

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2021**

**Dominika Zabáková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza cytotoxických účinkov nových chemických  
látok v HTS podmienkach**

**Bakalárska práca**

**Dominika Zabáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí práce: Ing. Soňa Gurská, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 20<sup>19</sup>20/20<sup>20</sup>21

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Dominika ZABÁKOVÁ  
Osobní číslo: R18666  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Analýza cytotoxických účinků nových chemických látek v HTS podmínkách  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce
2. práca s ľudskými bunkovými líniami v sterilných podmienkach
3. analýza cytotoxických účinkov nových chemických látok na úrovni HTS, primárny a sekundárny skríning
4. stanovenie hodnoty IC50

Rozsah pracovnej zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21358741/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27317000/> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30281308/> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18335092/>

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Soňa Gurská, PhD.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 2. prosince 2020  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice  
tel.: +420 585 634 901  
-2-

## SÚHRN

Meno a priezvisko autora: Dominika Zabáková

Názov práce: Analýza cytotoxických účinkov nových chemických látok v HTS podmienkach

Typ práce: Bakalárska

Pracovisko: Ústav molekulárnej a translačnej medicíny

Vedúci práce: Ing. Soňa Gurská, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

### Abstrakt:

Vysokokapacitný skrining je pomerne nová technika, ktorá sa vo veľkej miere využíva pri objave liekov vo farmaceutickom priemysle. Táto technika umožňuje stanovenie aktivity veľkého množstva látok a má mnoho výhod v porovnaní s tradičnými metódami skriningu. K výhodám tejto metódy patrí jej rýchlosť, jednoduchosť, nízke náklady a vysoká účinnosť.

Cieľom tejto práce bolo stanovenie cytotoxických účinkov in vitro nových chemických látok z unikátnej ÚMTM knižnice. Tieto látky boli testované na nádorových a nenádorových bunkových líniiach v 385- jamkových doštičkách. Stanovenie cytotoxických účinkov bolo prevedené pomocou MTS testu v HTS podmienkach. Pri primárnom skriningu bolo celkovo otestovaných 72 látok a z nich vyselektovaných 24 neaktívnych látok, na základe hodnoty PI. V sekundárnom skriningu boli otestované len aktívne látky z primárneho skriningu a následne boli stanovené hodnoty IC50 v programe Dotmatics.

Kľúčové slová: cytotoxicita, HTS

Počet strán: 61

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

## SUMMARY

Author's first name and Surname: Dominika Zabáková

Title of thesis: Analysis of the cytotoxic effects of new chemical substances in HTS conditions

Type of thesis: Bachelor

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine

Supervisor: Ing. Soňa Gurská, Ph.D

The year of presentation: 2021

### Abstract:

High throughput screening is quite a new technique, that is used in discovery of drugs in farmaceutic industry. This technique enables to determinate the activity of many substances and has many advantages in comparison to the traditional screening methods. Advantages of this methods are its speed, simplicity, low expenses and high efficiency.

The aim of this work was to qualify the cytotoxic effect *in vitro* of new chemical substances from unique ÚMTM library. The substances were tested on tumor and antitumor cell lines in 385-well plates. Determination of cytotoxic effects was made by MTS assay in HTS conditions. 72 substances were tested in a primary screening and 24 of them were defined as inactive according the PI value. Only active substances, from the primary screening, were tested in a secondary screening. After that the IC50 value was determined for all substances in a program called Dotmatics.

Keywords: cytotoxicity, HTS

Number of pages: 61

Number of appendices: 0

Language: Slovak

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som prácu vykonala samostatne pod vedením Ing. Soni Gurskej, PhD. Všetky zdroje a použitá literatúra, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.

V Olomouci dňa: .....

.....

Podpis

## **POĎAKOVANIE**

Týmto by som rada poďakovala pani Ing. Soni Gurskej, Ph.D. za odborné vedenie bakalárskej práce, trpezlivosť pri vysvetlení danej problematiky a cenné rady pri spracovaní. Ďalej by som chcela poďakovať za možnosť vypracovania svojej práci na tomto pracovisku a tiež všetkým pracovníkom Laboratória experimentálnej medicíny z Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.



1	ÚVOD .....	7
2	CIELE PRÁCE .....	8
3	LITERÁRNY PREHLAD .....	9
3.1	Akútna toxicita .....	9
3.2	Hodnotenie cytotoxicity <i>in vitro</i> .....	10
3.3	Bunkové testy .....	11
3.3.1	Typy bunkových kultúr .....	12
3.3.2	2D a 3D bunkové modely .....	13
3.4	Testy stanovenia cytotoxicity a životaschopnosti buniek .....	14
3.4.1	Testy integrity bunkovej membrány .....	15
3.4.2	Testy založené na metabolickej aktivite .....	16
3.4.2.1	Alamar Blue .....	16
3.4.2.1	LDH test .....	16
3.4.2.2	Testy založené na redukcii tetrazóliových solí (tetrazolium reduction assays) .....	17
3.4.3	Testy produkcie ATP .....	20
3.4.4	Testy bunkovej proliferácie s použitím nukleotidových analógov .....	20
3.5	Vysokokapacitný skrining (High-throughput screening, HTS) .....	21
3.5.1	Pokrok v metóde HTS .....	22
3.5.2	Potreba miniaturizácie .....	23
3.5.3	Automatizácia .....	24
3.5.4	Vyhodnotenie testov v HTS .....	25
3.6	Chemické knižnice .....	26
4	MATERIÁLY A METÓDY .....	29
4.1	Biologický materiál .....	29
4.2	Použité chemikálie súpravy a roztoky .....	30
4.3	Prístroje a vybavenie .....	31
4.4	Použité experimentálne vyhodnocovacie postupy .....	32
4.4.1	Príprava bunkových línií na experiment .....	32
4.4.2	Príprava testovaných látok .....	33
4.4.3	Ovplyvnenie buniek testovanými látkami – primárny skrining .....	33
4.4.4	Ovplyvnenie buniek testovanými látkami – sekundárny skrining .....	34
4.4.5	Metóda MTS .....	35
4.4.6	Spracovanie nameraných dát .....	35

5	VÝSLEDKY .....	36
5.1	Primárny skrining nových látok z ÚMTM chemickej knižnice.....	36
5.2	Sekundárny skrining aktívnych látok z ÚMTM chemickej knižnice.....	38
6	DISKUSIA .....	42
7	ZÁVER .....	45
8	LITERATÚRA .....	46

## ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

ATCC	American tissue and cultures collection
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický 3'-5'-adenosinmonofosfát
CML	chronická myeloidná leukémia
DMSO	dimetylsulfoxid
EC50	polovica maximálnej efektívnej koncentrácie
GPCR	receptor sprážený s G-proteínom
HTS	vysokokapacitný skrining
IC50	koncentrácia pri ktorej je usmrtených 50% buniek
IM	imatinib
LDH	laktátdehydrogenáza
LOPAC	knižnica farmakologicky aktívnych zlúčenín
MTP	mikrotitračné doštičky
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2(4sulfonyl)-2H tetrazolium
MTT	3- (4,5-dimetyltiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid
NADH	nikotínamidadeníndinukleotid
NCE	nové chemické subjekty
NRU	neutral red uptake
PI	percento inhibície
PKI	protein kinase inhibitor
PMS	fenazín metosulfát

TB	tripánová modrá
uHTS	ultra vysokokapacitný skrining
ÚMTM	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
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

Zoznam bunkových línií:

A549	bunková línia adenokarcinómu pľúc
BJ	bunková línia kožných fibroblastov
CCRF-CEM	bunková línia akútnej lymfoblastickej leukémie
CEM-DNR	bunková línia akútnej lymfoblastickej leukémie rezistentná k daunorubicínu
HCT116	bunková línia kolorektálneho karcinómu
HCT116 p53-/-	bunková línia kolorektálneho karcinómu s potlačeným génom pre proteín p53
K562	bunková línia erytromyeloblastickej leukémie
K562	bunková línia erytromyeloblastickej leukémie rezistentnej k paclitaxelu
MRC-5	bunková línia fibroblastov
U20S	bunková línia osteosarkómu

## ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. č. 1: Redukcia tetrazoliovej soli MTS na červený formazánový produkt, metabolicky aktívnymi bunkami

Obr. č. 2: Trend miniaturizácie pri skríningu. Obrázok ukazuje rôzne typy mikrotitračných doštičiek používaných pri vysokokapacitnom skríningu. Na začiatku a v polovici 90. rokov boli hlavným formátom skríningu mikrotitračné doštičky s 96 jamkami (96w-MTP). Tento typ doštičiek bol v posledných rokoch vo veľkej miere nahradený 384- jamkovými doštičkami a v niektorých prípadoch 1536- jamkovými doštičkami (384w-MTP, 1536w-MTP)

Obr. č. 3: Príklad usporiadania testovaných látok na 384-jamkovej doštičke pri primárnom skríningu (B- blank, L- pozitívna kontrola, C- bunky bez pridaných látok, H- negatívna kontrola, S- testované látky )

Obr. č. 4: Zobrazenie výsledkov v programe Dotmatics, odpovedajúce inhibícii rastu určitej bunkovej línie

Obr. č. 5: Cytotoxické účinky látky LEM23460 na bunkovú líniu CCRF-CEM.

Obr. č. 6: Cytotoxické účinky látky LEM 23460 na bunkovú líniu K562, a) pri testovaní v koncentračnom rozsahu 50 – 0,012  $\mu\text{M}$  b) pri testovaní v koncentračnom rozsahu 5 – 0,0012  $\mu\text{M}$

Obr. č. 7: Chemická štruktúra dasatinibu

## **ZOZNAM TABULIEK**

Tab. č. 1: Porovnanie pôvodného skríningu a skríningu na 96-jamkovej doštičke v HTS

Tab. č. 2: Prehľad použitých nenádorových bunkových línií

Tab. č. 3: Prehľad použitých nádorových bunkových línií

Tab. č. 4: Prehľad počtu buniek jednotlivých bunkových línií na jamku/1 ml/30 ml

Tab. č. 5: Konečná koncentrácia nanosených cytostatik a ich objem v 384- jamkovej doštičke

Tab. č. 6: Počet identifikovaných aktívnych látok z ÚMTM knižnice

Tab. č. 7: Rozdelenie látok na základe hodnoty IC<sub>50</sub>, vypočítanej z dát zo sekundárneho skríningu pomocou programu Dotmatics

Tab. č. 8: Porovnanie cytotoxickej aktivity látok LEM 11967 a LEM 23460 na jednotlivých bunkových líniách

Tab. č. 9: Vypočítaný Z' faktor pre jednotlivé bunkové línie

# 1 ÚVOD

Kľúčovou otázkou vo výskume biotransformácie liečiv bolo vytvorenie spoľahlivej extrapolácie z modelov *in vitro* či *in vivo* do klinickej praxe (Ishiyama et al., 1996). Postupom času preto došlo k používaniu testov na rôznych tkanivách, ktoré slúžia aj k stanoveniu toxicity látok. Tieto testy sa radia medzi prvé použité *in vitro* metódy (Tolosa et al., 2014). *In vitro* testovanie cytotoxicity poskytuje informácie pre klasifikáciu zlúčenín z hľadiska bezpečnosti. Tieto metódy merajú životaschopnosť, integritu bunkovej membrány, bunkovú proliferáciu a metabolickú aktivitu. Najpoužívanejším nástrojom v bunkovej biológii pre stanovenie bunkovej viability, proliferácie a metabolickej aktivity buniek od cicavcov až po mikrobiálny pôvod sa stali tetrazóliové soli (Sumantran, 2011; Tsukatani et al., 2009). Najbežnejšie zo spomenutých tetrazóliových solí pri skriningových metódach sú MTT a MTS, ktoré merajú mitochondriálnu enzymatickú aktivitu na základe čoho je možné odlišiť životaschopné proliferujúce bunky od buniek mŕtvych (McGowan, 2013).

Zvyšovaním množstva nových molekúl vyžadoval vývoj HTS technológií včasné testovanie veľkého množstva zlúčenín (Schnecke a Bostrom, 2006). HTS sa v súčasnosti bežne používajú v spojení s výpočtovými metódami a informačnými technológiami na skúmanie interakcie chemikálií s biologickými systémami *in vitro* aj *in vivo* (Ticeet et al., 2013). HTS preto úspešne umožňuje skrining veľkých chemických knižníc na generovanie záznamov potrebných v medicínskej chémii pri výskume liekov (Thorne et al., 2010).

Na stanovenie cytotoxicity našich 72 testovaných látok bola použitá kolorimetrická metóda CellTiter 96® (MTS) založená na stanovení metabolicky aktívnych buniek. Hodnota IC50 bola stanovená pomocou kvantitatívneho metabolitu MTS, kedy dochádza k jeho redukcii na farebný produkt formazan. Množstvo formazanu bolo následne detekované meraním absorbancie a je priamo úmerné životaschopným bunkám (Tokarenko et al., 2018).

## **2 CIELE PRÁCE**

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce.
2. Stanovenie cytotoxických účinkov nových chemických látok na úrovni HTS, primárny a sekundárny skrining.
3. Stanovenie hodnoty IC50 a rozdelenie podľa cytotoxických účinkov.



## 3 LITERÁRNY PREHĽAD

### 3.1 Akútna toxicita

Typické výskumné modely v toxikológii sa pôvodne spoliehali na testovanie na zvieratách, za účelom stanovenia nepriaznivých efektov chemikálií s komerčným alebo ekologickým významom (Bucher a Portier, 2004). Preto boli prvé využívané modely pre stanovenie toxicity liečiv a ich metabolitov modely *in vivo* (malé živočíšne druhy ako myši, potkany, králiky), ktoré sa využívali pre stanovenie akútnej alebo chronickej toxicity (Costa, 2014). Testovanie na zvieratách sa využívalo hlavne pre ich dobrú prognózu ľudskej toxicity, ktorá sa pohybovala okolo 70-80% (Olson et al., 2000). Existuje však niekoľko nedostatkov *in vivo* metód. Dôležitým obmedzením je medzidruhovú variabilita medzi zvieratami a človekom (dĺžka života, odlišné fyziologické a biochemické procesy), čo komplikuje extrapoláciu výsledkov na človeka, ktoré sú získané testovaním na zvieratách (Blaauboer et al., 2002; Devlin et al., 2005).

Vývoj nového medicínskeho produktu je dlhotrvajúci a finančne náročný proces, hlavne kvôli regulačným odporúčaniam týkajúcich sa kvality, bezpečnosti a účinnosti. V súčasnosti je veľký záujem zvýšiť účinnosť a vývoj liečiv a tiež rýchlejšie poskytnúť nové medicínske produkty lepšej kvality pre verejnosť. Jednou z možností ako ušetriť čas a náklady, tiež s ohľadom na ochranu zvierat, bolo predstavenie novej alternatívnej metódy bez klinických testov (Ukelis et al., 2008). Keďže prišlo v Európskej únii k postupnému zákazu testovania kozmetiky na zvieratách, čo spôsobilo problémy v priemysle, bolo nutné nájsť vyhovujúce riešenie. (Pauwels a Rogiers, 2010) Alternatívnou náhradou *in vivo* testov sa stali testy *in vitro* (Ukelis et al., 2008), ktoré umožňujú testovať stovky až tisíce chemikálií s veľkým množstvom biologických odpovedí (Houck a Kavlock, 2008) v rovnakom čase, čo slúži na predpovedanie akútnej toxicity a tým k urýchleniu vývoja liečiv (Ukelis et al., 2008). Vo farmaceutickom priemysle sa preto vo veľkom začali využívať v testovaní liečiv bunkové testy, ktoré čiastočne spojili rozdiely medzi analýzami na molekulárnej úrovni a testami na zvieratách. Okrem toho, nahradenie testov *in vivo* metódami *in vitro*, sa preukázalo ako efektívne a etické riešenie v prospech zvierat (Wu et al., 2010).

V roku 1985 Willi Halle skonštruoval model pre vzťah regresie medzi *in vitro* a *in vivo* na základe dát toxicity získaných z myši a potkanov. V tomto vzťahu použil hodnoty IC50 (*in vitro* inhibičná koncentrácia) (Halle et al., 2003) a LD50 (*in vivo* priemerná maximálna letálna dávka) (Sedykh et al., 2011). Podľa Halleho výsledku nám pozitívna korelácia medzi *in vivo*

a *in vitro* dátami umožňuje predpovedať potenciálnu toxicitu xenobiotík alebo klasifikovať látky na základe toxicity (Ukelis et al., 2008). Predpokladá sa, že bunková životaschopnosť je funkciou koncentrácie liečiv. Životaschopnosť je popísaná sigmoidnou funkciou s dvoma parametrami. Jeden parameter určuje hodnotu IC50 vzhľadom ku maximálnej použitej koncentrácii a druhý parameter určuje smernicu (slope). (Vis et al., 2016).

### 3.2 Hodnotenie cytotoxicity *in vitro*

Dôležitým pilierom pri procese vývoja nových liekov sú *in vitro* testy, založené na bunkových kultúrach, ktoré poskytujú jednoduchý, rýchly a nákladovo efektívny nástroj. Týmto sa predchádza rozsiahlemu, nákladnému a časovo náročnému testovaniu na zvieratách od ktorého sa tiež upúšťa v rámci etických noriem (Raies a Bajic, 2016; Edmondson et al., 2014).

Cytotoxicita je jeden z najdôležitejších indikátorov pre biologické vyhodnotenie *in vitro* štúdie (Aslantürk, 2017). Ide o čo najpresnejšie imitovanie a predpovedanie biologickej odpovedi živých organizmov (Kijanska et al., 2016), preto je cytotoxická analýza *in vitro* rozšírená z dôvodu dopytu pre testovanie bezpečnosti nových liečiv s cieľom minimalizovať riziká pre zdravie ľudí (Ceriotti et al., 2007). Chemikálie ako liečivá a pesticídy, majú rozdielne cytotoxické mechanizmy *in vitro*, ako napríklad deštrukcia bunkovej membrány, predchádzanie syntézy proteínov, ireverzibilné viazanie k receptorom a mnohé ďalšie (Aslantürk, 2017). Za účelom stanovenia bunkovej smrti spôsobenou týmito mechanizmami je potreba využívať lacné, spoľahlivé, reprodukovateľné a krátkodobé cytotoxické analýzy. V súčasnosti sa tieto analýzy používajú aj v onkologickom výskume na vyhodnotenie toxicity a rastovej inhibícii nádorových buniek počas vývoja liečiv (Ishiyama et al., 1996).

Analýzy cytotoxicity a bunkovej viability *in vitro* majú mnoho výhod, a to rýchlosť, redukované náklady, automatizácia a použitie ľudských buniek. V niektorých prípadoch môžu byť oveľa spoľahlivejšie ako určité *in vivo* testy na zvieratách (Aslantürk, 2017). Nevýhodou však môže byť testovanie prevažne na nádorových bunkových líniiach s podstatnou abnormálnou funkciou. Taktiež absencia biologickej kinetiky v metódach *in vitro* môže viesť k nesprávnej interpretácii dát (Saeidnia et al., 2015).

Bunky sú považované za mŕtve ak splňajú aspoň jedno z nasledujúcich kritérií: plazmatická membrána stratila svoju integritu, bunka sa rozpadla na apoptické časti tela alebo jednotlivé fragmenty tela bunky sú pohltené susednými bunkami (Kepp et al., 2011). Látka je

považovaná za cytotoxickú v prípade, že ovplyvňuje rýchlosť replikácie, spôsobuje výrazné zmeny v morfológii alebo vedie k zníženiu celkovej viability. Za zmienku stojí, že jej účinok závisí nielen od expozície zlúčeniny, ale aj od mechanizmu akým cytotoxicitu spôsobuje (Niles et al., 2009). Výsledky cytotoxicity sú založené na bunkovej reakcii, ktorá vzniká na základe pôsobenia liekov, látok alebo vplyvom vonkajších podnetov (Edmondson et al., 2014).

### 3.3 Bunkové testy

Bunkové a tkanivové kultúry boli vyvinuté už od 19. storočia so záujmom študovania aktivity buniek izolovaných z ich pôvodných tkanív, analyzovania bunkovej viability a delenia v *in vitro* systémoch (Rodríguez-hernández et al., 2014). *In vitro* modely bunkových kultúr sú výhodné a tiež šetriace čas pri výskume kandidátov liečiv (Fang a Eglén, 2017).

V súčasnosti je využívané široké spektrum cytotoxických analýz vo sfére toxikológie a farmakológie. Voľba vhodnej metódy spomedzi všetkých je dôležitá pre získanie správnych a spoľahlivých výsledkov. Pri voľbe metód cytotoxicity a bunkovej viability treba zvážiť viaceré parametre, ako testované zlúčeniny, mechanizmy detekcie a tiež špecifitu a senzitivitu (Aslantürk, 2017).

Testy životaschopnosti buniek sú jedným z najčastejšie používaných fenotypových testov pri objavovaní liekov (Swinney a Anthony, 2011; Zheng et al., 2013). Neregulovaná bunková smrť je spojená s mnohými ľudskými chorobami, vrátane rakoviny, neurodegenerácie a mŕtvice (Kepp et al., 2011). Malé molekuly, ktoré môžu modulovať životaschopnosť buniek, sú preto nádejnými kandidátmi na potenciálne terapeutiká rakoviny (zabíjanie buniek) a neurodegeneratívnych porúch (záchrana buniek) (Botham, 2004). Skrining životaschopnosti buniek by preto mohol slúžiť ako primárny test na identifikáciu zlúčenín, ktoré ničia rakovinové bunky alebo exogénne patogény vrátane baktérií, húb a parazitov, alebo ako test na vylúčenie zlúčenín s nežiaducou cytotoxicitou, čo pomáha určiť osud testovaných zlúčenín pri objavovaní a vývoja liekov (Kepp et al., 2011).

Testy životaschopnosti buniek v zásade spadajú do dvoch kategórií: testy, ktoré priamo detegujú bunkovú smrť vitálnymi farbivami, a testy, ktoré merajú náhradné biomarkery životaschopnosti vrátane mitochondriálnej aktivity, bunkového metabolizmu alebo aktivity enzýmov spojených so životaschopnosťou buniek. Hlavné výzvy v testoch životaschopnosti buniek sú dvojaké: 1) rôzne bunkové línie môžu reagovať na rovnaké chemikálie s rôznou

citlivosťou a v testoch životaschopnosti buniek neexistuje žiadna jediná bunková línia, ktorá by bola reprezentatívna alebo presvedčivá a 2) bunková smrť je dynamický proces, zatiaľ čo test životaschopnosti buniek je viac-menej statický moment. V chemicky indukovaných testoch cytotoxicity niektoré chemikálie vyvolávajú rýchlu cytotoxicitu moduláciou rýchlo reagujúcich cieľov, ako sú iónové kanály, zatiaľ čo niektoré reagujú pomaly interferenciou s dráhami bunkového cyklu (Hsieh et al., 2011).

Zdá sa, že vyvážená súhra medzi apoptózou, autofágiou a regulovanou nekrozou určuje bunkový koncový bod, ktorá zahŕňa niekoľko centrálnych efektorových molekúl smrti fungujúcich ako mediátory pre prežitie alebo smrť (Nikoletopoulou et al., 2013). Situácia sa stáva ešte zložitejšou pri zvažovaní cytostatických vlastností zlúčenín. Cytostatické zlúčeniny nezabíjajú bunky, ale naopak vyvolávajú inhibíciu bunkovej proliferácie a rastu. Identifikované mechanizmy zahŕňajú poškodenie DNA, inhibíciu DNA polymerázy, zvýšenú onkogénnu signalizáciu, oxidačný stres a cytoskeletálnu inhibíciu (Rixe a Fojo, 2007).

### 3.3.1 Typy bunkových kultúr

Podľa spôsobu kultivácie môžeme bunkové kultúry rozdeliť do dvoch kategórií:

a) Suspenzné bunkové kultúry.

Z veľkej časti ide o krvné bunky, pri ktorých dochádza k reprodukcií aj v podmienkach *in vitro* a je možné ich kultivovať aj po dlhšiu dobu. Veľkou výhodou tohto systému je ich homogénna koncentrácia a tým aj dobrá možnosť premiešania. Nevýhodou však je nutnosť separácie buniek od média v prípade použitia v ďalšej štúdií (Bhojwani a Razdan, 1996).

Pre využitie bunkových suspenzných kultúr je potrebné udržať vysokú kvalitu kultivovaných buniek. Rozbor obrazu je nutný pre realizáciu neinvazívneho, jednoduchého a objektívneho hodnotenia buniek suspenznej kultúry. Medzi faktory hodnotenia sa radí tvar, veľkosť, farba a tempo rastu (Aitken-Christie et al., 1995).

b) Adherentné bunkové kultúry.

Čo sa týka práce s adherentnými bunkovými kultúrami v podmienkach *in vitro*, či už ľudského alebo živočíšneho pôvodu, je tento systém jeden z najpoužívanejších experimentálnych usporiadaní. Kultivovanie buniek prebieha v plastových kultivačných fľašiach, doskách alebo aj viac-jamkových doskách. Pri týchto bunkových kultúrach je nutné

prilnutie na povrch, k čomu slúžia elektrostaticky nabité plasty. Od povrchu sa oddeľujú buď mechanicky alebo enzymaticky (Darzynkiewicz, 2005).

Ku kultivácii väčšiny typu buniek sú komerčne dodávané špeciálne médiá. Tieto médiá obsahujú potrebné množstvá a kombinácie vitamínov, hormónov, esenciálnych substrátov a mnohých ďalších potrebných látok. Pre zabezpečenie proliferácie a diferenciácie buniek sa do médií pridáva telacie fetálne sérum bohaté na rastové faktory. Bunkové kultúry sa často krát kultivujú za prítomnosti antibiotík a udržiavajú sa v špeciálnych inkubátoroch, obvykle pri teplote 37 °C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> (Darzynkiewicz, 2005).

### 3.3.2 2D a 3D bunkové modely

Počiatky použitia bunkových kultúr sa uvádzajú od experimentu pána Roucha, ktorý vykonal prvý bunkový test, kedy potvrdil, že bunky izolované zo živých tkanív sú schopné prežiť v roztoku podobnom *in vivo* podmienkam (Rodríguez-hernández et al., 2014).

Klasické bunkové kultúry, známe ako 2D bunkové kultúry, predstavujú osvedčenú metódu a vhodný bunkový model (Souza et al., 2018). Patria sem imortalizované bunkové línie, kmeňové bunky alebo primárne bunky a využívajú sa ako najčastejší model na hodnotenie cytotoxicity *in vitro*. Typ buniek závisí od navrhutej aplikácie nanomateriálov a očakávaných *in vivo* cieľových orgánov (Jones a Grainger, 2009). V rámci 2D modelu bunky rastú na plochých diskoch na ktoré adherujú a rozmnožujú sa za vzniku monovrstvy prilnutých buniek na plastový povrch. Avšak monovrstvy bunkových kultúr majú tiež svoje obmedzenia, ako odlišné bunkové interakcie (neposkytujú interakcie medzi bunkami, bunkou a matrix), neprítomnosť štruktúrnej architektúry, mechanických a biochemických signálov prítomných v *in vivo* prostredí. Z uvedených dôvodov *in vitro* testy nemôžu úplne odpovedať testom vykonaným *in vivo* (Antoni et al., 2015; (Chen et al., 2019; Souza et al., 2016).

Napriek tomu, že v posledných desaťročiach bola rýchlosť identifikácie potenciálnych terapeutických liekov výrazne zvýšená, je počet liekov, ktoré nakoniec prejdú klinickými skúškami a dostanú sa na trh, veľmi nízky (Van Hunsel, 2017). Väčšina kandidátov potenciálnych liekov hodnotených v laboratóriu v praxi vykazujú buď nízku klinickú účinnosť alebo neprípustnú toxicitu. Medzi mnohými dôvodmi je jedno zjavné vysvetlenie, že konvenčné bunkové modely *in vitro* na skríning liekov sú založené na reakciách buniek kultivovaných v dvojrozmerných monovrstvách na plochých pevných plastových doskách, čo je (Kenny et al. 2007; Lee et al., 2007) dramaticky odlišné od fyziologických podmienok.

Například rast nádoru *in vivo* má oveľa zložitejšiu štruktúru, ktorá obsahuje rakovinové bunky, stromálne bunky a extracelulárnu maticu (Wurtzel a Mao, 2017; James et al., 2012). Tieto zložky sa nielen navzájom spájajú, ale vytvárajú aj mikroprostredie na podporu rastu rakovinových buniek, invázie, ako aj ochrana nádorových buniek pred poškodením (Liu et al., 2018).

3D kultúry boli jedným z najlepších riešení napodobňujúce *in vivo* systémy väčšiny bunkových typov, čím sú považované za spojovacie mosty pri vyhodnotení protirakovinových liekov medzi *in vitro* a *in vivo*. Zistilo sa, že 3D modely kompenzujú veľa nedostatkov vyskytujúcich sa pri 2D bunkových kultúrach (Weng et al., 2019). Využívajú výhody jednak jednoduchosti a ľahkosti použitia 2D bunkovej kultúry, a tiež niektoré vlastnosti podobné zvieraciemu modelu *in vivo* (Li et al., 2017). Vzhľadom k tomu je možné vykonávať testy s vysokou klinickou relevantnosťou pre analýzu skríningu, pôsobenia a rezistencie protinádorových liekov (Souza et al., 2018). Tento model vykazuje premenné vlastnosti ako zmeny pH, hypoxia, rôzne škály bunkového delenia, dormanciu, rezistenciu voči liečivám a apoptóze čím sa blíži k napodobneniu prostredia *in vivo* nádorových buniek. Jedným z kľúčových znakov 3D bunkových kultúr je to, že sféroidný tvar pravdepodobne podporuje tvorbu hypoxického mikroprostredia, ktoré ovplyvňuje bunkový metabolizmus. V dôsledku toho je 3D systém jeden z hlavných pokrokov v tejto oblasti, reprezentujúci najlepšieho kandidáta pre skrining liečiv proti rakovine a štúdiá v oblasti vývoja nádorov (Imamura et al., 2015; Liu et al., 2018).

### **3.4 Testy stanovenia cytotoxicity a životaschopnosti buniek**

Testy analyzujúce životaschopnosť buniek slúžia k stanoveniu celkového popripade žiadneho bunkového rastu, ako odpoveď na vonkajšie podnety (Sundberg, 2000). Prevedenie testov je relatívne nenáročné, avšak v porovnaní s bezbunkovými testami časovo náročnejšie (Szymański et al., 2012).

Bunkové testy zahŕňajú rôzne metódy, ktoré merajú bunkovú proliferáciu, toxicitu, produkciu markerov, motilitu, aktiváciu špecifických signálnych dráh a zmeny morfológie (Michellini et al., 2010). Veľké množstvo, z uvedených testovacích metód, je založené na rôznych bunkových funkciách, ako je enzýmová aktivita, permeabilita bunkovej membrány, adherencia buniek, produkcia ATP, produkcia koenzýmu a aktivita absorpcie nukleotidov. Tieto metódy by sa dali v zásade rozdeliť do rôznych kategórií: (I) metódy vylúčenia farbív, (napr. Trypan Blue assay), (II) metódy založené na metabolickej aktivite, (III) test ATP, (IV)

test sulforhodamínu B, (V) proteázový test markerov životaschopnosti, a (VI) testy syntézy buniek DNA (Adan et al., 2016). Na základe posúdenia účinnosti a špecifickosti umožňujú charakterizovať potenciálne liečivá pomocou vyhodnotenia ich účinkov na bunky (Szymański et al., 2012).

### 3.4.1 Testy integrity bunkovej membrány

Test založený na vylučovaní farbiva (dye exclusion assay) sa používa na stanovenie počtu životaschopných buniek prítomných v bunkovej suspenzii. Zistilo sa, že integrita bunkovej membrány je základným kritériom na odlíšenie buniek mŕtvych od živých. Test založený na princípe, že živé bunky majú intaktné bunkové membrány, ktoré vylučujú určité farbivá, ako je trypanová modrá, eoziín alebo propídium, zatiaľ čo mŕtve bunky nie, t.j. mŕtve bunky zostávajú zafarbené. Ide o jednoduchú a rýchlu techniku merania životaschopnosti buniek. Problémom však je, že životaschopnosť sa určuje nepriamo z integrity bunkovej membrány. Je teda možné, že životaschopnosť bunky mohla byť narušená (merané podľa kapacity rastu alebo funkcie), aj keď je jej membránová integrita (aspoň prechodne) zachovaná. Naopak, integrita bunkovej membrány môže byť abnormálna, ale bunka je schopná reparácie a tým sa stať plne životaschopnou (Kroemer et al., 2009; Strober, 2015).

Farbivá schopné selektívne preniknúť do cytoplazmy odumretých buniek sa teda široko používali ako vitálne farbivá. Metóda trypanovej modrej (TB) je veľmi častým testom na hodnotenie cytotoxicity v experimentálnych štúdiách (Avelar-Freitas et al., 2014), kedy mŕtve bunky absorbujú TB do cytoplazmy kvôli strate membránovej selektivity, zatiaľ čo živé bunky zostávajú nezafarbené (Tennant, 1964). Relatívny počet mŕtvych a živých buniek sa teda získa optickou mikroskopiou spočítaním počtu zafarbených (mŕtvych) a nezafarbených (živých) buniek pomocou Neubauerovej komory. Ak sa tento konvenčný test vylúčenia TB používa pre veľké množstvo vzoriek, môže poskytnúť výsledky s nízkou presnosťou z dôvodu dlhého časového úseku a potrebného intenzívneho mikroskopického vyšetrenia (Kim et al., 2011).

Sofistikovanejšou metódou merania životaschopnosti buniek je stanovenie vylúčenia farbiva prietokovou cytometriou. To sa dá urobiť pomocou trypanovej modrej, pretože tento proteín sa viaže na proteíny a potom vysiela fluorescenčný signál, ktorý sa dá detegovať v prietokovom cytometri (pri 660 nm, pri naviazaní na hovädzi sérový albumín). Alternatívne je možné vylúčenie merať pomocou iných farbív emitujúcich svetlo, ako je propídium jodid

(PI) (Strober, 2015). Podobne ako TB, PI má tiež schopnosť sa penetrovať do mŕtvych buniek a tak vytvárať komplex s DNA (Riccardi a Nicoletti, 2006).

### **3.4.2 Testy založené na metabolickej aktivite**

Na stanovenie počtu buniek sa používajú metabolické testy, ako je Alamar Blue, vo vode rozpustná tetrazoliové soli a 3- (4,5-dimetyltiazol-2-yl) -2,5-difenyl-tetrazóliumbromid, ktoré boli pôvodne vyvinuté na stanovenie bunkovej toxicity (Quent et al., 2010).

#### **3.4.2.1 Alamar Blue**

Alamar Blue sa za posledných 50 rokov široko používal v štúdiách životaschopnosti buniek a cytotoxicity v rade biologických a environmentálnych systémov. Všeobecne sa jeho použitie uplatňuje na rôzne aspekty monitorovania bunkového zdravia ( Ashmed et al., 1994; O'Brien et al., 2000), apoptózy, funkcie a kontroly bunkového cyklu, toxikológie testovaných látok v medicíne a pri hodnotení rizík pre životné prostredie, cytotoxicity a testovanie antimikrobiálnej citlivosti. Alamar Blue ponúka veľa výhod oproti tetrazóliovým soliam (Hamid et al., 2004; White et al., 1996).

Ide o liečivo resazurín (názov IUPAC: 7-hydroxy-10-oxidofenoxazín-10-ium-3-ón), tiež známy ako diazorezorcínol, azoresorcín, resazoín alebo resazurín, ktorý je rozpustný vo vode, stabilný v kultivačnom prostredí, je netoxický a priepustný cez bunkové membrány. Vďaka tomu je povolené nepretržité sledovanie buniek v kultúre. Je to modré nefluorescenčné farbivo, ktoré sa redukuje na ružovo sfarbený, vysoko fluoreskujúci resorufín (Kreft a Kreft, 2009). Pretože indikátorové farbivo prijíma elektróny, mení sa z oxidovaného, nefluorescenčného, modrého stavu na redukované, fluorescenčné, ružové (Page et al., 1993). Okrem mitochondriálnych reductáz sú potrebné aj ďalšie enzýmy ako napríklad diaforázy (Matsumoto et al., 1990), NAD(P)H a flavín reductáza, ktoré môžu redukovať Alamar Blue. Zmena z oxidovaného na redukovaný stav umožňuje flexibilitu detekcie, pri ktorej môžu byť merania kvantitatívne ako kolorimetrické a fluorometrické údaje alebo kvalitatívne ako viditeľná zmena farby indikujúca prítomnosť alebo neprítomnosť životaschopných buniek (Rampersad, 2012).

#### **3.4.2.1 LDH test**

Ďalšou bežnou metódou na stanovenie cytotoxicity je LDH test, ktorý je založená na meraní aktivity cytoplazmatických enzýmov uvoľňovaných poškodenými bunkami. Kľúčovým podpisom pre nekrotické bunky je permeabilizácia plazmatickej membrány. Túto



udalosť je možné kvantifikovať v prostredí tkanivových kultúr meraním uvoľňovania enzýmu laktátdehydrogenázy (LDH). V kombinácii s inými metódami je meranie uvoľňovania LDH užitočnou metódou na detekciu nekrózy (Chan et al., 2013).

LDH je stabilný, rozpustný, cytoplazmatický enzým, ktorý sa nachádza takmer vo všetkých bunkách (Burd a Usategui-Gomez, 1973). Tento enzým katalyzuje premenu pyruvátu na L-laktát so sprievodnou premenou NADH na  $\text{NAD}^+$  počas glykolýzy a katalyzuje reverzné reakcie počas Coriho cyklu (Decker a Lohmann-Matthes, 1988; Nachlas et al., 1960). LDH sa rýchlo uvoľňuje do supernatantu bunkovej kultúry, keď je poškodená plazmatická membrána, čo je kľúčový znak buniek podliehajúcich apoptóze, nekróze a iným formám bunkového poškodenia (Kumar et al., 2018).

Na detekciu úniku LDH do bunkového kultivačného média sa v tomto teste používa tetrazoliová soľ. V prvom kroku LDH produkuje redukovaný nikotínamid adenín dinukleotid (NADH), keď katalyzuje oxidáciu laktátu na pyruvát. V druhom kroku sa tetrazoliová soľ prevedie na sfarbený formazánový produkt pomocou novo syntetizovaného NADH v prítomnosti akceptora elektrónov (Korzeniewski a Callewaert, 1983). Množstvo formazánového produktu je možné kolorimetricky kvantifikovať štandardnou spektroskopiou. Test spočíva v predpoklade, že zvýšenie množstva formazanu produkovaného v supernatante kultúry priamo koreluje s životaschopnosťou buniek. Z dôvodu linearity testu sa môže použiť na výpočet percentuálneho podielu nekrotických buniek vo vzorke (Kaja et al., 2015; Chan et al., 2013).

#### **3.4.2.2 Testy založené na redukcii tetrazóliových solí (tetrazolium reduction assays)**

Tetrazoliové soli sa stali jedným z najbežnejšie používaných nástrojov v bunkovej biológii na meranie bunkovej viability, proliferácie (Sumantran, 2011) a metabolickej aktivity buniek od cicavcov až po mikrobiálny pôvod (Tsukatani et al., 2009). Metódy založené na tetrazóliových solí sú efektívne, bežne používané a cenovo nenáročné (Mosmann, 1983), a preto sa využívajú po mnoho rokov na odlíšenie živých buniek od buniek mŕtvych. Tieto soli sú redukované na formazany pôsobením cytochrómového systému živých buniek, kde vzniknutá farebná zmena je priamo úmerná viabilite skúmanej kultúry (Cory et al., 1991).

Na detekciu živých buniek bolo použitých mnoho variant tetrazoliových zlúčenín. K najviac používaným zlúčeninám patria MTT, MTS, XTT a WST-1 (Rampersad, 2012). Tieto zlúčeniny spadajú do dvoch základných kategórií : 1) MTT ktoré je kladne nabitá a ľahko

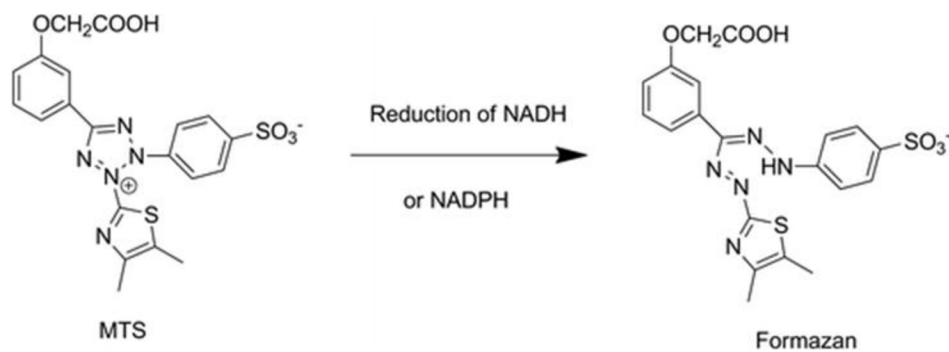
peniká do živej eukaryotickej bunky a 2) zlúčeniny ako MTS, XTT a WST-1, ktoré sú negatívne nabité, a preto nie sú schopné ľahkej penetrácie do živej bunky. Druhá skupina zlúčenín sa preto používa s prechodným elektrónovým akceptorom, ktorý je schopný prenášať elektróny z cytoplazmy a tým umožniť redukciu tetrazólia na farebný produkt formazan (Riss et al., 2013). Tetrazóliové soly sú vo všeobecnosti cytotoxické, pretože redukciou vzniknuté kryštály formazanu musia byť rozpustené v DMSO či HCL/isopropanole, ktoré ničia skúmané bunky (Mosmann, 1983).

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) tetrazolium reduction assay (Nga et al. 2020) bola prvá homogénna analýza bunkovej viability, navrhnutá pre 96- jamkovú doštičku, ktorá bola vhodná pre vysokokapacitný skrining (Mosmann T. 1983). MTT je kalorimetrická analýza založená na redukcii žltej solubilnej molekuly MTT na fialový produkt formazan vo forme kryštálov (Sylvester P. W. 2011). K štiepeniu dochádza prostredníctvom mitochondriálnych enzýmov ako sukcinát dehydrogenáza (Stone et al. 2009), na membráne metabolicky aktívnych buniek (McGowan et al 2011). Keďže je MTT ľahko redukateľný, často krát nevyžaduje redoxný prostriedok ako phenazin metylsulfát (PMS) (Cory et al. 1991). Táto metóda bolo prvý krát využitá Mossmanom, na detekciu proliferácii a prežitia buniek. Výhodou analýzy je jej presnosť a rýchlosť, vďaka čomu si táto metóda získala nezastúpiteľnú úlohu v meraní viability buniek. Nevýhodou však je, že MTT produkuje nerozpustný produkt formazan, ktorý vyžaduje nasávanie média a pridanie rozpúšťadla pre rozpustenie kryštálikov, aby bolo možné zmerať absorbanciu (Roehm et al 1991).

Kvantita formazanu (priamo úmerná počtu živých buniek) je meraná pri absorbancii 570 nm pomocou spektrofotometra (Kumar et al. 2018). Keď bunky zomrú, stratia schopnosť premeny MTT na formazan, z toho dôvodu farebná zmena slúži ako užitočný marker len živých buniek (Marshall N. J. 1995).

MTS test (5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethyl-thiazoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium) patrí ku kalorimetrickým metódam (Ganguly et al., 2006). Táto analýza funguje na princípe redukcie soli, na farebný vo vode rozpustný produkt formazan, pôsobením mitochondriálneho enzýmu dehydrogenázy (O'Toole et al., 2003), ktorý je exprimovaný iba v metabolicky aktívnych, inak povedané v životaschopných bunkách (obr. 2). Množstvo vyprodukovaného formazanu je preto priamo úmerné počtu prítomných životaschopných buniek (Mikus a Steverding, 2000) ktorý je detegovaný priamo pri 490 nm (Malich et al.,

1997). Avšak pre dosiahnutie odpovedajúcej citlivosti MTS testu je nutná dôkladná optimalizácia, vzhľadom k tomu, že množstvo vyprodukovaného formazanu závisí na faktoroch ako počet buniek, pH média, použitá bunková línia atď (Jacobsen et al., 1996). Formazánové produkty, ktoré vznikli bioredukciou MTS, sú priamo rozpustné v kultivačnom médiu, a preto ich nie je nutné rozpúšťať ako pri teste MTT (Castell a Gmez-Lechn, 1996). Z tohto dôvodu je MTS test považovaný za alternatívnu metódu k MTT, kedy dochádza k tvorbe formazanu, ktorý je rozpustný vo vode a je menej toxický. Z dôvodov uvedených vyššie, sa test MTS sa využíva preferenčne pred testom MTT v mnoho štúdiách (O'Toole et al., 2003). Test MTS je jednoduchý, rýchly, vysoko reprodukovateľný a vhodný pre skrining liečiv, identifikáciu izolátov rezistentných k liečivám a tiež pri štúdie kinetiky rastu (Berg et al., 1994).



**Obr. č. 1:** Redukcia tetrazoliovej soli MTS na červený formazánový produkt, metabolicky aktívnymi bunkami (prevzaté z: McCauley, et al. 2013)

Rovnako ako XTT, bioredukcia MTS vyžaduje prídanie intermediárneho elektrónového akceptoru phenazin metylsulfátu (PMS) (Buttke et al., 1993) alebo phenazín etylsulfátu (PES) prenikajúce cez živé bunky a tým môžu previesť tetrazólium na rozpustný formazan (Goodwin et al., 1995). Svojím výkonom je MTS test konkurujúci s ostatnými toxikologickými testami, pretože poskytuje ideálne vlastnosti na meranie cytotoxicity (je ľahko použiteľný, rýchly, spoľahlivý a pomerne lacný). Môže sa preto použiť na rôzne toxikologické hodnotenie látok (Berg et al., 1994; Cory et al., 1991).

### 3.4.3 Testy produkcie ATP

Vzhľadom k tomu, že testy ako dye exclusion assay interferujú alebo dokonca poškodzujú chod bunky patria k terminálnym testom. Preto boli vyvinuté iné testy, ktoré nepriamo merajú životaschopnosť buniek kvantifikáciou redukcie intracelulárneho prostredia pomocou indikátorových metabolických markerov a ponúkajú menšie obmedzenia ako iné metódy. Pri testoch, ktoré kvantifikujú intracelulárne ATP (stav ATP buniek odráža energetickú kapacitu a životaschopnosť buniek), naznačuje koncentrácia ATP počet životaschopných buniek v tejto kultúre (Rampersad, S. N., 2012).

Test ATP je vysoko citlivá a všestranná metóda na meranie cytotoxicity (Tahara et al., 2017).

Bolo vyvinutých veľa metód hodnotenia cytotoxicity na preskúmanie viability a proliferácie kultivovaných buniek v prítomnosti rôznych chemických látok (Cook a Mitchell, 1989). Z rôznych používaných cytotoxických testov je ATP metóda najľahšia na vykonanie a tiež najviac šetrná k času, na rozdiel od testov ako MTT a NRU (neutral red uptake), ktoré vyžadujú absorpciu látok bunkou. Z toho dôvodu je ATP široko používaná pre hodnotenie bunkovej viability.

ATP test využíva bioluminiscenciu ako indikátor počtu živých buniek. Je to rýchly, jednoduchý a citlivý test cytotoxicity (Kuzmits et al., 1986). ATP test môže byť použitý k vyhodnoteniu fungujúcej integrity živých buniek, vzhľadom k tomu, že všetky bunky vyžadujú ATP pre bunkové funkcie (Augustine et al., 2007). Tento test je špeciálne výhodný, pretože jeho aplikácia má 100-násobne vyššiu senzitivitu ako MTS test (Tahara et al., 2017). Vysoká citlivosť, univerzálnosť, rýchlosť, a jednoduchosť ATP testu je dôvodom vysoko odporúčanej metódy cytotoxických testov (Castano a Tarazona, 1994).

### 3.4.4 Testy bunkovej proliferácie s použitím nukleotidových analógov

Testy bunkovej proliferácie monitorujú aktívne sa deliace bunky, vyjadrené buď ako skutočný počet aktívnych buniek, alebo ako pomer proliferujúcich k neproliferujúcim bunkám v kultúre (Quent et al., 2010; Stoddart, 2011). Bunky v pokojovom stave, ktoré sú zdravé, ale neproliferujú, sa nedetegujú pomocou testov bunkovej proliferácie. Meranie syntézy DNA sa použilo ako špecifický marker v aktívne sa deliacich bunkách. V týchto testoch sa k bunkám pridajú označené nukleotidové analógy (napr.  $[^3\text{H}]$ -tymidín alebo 5-bróm-2'-deoxyuridín [BrdU]), ktoré sa inkorporujú do replikovanej DNA počas fázy S bunkového cyklu. Množstvo označeného nukleotidu sa potom kvantifikuje buď pomocou merania celkového množstva

označenej DNA v populácii buniek alebo spočítania počtu označených jadier pod mikroskopom. Rýchlosť rastu buniek bude určovať rýchlosť bunkového obratu, ktorá určuje inkubačnú dobu s označenými nukleotidovými analógmi. Kvantifikácia obsahu DNA v bunkách na základe rádioizotopických testov predstavuje určité problémy ako pracnosť, problémy s manipuláciou, skladovaním a likvidáciou. Preto sa analýza častejšie robí na prietokovom cytometri a ako nukleotidový analóg sa používa BrdU. Nevýhodou tiež je, že ide o konečný test. Sú tiež časovo náročné a často krát dochádza k vzniku chýb, najmä pre vysokokapacitné aplikácie (Quent et al., 2010; Longo-Sorbello et al., 2005).

Testy založené na DNA neodrážajú bunkový metabolický stav a vyžadujú kalibračnú krivku na odhad počtu buniek. Markery bunkovej proliferácie súvisia nielen s procesom bunkového delenia, ale aj s ďalšou bunkovou aktivitou vrátane malignity, metastáz a štádia delenia rakovinových buniek (Chung et al., 2017).

### **3.5 Vysokokapacitný skrining (High-throughput screening, HTS)**

Vysokokapacitný skrining sa vo veľkej miere používa pri výskume liečiv, na základe čoho je bežne definovaný ako automatický proces testovania potenciálnych kandidátov liečiv (Wang et al., 2012). Techniky vysokokapacitného skriningu sú kriticky potrebné pre efektívny skrining farmaceuticky významných zlúčenín. Proces identifikácie nových cieľov je založený na rozsiahlom množstve technológií zahŕňajúcich bioinformatiku, kombinatorickú chémiu a HTS. Spoločnou vlastnosťou týchto technologických platforiem je vytvorenie efektívnejšej platformy založenej na vedomostiach, v rámci vývoja liečiv, na urýchlenie výskumu a pomocou extrapolácie skrátiť čas vývoja s cieľom zabezpečiť, aby sa nové chemické subjekty (NCE) dostali čo najrýchlejšie na trh (Buehler a Rashidi, 2005). Rýchly pokrok vysoko kapacitného skriningu umožnil paralelnú analýzu tisícky reakcií s cieľom identifikovať účinné zlúčeniny pre konkrétny biologický proces. Väčšina súčasných technológií HTS zahŕňa robotiku na automatickú manipuláciu s kvapalinami a doštičkami (96-, 384- a 1536-jamková), vďaka čomu je možné testovanie stoviek až tisícov chemikálií súčasne (Judson et al., 2014).

Masívne údaje získané zo štúdií HTS poskytujú vedcom novú víziu biologických účinkov testovaných zlúčenín. V dôsledku toho sa tiež vyvíjalo úsilie o zdieľanie údajov, aby boli tieto údaje ľahko dostupné pre komunitu. HTS údaje sú ukladané prostredníctvom PubChem do dvoch oblastí: výsledok aktivity a aktívna koncentrácia. Výsledok aktivity identifikuje zlúčeninu buď ako chemickú sondu (tj. pozitívna kontrola HTS analýzy) alebo kvalitatívne

transformuje experimentálne údaje do jednej z nasledujúcich kategórií: aktívna, neaktívna, nešpecifikovaná alebo neotestovaná. Na druhej strane aktívna koncentrácia ukladá HTS dáta kvantitatívne, ako hodnotu koncentrácie v  $\mu\text{M}$  ako presne definované biologické koncové body, čo predstavuje polovičnú maximálnu odpoveď aktivity (napr. IC50 a EC50) (Russo a Zhu, 2016).

Čo sa týka vzoriek pre HTS, je nutné ich pripraviť tak aby sa prispôbili potrebám vysoko automatizovaného systému. Štandardné rozpúšťadlo je DMSO, vzhľadom k tomu, že väčšina zlúčenín je v ňom dobre rozpustná a malé kvantity (~1%) neinterferujú s väčšinou biochemických testov. Vzorky pre HTS sú prevažne skladované v mikrotitračných doštičkách v suchom, inertnom a chladnom prostredí aby sa predišlo degradácií a precipitácii zlúčenín (Entzeroth et al., 2009).

### **3.5.1 Pokrok v metóde HTS**

V priebehu 90. rokov boli poskytnuté investície do základnej technológie od výrobcov a tiež biotechnologických spoločností. Táto investícia umožnila automatizáciu a miniaturizáciu analýz, zber dát, analýzu dát a nové formáty biologických testov (Houston et al., 2011). Vzhľadom k nižšej spotrebe činidiel a vzoriek, došlo k zníženiu finančných nákladov. V súčasnosti bežné rutiny fungujúce na princípe HTS preferenčne využívajú bunkové kultúry na proces skorého vývoja liečiv (Bank et al., 2006).

Z HTS sa vyvinula rozvinutá disciplína, ktorá je kľúčovým zdrojom pre vývoj liekov a tiež stavebným kameňom pri rozširovaní biomedicínskych znalostí (Macarron et al., 2011). Rôzne technológie na miniaturizáciu testov, automatizáciu laboratórií a robotiku umožňujú testovanie chemických zlúčenín v biologických systémoch pomocou HTS a uHTS (Mayr, 2009). Skrining chemických knižníc pomocou procesov HTS a uHTS je relatívne nová disciplína, ktorá sa začala praktizovať asi pred 10–15 rokmi (Macarron, 2006) počiatocnými pokusmi o skrining zbierok prírodných produktov/extraktov (Pereira a Williams, 2009). Do rokov 1985, sa skrining vykonával viac menej manuálne s počtom spracovaných vzoriek v rade niekoľkých stoviek za týždeň. Validácia HTS metódy vo výskume asperlicínu Changa et al. (1986), spolu so snahou skrátiť čas procesu uvedenia liečiva na trh, spôsobilo posun v metóde HTS. Postupne tak došlo k nahradeniu HTS za uHTS s výkonom >100 000 testovaných vzoriek voči jednému špecifickému cieľu za deň (Sundberg, 2000), zatiaľ čo HTS je definovaný počtom testovaných zlúčenín v rozmedzí 10 000–100 000 za deň. Spoločne sa technológie HTS a uHTS považujú za kľúčové prvky pre doplnenie údajov pri vývoji liečiv

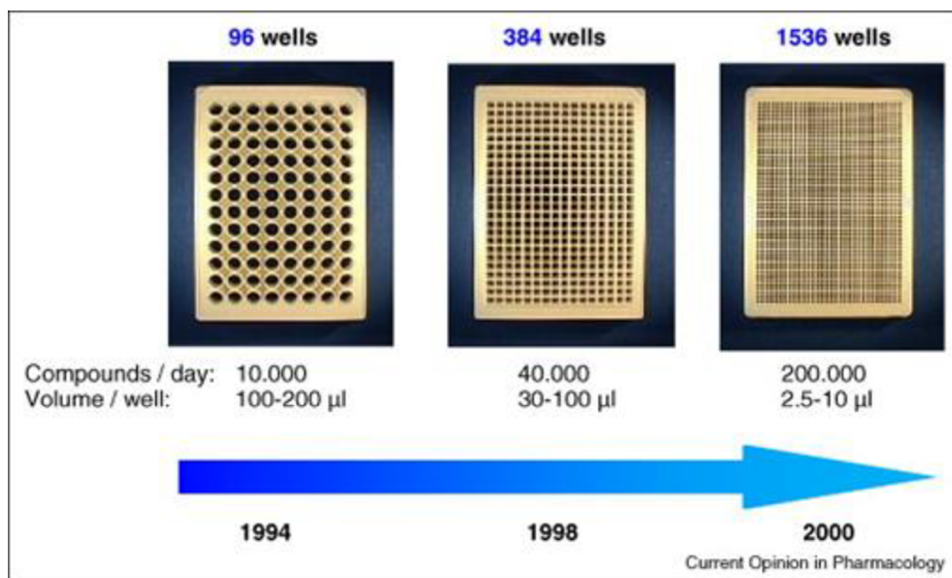
s novými chemickými zlúčeninami a novými mechanizmami pôsobenia (Mayr, 2009). Porovnanie pôvodného skríningu s HTS metódou je zhrnuté v tabuľke 1.

**Tab. č. 1:** Porovnanie pôvodného skríningu a skríningu na 96-jamkovej doštičke v HTS (Prevzaté z: Pereira a Williams, 2009)

<b>Pôvodný skrínig</b>	<b>Vysokokapacitný skrínig (HTS)</b>
Skúmavka	96-jamkové doštičky
Veľký objem na test ~1 ml	Malý objem na test 50–100 $\mu$ l
Hmotnosť zlúčenín ~5–10 mg	Hmotnosť zlúčenín ~1 $\mu$ g
Zložky testy pridávané jednotlivo	Zložky testy pridávané súčasne
Zlúčeniny vo forme prášku – vlastné riešenie	Zlúčeniny vo forme roztoku – DMSO
Prevedenie pomalé a pracné	Prevedenie rýchle a účinné (~1 min/doštičku)
Skrínig 20 – 50 zlúčenín /týždeň/laboratórium	Skrínig 1000 – 10 000 zlúčenín /týždeň/laboratórium
Obmedzené množstvo a rôznorodosť zlúčenín	Neobmedzené množstvo a rôznorodosť zlúčenín

### 3.5.2 Potreba miniaturizácie

Zvyšujúci sa počet chemických zlúčenín na testovanie a súčasné zvýšenie počtu molekulárnych cieľov môže byť prispôsobený len pomocou značnej miniaturizácie analýzy HTS (Mayr, 2009). Na počiatku HTS a v polovici 90. rokov boli mikrotitračné doštičky (MTP) s 96 jamkami na doštičku (96w-MTP) hlavným formátom pre manipuláciu a skrínig zlúčenín vo väčšine farmaceutických a biotechnologických spoločností. Avšak počas posledných desaťročí došlo k tlaku smerom k vývoju rovnakého typu doštičky ale s väčším množstvom jamiek ako boli tie pôvodné. Prvým zdokonalením bol 384w-MTP, ktorý pojme štyrikrát viac vzoriek ako 96w-MTP. Typický objem s ktorým sa pracuje pri 384w-MTP je v rozmedzí 25–100  $\mu$ l celkového objemu, kedy typický objem na jamku je približne 50  $\mu$ l. Väčšia časť všetkých biochemických alebo bunkových testov je možné bez problémov adaptovať na 384w-MTP a tento formát bol zavedený ako voliteľný formát pri skrínigových metódach u väčšiny farmaceutických a biotechnologických spoločností (Moraga, 2006).



**Obr. č. 2:** Trend miniaturizácie pri skríningu. Obrázok ukazuje rôzne typy mikrotitračných doštičiek používaných pri vysokokapacitnom skríningu. Na začiatku a v polovici 90. rokov boli hlavným formátom skríningu mikrotitračné doštičky s 96 jamkami (96w-MTP). Tento typ doštičiek bol v posledných rokoch vo veľkej miere nahradený 384- jamkovými doštičkami a v niektorých prípadoch 1536- jamkovými doštičkami (384w-MTP, 1536w-MTP) (prevzaté z: Mayr a Bojanic, 2009)

Množstvo spoločností prispôsobilo procesy spracovávania zlúčenín a skrínung na formát doštičky s 1536 jamkami (Klumpp et al., 2006). Typický pracovný objem pri 1536w-MTP je v rozmedzí 2.5–10  $\mu$ l celkového objemu, s objemom približne 5  $\mu$ l na jamku (Brandish, 2006). V súčasnosti sa od 96-jamkového formátu v HTS upúšťa a štandardne sa používajú 384- a 1536- jamkové doštičky (Rose, 1999), vzhľadom k tomu, že priemyselný vývoj poukazuje smerom k 384- jamkovému štandardu a 1536- jamkovej MTP ako k hlavným formátom doštičiek pre testovanie zlúčenín v budúcnosti (Mayr a Fuerst, 2008). Miniaturizácia spolu s robotickou integráciou procesov do značnej miery prispela k významnému zvýšeniu efektívnosti procesov za posledných 10 rokov (Mayr a Bojanic, 2009).

### 3.5.3 Automatizácia

So znižujúcim sa pracovným objemom a použitím 1536-jamkových doštičiek, sa stal proces prenosu látok veľmi náročný, vzhľadom k tomu že bolo nutné predísť medziproduktovému riedeniu. V tomto kroku bola zlomová automatizácia systému, reprezentovaná technológiou akustického vystreľovania kvapiek (ultrazvuk) pre dávkovanie



nanolitrových až pikolitrových objemov. Táto technológia môže kompenzovať rozdiely vo viskozite kvapalných vzoriek a ďalšie odchýlky vznikajúce pri v transporte vzoriek (Entzeroh et al., 2009). Súčasnú metódu HTS typicky pozostávajú z robotického manipulačného systému, pipetovacieho zariadenia, citlivých detektorov a softvérov pre spracovanie a kontrolu dát. Kombinácia spomenutých komponentov umožňuje súbežné vykonanie tisícky biochemických, genetických, proteomických a farmakologických testov (Hong et al., 2009).

Vzhľadom k tomu, že častou príčinou vzniku chýb je manipulácia s kvapalinami, bol vynájdený bezdotykový manipulátor s kvapalinami Echo 550. Tento prístroj požíva sústredenú akustickú energiu (ultrazvuk) k vystreľovaniu kvapiek z povrchu kvapaliny. Vďaka tomu, že ide o bezdotykové zariadenie je eliminovaná kontaminácia vzoriek a tiež nedochádza k vzniku odpadu. Prístroj Echo 550 je veľmi presný, nepoužíva žiadne špičky a tým eliminuje dopad na životné prostredie. Veľkou výhodou tohto prístroja je kontrolovanie objemu, výšky hladiny v jamkách a koncentrácii vody v zlúčeninách (Shaffer, 2005).

#### 3.5.4 Vyhodnotenie testov v HTS

Pri prvom (primárnom) skríningu sa sledované látky testujú pri jednej stanovenej koncentrácii, a to z toho dôvodu že sa do testovania dostáva veľké množstvo látok, z ktorých je nutné vyselektovať len aktívne látky (Shoemaker et al., 2002; Shun et al., 2011). Pri vyhodnotení takéhoto primárneho skríningu sa pozoruje inhibícia životaschopnosti buniek, ktorá je vyjadrená pomocou percenta inhibície (PI). PI sa vypočíta podľa nasledujúceho vzorca:

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

$C_{MIN}$  ide o priemer nízkeho signálu (low signal),  $C_{MAX}$  priemer najvyššieho signálu (živé bunky) a  $X_i$  je nespracované meranie  $i$ -tej zlúčeniny. Zlúčeniny vykazujúce percento inhibície väčšie ako prahovú hodnotu (napríklad >50%) sú považované za aktívne (Shun et al., 2011).

Pokiaľ je skúmaná zlúčenina v primárnom skríningu vyhodnotená ako aktívna, je následne podrobená druhému (sekundárnemu) skríningu. Pri tomto testovaní sa pre každú aktívnu látku stanovuje hodnota  $IC_{50}$  (TDI, 2016). Hodnota  $IC_{50}$  sa určuje z takzvanej dose-response krivky. Zvislá os definuje viabilitu buniek v % a vodorovná os zasa koncentráciu, ktorá sa

udáva v logaritmickej stupnici. Hodnota IC50 je kvantitatívne meradlo, ktoré stanovuje polovičnú inhibičnú koncentráciu látok (Astashkina et al., 2012; Vis et al., 2016).

V HTS sa veľký dôraz kladie na presnosť prevedenia všetkých testov. Pre zistenie kvality vykonaných testov v HTS sa využíva Z' faktor (Mayr a Bojanic, 2009). Z' faktor je možné vypočítať podľa nasledujúceho vzorca:

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

$s_{MIN}$  a  $s_{MAX}$  predstavujú štandardné odchýlky MIN a MAX kontrolných signálov. Rovnako ako pri PI hodnote  $C_{MIN}$  a  $C_{MAX}$  označujú priemer pozitívnych a negatívnych kontrol. Z' faktor je bezrozmerná, štatistická veličina charakteristická pre každý HTS test. Využíva sa pre optimalizáciu a validáciu testu a tým poskytuje užitočný nástroj pre vyhodnotenie kvality testu (Entzeroth et al., 2009). Hodnota  $Z' \geq 0,5$  znamená vynikajúci test. Test s  $0 < Z' < 0,5$  sa považuje za hraničný ale môže byť použitý pre HTS, často krát je však potrebná ďalšia optimalizácia. Testy so  $Z' < 0$  nie sú vhodné pre HTS (An a Tolliday, 2010).

### 3.6 Chemické knižnice

Knižnice zlúčením, tiež známe ako chemické knižnice, je súbor rôznych uskladnených chemikálií alebo virtuálnych chemických zlúčenín pre HTS testovanie. Koncept knižnice zlúčenín sa dostal do popredia súčasne s predstavením kombinatorickej chémie a HTS v oblasti vývoja liečiv. Prvé knižnice zlúčenín pozostávali zo zlúčenín generovanými kombinatorickou syntézou, taktiež však existujú knižnice postavené na základe tradičnej syntézy, prírodných produktov alebo fytochemikálií (Paricharak et al., 2016; Spears a Brown, 2017).

Knižnica zlúčenín môže zahŕňať uskladnené chemikálie a k nim relevantné informácie ako chemickú štruktúru, čistotu, kvantitu a fyzikálnochemickú charakterizáciu každej zložky. Virtuálne knižnice zlúčenín zahŕňajú 2D alebo 3D štruktúrne zobrazenie chemických zložiek, ktoré sú použité pre výpočtové metódy a *in silico* skrining. Existuje množstvo knižníc dostupných komerčne. Ide napríklad o knižnice LOPAC, ENZO, Prestwick. Tieto knižnice obsahujú zlúčeniny, ktorých vlastnosti sú už známe a sú vhodné na validáciu nových metód v HTS. K jednej z najväčších chemických knižníc patrí napríklad ChemBridge knižnica zlúčenín, ktorá ponúka zlúčeniny pre skrining vo vysokej kvalite, vrátane skriningových

zlúčenín podobným liekom, založených na rozvíjaní požiadaviek vývoja liečiv (Nahar a Sarker, 2018).

Knižnice môžu byť pripravené, tak aby dosahovali maximálnu štruktúrnu diverzitu alebo s účelom pôsobenia na konkrétny cieľový proteín alebo rodinu, špecifickú terapeutickú oblasť, trasa riadenia alebo na základe ich kombinácie. Napriek tomu že v súčasnosti existuje cez  $10^{63}$  molekúl podobných liekom, len malá časť z nich má predpoklad sa stať terapeuticky relevantnými a môžu vytvoriť úspešnú skupinu spomedzi potenciálnych molekúl (Paricharak et al., 2016).

Ak sú knižnice zlúčenín cielené voči špecifickej biologickej rodine, hovoríme o focused-knižniciach, ktoré sú často navrhnuté pre dobre preštudované cieľové miesta, ako napr. G proteín sprážené receptory (GPCRs), kinázy a v určitých prípadoch aj iónové kanály (Paricharak et al., 2016). Všeobecne, pre cieľové triedy so známymi chemotypmi alebo s dodatočnými informáciami k interakcii medzi štruktúrou a ligandom, fokusované knižnice zaznamenávajú väčšie množstvo aktívnych látok ako knižnice založené na diverzite. Fokusované knižnice dramaticky znižujú počet zlúčenín na hodnotenie experimentálnej aktivity a zvyšujú počet aktívnych inhibítorov nájdených v biologických testoch. Vďaka pozoruhodnému pokroku vo výpočtoch a v skriningových nástrojoch *in silico*, v priebehu niekoľkých desaťročí, sa virtuálna HTS stala populárnejšou medzi vedcami zaoberajúcimi sa objavovaním liekov (Nahar a Sarker, 2018).

Pre tvorbu, skladovanie a správu zložených knižníc sú nevyhnutné výpočtové pomôcky v rôznych fázach. Väčšina knižníc je zorganizovaná s informačnými technológiami, ako barkódovanie a zoradenie v databázy na základe príbuznosti jednotlivých zložiek. Robotika je navyše nevyhnutná na začlenenie zlúčenín do väčších chemických knižníc. Väčšina knižníc ponúka zlúčeniny v rozpúšťadle DMSO a v rôznych skriningových formátoch, napríklad knižnica LOPAC je ponúkaná v 96-jamkovom formáte (Nahar a Sarker, 2018)

Voľba chemickej knižnice je veľmi dôležitá pri každom virtuálnom skriningu založenom na štruktúre zlúčenín. Skrining vhodného súboru zlúčenín a vysokou mierou diverzity, výrazne zlepšuje úspešnosť v programoch výskumu liečiv (Spear a Brown, 2017). Výsledok akéhokoľvek vysoko výkonného (virtuálneho) skriningu je nakoniec založený na kvalite samotného zberu zlúčenín. Zle navrhnuté knižnice, ktoré nemajú dostatočnú rozmanitosť, môžu mať za následok identifikáciu malého množstva aktívnych látok (Ma et al., 2015). Na počiatkoch skriningu boli skupiny knižníc katalógované na papieri a skladované v menej ako

optimálnych podmienkach. Mnoho z týchto zlúčenín sa následne vyparilo, rozložilo alebo boli zmesou rozložených produktov. Často krát bola identifikácia aktívnych látok náročná, pretože materiál vo vzorkovej skúmavke nebol ten pôvodný, ktorý bol popísaný v počiatočnej registrácii a tiež preto, že resyntetizovaný materiál nevykazoval pôvodnú aktivitu pozorovanú v HTS teste. V súčasnosti sú jednotlivé zlúčeniny v knižnici všeobecne dobre charakterizované. Zlúčeniny sú triedené podľa štruktúrnych odlišností alebo podobností (Willett et al., 1998). Okrem iného v priebehu času tiež došlo k zníženiu počtu testovaných zlúčenín, ktoré bolo sprevádzané zlepšením ich kvality (Schnur, 2008). Napokon sa ako najlepšie ukázali alternatívne prístupy kladúce dôraz na kvalitu zlúčenín pred veľkosťou knižníc. Úsilie navrhnúť dôkladnejšie stratégie výberu zložiek malo 2 úlohy/ciele: zlepšiť pomernú početnosť aktívnych látok/záznamov alebo znížiť percento opotrebovania zistených počas vyhodnotenia aktívnych látok. Jedným z výsledkov bola zvýšená účinnosť skriningového procesu (Paricharak et al., 2016).

## 4 MATERIÁLY A METÓDY

### 4.1 Biologický materiál

**Bunkové línie:** Všetky bunkové línie boli zmrazené a uskladnené na ÚMTM.

- A549 (ATCC, USA)
- BJ (ATCC, USA)
- MRC-5 (ATCC, USA)
- 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)
- HCT116 (Horizon, UK)
- HCT116 p53-/- (Horizon, UK)
- U2OS (Dr. Martin Mistrík, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)

**Tab. č. 2:** Prehľad použitých nenádorových bunkových línií.

Nenádorové bunkové línie	Druh usporiadania	Pôvod	Kultivačné médium
BJ	aherentné	kožné fibroblasty	EMEM
MRC-5	adherentné	pľúcne fibroblasty	EMEM

**Tab. č. 3:** Prehľad použitých nádorových bunkových línií.

Nádorové bunkové línie	Druh usporiadania	Pôvod	Kultivačné médium
A549	adherentné	adenokarcinóm pľúc	DMEM
HCT116	adherentné	kolorektálny karcinóm	McCoy médium
HCT116 p53-/-	adherentné	kolorektálny karcinóm	McCoy médium
U20S	adherentné	osteosarkom	McCoy médium
CCRF-CEM	suspenzné	akútna lymfoblastická leukémia	RPMI-1640 médium
CEM-DNR	semisuspenzné	akútna lymfoblastická leukémia	RPMI-1640 médium
K562	suspenzné	erytromyeloblastická leukémia	Iscové médium
K562-TAX	semisuspenzné	erytromyeloblastická leukémia	Iscové médium

## 4.2 Použité chemikálie súpravy a roztoky

### Použité chemikálie

- 99% Etanol (Dr. Kulich Pharma, ČR)
- NaCl (Sigma-Aldrich, USA)
- KCl (Sigma-Aldrich, USA)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (LachNer, s.r.o., ČR)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach-Ner, s.r.o., ČR)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- Aktinomycin D (APExBIO)
- Mitomycin C (APExBIO)
- Phenazin methosulfát (Sigma - Aldrich, USA)
- Testované látky z unikátnej ÚMTM chemickej knižnice
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96®)

## **Použité roztoky a ich príprava**

70% Etou: Bolo zmiešané 70,7 ml 99% Etou s 29,3 ml H<sub>2</sub>O.

10x PBS (6,8): V 800 ml destilovanej vody bolo rozpustené 80 g NaCl; 2g KCl; 32,1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Po dokonalom rozpustení pridaných látok, bol objem doplnený na 1 l destilovanou vodou. pH pripraveného roztoku bolo upravené pomocou 0,1mol/l HCl alebo 0,1mol/l NaOH na hodnotu 6,8. Takto pripravený zásobný roztok bol sterilizovaný autoklávaním a skladovaný pri laboratórnej teplote.

1x PBS (pH 7,4): Bolo zmiešané 100 ml 10x PBS s 900 ml H<sub>2</sub>O vo flow boxe. pH vzniknutého roztoku 1x PBS bolo upravené na hodnotu 7,4. Roztok sa uskladnil v chladničke.

MTS: V 500 ml 1x PBS bolo rozpustené 1 g MTS reakčného prášku za vzniku žltého roztoku s výslednou koncentráciou 2 mg/ml. Optimálne pH roztoku by malo odpovedať hodnotám v rozmedzí 6 – 6,5. Zásobný roztok bol prefiltrovaný a následne rozdávkovaný po 100 ml do sklenených fliaš obalených alobalom pre zabránenie styku so svetlom a zamrazený na -20 °C. Pred použitím sa k roztoku MTS pridal 1 ml PMS (5 mg/ml)

PMS: V 20 ml 1x PBS bolo rozpustené 0,1 g PMS. Roztok bol rozdávkovaný po 1 ml do mikroskúmaviek a zmrazený na -14°C.

Aktinomycin D: 1 mg prášku aktinomycinu D bol rozpustený v 1 ml DMSO a rozdávkovaný po 60 ul do mikroskúmaviek. Uchovávané zmrazené v mikroskúmavkách pri -20 °C.

Mitomycin C: 10 mg prášku mitomycinu C bol rozpustený v DMSO a rozdávkovaný po 60 ul do mikroskúmaviek. Uchovávané zmrazené v mikroskúmavkách pri -80 °C.

Testované látky: Testované látky boli rozpustené v DMSO o koncentrácii 10 mM a uskladnené pri -20°C.

## **4.3 Prístroje a vybavenie**

- Flow box HeraSafe (ThermoScientific, USA)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (ThermoScientific, USA)
- Centrifuga (Eppendorf, Nemecko)
- pH meter (P-LAB, ČR)
- Miešačka MR Hei-Tec (Heidolph Instruments GmbH, Nemecko)
- Multidrop Combi (ThermoScientific, USA)

- Echo 550 (LabCyte, USA)
- Echo 555 (Labcyte, USA)
- EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA)
- PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent Technologies, USA)
- TundraStore (ResBiosolutions, USA)

#### 4.4 Použité experimentálne vyhodnocovacie postupy

Látky z jedinečnej chemickej ÚMTM knižnice boli testované na cytotoxicitu *in vitro* na 10 bunkových líniah. Na testovanie týchto látok bol použitý kit CellTiter® (MTS).

##### 4.4.1 Príprava bunkových líní na experiment

Testovanie bolo vykonané na desiatich bunkových líniah (BJ, MRC-5, A549, HCT116, HCT116 p53-/-, CCRF-CEM, CEM-DNR, K562, K562-TAX, U2OS). Boli prichystané 384- jamkové doštičky kde každá bunková línia bola rozpipetovaná na jednu doštičku. Každá bunková línia použitá v experimente vyžadovala iný počet buniek, ktorý bol stanovený pred experimentom (Tab. 4). Pomocou prístroja Multidrop Combi bolo napipetované 30  $\mu$ l RPMI média do prvého a posledného stĺpca, čo slúžilo ako blank. Do všetkých ostatných jamiek bolo napipetované 30  $\mu$ l bunkovej suspenzie. Po napipetovaní každej bunkovej línie bolo potrebné kazetu premyť etanolom a následne médiom, aby sa predišlo kontaminácii medzi jednotlivými bunkovými líniami. Po napipetovaní média a bunkovej suspenzie boli doštičky vložené do inkubátoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>).

**Tab. č. 4:** Prehľad počtu buniek jednotlivých bunkových líní na jamku/1 ml/30 ml.

Bunková línia	Počet buniek na jamku	Počet buniek na ml	Bunková suspenzia
CCRF-CEM	$1,2 \times 10^3$	$4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$
CEM-DNR	$5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$	$0,48 \times 10^6$
K562	$8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$0,81 \times 10^6$
K562-TAX	$5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$	$0,48 \times 10^6$
A549	$5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$	$0,48 \times 10^6$
HCT116	$8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$0,81 \times 10^6$
HCT116 p53-/-	$8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$0,81 \times 10^6$
U2OS	$8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$0,81 \times 10^6$
BJ	$3,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$
MRC5	$3,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$



#### **4.4.2 Príprava testovaných látok**

Testované látky boli uskladnené v 96- jamkových doskách Tube Rack s koncentráciou 10 mM v DMSO pri -20 °C. Pred experimentom boli prichystané 384- jamkové zdrojové (source) doštičky s testovanými látkami. Pre primárny skrining boli testované látky na zdrojovej doštičke v jednej koncentrácii odpovedajúcej 10 mM. Pre sekundárny skrining sa na zdrojovej doštičke nachádzala každá testovaná látka v troch koncentráciách: 10 mM, 1 mM a 0,1 mM). Takto pripravené doštičky boli zalepené hliníkovou fóliou pomocou prístroja PlateLock a skladované v TundraStore pri 16 °C a vlhkosti 20 %.

#### **4.4.3 Ovplyvnenie buniek testovanými látkami– primárny skrining**

Po 24 hodinách boli testovacie doštičky s bunkami vybraté z CO<sub>2</sub> inkubátoru. Z TundraStoru bola vybratá zdrojová doštička s testovanými látkami a stočená na centrifuge na 1000 otáčok po dobu 2 minút. Látky boli prenesené na 384- jamkové doštičky pomocou prístroja Echo 550 (software CherryPick). Do všetkých doštičiek boli v tripletoch napipetované látky s objemom 150 nl s výslednou koncentráciou 50 µM.

Okrem testovaných látok, boli na doštičku obdobným spôsobom prenesené tiež pozitívne a negatívna kontroly (obr.) pomocou prístroja Echo 550 (software Plate Reformat).. Ako pozitívne kontroly boli použité cytostatika aktinomycin D a mitomycin C. Ako negatívna kontrola bol zvolený roztok DMSO. Všetky doštičky s bunkami, látkami, pozitívnou a negatívnou kontrolou boli vložené do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 72 hodín. Všetky látky boli testované v troch technických a dvoch biologických opakovaníach.

	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.B1	C 1.1.C1	L 1.1.L1	L 2.1.L2	L 3.1.L3	L 4.1.L4	L 5.1.L5	L 6.1.L6	L 7.1.L7	H 2.1.H2	H 3.1.H3	H 4.1.H4	H 5.1.H5	H 6.1.H6	H 7.1.H7	H 8.1.H8	C 2.1.C2	C 3.1.C3	C 4.1.C4	C 5.1.C5	C 6.1.C6	C 7.1.C7	C 8.1.C8	B 3.1.B3
B	B 1.2.B1	H 1.1.H1	S.1.1	S.1.2	S.1.3	S.1.5.1	S.1.5.2	S.1.5.3	S.2.9.1	S.2.9.2	S.2.9.3	S.4.3.1	S.4.3.2	S.4.3.3	S.5.7.1	S.5.7.2	S.5.7.3	S.7.1.1	S.7.1.2	S.7.1.3	S.8.5.1	S.8.5.2	S.8.5.3	B 3.2.B3
C	B 1.3.B1	H 1.2.H1	S.2.1	S.2.2	S.2.3	S.1.6.1	S.1.6.2	S.1.6.3	S.3.0.1	S.3.0.2	S.3.0.3	S.4.4.1	S.4.4.2	S.4.4.3	S.5.8.1	S.5.8.2	S.5.8.3	S.7.2.1	S.7.2.2	S.7.2.3	S.8.6.1	S.8.6.2	S.8.6.3	B 3.3.B3
D	B 1.4.B1	H 1.3.H1	S.3.1	S.3.2	S.3.3	S.1.7.1	S.1.7.2	S.1.7.3	S.3.1.1	S.3.1.2	S.3.1.3	S.4.5.1	S.4.5.2	S.4.5.3	S.5.9.1	S.5.9.2	S.5.9.3	S.7.3.1	S.7.3.2	S.7.3.3	S.8.7.1	S.8.7.2	S.8.7.3	B 3.4.B3
E	B 1.5.B1	H 1.4.H1	S.4.1	S.4.2	S.4.3	S.1.8.1	S.1.8.2	S.1.8.3	S.3.2.1	S.3.2.2	S.3.2.3	S.4.6.1	S.4.6.2	S.4.6.3	S.6.0.1	S.6.0.2	S.6.0.3	S.7.4.1	S.7.4.2	S.7.4.3	S.8.8.1	S.8.8.2	S.8.8.3	B 3.5.B3
F	B 1.6.B1	H 1.5.H1	S.5.1	S.5.2	S.5.3	S.1.9.1	S.1.9.2	S.1.9.3	S.3.3.1	S.3.3.2	S.3.3.3	S.4.7.1	S.4.7.2	S.4.7.3	S.6.1.1	S.6.1.2	S.6.1.3	S.7.5.1	S.7.5.2	S.7.5.3	S.8.9.1	S.8.9.2	S.8.9.3	B 3.6.B3
G	B 1.7.B1	H 1.6.H1	S.6.1	S.6.2	S.6.3	S.2.0.1	S.2.0.2	S.2.0.3	S.3.4.1	S.3.4.2	S.3.4.3	S.4.8.1	S.4.8.2	S.4.8.3	S.6.2.1	S.6.2.2	S.6.2.3	S.7.6.1	S.7.6.2	S.7.6.3	S.9.0.1	S.9.0.2	S.9.0.3	B 3.7.B3
H	B 1.8.B1	H 1.7.H1	S.7.1	S.7.2	S.7.3	S.2.1.1	S.2.1.2	S.2.1.3	S.3.5.1	S.3.5.2	S.3.5.3	S.4.9.1	S.4.9.2	S.4.9.3	S.6.3.1	S.6.3.2	S.6.3.3	S.7.7.1	S.7.7.2	S.7.7.3	S.9.1.1	S.9.1.2	S.9.1.3	B 3.8.B3
I	L 8.1.L8	L 9.1.L9	S.8.1	S.8.2	S.8.3	S.2.2.1	S.2.2.2	S.2.2.3	S.3.6.1	S.3.6.2	S.3.6.3	S.5.0.1	S.5.0.2	S.5.0.3	S.6.4.1	S.6.4.2	S.6.4.3	S.7.8.1	S.7.8.2	S.7.8.3	S.9.2.1	S.9.2.2	S.9.2.3	B 3.9.B3
J	L 8.2.L8	L 9.2.L9	S.9.1	S.9.2	S.9.3	S.2.3.1	S.2.3.2	S.2.3.3	S.3.7.1	S.3.7.2	S.3.7.3	S.5.1.1	S.5.1.2	S.5.1.3	S.6.5.1	S.6.5.2	S.6.5.3	S.7.9.1	S.7.9.2	S.7.9.3	S.9.3.1	S.9.3.2	S.9.3.3	B 3.10.B3
K	L 8.3.L8	L 9.3.L9	S.10.1	S.10.2	S.10.3	S.2.4.1	S.2.4.2	S.2.4.3	S.3.8.1	S.3.8.2	S.3.8.3	S.5.2.1	S.5.2.2	S.5.2.3	S.6.6.1	S.6.6.2	S.6.6.3	S.8.0.1	S.8.0.2	S.8.0.3	S.9.4.1	S.9.4.2	S.9.4.3	B 3.11.B3
L	L 8.4.L8	L 9.4.L9	S.11.1	S.11.2	S.11.3	S.2.5.1	S.2.5.2	S.2.5.3	S.3.9.1	S.3.9.2	S.3.9.3	S.5.3.1	S.5.3.2	S.5.3.3	S.6.7.1	S.6.7.2	S.6.7.3	S.8.1.1	S.8.1.2	S.8.1.3	S.9.5.1	S.9.5.2	S.9.5.3	B 3.12.B3
M	L 8.5.L8	L 9.5.L9	S.12.1	S.12.2	S.12.3	S.2.6.1	S.2.6.2	S.2.6.3	S.4.0.1	S.4.0.2	S.4.0.3	S.5.4.1	S.5.4.2	S.5.4.3	S.6.8.1	S.6.8.2	S.6.8.3	S.8.2.1	S.8.2.2	S.8.2.3	S.9.6.1	S.9.6.2	S.9.6.3	B 3.13.B3
N	L 8.6.L8	L 9.6.L9	S.13.1	S.13.2	S.13.3	S.2.7.1	S.2.7.2	S.2.7.3	S.4.1.1	S.4.1.2	S.4.1.3	S.5.5.1	S.5.5.2	S.5.5.3	S.6.9.1	S.6.9.2	S.6.9.3	S.8.3.1	S.8.3.2	S.8.3.3	S.9.7.1	S.9.7.2	S.9.7.3	B 3.14.B3
O	L 8.7.L8	L 9.7.L9	S.14.1	S.14.2	S.14.3	S.2.8.1	S.2.8.2	S.2.8.3	S.4.2.1	S.4.2.2	S.4.2.3	S.5.6.1	S.5.6.2	S.5.6.3	S.7.0.1	S.7.0.2	S.7.0.3	S.8.4.1	S.8.4.2	S.8.4.3	S.9.8.1	S.9.8.2	S.9.8.3	B 3.15.B3
P	B 2.1.B2	C 9.1.C9	C 10.1.C10	C 11.1.C11	C 12.1.C12	C 13.1.C13	C 14.1.C14	C 15.1.C15	C 16.1.C16	C 17.1.C17	C 18.1.C18	C 19.1.C19	C 20.1.C20	C 21.1.C21	C 22.1.C22	C 23.1.C23	C 24.1.C24	C 25.1.C25	C 26.1.C26	C 27.1.C27	C 28.1.C28	C 29.1.C29	C 30.1.C30	B 3.16.B3

**Obř. ř. 3:** Príklad usporiadania testovaných látok na 384-jamkovej dořtiřke pri primárnom skrínungu (B- blank, L- pozitívna kontrola, C- bunky bez pridanych látok, H- negativna kontrola, S- testované látky).

#### 4.4.4 Ovplynvenie buniek testovanými látkami – sekundárny skrínung

Pri druhom experimente sme ďalej testovali látky z primárneho skrínungu, ktoré boli vyhodnotené pomocou programu Dotmatics ako aktívne. Vyhodnotené aktívne látky sa následne ďalej testovali v sekundárnom skrínungu pri 7 koncentráciách. Po 24 hodinách boli testovacie dořtiřky s bunkami vybraté z CO<sub>2</sub> inkubátoru. Z TundraStoru bola vybratá zdrojová dořtiřka s testovanými látkami a stočená na centrifúge na 1000 otáčok po dobu 2 minút.

Nanesenie negativnej a pozitívnej kontroly prebiehalo obdobným spôsobom ako pri primárnom skrínungu. Ako pozitívne kontroly boli opäť použité cytostatika aktinomycin D a mitomycin C a ako negativna kontrola bol zvolený roztok DMSO.

Testované látky boli prenesené na 384- jamkové dořtiřky pomocou prístroja Echo 550 (software DoseResponse). Do všetkých dořtiřiek boli prenesené testované látky s odpovedajúcim objemom a koncentráciou (vid' tab. ř. 5). Dořtiřky obsahujúce bunky, kontroly a látky boli vložené na 72 hodín do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Všetky látky boli testované v dvoch technických a troch biologických opakovaníach.

**Tab. č. 5:** Konečná koncentrácia nanesených cytostatik a ich objem v 384- jamkovej doštičke.

	Source koncentrácia (mM)	Transfer volume (nl)	Konečná koncentrácia ( $\mu$ M)
1.	10	150,00	50,000
2.	10	37,50	12,500
3.	10	10,00	3,333
4.	1	22,50	0,749
5.	1	5,00	0,167
6.	0,1	15,00	0,049
7.	0,1	5,00	0,017

#### 4.4.5 Metóda MTS

Roztok MTS, skladovaný v mraziacom boxe pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bol vybraný ponechaní pri izbovej teplote, až do jeho rozmrazenia, potom bol vložený do vodného kúpeľa ( $37^{\circ}\text{C}$ ). 384-jamkové doštičky boli vybraté z  $\text{CO}_2$  inkubátoru a následne bolo k bunkám pridaných  $4\ \mu\text{l}$  MTS do všetkých jamiek, pomocou prístroja Multidrop Combi. Následne boli doštičky inkubované v  $\text{CO}_2$  inkubátore na 2 – 4 hod. Po zafarbení boli doštičky vybraté z  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Na prístroji EnVision Multimode Plate reader bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 490\ \text{nm}$  vo všetkých jamkách. Hodnoty absorbancií boli uložené v programe MS Office Excel a spracované pomocou programu Dotmatics.

#### 4.4.6 Spracovanie nameraných dát

Pri primárnom skríningu boli namerané hodnoty absorbancií spracované v programe Dotmatics, kde sa pre každú látku vypočítala hodnota PI (percento inhibície). Na základe tejto hodnoty boli vyselektované aktívne látky pre nasledujúci sekundárny skríning. Za aktívne sa považujú látky s hodnotou PI vyššou ako 50%.

Pri sekundárnom skríningu aktívnych látok bola v programe Dotmatics stanovená hodnota  $\text{IC}_{50}$  na základe 7 koncentrácií danej látky, pomocou modelu nelineárnej regresie. Táto hodnota vyjadruje koncentráciu testovanej látky, spôsobujúca 50 % inhibíciu životaschopnosti zo 100 % životaschopnosti buniek. So znižujúcou sa hodnotou  $\text{IC}_{50}$  sa zvyšujú toxické účinky testovanej látky na bunky.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Primárny skrining nových látok z ÚMTM chemickej knižnice

Celkovo bolo v našom experimente otestovaných 72 látok z unikátnej ÚMTM chemickej knižnice. Pri primárnom testovaní boli všetky tieto látky testované pri rovnakej koncentrácii, ktorá odpovedala 50  $\mu$ M. Testovanie prebiehalo na 384- jamkových doštičkách. V programe Dotmatics sa stanovovala hodnota PI pre každú látku, na základe čoho sa látky rozdelili na aktívne a neaktívne. Za aktívne látky sa považujú tie, pre ktoré platí vzťah  $PI > 50$  a naopak za neaktívne látky s hodnotou  $PI < 50$  pre jednotlivé bunkové línie. Na obrázku č. 4 môžeme vidieť príklad vypočítaných PI hodnôt v programe Dotmatics pre danú knižnicu.

plate	well	sample id	PI	pass	conc	inc	✓	✗
1 (Plate 1)	B3	LEM00023445	15.283	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	B4	LEM00023445	14.891	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	B5	LEM00023445	14.401	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C3	LEM00023446	90.318	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	C4	LEM00023446	89.338	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C5	LEM00023446	91.888	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D3	LEM00023447	-0.0178	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	D4	LEM00023447	-4.824	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D5	LEM00023447	-11.494	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E3	LEM00023448	24.209	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	E4	LEM00023448	22.444	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E5	LEM00023448	20.384	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F3	LEM00023449	19.795	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	F4	LEM00023449	10.085	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F5	LEM00023449	15.185	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G3	LEM00023450	87.964	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	G4	LEM00023450	90.024	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G5	LEM00023450	85.708	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H3	LEM00023452	30.781	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	H4	LEM00023452	33.331	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H5	LEM00023452	37.549	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I3	LEM00023453	84.237	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	I4	LEM00023453	81.883	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I5	LEM00023453	86.493	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J3	LEM00023454	16.755	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	J4	LEM00023454	28.721	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J5	LEM00023454	7.0443	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	K3	LEM00023455	74.625	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	K4	LEM00023455	71.584	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	K5	LEM00023455	74.429	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	L3	LEM00023456	85.316	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	L4	LEM00023456	90.22	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	L5	LEM00023456	88.259	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	M3	LEM00023457	91.594	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	M4	LEM00023457	93.948	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	M5	LEM00023457	92.672	●	50.0uM	+		

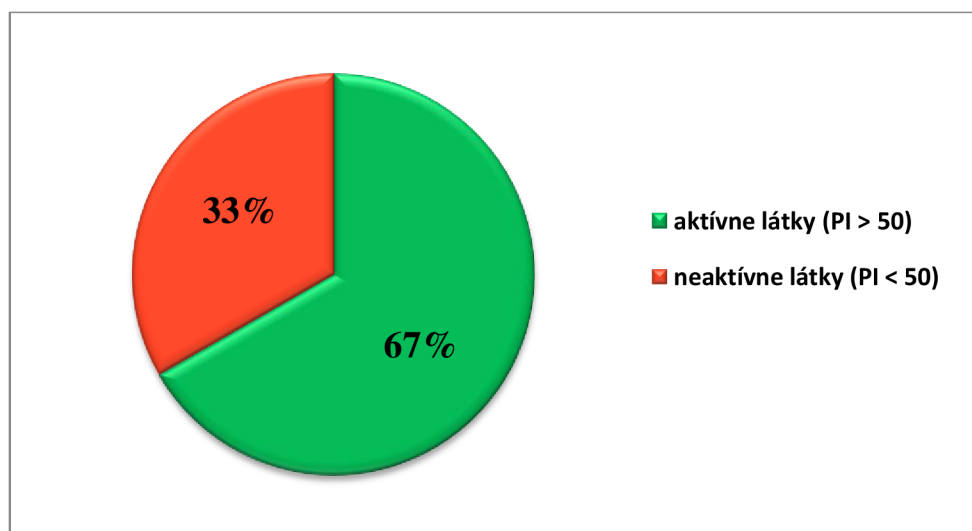
**Obr. č. 4:** Zobrazenie výsledkov v programe Dotmatics, odpovedajúce inhibícii rastu určitej bunkovej línie .

Na základe hodnôt PI vypočítaných pomocou programu Dotmatics boli stanovené za najmenej citlivé bunkové línie voči testovaným látkam línie BJ, kde nám ako aktívne vyšlo 5 látok a MRC-5 s počtom aktívnych látok 10. Naopak najviac aktívnych látok bolo identifikovaných v bunkových líniách K562-TAX s počtom aktívnych látok 39 a CCRF-CEM s 38 aktívnymi látkami. Prehľad identifikovaných aktívnych látok pre všetky bunkové línie je zhrnutý v tabuľke č. 6.

**Tab. č. 6:** Počet identifikovaných aktívnych látok z ÚMTM knižnice.

Bunková línia	Počet aktívnych látok z ÚMTM knižnice	Počet neaktívnych látok z ÚMTM knižnice
CCRF-CEM	38	34
CEM-DNR	25	47
K562	14	58
K562-TAX	39	33
A549	14	58
HCT116	14	58
HCT116 p53-/-	15	57
U20S	19	53
BJ	5	67
MRC5	10	62

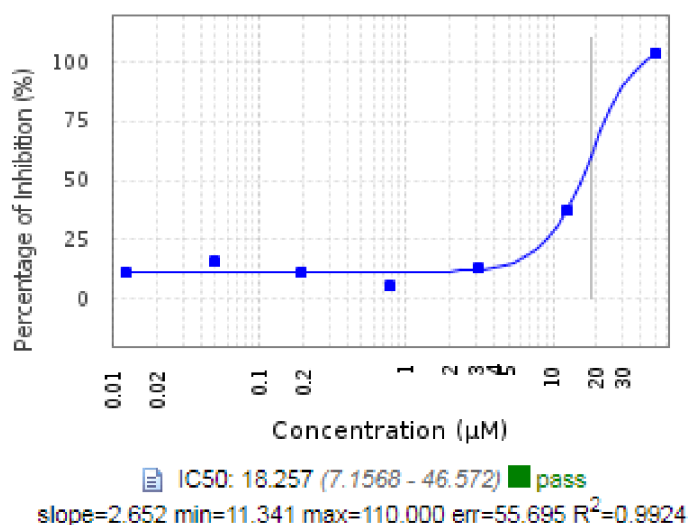
Zo všetkých otestovaných látok (72) nám vyšlo 24 látok ako neaktívne, s hodnotou PI < 50 pri všetkých bunkových líniách (graf č. 1).



**Graf č. 1:** Vyhodnotenie primárneho skrínungu celkového počtu testovaných látok (72) na základe hodnôt PI.

## 5.2 Sekundárny skrínung aktívnych látok z ÚMTM chemickej knižnice

Látky, ktoré nám vyšli ako aktívne pri primárnom skrínungu sa následne testovali po druhý krát v sekundárnom skrínungu. Látky boli testované v 7 koncentráciách, kedy sa stanovovala hodnota IC<sub>50</sub> v programe Dotmatics. Hodnota IC<sub>50</sub> bola stanovená z grafu na základe závislosti percenta inhibície (%) na koncentrácii použitej látky (obr. č. 5).



**Obr. č. 5:** Cytotoxické účinky látky LEM23460 na bunkovú líniu CCRF-CEM.

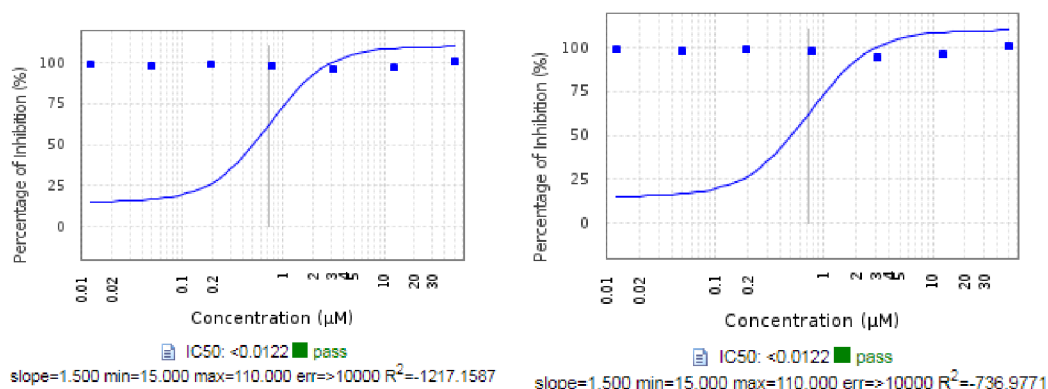
Na základe vypočítaných hodnôt IC<sub>50</sub> boli látky rozdelené na neaktívne, stredne cytotoxické, cytotoxické a vysoko cytotoxické (Tab. č. 7). Testovanie prebiehalo v 384-jamkových doštičkách.

**Tab. č. 7:** Rozdelenie látok na základe hodnoty IC<sub>50</sub>, vypočítanej z dát zo sekundárneho skrínungu pomocou programu Dotmatics.

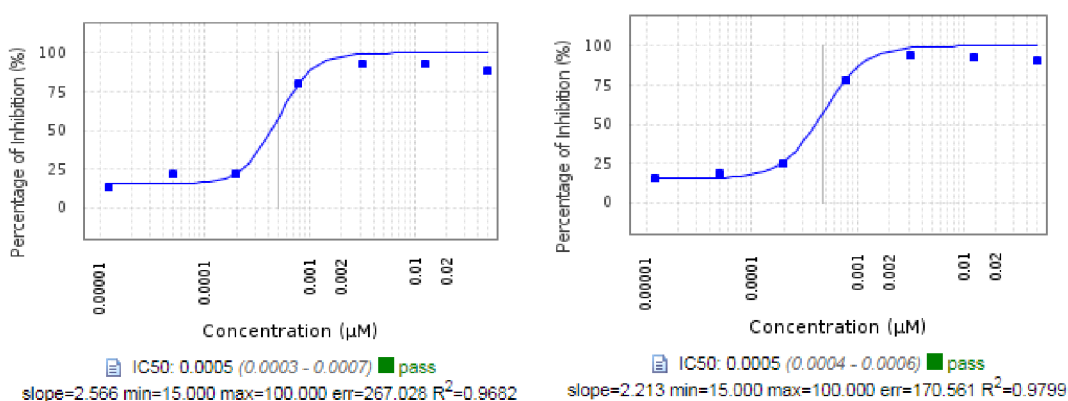
IC <sub>50</sub> stanovené v programe Dotmatics	Rozdelenie látok
> 50 µ	Neaktívne
50 µM - 10 µM	Stredne cytotoxické
10 µM – 1 µM	Cytotoxické
< 1 µM	Vysoko cytotoxické

Najcitlivejšie na testované látky reagovala bunková línia CCRF-CEM, ktorá vykazovala rôzne miery cytotoxických účinkov k daným látkam. Pri tejto bunkovej línii bolo zaznamenaných 13 cytotoxických látok ( $IC_{50} = 10 \mu M - 1 \mu M$ ), čo bol najvyšší zaznamenaný počet, a 2 látky spôsobujúce vysokú cytotoxicitu. Pri sekundárnom skríningu aktívnych látok nám najvyššiu toxicitu ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ) vykazovali 4 látky pri bunkových líniách K562 a K562-TAX. V dvoch prípadoch (LEM 11967 a LEM 23460) nebolo možné v rozsahu testovaných koncentrácií vypočítať hodnotu  $IC_{50}$  pre bunkovú líniu K562. Z tohto dôvodu boli tieto látky pretestované v nižšom koncentračnom rozsahu, kedy najvyššia testovaná koncentrácia bola  $5 \mu M$ . Výsledky sú na obr. č. 6. Hodnoty  $IC_{50}$  týchto 2 látok pre ostatné bunkové línie neboli podobne nízke a sú v tabuľke č. 8.

a)



b)

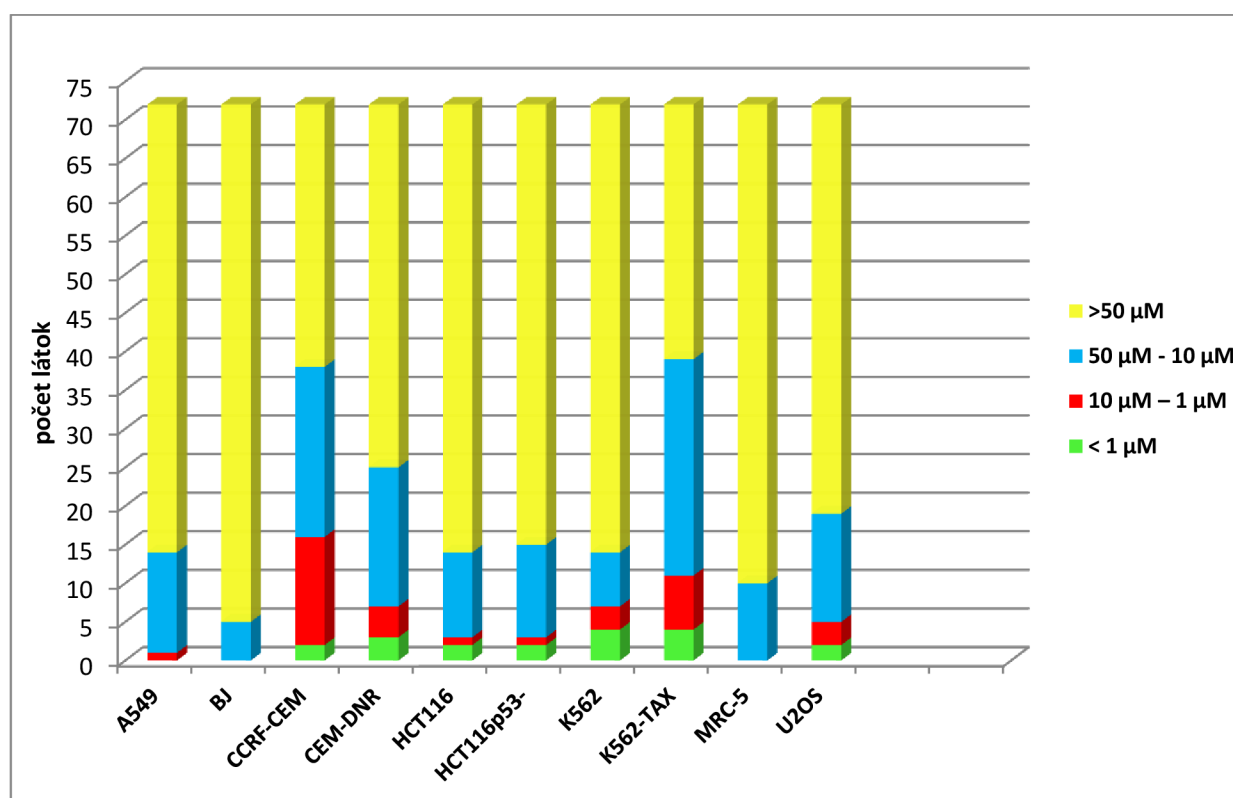


**Obr. č. 6:** Cytotoxické účinky látky LEM 23460 na bunkovú líniu K562, a) pri testovaní v koncentračnom rozsahu  $50 - 0,012 \mu M$  b) pri testovaní v koncentračnom rozsahu  $5 - 0,0012 \mu M$

**Tab. č. 8:** Porovnanie cytotoxickej aktivity látok LEM 11967 a LEM 23460 na jednotlivých bunkových líniách

	A549	BJ	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HCT116p53 -/-	K562	K562-TAX	MRC-5	U2OS
<b>LEM 11967</b>	20,07	25,48	6,98	0,13	13,74	15,12	0,00026	0,62	17	8,3
<b>LEM 23460</b>	14,46	19,19	15,63	1,07	15,58	10,79	0,00039	0,64	46,9	12,46

Naopak za najmenej citlivú bunkovú líniu môžeme považovať BJ, kde nebola zaznamenaná ani jedna látka spôsobujúca vysokú cytotoxicitu či toxicitu a len 5 látok pôsobilo stredne cytotoxicky (IC<sub>50</sub> v rozsahu 50 µM - 10 µM). Prehľad cytotoxických účinkov testovaných látok na jednotlivé bunkové línie je zobrazený v grafe č. 2.



**Graf č. 2:** Rozdelenie testovaných látok na základe ich toxicity.

Pre každú doštičku, ktorá je analyzovaná v programe Dotmatics sa automaticky vypočíta Z' faktor. Priemerné hodnoty Z' faktorov pre primárny a sekundárny skrining sú zobrazené v tabuľke č. Vo všetkých prípadoch bola hodnota nad 0,5 čo potvrdzuje kvalitu prevedeného



testu. Najvyšší Z' faktor bol dosiahnutý u bunkovej línie A549 a K562. Naopak najnižší bol u bunkovej línie BJ a K562-TAX.

**Tab. č. 9:** Vypočítaný Z' faktor pre jednotlivé bunkové línie.

	<b>1.experiment</b>	<b>2.experiment</b>	<b>3.experiment</b>	<b>4.experiment</b>	<b>Priemer</b>
<b>A549</b>	0,81	0,90	0,72	0,80	0,81
<b>BJ</b>	0,81	0,54	0,53	0,54	0,61
<b>CCRF-CEM</b>	0,74	0,71	0,87	0,84	0,79
<b>CEM-DNR</b>	0,66	0,64	0,81	0,87	0,75
<b>HCT116</b>	0,82	0,80	0,74	0,78	0,79
<b>HCT116p53-/-</b>	0,72	0,77	0,83	0,82	0,79
<b>K562</b>	0,88	0,83	0,68	0,85	0,81
<b>K562-TAX</b>	0,51	0,54	0,70	0,69	0,61
<b>MRC5</b>	0,59	0,65	0,69	0,65	0,65
<b>U20S</b>	0,66	0,65	0,89	0,75	0,74

## 6 DISKUSIA

Kľúčová otázka vo výskume biotransformácie ľudských liečiv je ako vytvoriť spoľahlivé extrapolácie z modelov *in vitro* či *in vivo* do klinickej praxe (Anderson a Krewski, 2008). Významnú úlohu tu zohrávajú bunkové testy, ktoré minimalizujú rozdiely medzi zjednodušenými biochemickými analýzami a testovaním na zvieratách. Tieto testy sa vo veľkej miere využívajú pri skríningu súboru zlúčenín s cieľom zistiť možný vplyv látky na bunkové delenie či priame efekty cytotoxicity, ktoré následne môžu viesť až k bunkovej smrti (Riss et al., 2013; Bhadriraju et al., 2002). Zvyšujúce sa množstvo látok a ich potreba včasného testovania postupne viedlo k vývoju technológií umožňujúcich testovanie viacerých vzoriek v rovnaký čas. Vďaka metóde HTS vykonanej v multijamkovej doštičke je možné testovať stovky až tisíce chemikálií s veľkým množstvom biologických odpovedí (Houck a Kavlock, 2008).

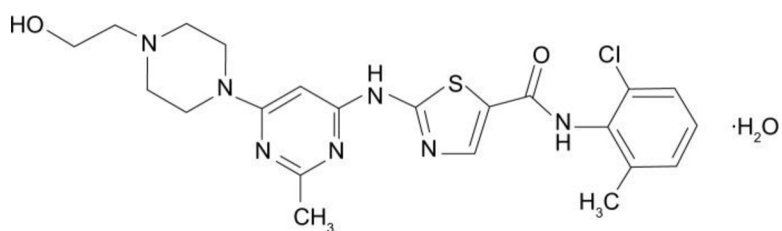
Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo vyhodnotenie cytotoxickej aktivity nových chemických látok z unikátnej ÚMTM chemickej knižnice vykonaných na 8 nádorových líniiach (A549, HCT116, HCT116 p53<sup>-/-</sup>, CCRF-CEM, CEM-DNR, K562, K562-TAX, U2OS) a dvoch nenádorových líniiach (BJ a MRC) v podmienkach HTS. Na vybraných 10 bunkových líniiach ľudského pôvodu boli použité cytostatiká aktinomycin D a mitomycin C, ako pozitívne kontroly, vzhľadom k tomu, že bunkové línie použité v experimente sú voči nim vysoko citlivé. Použité cytostatikum aktinomycin D pôsobí inhibičným účinkom na transkripciu a mitomycin C zasa spôsobuje alkyláciu a blokuje RNA a DNA replikáciu. (Wallau et al., 2005; Koba a Konopa, 2005). Ako negatívna kontrola bolo v experimente použité rozpúšťadlo DMSO. Primárny skríning sa prevádzal pri jednej koncentrácii, odpovedajúcej 50  $\mu$ M, kedy bolo vyselektovaných 24 neaktívnych látok na základe ich cytotoxických účinkov. Následne sa v sekundárnom skríningu pre vybrané aktívne látky (48) stanovovala hodnota IC<sub>50</sub>.

Daný parameter predstavuje koncentráciu látky, ktorá vyvoláva bunkové poškodenie a následnú smrť v 50-tich percentách bunkovej populácie. Pre dané aktívne látky boli stanovené hodnoty IC<sub>50</sub> po zmeraní absorbancie prostredníctvom programu Dotmatics. Bunková životaschopnosť je funkciou koncentrácie liečiv, ktorá je adekvátne popísaná sigmoidnou funkciou. Ďalej tiež môžeme povedať, že životaschopnosť buniek je 100 % v prípade absencie liečiva a v prípade dostatočne vysokej dávky, môže hodnota napokon

dosiahnuť aj 0 %. Tieto modely ponúkajú účinný spôsob ako vytvárať a zlučovať informácie z veľkého množstva dose-response (Vis et al., 2016).

Všeobecne väčšina aktívnych látok, ktoré sme testovali, vykazovala na nádorových bunkových líniah strednú cytotoxicitu. Cytotoxické až výrazne cytotoxické účinky sme zaznamenali hlavne v suspenzných bunkových líniah a ich rezistentných klonoch, menej často v ostatných nádorových líniah. Najvýraznejší cytotoxický účinok bol zaznamenaný vplyvom látok LEM 11967 a LEM 23460 na bunkách K562, pričom na ostatných líniah tieto látky vykazovali hlavne stredné cytotoxické, príp. cytotoxické účinky. Látka LEM 11967 je dasatinib, ktorá sa radí k zlúčeninám druhej generácie s inhibičným účinkom na BCR-ABL (Rixe et al., 2007). BCR-ABL je Philadelphský chromozóm, ktorý vzniká fúziou medzi génom v oblasti zlomu klastra (BCR) a génom ABL1 a jeho výskyt je charakteristický pre chronickú myeloidnú leukémiu (CML). Produktom tejto fúzie je proteín Bcr-Abl, v ktorom je narušených niekoľko autoregulačných vlastností proteínu tyrozínkinázy Abl, čo vedie k jeho konštitutívnej aktivite (Druker et al., 2002).

Dasatinib je efektívny pri liečbe viac ako v polovici imatinib (IM) rezistentných pacientov. V súčasnosti sa preukázalo, že nové inhibítory tyrozínkinázy druhej generácie (ako je dasatinib) sú účinné pri zastavení onkogénnej aktivity väčšiny mutantov BCR-ABL. Dasatinib je v súčasnosti implementovaný do prvej línie liečby, je 300-krát účinnejší ako IM pri inhibícii BCR-ABL a čo viac, má málo vedľajších účinkov (Okabe et al., 2008). Dasatinib a imatinib ovplyvňujú expresiu viacerých cyklín dependentných kináz, cyklínov a génov zodpovedných za bunkové delenie v priebehu cyklov. Tieto regulátory sa účasťujú v G1/S a G2/M prechode a ich znížená hladina génovej expresie (a teda znížená aktivita) sú nevyhnutné pre zastavenie bunkového cyklu v počiatočnom štádiu. Okrem iného tiež ovplyvňujú expresiu mitotických inhibítorov. Pravdepodobne downregulácia/inaktivácia veľkého množstva génov zapojených do bunkového cyklu pôsobí ako predpoklad apoptózy v dasatinib a imatinib ovplyvnených CML bunkách. Chronická myeloidná leukémia, je jedna z pomerne rezistentných voči liečivám, no vykazuje vysokú citlivosť voči PKI (Nunoda, et al. 2007).



**Obr. č. 7:** Chemická štruktúra dasatinibu (Chen, R. a Chen, B. 2015).

Druhou látkou, ktorá vykazovala vysokú mieru cytotoxicity na bunkovej línii K562 bola látka LEM 23460. Ide o karboránový derivát s naviazaným dasatinibom, čo vysvetľuje jeho výraznú cytotoxicitu voči K562 bunkám. Tieto 2 sledované látky boli vysoko aktívne na danej línii, z toho dôvodu, že bunky K562 boli izolované z pacientky s CML, čo je lúnia pozitívna na bcr-abl fúziu ktorej produktom je philadelphský chromozóm (Druker et. al. 2002).

Získané výsledky cytotoxických účinkov testovaných látok sú súčasťou bioprofilovania unikátnej ÚMTM chemickej knižnice a sú dôležitou informáciou pre ďalšie testovanie látok ako aj pre chemikov, ktorí tieto látky nasyntetizovali.

## 7 ZÁVER

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo stanovenie cytotoxických účinkov nových chemických látok v HTS podmienkach, pomocou MTS testu. Ako pozitívne kontroly boli zvolené 2 cytostatika a to aktinomycin D a mitomycin C. Celkovo bolo otestovaných 72 látok z unikátnej ÚMTU chemickej knižnice, z ktorej bolo pri primárnom skríningu vyselektovaných 24 látok neaktívnych. Primárny skríning sa vykonával pri 1 koncentrácii u všetkých látok, stanovila sa hodnota PI, kedy sa za neaktívne látky považovali tie, ktorých hodnota PI nepresiahla 50%.

Z výsledkov hodnôt PI vypočítaných pomocou programu Dotmatics boli stanovené za najmenej citlivé bunkové línie, voči testovaným látkam, línie BJ kde nám ako aktívne vyšlo 5 látok a MRC-5 s počtom aktívnych látok 10. Naopak najviac aktívnych látok bolo identifikovaných v bunkových líniách K562-TAX s počtom aktívnych látok 39 a CCRF-CEM s 38 aktívnymi látkami.

V sekundárnom skríningu sa následne testovali len aktívne látky z chemickej knižnice ÚMTU. Látky boli testované v 7 koncentráciách na základe čoho boli stanovené hodnoty IC50 pomocou programu Dotmatics.

Pri sekundárnom skríningu sme celkovo testovali 48 aktívnych látok, ktoré boli následne rozdelené do štyroch skupín podľa hodnoty IC50 stanovenej v programe Dotmatics. Z nameraných výsledkov sme stanovili za najcitlivejšiu bunkovú líniu CCRF-CEM, pri ktorej sme pozorovali 2 látky s vysoko cytotoxickým a 13 látok s cytotoxickým účinkom. Najvyššia miera cytotoxicity bola dosiahnutá pri bunkových líniách K562 a K562-TAX, ktorá bola zaznamenaná pri látkach LEM11967 a LEM23460.

## 8 LITERATÚRA

Adan A., Kiraz Y., Baran Y. (2016): Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 17, 1213-1221.

Ahmed S. A., Gogal R. M., Jr., Walsh J. E. (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Meth.* 170, 211–224.

Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.A.L. (1995): *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture.* Kluwer Academic Publishers. 574 s.

An W. F., Tolliday, N. (2010): Cell-Based Assays for High-Throughput Screening. *Mol Biotechnol.* 45, 180–186

Anderson M. E. a Krewski D. (2009): Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. *Toxicological Sciences.* 107, 324–330

Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. (2015): Three-dimensional cell culture : A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences.* 16, 5517-27.

Astashkina A., Mann B., Grainger D.W. (2012): A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-through put drugs creening and toxicity. *Pharmacology&Therapeutics.* s 82–106.

Avelar-Freitas B. A., Almeida V. G., Pinto M. C., Mourão F. A., Massensini A. R., Martins-Filho O. A., Rocha-Vieira E., Brito-Melo G. E. (2014): Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res.* 47, 307-15.

Banks M. N., Zhang L., Houston J. G. (2006): *Exploiting Chemical Diversity for Drug Discovery.* Royal Chemical Society Publishing, London. 315–335

Berg, K., Zhai, L., Chen, M., Kharazmi, A., Owen, T. C. (1994): The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitology Research.* 80, 235–239

Blaauboer, B.J. (2002): "The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals", *Environmental toxicology and pharmacology* 11, 213-25.

Bhadriraju K. a Chren C. (2002): Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing, *Drug Discovery Today.* 7, 612-620

Bhojwani, S.S., Razdan, M. K. (1996): *Plant Tissue Culture: Theory and Practice.* Elsevier. 767 s.

Botham P.A. (2004): Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. *Toxicol In Vitro.* 18, 227-30.

- Brandish P. E., Chiu C.-S., Schneeweis J., Brandon N. J., Leech C.L., Kornienko O., Scolnick E. M., Strulovici B., Zheng W. (2006): A cell-based ultra-high-throughput screening assay for identifying inhibitors of D-amino acid oxidase. *Journal of Biomolecular Screening*. 11, 481-487
- Bucher R., Portier J. Ch. (2004): Human carcinogenic risk evaluation, Part V: The national toxicology program vision for assessing the human carcinogenic hazard of chemicals. *Toxicological science*. 82, 363-366
- Buehler L. K. a Rashidi H. H. (2005): *Bioinformatics basics. Application in biomedical science and medicine*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, Fla. 5, 1-2
- Burd J. F., Usategui-Gomez M. (1973): A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta*. 46, 223-7
- Buttke T. M., McCubrey J. A., Owen T. C. (1993): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines, *Journal of Immunological Methods*. 157, 233-240
- Castell, J.V., Gmez-Lechn, M.J. (1996): *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press. str 467
- Cerioti, L., Ponti J., Broggi F. (2007): "Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate", *Sensors and Actuators B: Chemical*. 123, 769- 78
- Chan F. K., Moriwaki K., De Rosa M. J. (2013): Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*. 979, 65-70.
- Chen L., Wu M., Jiang S., Zhang Y., Li R., Lu Y., Liu L., Wu G., Liu Y., Xie L., Xu L. (2019): Skin Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles in a 3D Epidermal Model Compared to 2D Keratinocytes. *Int J Nanomedicine*. 14, 9707-9719
- Chen R., Chen B. (2015): The role of dasatinib in the management of chronic myeloid leukemia. *Drug Des Devel Ther*. 9, 773-9
- Chung S., Kim S. H., Seo Y., Kim S. K., Lee J. Y. (2017): Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: Application to cell lines and cocultures. *Cytometry A*. 91, 704-712
- Cook J.A. a Mitchell, J.B. (1989): Viability measurments in mammalian cell systems. *Anal Biochemistry*. 179, 1-7
- Cory, A. H., Owen, Terence, C., Barltrop, J. A., Cory, J. G. (1991): Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture. *Cancer communication*. 3, 207-212
- Costa, A., Bruno, S., Vitor, S. (2014): "An evaluation of the latest in vitro tools for drug metabolism studies", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 10: 103- 19

- Darzynkiewicz, Z., Roederer, M., Tanke, H.J. (2005): *Methods in cell biology. Cytometry: New Developments*. Academic Press. 920 s.
- Decker T. a Lohmann-Matthes M. L., (1988): *J. Immunol. Methods* .115, 61–69
- Devlin R. B., Mark L. F., Andrew J. G. (2005): "In vitro studies: what is their role in toxicology", *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 1, 183-88.
- Druker B. J , O'Brien S. G., Cortes J., Radich J. (2002): *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 111-135
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., Yang, L. (2014): "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors", *Assay and Drug Development Technologies*. 12, 207-18
- Entzeroth M., Flotow H., Condron P. (2009): Overview of high-throughput screening. *Curr Protoc Pharmacol*. Chapter 9:Unit 9.4.
- Fang Y, Eglén R. M. (2017): Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS Discov* 22, 456–472
- Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. (2006): Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Methods*. 79-86
- Goodwin C. J., Holt S. J., Downes S., Marshall N. J. (1995): Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts XTT and MTS. *J. Immunol. Methods*. 179, 95-103
- Halle W., Halder M., Worth A., Genschow E. (2003): *The Registry of Cytotoxicity: Toxicity Testing in Cell Cultures to Predict Acute Toxicity (LD50) and to Reduce Testing in Animals*. Research Article. 31, 89-198
- Hsieh J.H., Huang R., Lin J.A., Sedykh A., Zhao J., Tice R.R., Paules R.S., Xia M., Auerbach S.S. (2017): Real-time cell toxicity profiling of Tox21 10K compounds reveals cytotoxicity dependent toxicity pathway linkage. *PLoS One*. 12(5)
- Hong J., Edel J. B., DeMello, A. J. (2009): Micro- and nanofluidic systems for highthroughput biological screening, *Drug Discovery Today*, 14, 134-146
- Houck K. H., Kavlock R. J., (2008): Understanding mechanisms of toxicity: Insights from drug discovery research. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 227, 163 – 178
- Houston, J. G., Banks M. N., Binnie A., Brenner S., O'Connell J., Petrillo E. W. (2008): Case study: impact of technology investment on lead discovery at Bristol-Myers Squibb, 1998–2006. *Drug Discov. Today* 13, 44–51



Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. (2015): Comparison of 2D and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*. 33, 1837-43.

Ishiyama M., Tominaga H., Shiga M., Sasamoto K., Okhura Y., Ueno KA. (1996): Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 19, 1518-1520

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

James S., Mishra P., Berbeco R. (2012): ITV variations as a function of CT geometry and scan time: a simulation study using patient data. *Med Phys*. 39, 3692–3692.

Jones C.F., Grainger D.W. (2009): In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*. 61, 438-56.

Judson R., Kavlock R., Martin M., Reif D., Houck K., Knudsen T., Richard A., Tice R. R., Whelan M., Xia Huang R., Austin Ch., Daston G., Hartung T., Fowle J. R., Wooge W., Tong W., Dix D. (2014): Perspectives on Validation of High-Throughput Assays Supporting 21st Century Toxicity Testing. *ALTEX*. 30, 51-56

Kaja S., Payne A. J., Singh T., Ghuman J. K., Sieck E. G., Koulen P. (2015): An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 73, 1-6

Kenny P. A., Lee G. Y., Myers C. A. (2007): The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*. 1, 84–96.

Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G. (2011): Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 221–237

Kim J. S., Nam M. H., An S. S., Lim C. S., Hur D. S., Chung C. (2011): Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. *J Clin Lab Anal*. 25, 90–94.

Klumpp M., Boettcher A., Becker D., Meder G., Blank J., Leder L., Forstner M., Ottl J., Mayr L.M. (2006): Readout technologies for highly miniaturized kinase assays applicable to high-throughput screening in a 1536-well format. *Journal of Biomolecular Screening*. 11, 617-633

Koba M., Konopa J. (2005): Aktywność i mechanizmy jej działania [Actinomycin D and its mechanisms of action]. *Postepy Hig Med Dosw*. 59, 290-8

Korzeniewski C., Callewaert D. M. (1983): An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 64, 313–20

Kreft S., Kreft M. (2009): Quantification of dichromatism: A characteristic of color in transparent materials. *J. Opt. Soc. Am. A.* 26, 1576–1581.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A.,

Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. (2018): Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* (6).

Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nunez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.

Lee G. Y., Kenny P. A., Lee E. H. (2007): Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* 4, 359–365.

Li J., He X., Zou Y. (2017): Mitochondria-targeted platinum(ii) complexes: dual inhibitory activities on tumor cell proliferation and migration/invasion via intracellular trafficking of  $\beta$ -catenin. *Met Integr Biometal Sci.* 9, 726–733.

Liu Q., Zhang Z., Liu Y., Cui Z., Zhang T., Li Z., Ma W. (2018): Cancer cells growing on perfused 3D collagen model produced higher reactive oxygen species level and were more resistant to cisplatin compared to the 2D model. *J Appl Biomater Funct Mater.* 16, 144-150.

Longo-Sorbello G. S. A., Saydam G., Banerjee D., Bertino J. R. (2005): Chapter 38: Cytotoxicity and cell growth assays. In: Julio C., Nigel C., Kai S., Small J., Hunter T., David S., editors. *Cell Biology a Laboratory Handbook*. 3rd ed. Academic Press; New York, NY, USA. s 315–324

Ma D. L., Liu, Li J., Lin S., Wang M., Shiu-Hin Chan D., Leung Ch. H. (2015): Recent Advances in the Discovery and Development of Protein-Protein Interaction Modulators by Virtual Screening. *Frontiers in Computational Chemistry.* 1, 121 – 157

Macarron R., Banks M. N., Bojanic D., Burns D. J., Cirovic D. A., Garyantes, T., Sittampalam, G. S. (2011): Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery.* 10, 188–195.

Macarron, R. (2006): Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov Today.* 11, 277-279

Malich, G., Markovic, B., Winder, Ch. (1997): The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 123, 179-192

Marshall N. J., Goodwin C. J., Holt S. J. (1995): A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 5, 69–84

- Matsumoto K., Yamada Y., Takahashi M., Todoroki T., Mizoguchi K, Misaki H, Yuki H. (1990): Fluorometric determination of carnitine in serum with immobilized carnitine dehydrogenase and diaphorase. *Clin Chem.* 36, 2072-6.
- Mayr L. M., Bojanic B. (2009): Novel trends in high-throughput screening, *Current Opinion in Pharmacology.* 9, 580-588
- Mayr L. M., Fuerst P. (2008): The future of high-throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening.* 13, 443-448
- McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D. (2013): Bioassays for anticancer activities. *Methods Mol Biol.* 1055, 191-205
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte L., Coppa A., Roda A., (2010): Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 227-238
- Mikus J., Steverding D. (2000): A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar blue. *Parasitology International.* 48, 265-269
- Moraga C. A. (2006): A History of High-Throughput Screening for Drug Discovery, A Special Report Summarizing Six Comprehensive Industry Studies in the Years 1998–2005, *HighTech Business Decisions*
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65, 55-63
- Nahar L., Sarker D. (2018): Application of Computation in Building Dereplicated Phytochemical Libraries. *Computational Phytochemistry.* 5, 141-163
- Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., Thao, D. T. P. (2020) Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analitical Biochememistry.* 610
- Nikoletopoulou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. (2013): Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research.* 1833, 3448– 3459
- 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", *Curr Chem Genomics.* 3, 33-41
- Nunoda, K., Tauchi, T., Takaku, T. Okabe S., Akahane D., Sashida G., Ohyashiki J. H., Ohyashiki K. (2007): Identification and functional signature of genes regulated by structurally different ABL kinase inhibitors. *Oncogene* 26, 4179–4188
- O'Brien J., Wilson I, Orton T., Pognan F. (2000): Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426

- Okabe S., Tauchi T., Ohyashiki K. (2008): Characteristics of dasatinib- and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 14, 6181-6.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monroe, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A. (2000): Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 32, 56-67
- O'Toole S. A., Sheppard B. L., McGuinness E. P., Gleeson N. C., Yoneda M., Bonnar J. (2003): The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detect Prev.* 27, 47-54.
- Page A. B., Page A. M., Noel C. (1993): A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3:473–476.
- Paricharak S., Mendez-Lucio O., Ravindranath A. C., Bender A., IJzerman A. P., van Westen G. J. P. (2016): Data-driven approaches used for compound library design, hit triage and bioactivity modeling in high-throughput screening. *Briefings in Bioinformatics* 19, 277-285
- Pauwels M., Rogiers V. (2010): Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: A legally imposed challenge to science, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243, 260 – 274
- Pereira D.A., Williams J. A. (2009): Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol.* 152, 53-61
- Quent V. M., Loessner D., Friis T., Reichert J. C., Hutmacher D. W. (2010): Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med.* 14, 1003-13.
- Rampersad, S. N. (2012): Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 12, 12347-12360
- Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016): In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science*, 6, 147–172.
- Riccardi C., Nicoletti I. (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 1, 1458-61.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. (2013): Cell Viability Assays. [Updated 2016 Jul 1]. Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 1-33
- Rixe, O. and Fojo, T. (2007): Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? *Clinical Cancer Research.* 13, 7280– 7287

Rodríguez-hernández C.O., Torres-garcía S.E., Olvera-sandoval C., Castillo F.E., Muro A.L., Gronzález F.J., Guerrero-Barrera A. L. Fang (2014): Cell culture: history, development and prospects. *Int J Curr Res Acad Rev.* 2, 188-200.

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. *J Immunol Methods.* 142, 257-65

Russo D. P, Zhu H. (2016) Accessing the High-Throughput Screening Data Landscape. *Methods Mol Biol.* 1473, 153-159

Saeidnia S, Manayi A, Abdollahi M. (2015): From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies.* 12, 218-24

Sedykh A., Zhu H., Tang H., Zhang L., Richard A., Rusyn I., Tropsha, A., (2011): Use of in Vitro HTS-Derived Concentration–Response Data as Biological Descriptors Improves the Accuracy of QSAR Models of in Vivo Toxicity. *Environment Health Perspective.* 119, 368-370

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

Schnecke V., Bostrom J. (2006): Computational chemistry-driven decision making in lead generation. *Drug Discov Today.* 11, 43–50

Schnur D. M. (2008): Recent trends in library design: ‘Rational design’ revisited. *Current Opinion in Drug Discovery & Development,* 11, 375-380

Souza A.G., Silva I.B.B., Campos-Fernandez E., Barcelos L.S., Souza J.B., Marangoni K., Goulart L.R., Alonso-Goulart V. (2018): Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Curr Pharm Des.* 24, 1689-1694.

Spears K. L. a Brown S. P. (2017): The evolution of library design: crafting smart compound collections for phenotypic screens. *Drug discovery today: Technologies.* 23, 61-67

Stoddart M. J. (2011): Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol.* 740, 1-6

Strober W. (2015): Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.*

Sumantran, V. N. (2011): Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Molecular Biology* 731, 219-236

Sundberg, S. A. (2000): High-throughput and ultrahigh-throughput screening: Solution- and cellbased approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 47-53.

Sylvester P.W. (2011): Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In: Satyanarayananjois S. (eds) Drug Design and Discovery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). 716, 157–168

Swinney D. C., Anthony J. (2011): How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discovery*. 10, 507-19.

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

Tahara H., Matsuda S., Yamamoto Y., Yoshizawa H., Fujita M., Katsuoka Y., Kasahara T. (2017): High-content image analysis (HCIA) assay has the highest correlation with direct counting cell suspension compared to the ATP, WST-8 and Alamar blue assays for measurement of cytotoxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 88, 92-99.

Tennant J. R. (1964): Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. 2, 685–694.

Thorne N., Auld D. S., Inglese J. (2010): Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference. *Curr Opin Chem Biol*. 14, 315-24.

Tice R. R., Austin Ch. P., Kavlock R. J. (2013): Improving the Human Hazard Characterization of Chemicals: A Tox21 Update. *Environmental Health Perspect*. 121, 756-765

Tokarenko A, Lišková B, Smoleň S, Táborská N, Tichý M, Gurská S, Perlíková P, Frydrych I, Tloušťová E, Znojek P, Mertlíková-Kaiserová H, Poštová Slavětinská L, Pohl R, Klepetářová B, Khalid NU, Wenren Y, Laposa RR, Džubák P, Hajdúch M, Hocek M. (2018): Synthesis and Cytotoxic and Antiviral Profiling of Pyrrolo- and Furo-Fused 7-Deazapurine Ribonucleosides. *J Med Chem*. 20, 9347-9359.

Tsukatani, T., Higuchi, T., Suenaga, H., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K. (2009): Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Analytical Biochemistry*. 393, 117-125

Ukelis U., Kramer P-J., Olejniczak K., Mueller S. O. (2008): Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. *Elsevier. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51, 108–118.

Van Hunsel, F., de Waal S., Härmak L. (2017): The contribution of direct patient reported ADRs to drug safety signals in the Netherlands from 2010 to 2015. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 26, 977–983.

Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 145–174. [Crossref](#) [Medline](#) [Google Scholar](#)

Vis DJ., Bombardelli L., Lightfoot H., Iorio F., Garnett MJ., Wessels LF. (2016): Multilevel models improve precision and speed of IC50 estimates. *Pharmacogenomics*. 17, 691-700

Wallau A. D., Leoratti M. C., Campos M. (2005): Mitomicina C e "Excimer laser" [Mitomycin C and excimer laser]. *Arq Bras Oftalmol.* 68, 867-72

Wang D., Li Y., Zhang Y., Liu Y., Shi G. (2012): High throughput screening (HTS) in identification new ligands and drugable targets of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* 15, 232-241

Weng Q., Zhou L., Xia L., Zheng Y., Zhang X., Li F., Li Q. (2019): In vitro evaluation of FL118 and 9-Q20 cytotoxicity and cellular uptake in 2D and 3D different cell models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 84, 527-537.

Willett P., Barnard J. M., Downs G. M. (1998): Chemical Similarity Searching. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 38, 976-982.

Wu M.-H., Huang S.-B., Lee G.-L. (2010): Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab on a Chip.* 10, 939 - 956

Wurtzel M. J. V. a Mao J. G. T. (2017): Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood.* 13, 567–580.

Zheng W., Thorne N., McKew J.C. (2013): Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today.* 18, 1067-1073.

#### Internetové zdroje

Aslantürk Ö. S. (2017): In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Marcelo L. Larramendy and Sonia Soloneski, IntechOpen. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/57717> citované: 29.12. 2020

Kijanska, M., Kelm, J. (2016) In vitro 3D Spheroids and microtissues: ATP-based cell viability and toxicity assays. Assay guidance manual. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343426/#!po=1.19048> citované: 12.1. 2021

McGowan, E. M., Alling, N., Jackson, E. A., Yagoub, D., Haass, K. N., Allen, D. J., Martinello-Wilks, R. (2011) Evaluation of Cell Cycle Arrest in Estrogen Responsive MCF-7 Breast Cancer Cells: Pitfalls of the MTS Assay. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21673993/> citované: 12.1. 2021

TDI (2016): Target Discovery Institute, University of Oxford, High-throughput screening Dostupné z: <http://www.tdi.ox.ac.uk/high-throughput-screening-2> citované: 25.5. 2021