je uvedeno, že 384- a 1536- jamkové typy destiček dosahují v testech srovnatelných hodnot (Sorg et al., 2002). Ovšem u 1536- jamkových destiček bývá oproti 96- a 384- jamkovým destičkám zjištěna nižší citlivost signálu (Berg et al., 2000). Čím nižší objemy látek jsou v jednotlivých jamkách, tím výraznější je poměr povrchu k objemu (Mayr et Bojanic, 2009). Některé testy mohou být v 1536- jamkovém formátu těžko proveditelné vzhledem k citlivosti na konečné koncentrace DMSO (Sundberg, 2000). U více než poloviny testovaných látek byl zjištěn statistický rozdíl mezi IC₅₀ hodnotami u 384- a 1536- jamkových destiček. Mohlo by to být způsobené tím, že v průběhu testování dochází ke snižování množství DMSO, díky tomu, že je velmi hygroskopické a rychle absorbuje vodu z ovzduší. Voda urychluje degradaci a může dojít k rozkladu sloučeniny.

Výsledky získané diplomovou prací potvrzují vhodnost a kvalitu testů cytotoxicity MTS na 384- jamkových destičkách v HTS podmínkách. Miniaturizace testu do formátu 1536- jamkové destičky vyžaduje další testování.

7 Závěr

Hlavním cílem experimentální části diplomové práce byla validace testu cytotoxicity MTS v HTS podmínkách. První testy byly zaměřeny na identifikaci vhodné pozitivní kontroly, která musí mít spolehlivý účinek ve všech buněčných liniích. Ze skupiny 8 cytostatik, které se lišily svým mechanismem působení, byly vybrány 2 cytostatika, a to aktinomycin D a mitomycin C. Na validaci MTS testu byly využity komerční chemické knihovny LOPAC90 a LOPAC1280. Primární skrínig obou typů chemických knihoven byl prováděn pouze při 1 koncentraci, při níž se stanovila hodnota PI. Do dalšího testování postoupily látky, ve kterých vyšla hodnota PI nad 50 %. V sekundárním skrínigu byly použity pouze aktivní látky z chemické knihovny LOPAC90, v němž byly látky otestovány v 7 koncentracích pro určení IC₅₀. Na základě směrodatných odchylek a vypočítaného Z' faktoru se MTS test považuje za vhodný v HTS podmínkách.

Stanovené IC₅₀ hodnoty u cytostatik a látek z knihovny LOPAC90 na 384- jamkových destičkách byly porovnány s hodnotami IC₅₀ z 1536- jamkových destiček. Ve většině případů byl mezi jednotlivými hodnotami IC₅₀ zaznamenaný statistický rozdíl. Nejmenší statistický rozdíl mezi jednotlivými typy destiček (25,80 %) byl zjištěn u buněčné linie A549, na druhé straně největší statisticky rozdílné hodnoty IC₅₀ (64,29 %) byly stanoveny u buněčné linie CEM-DNR. Využití 1536- jamkových destiček na stanovení cytotoxicity pomocí MTS v HTS laboratoři vyžaduje další testování.

8 Literatura

Odborná periodika:

Astashkina A., Mann B., Grainger D. W. (2012) A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity, *Pharmacology&Therapeutics*, 134, 82–106

Barbuti A. M., Chen Z-S. (2015) Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy, *Cancers*, 7, 2360-2371

Berg M., Undisz K., Thiericke R., Moore T., Posten C. (2000) Miniaturization of a Functional Transcription Assay in Yeast (Human Progesterone Receptor) in the 384- and 1536-Well Plate Format, *Journal of Biomolecular Screening*, 5, 71-76

Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152

Bobeničová M., Valko M., Brezová V., Dvoranová D. (2014) UVA generated free radicals in irinotecan (CPT-11) in the presence of copper ions, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 290, 125-138

Bosse R., Illy Ch., Elands J., Chelsky D. (2000) Miniaturizing screening: how low can we go today?, *Drug Discovery Today*, 5, 42-47

Cavalcante L de S., Monteiro G. (2014) Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer, *European Journal of Pharmacology*, 741: 8-16

De Jong L. A. A., Uges D. R. A., Franke J. P., Bischoff R. (2005) Receptor–ligand binding assays: Technologies and Applications, *Journal of Chromatography B*, 829, 1-25

Du Y. (2015) Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions in an HTS format, *Methods in molecular biology*, 1278, 529-544

Ensafi A. A., Amini M., Rezaei B. (2014) Impedimetric DNA-biosensor for the study of anti-cancer action of mitomycin C: Comparison between acid and electroreductive activation, *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 282-288

Gacic J., Vorkapic E., Olsen R. S., Söderberg D., Gustafsson T., Geffers R., Skoglund K., Matussek A., Wågsäter D. (2016) Imatinib reduces cholesterol uptake and matrix metalloproteinase activity in human THP-1 macrophages, *Pharmacological Reports*, 68, 1-6

Galluzzi, L. et al. (2009) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes, *Cell Death and Differentiation*, 16, 1093-1107

Hertzberg R. P., Pope J. A. (2000) High-throughput screening: new technology for the 21st century, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 445-451

Hirota T., Warren G. L., Liu A. C., Lee J. W., Schultz P. G., Kay S. A. (2008) A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β , *PNAS*, 105, 20746-20751

- Hong J., Edel J. B., DeMello, A. J. (2009) Micro- and nanofluidic systems for high-throughput biological screening, *Drug Discovery Today*, 14, 134-146
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-805
- Inglese J., Auld D. S., Jadhav A., Johnson R. L., Simeonov A., Yasgar A., Zheng W., Austin Ch. P. (2006) Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries. *PNAS*, 103, 11473-11478
- Jacobsen J., Pedersen M., Rassing M. R. (1996) TR146 cells as a model for human buccal epithelium: II. Optimisation and use of a cellular sensitivity MTS/PMS assay, *International Journal of Pharmaceutics*, 141, 217-225
- Johnson C. H., Fisher T. S., Hoang L. T., Felding B. H., Siuzdak G., O'Brien P. J. (2014) Luciferase does not alter metabolism in cancer cells, *Metabolomics*, 10, 354-360
- Kanda T., Sullivan K. F., Wahl G. M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells, *Current Biol*, 8, 377-385
- Ko K. Ch., Han Y., Cheong D. E., Choi J. H., Song J. J. (2013) Strategy for screening metagenomic resources for exocellulase activity using a robotic, high-throughput screening system, *Journal of Microbiological Methods*, 94, 311-316
- Korn K., Krausz E. (2007) Cell-based high-content screening of small-molecule libraries, *Analytical Techniques / Mechanisms*, 11, 503-510
- Lai T. S., Liu Y., Tucker T., Daniel K. R., Sane D. C., Toone E., Burke J. R., Strittmatter W. J., Greenberg Ch. S. (2008) Identification of Chemical Inhibitors to Human Tissue Transglutaminase by Screening Existing Drug Libraries, *Chemistry & Biology*, 15, 969-978
- Lai Y., Xiang M., Liu S., Li E., Che Y., Liu X. (2014) A novel high-throughput nematicidal assay using embryo cells and larvae of *Caenorhabditis elegans*, *Experimental Parasitology*, 139, 33-41
- Liu E. C. K., Abell L. M. (2006) Development and validation of a platelet calcium flux assay using a fluorescent imaging plate reader, *Analytical Biochemistry*, 357, 216-224
- Liu R., Hsieh Ch-Y., Lam K. S. (2004) New approaches in identifying drugs to inactivate oncogene products, *Seminars in Cancer Biology*, 14, 13-21
- Malich G., Markovic B., Winder C. (1997) The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines, *Toxicology*, 124, 179-192
- Mayr L. M., Bojanic D. (2009) Novel trends in high-throughput screening, *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 580-588
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63
- Niles A. L., Moravec R. A., Riss T. L. (2009) *In Vitro* Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening, *Current Chemical Genomics*, 3, 33-41

- Paciello L., Falco F. C., Landi C., Parascondola P. (2013) Strengths and weaknesses in the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability by ATP-based bioluminescence assay, *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 157-162
- Rjiba-Touati K., Ayed-Boussema I., Belarbia A., Mokni M., Achour A., Bacha H., Abid S. (2015) Role of recombinant human erythropoietin against mitomycin C-induced cardiac, hepatic and renal dysfunction in Wistar rats, *Human and Experimental Toxicology*, 34, 468-478
- Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *Journal of Immunological Methods*, 142, 257-265
- Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Research*, 48: 4827-4833
- Seifert R., Schneider E. H., Bähre H. (2015) From canonical to non-canonical cyclic nucleotides as second messengers: Pharmacological implications, *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 154-184
- Shaffer C. (2005) Automating compound management systems, *Drug Discovery & Development*, 8, 36-41
- Sheth H., Gorey C., Roush N., Smallman S., Collantes E., Santoro M., Olson B., Fitzgerald L., Lee P. H., Shen X. J. (2013) A Multiplexed Fluorescent Calcium and NFAT Reporter Gene Assay to Identify GPCR Agonists, *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 7, 1-8
- Shoemaker R. H., Scudiero D. A., Melillo G., Currens M. J., Monks A. P., Rabow A. A., Covell D. G., Sausville E. A. (2002) Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 229-246
- Shun T. Y, Lazo J. S., Sharlow E. R., Johnston P. A. (2011) Identifying Actives from HTS Data Sets: Practical Approaches for the Selection of an Appropriate HTS Data-Processing Method and Quality Control, *Journal of Biomolecular Screening*, 16:1-14
- Scheuermann J., Neri D. (2015) Dual-pharmacophore DNA-encoded chemical libraries, *Current Opinion in Chemical Biology*, 26, 99-103
- Sittampalam G. S., Kahl S. D., Janzen W. P. (1997) High-throughput screening: advances in assay technologies, *Current Opinion in Chemical Biology*, 1, 384-391
- Sorg G., Schubert H-D., Büttner F. H., Heilker R. (2002) Automated High Throughput Screening for Serine Kinase Inhibitors Using a LEADSeeker™ Scintillation Proximity Assay in the 1536-WellFormat, *Journal of Biomolecular Screening*, 7, 11-19
- Spano A., Monaco G., Barni S., Sciola L. (2007) Expression of cell kinetics and death during monocyte-macrophage differentiation: effects of Actinomycin D and Vinblastine treatments, *Histochemistry and Cell Biology*, 127, 79-94
- Stepanenko A. A., Dmitrenko V. V. (2015) Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability, *Gene*, 574, 193-203

- Stevens M. G., Olsen S. C. (1993) Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity, *Journal of Immunological Methods*, 157, 225-231
- Sundberg S. A. (2000) High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 47-53
- Szczepanik W., Kaczmarek P., Jeżowska-Bojczuk M. (2004) Identification of copper (II) binding sites in actinomycin D, a cytostatic drug - correlation of coordination with DNA damage, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 2141-2148
- Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E. (2012) Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery - Toxicological Screening Tests, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 427-452
- Tada H., Shiho O., Kuroshima K., Koyama M., Tsukamoto K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2, *Journal of Immunological Methods*, 93: 157-165
- Tanaka T. Q., Dehdashti S. J., Nguyen D. T., Mc Kew J. C., Zheng W., Williamson K. C. (2013) A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 188, 20-25
- Thomsen W., Frazer J., Unett D. (2005) Functional assays for screening GPCR targets, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 655-665
- Toda H., Nakamura K., Nakahama M., Wada T., Watanabe A., Hishimoto K., Terasaka R., Tokioka K., Nishii N., Miyosho T., Kohno K., Kawai Y., Miyaji K., Koide Y., Tachibana M., Yoshioka R., Ito H. (2016) Clinical characteristics of responders to treatment with tolvaptan in patients with acute decompensated heart failure: Importance of preserved kidney size, *Journal of Cardiology*, 67, 177-183
- Tominaga H., Ishiyama M., Ohseto F., Sasamoto K., Hamamoto T., Suzuki K., Watanabe M. (1999) A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay, *Analytical Communications*, 36, 47-50
- Wetmore B. A. (2015) Quantitative *in vitro*-to-*in vivo* extrapolation in a high-throughput environment, *Toxicology*, 332, 94-101
- Wigglesworth M. J., Murray D. C., Blackett C. J., Kossenjans M., Nissink J. W. M. (2015) Increasing the delivery of next generation therapeutics from high throughput screening libraries, *Current Opinion in Chemical Biology*, 26, 104-110
- Wölcke J., Ullmann D. (2001) Miniaturized HTS technologies – uHTS, *Drug Discovery Today*, 6, 637-646
- Yang F., Teves S. S., Kemp Ch. J., Henikoff S. (2014) Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845, 84-89
- Young F. M., Phungtamdet W., Sanderson B. J. S. (2005) Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS, *Toxicology in vitro*, 19, 1051 - 1059

Zang R., Li D., Tang I. Ch., Wang J., Yang S. T. (2012) Cell-based assay in high-throughput screening for drug discovery, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1, 31-51

Zhang J. H., Chung T. D. Y., Oldenburg K. R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays, *Journal of Biomolecular Screening*, 4, 67-73

Odborné publikace:

Guengerich F. P. (2010) Mechanisms of Enzyme Catalysis and Inhibition, In *Comprehensive Toxicology Edition* (2. vydání), pp. 31-39, Reference Module in Biomedical Sciences

Hampl F., Rádl S., Paleček J. (2007) *Farmakochemie* (2. vydání), pp. 53, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha

Internetové zdroje:

Casey R. (2005) Designing Chemical Compound Libraries for Drug Discovery, [online], [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: <http://www.b-eye-network.com/view/2039>

Fritz J. (2007) Cell Proliferation Reagent WST-1 From Roche Applied Science. *Biocompare* [online], [cit. 2016-01-07]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/40932-Cell-Proliferation-Reagent-WST-1-From-Roche-Applied-Science/>

Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Benink H. A., Worzella T. J., Ninor L. (2013) Cell viability assay, *Assay guidance manual* [online], [cit. 2015-10-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Sigma-Aldrich (2016) cAMP assays [online], [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/recombinant-protein-expression/protocols/camp-assays.html>

Sigma-Aldrich (2014) LOPAC1280- The Library of Pharmacologically Active Compounds [online], [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/bioactive-small-molecules/lopac1280-navigator.html>

TDI (2016) Target Discovery Institute, University of Oxford, High-throughput screening [online], [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://www.tdi.ox.ac.uk/high-throughput-screening-2>

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ADMET	absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace a toxicita
AP	alkalická fosfatáza
ATCC	American tissue and cultures collection
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický 3'-5'-adenosinmonofosfát
DMEM	Dublecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNR	daunorubicin
DOXO	doxorubicin
DR	dose-response
eHTS	experimentální chemické knihovny
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FCSI	fetální bovinní sérum
FP	fluorescenční polarizace
GFP	zelený fluorescenční protein
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
HTS	vysokokapacitní skrining
IC50	koncentrace, při které zahyne 50 % buněk
LEM	laboratoř experimentální medicíny
L-glu	L-glutamin

LOPAC	knihovna farmakologicky aktivních sloučenin
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H tetrazolium
MTT	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PES	phenazin ethylsulfát
pH	potential of hydrogen
PI	procento inhibice
PMS	phenazin methylsulfát
PNC	penicilin
SD	směrodatná odchylka
STM	streptomycin
TK H ₂ O	sterilní autoklávovaná destilovaná voda
vHTS	virtuální chemické knihovny
wp	well plates
WST-1	5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2,-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid

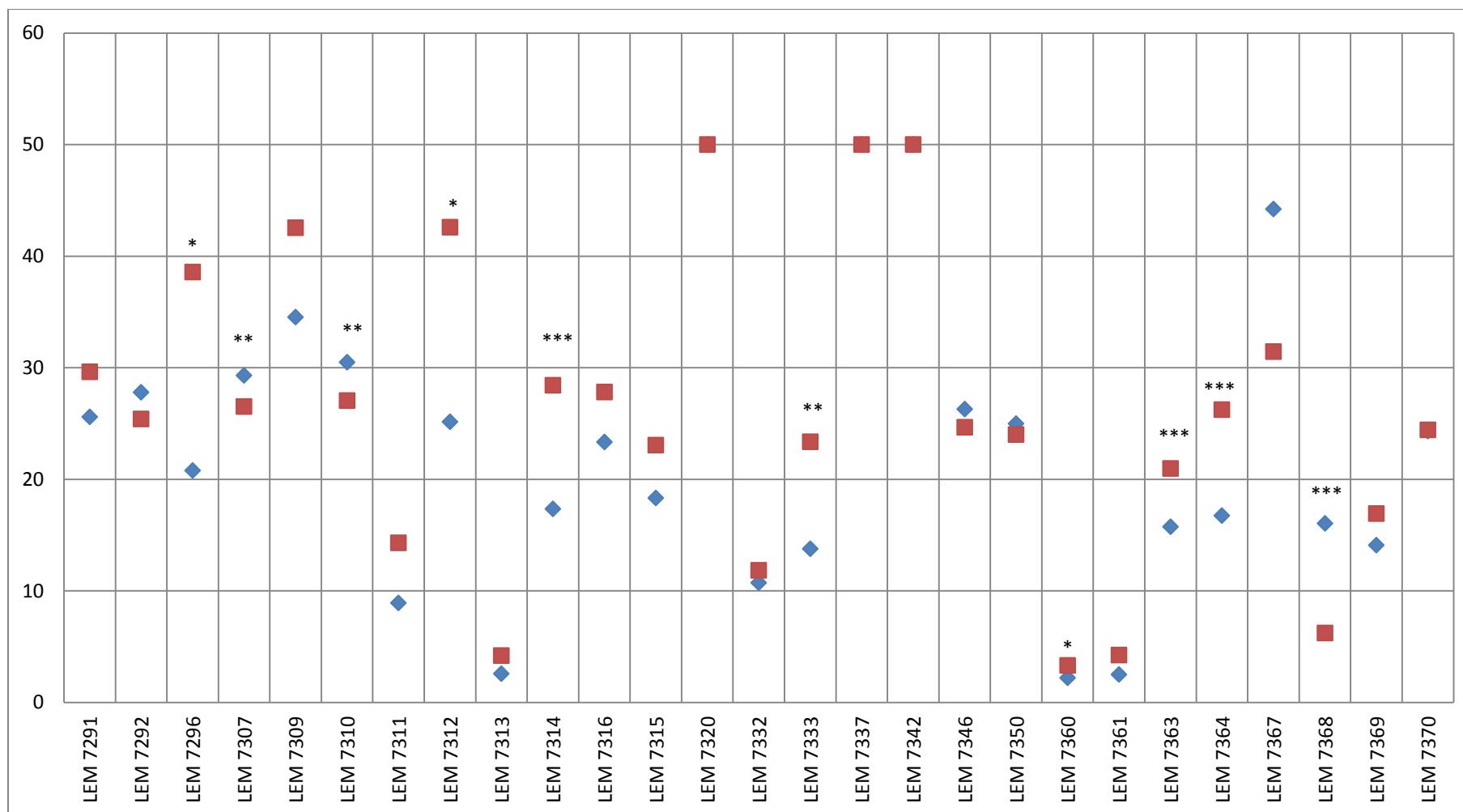
Seznam buněčných linií:

A549	buněčná linie adenokarcinomu plic
BJ	buněčná linie kožních fibroblastů

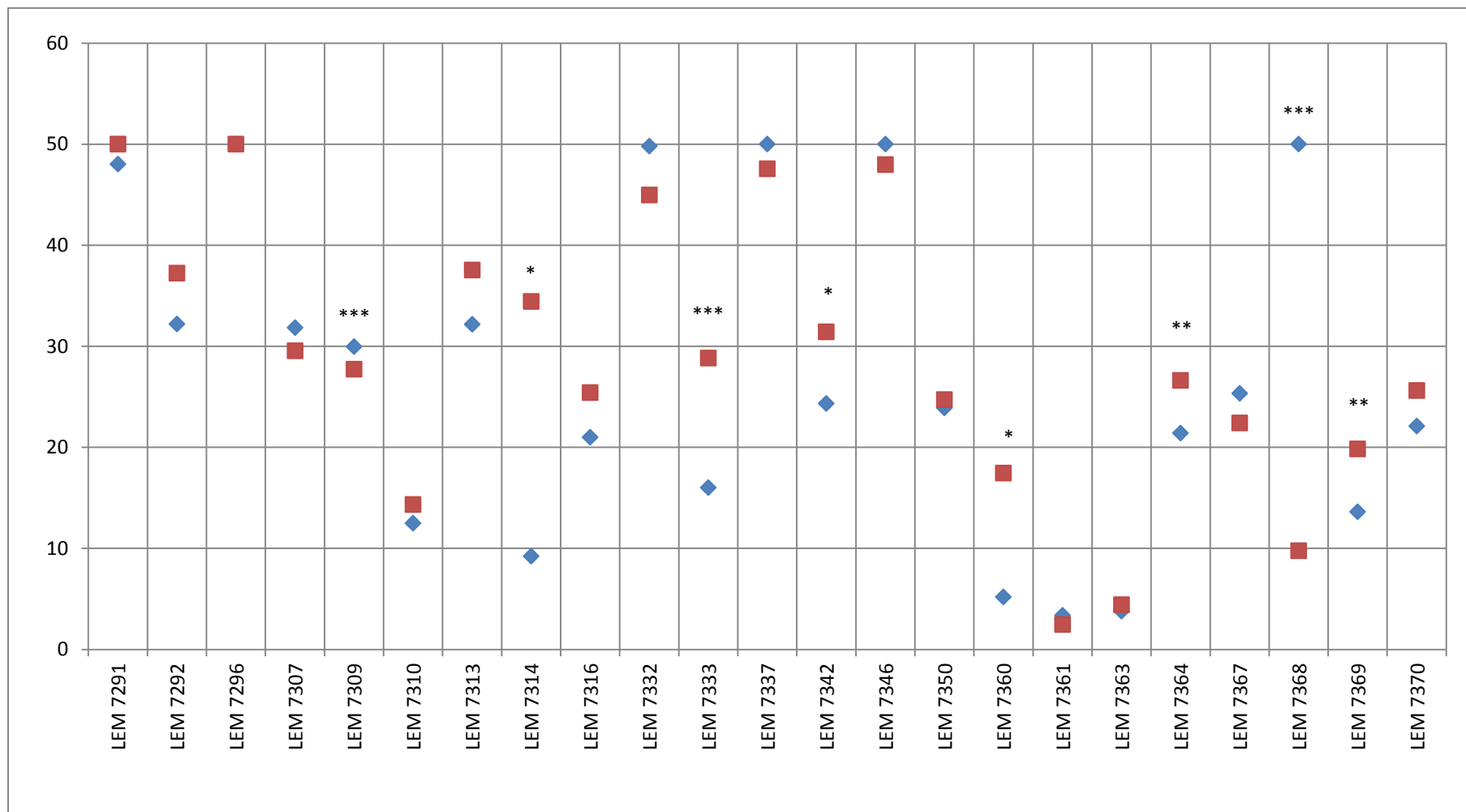
CCRF-CEM	buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie
CEM-DNR	buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie rezistentní k daunorubicinu
HCT116	buněčná linie kolorektálního karcinomu
HCT116 p53-/-	buněčná linie kolorektálního karcinomu s potlačeným genem pro protein p53
K562	buněčná linie erytromyeloblastické leukémie
K562-TAX	buněčná linie erytromyeloblastické leukémie rezistentní k paclitaxelu
MRC-5	buněčná linie fibroblastů
U2OS	buněčná linie osteosarkomu

10 Přílohy

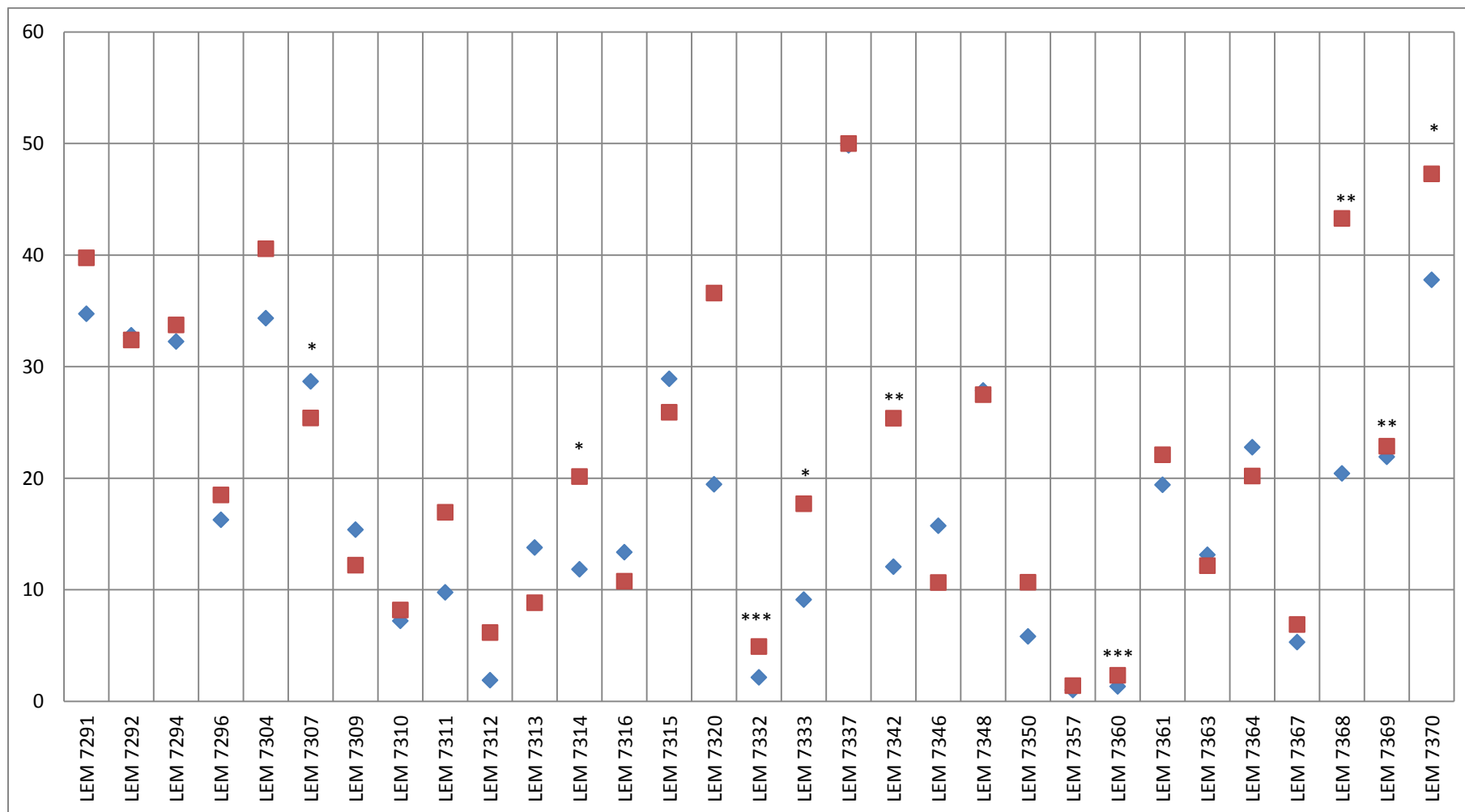
Příloha 1: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie MRC-5



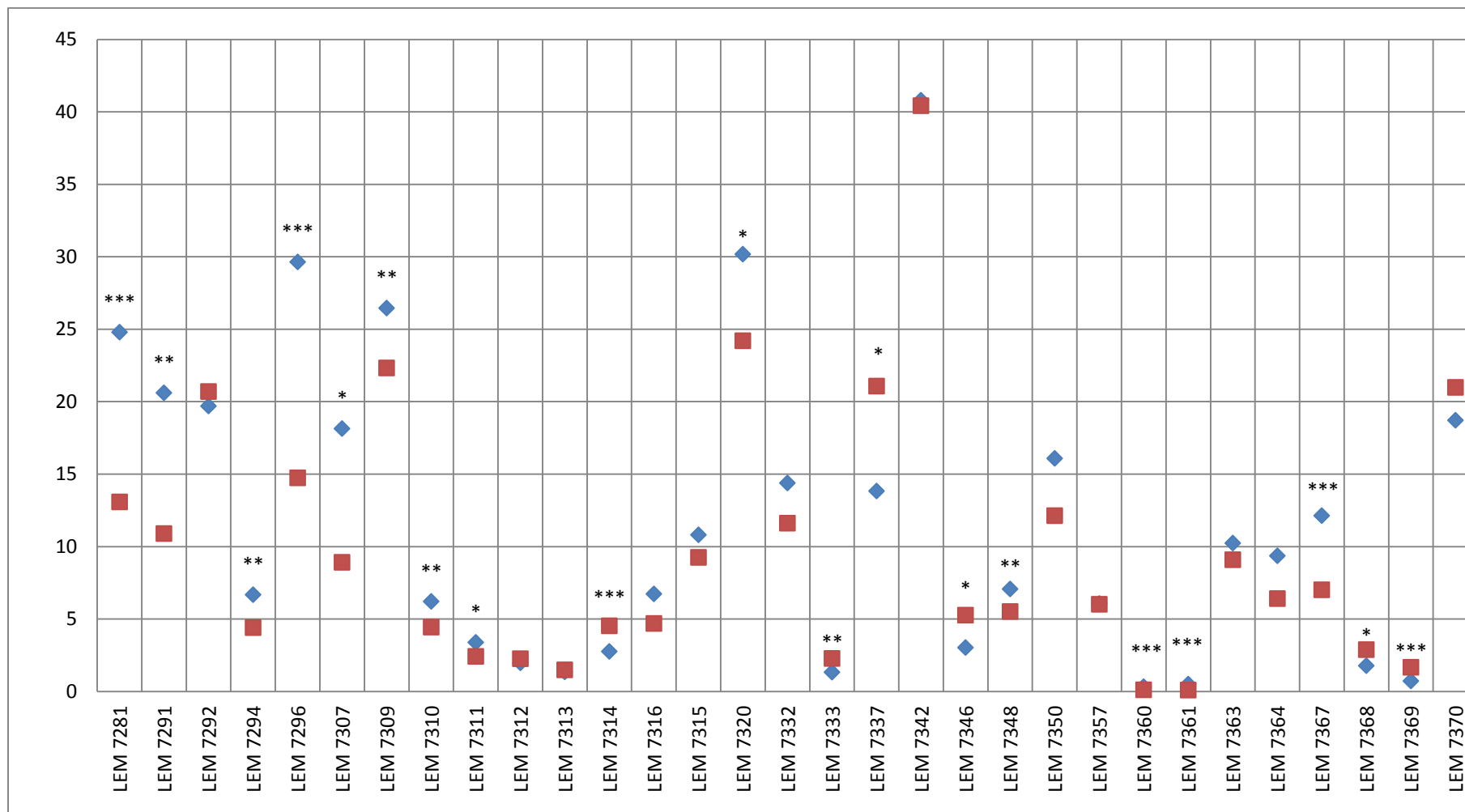
Příloha 2: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie BJ



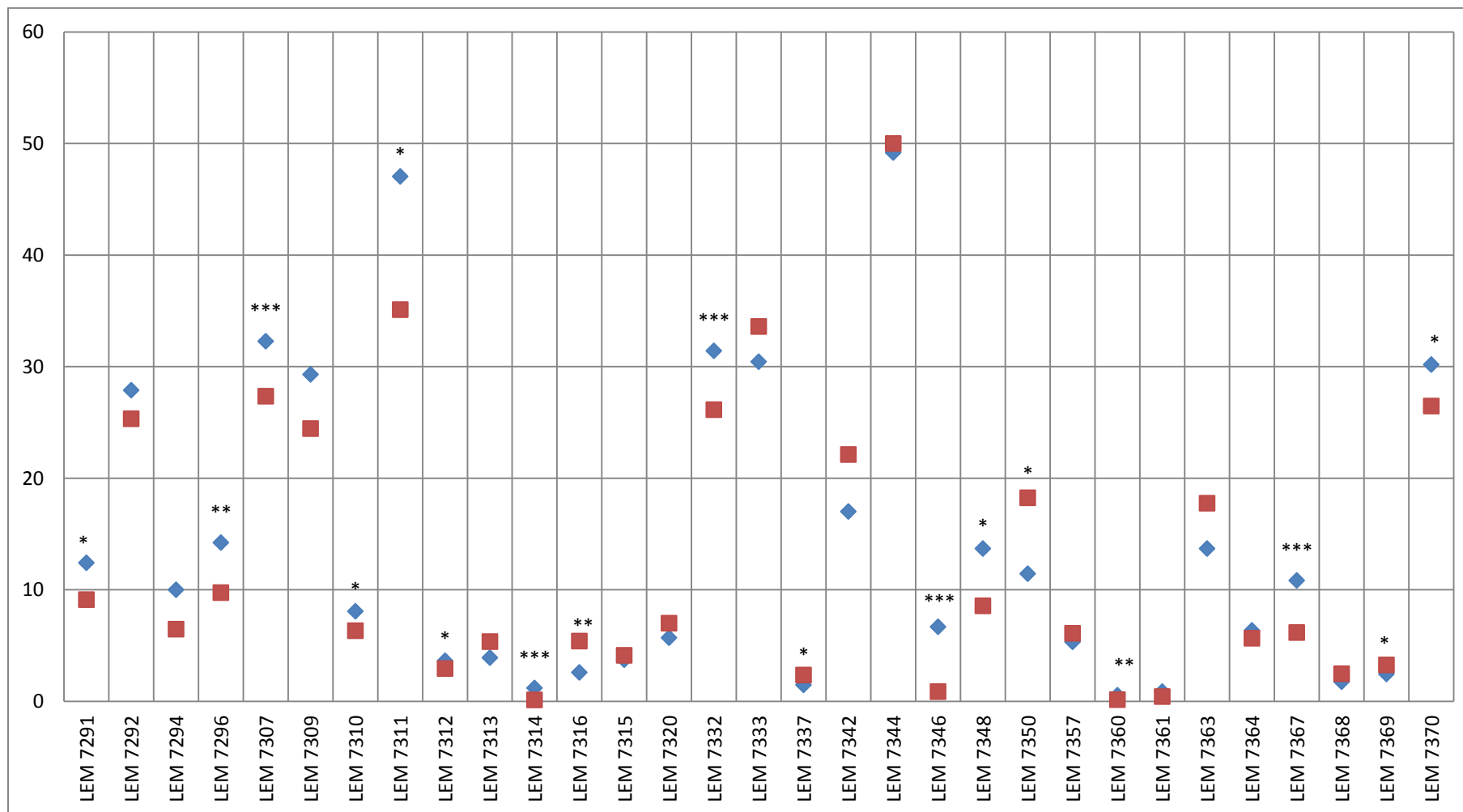
Příloha 3: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie A549



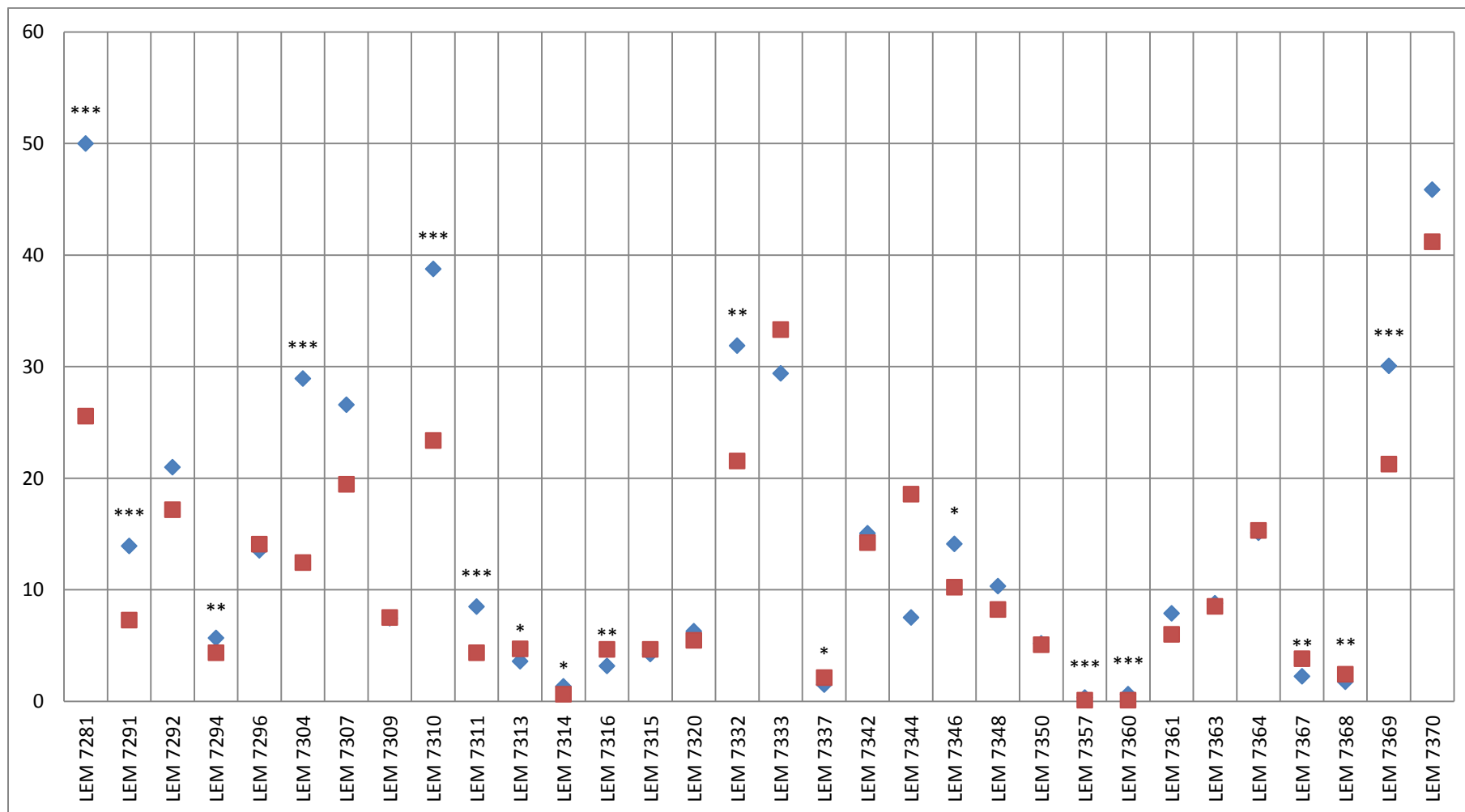
Příloha 4: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie U2OS



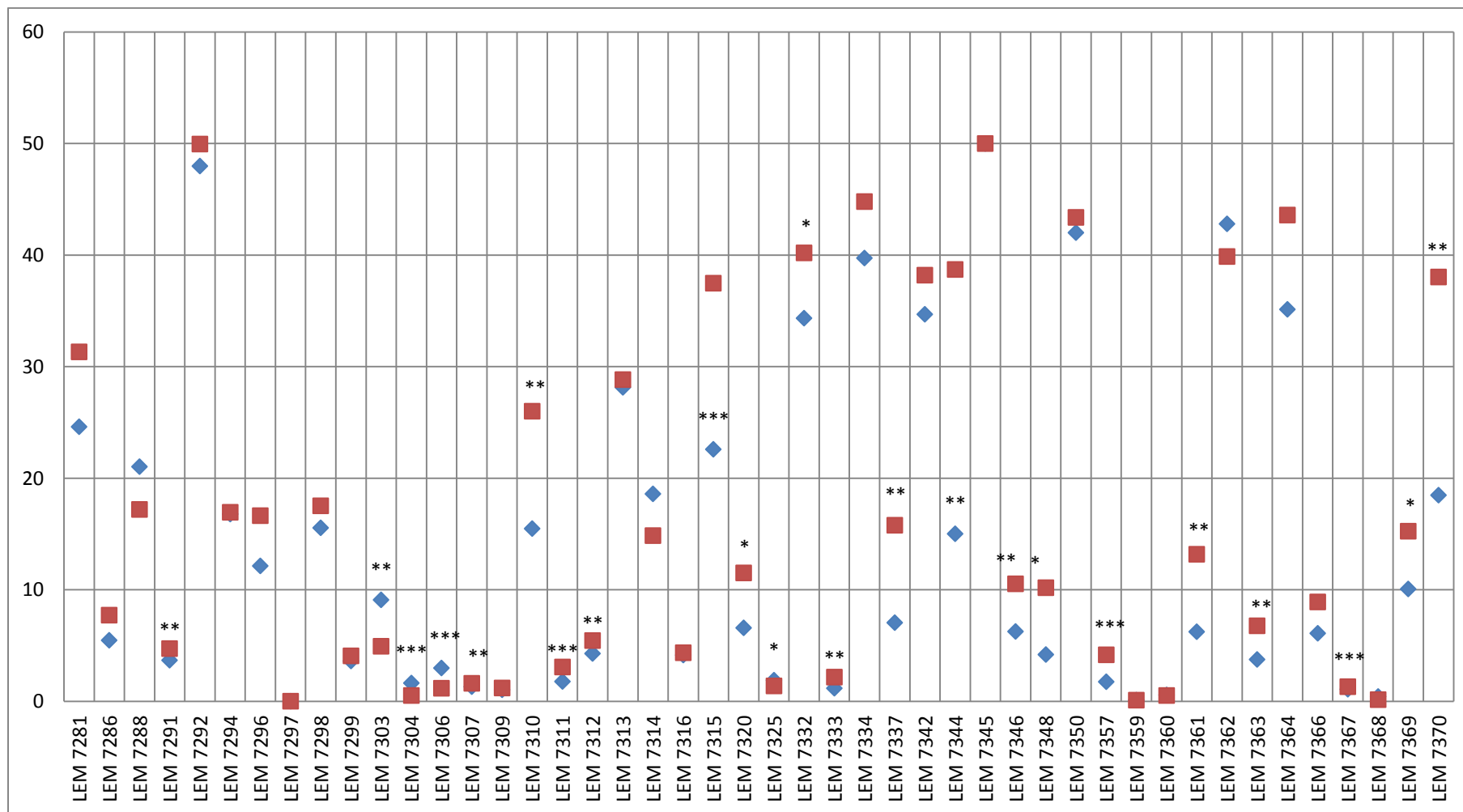
Příloha 5: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie HCT116



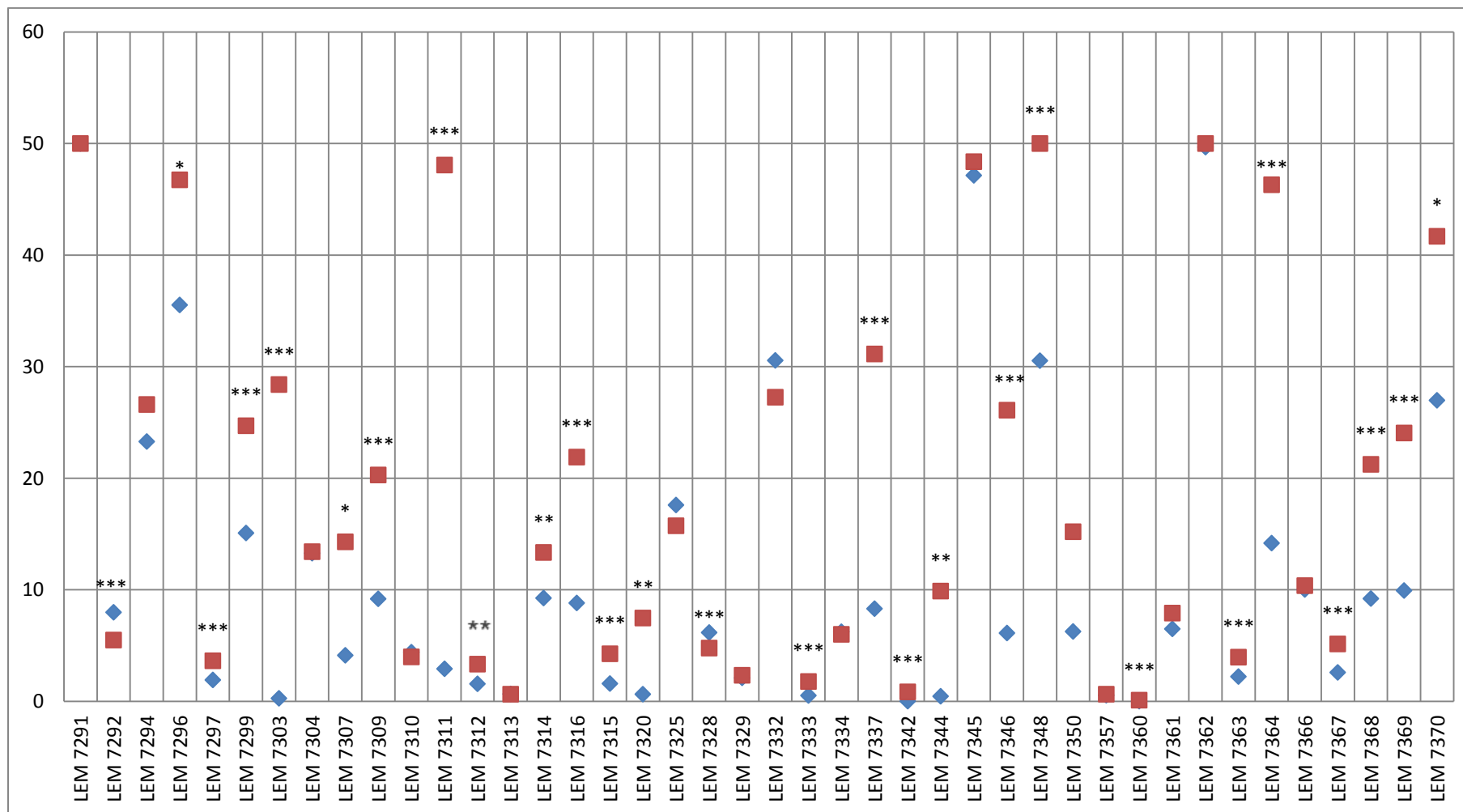
Příloha 6: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie HCT116 p53-/-



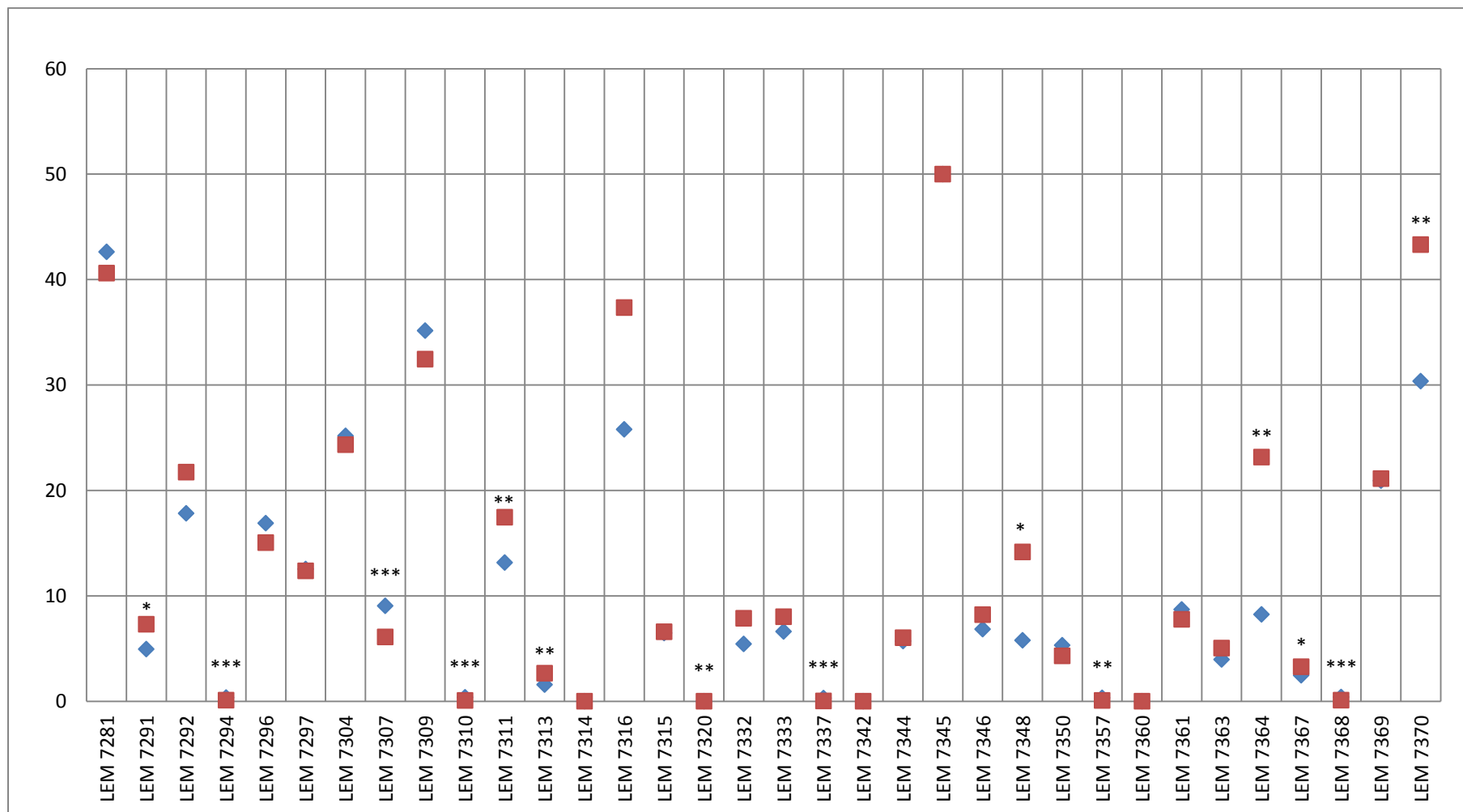
Příloha 7: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie CCRF-CEM



Příloha 8: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie CEM-DNR



Příloha 9: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie K562



Příloha 10: Porovnání 384- a 1536- jamkových panelů u buněčné linie K562-TAX

