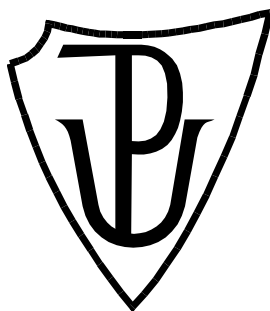


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Oddělení buněčné biologie

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum



**Testování cytotoxicity nových potenciálně bioaktivních
sloučenin pomocí vysokokapacitního screeningu (HTS)**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Voltemarová
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Soňa Gurská, Ph.D.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Tereza Voltemarová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Soni Gurské, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce, ochotu a čas, který mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mě podporují ve všech mých rozhodnutích.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Voltemarová
Název práce	Testování cytotoxicity nových potenciálně bioaktivních sloučenin pomocí vysokokapacitního screeningu (HTS)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Ing. Soňa Gurská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Vývoj léčiv je nezbytný, avšak velmi složitý proces vyžadující spolupráci mnoha přírodovědných oborů. Celý vývoj nového léčiva je rozdělen to několika fází a trvá i více než 10 let. V počátečních fázích celého vývoje je často využíván vysokokapacitní screening. Díky tomuto typu screeningu je možno rychle testovat velké množství potenciálních kandidátů na léčiva a vyřadit ty, které nemají požadované vlastnosti. Jednou z testovaných vlastností kandidátů je jejich cytotoxicita, která se využívá k popisu kumulativního účinku testované sloučeniny na buňky, ať už je následkem apoptóza, nekróza nebo snížení rychlosti buněčné proliferace.

V této práci byla testována cytotoxicita 88 chemických látek. Bylo identifikováno 50 aktivních sloučenin, které byly na základě jejich hodnoty IC₅₀ rozděleny na mírně cytotoxické, cytotoxické a extra cytotoxické. U všech aktivních sloučenin byl vypočítán jejich terapeutický index a na základě něj bylo identifikováno 9 terapeuticky zajímavých látek. V další části práce byl implementován a validován nový test na stanovení cytotoxických účinků látek, který je založen na měření produkce ATP v buňkách.

Klíčová slova	vývoj léčiv, HTS, cytotoxicita
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Tereza Voltemarová
Title	Cytotoxicity profiling of new potentially bioactive compounds using high throughput screening (HTS)
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Molecular and Traslational Medicine
Supervisor	Ing. Soňa Gurská, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Drug development is a necessary but very complex process requiring cooperation of many scientific disciplines. The whole development of a new drug is divided into several phases and takes more than 10 years. In the early stages of development a high-throughput screening is often used. This type of screening allows rapidly test many of potential drug candidates and excludes those that do not have the desired properties. One of the tested properties of the candidates is a cytotoxicity, which is used to describe the cumulative effect of a test compounds on cells, whether resulting in apoptosis, necrosis or reduction of the cell proliferation rate.

In this thesis the cytotoxicity of 88 compounds was evaluated. In the primary screen 50 compounds were identified as active and according their IC₅₀ values they were divided into moderate cytotoxic, cytotoxic and extra cytotoxic ones. For all active compounds the therapeutic index was calculated and 9 therapeutically interesting compounds were identified. In the next part of this thesis a new test for the determination of compounds cytotoxic effects was implemented. This test is based on the detection of ATP production in the cells.

Keywords	drug discovery, HTS, cytotoxicity
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Vývoj léčiv	10
2.1.1	Historie vývoje	10
2.1.2	Moderní vývoj léčiv	10
2.1.3	Kroky vývoje nových léčiv	11
2.1.4	Formy testů ve vývoji léčiv	13
2.1.4.1	Testy využívající buněčné kultury	13
2.1.4.2	Testy využívající laboratorní zvířata	14
2.1.4.3	Virtuální studie	15
2.1.5	Zdroje nových potenciálních léčiv	15
2.1.5.1	Přírodní látky	16
2.1.5.2	Analogy známých látek	17
2.1.5.3	Využití již používaných léčiv	17
2.2	Vysokokapacitní screening	18
2.2.1	Miniaturizace a automatizace	19
2.2.2	Skladování vzorků	20
2.2.3	Chemické knihovny	20
2.2.4	Typy HTS testů	21
2.2.4.1	Biochemické testy	21
2.2.4.1.1	Radiometrické metody	22
2.2.4.1.2	Fluorescenční metody	22
2.2.4.1.3	Kolorimetrické testy	22
2.2.4.2	Buněčné testy	23
2.2.4.2.1	Testy na bázi tetrazoliových solí	24
2.2.4.2.2	Testy založené na měření ATP	25
2.3	Cytotoxicita	26
2.3.1	Metody detekce při testování cytotoxicity	27
2.3.1.1	Ověření kvality testu	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3. 1	Materiál	28
3.1.1	Přístrojové a laboratorní vybavení	28
3.1.2	Použité chemikálie	28
3.1.3	Použité roztoky	29
3.1.4	Použité buněčné linie a jejich charakteristika	30

3.2	Metody	31
3.2.1	Stanovení cytotoxicity na úrovni HTS pomocí kolorimetrického MTS testu	31
3.2.1.1	Příprava testovaných látek	31
3.2.1.2	Primární screening	32
3.2.1.3	Sekundární screening	34
3.2.2	Zavedení luminiscenčního ATP testu do podmínek HTS	35
3.2.2.1	Měření závislosti intenzity signálu na počtu buněk v jamce	35
3.2.2.2	Validace ATP testu pro HTS podmínky	36
3.2.2.3	Porovnání testování cytotoxicity pomocí luminiscenčního ATP testu a pomocí kolorimetrického MTS testu	37
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Stanovení cytotoxicity na úrovni HTS pomocí kolorimetrického MTS testu	39
4.1.1	Primární screening	39
4.1.2	Sekundární screening	42
4.2	Zavedení luminiscenčního ATP testu do podmínek HTS	47
4.2.1	Měření závislosti intenzity signálu na počtu buněk v jamce	47
4.2.2	Validace ATP testu pro HTS podmínky	48
4.2.3	Porovnání testování cytotoxicity pomocí luminiscenčního ATP testu a pomocí kolorimetrického MTS testu	50
5	DISKUZE	54
6	ZÁVĚR	57
7	LITERATURA	58
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	61

Cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracování literární rešerše na téma diplomové práce, tedy sepsání obecných informací týkajících se vývoje léčiv, vysokokapacitního screeningu a testování cytotoxicity.

Hlavním cílem praktické části této práce, jak vyplývá z jejího názvu, bylo testování cytotoxicity nových potenciálně bioaktivních sloučenin v podmínkách vysokokapacitního screeningu. To zahrnovalo několik dílčích cílů:

- 1) příprava testovaných látek na analýzu,
- 2) testování cytotoxicity, zpracování naměřených dat, výpočet IC50, rozdělení testovaných látek podle jejich cytotoxické aktivity a analýza naměřených výsledků,
- 3) implementace nového testu na stanovení cytotoxických účinků látek, který je založen na měření produkce ATP.

1 ÚVOD

Vývoj léčiv je dlouhý a složitý proces, který zahrnuje nejmodernější multidisciplinární přístupy. Do procesu vývoje léčiv je zapojeno mnoho různorodých přírodovědných oborů, ať už se jedná o lékařskou chemii, biochemii, molekulární biologii či genomiku (Guido *et al.*, 2011). Kromě složitosti procesu vývoje je navíc celý proces velmi nákladný. Odhaduje se, že vývoj jednoho nového léčiva, od začátku vývoje až po jeho uvedení na trh, stojí přibližně 1,4 miliardy USD (Lombardino a Lowe, 2004).

I přes vysoké náklady je však vývoj nových léčiv beze sporu nezbytným procesem. V současné době stále existuje spousta nemocí, k jejichž léčbě není známá žádná medikace a pacienti s těmito chorobami jsou odkázáni pouze na léčbu podpůrnou a symptomatickou. Z toho důvodu je nutné se vývojem léčiv intenzivně zabývat, jelikož vývoj léku na tyto nemoci má potenciál zachránit velké množství lidských životů, nebo alespoň zásadně zlepšit kvalitu života pacientů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Vývoj léčiv

Vývoj léčiv je jednou z nejdůležitějších a zároveň i nejsložitějších vědeckých oblastí. Jedná se o velmi komplexní proces, který vyžaduje spolupráci mnoha různých vědeckých oborů. V současné době je naštěstí známo množství léčiv, díky nimž je zajištěna péče o pacienty trpící mnoha chorobami, ať už se jedná o bakteriální, parazitární a virové infekce, artritidu, astma, osteoporózu, kardiovaskulární onemocnění, cukrovku nebo třeba o psychiatrická onemocnění. I když mnohdy není možné pacienty plně vyléčit, díky dostupným lékům je alespoň zajištěna vyšší kvalita jejich života (Eder a Herrling, 2016).

2.1.1 Historie vývoje

Základ moderních vědeckých experimentů položil již v roce 1267 Roger Bacon, který popsal neustále se opakující cyklus, který je složen z pozorování, následného vyslovení hypotézy, provedení experimentu a jeho nezávislého ověření (Trist, 2011). Jako počátek moderního vývoje léčiv se udává konec devatenáctého století, kdy působili Claude Bernard, Louise Pasteur, Robert Koch, Paul Ehrlich či Joseph Lister. Zároveň v tomto období začalo docházet k rychlému pokroku v oblasti organické chemie. V minulém století došlo k objevům mnoha léčiv, která významně ovlivnila lékařskou praxi. Většina z nich však byla založena na etnobotanických znalostech a mnohdy byla k objevům nutná velká dávka štěstí. Mezi léčiva, která byla během tohoto období objevena, řadíme například penicilin, aspirin nebo steroidní hormony, přičemž všechny z nich jsou do dnešní doby stále hojně využívány (Eder a Herrling, 2016).

2.1.2 Moderní vývoj léčiv

S příchodem moderních metod molekulární biologie a s novými poznatky o lidském genomu se vývoj léčiv do značné míry změnil. Díky těmto znalostem je produkováno stále větší množství látek, které by se mohly stát potenciálními léčivy. Avšak i když je testováno stále více látek, počet těch, které by uspěly a byly uvedeny na trh, je čím dál tím menší. Naopak ale za posledních několik desetiletí rostou náklady na vývoj, za každých deset let se náklady přibližně zdvojnásobí (Matthews *et al.*, 2016).

V minulosti byl vývoj léčiv založen na chemocentrickém přístupu, kdy vývoj nových léčiv probíhal bez znalosti cíle, vůči kterému léčiva působila, a bez znalosti mechanismu účinku potenciálních léčiv. V současné době je vývoj léčiv založen na přístupu, který klade důraz na cíl, vůči kterému je požadováno působení daného léčiva. Tato změna přístupu šla ruku v ruce s vývojem ve farmaceutickém průmyslu (zejména vývoj *in vitro* testů, vývoj vysokokapacitního screeningu- HTS, fragmentovaného screeningu- FBS, krystalografie; Eder a Herrling, 2016).

Při využití *in vitro* testů (zejména HTS) pro detekci nových potenciálně aktivních sloučenin jsou pomocí těchto testů typicky identifikovány stovky nebo tisíce „hitů“, které jsou vybrány pro další analýzu. V závislosti na složitosti použitého testu může mnoho sloučenin reagovat (inhibovat nebo interferovat) s jinými složkami testu a ne jenom s požadovaným proteinem. Tím dochází ke zvyšování počtu falešně pozitivních výsledků, což má za následek nutnost zvýšení kontroly kvality a přesnosti *in vitro* testů tak, aby byl minimalizován počet falešných výsledků a aby byla snížena chybovost HTS (Guido *et al.*, 2011).

2.1.3 Kroky vývoje nových léčiv

Současný vývoj nových léčiv je založen jak na empirickém přístupu, tak na deduktivním uvažování (Trist, 2011). Výroba nového léčivého přípravku trvá v průměru 12 let, z nichž téměř polovina je věnována *in vitro* studiím (Jaroch *et al.*, 2018). Jedná se o komplikovaný proces, který lze rozdělit na čtyři po sobě jdoucí kroky: objev nového potenciálního léčiva, preklinické testování, klinické testování a schválení regulačními orgány (Obr. 1).

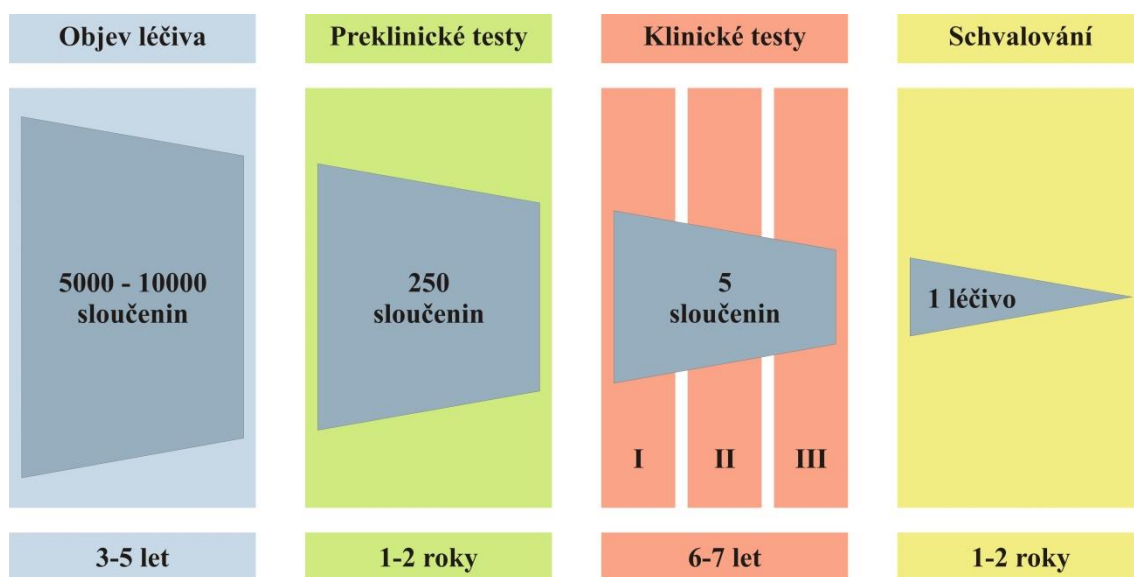
Na začátku vývoje nového léčiva je třeba vybrat cíl, na který by nový lék měl působit. Poté je stanovena metodika, pomocí které budou testovány reakce cíle s testovanými sloučeninami. Těmito testy jsou získány „hity“, ze kterých jsou vybráni potenciální kandidáti na nová léčiva. Celý proces probíhá do tohoto okamžiku pouze *in vitro*, přičemž tato první fáze trvá zhruba 3-5 let. Většina testovaných látek v první fázi však bohužel selhává.

Poté přechází vybraní kandidáti do druhé fáze (do preklinických testů), která trvá 1-2 roky. V této fázi jsou kromě *in vitro* testů zapojeny i testy *in vivo* (zejména testy na zvířecích modelech). Dochází k testování toxicity a některých dalších vlastností vybraných kandidátů (Matthews *et al.*, 2016). Mezi tyto vlastnosti patří ADME, což je zkratka popisující absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci látky. Zejména

se testuje schopnost kandidáta projít střevní stěnou, schopnost jeho pohybu mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty, metabolismus kandidáta a následně mechanismus jeho vylučování (Doogue a Polasek, 2013). Látky, které v této fázi uspějí, postupují do fáze klinického testování (Matthews *et al.*, 2016).

Klinické testy mají tři fáze- I, II a III. Ve fázi I jsou vybrané látky poprvé podány člověku („first time in human“- FTIH). Tato část klinického testování klade důraz zejména na bezpečnost podávaných látek. Jakmile jsou získány požadované údaje o bezpečnosti, kandidáti postupují do fáze II, kdy látku dostane určitá populace pacientů. V této fázi má být definitivně potvrzena bezpečnost a klade se důraz na prokázání účinnosti. Pokud jsou data získaná z fáze II uspokojivá, je umožněn postup kandidáta do fáze III. V této fázi je již látkou léčen významný počet pacientů a jejím cílem je potvrzení dříve získaných dat (Trist, 2011). Fáze klinického testování je nejdélsí a může trvat 6-7 let.

Pokud jsou data získaná v klinických testech uspokojivá, je podána žádost o schválení léčiva regulačními orgány. Proces schvalování trvá obvykle 1-2 roky a poté může být léčivo uvedeno na trh (Matthews *et al.*, 2016). Regulačními orgány, které schvalují uvedení léčiva na trh, jsou Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) nebo Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA). Ani po uvedení na trh však kontrola léčiva nepřestává, bezpečnost a účinnost léčiva je kontrolována průběžně po celou dobu, kdy se léčivo vyskytuje na trhu (Duelen *et al.*, 2019).



Obr. 1: Fáze vývoje léčiva (upraveno podle Matthews *et al.*, 2016).

Celým procesem vývoje léčiv projde jen malé množství látek. Udává se, že z 5000-10000 sloučenin v první fázi vývoje se do preklinických testů dostane přibližně 250 sloučenin. Z nich je do klinického testování vybráno zhruba 5 sloučenin a z těchto látek nakonec uspěje jen 1, která je uvedena na trh (Matthews *et al.*, 2016). Jedním z důvodů je, že regulační úřady vyžadují výrazně vyšší účinnost, než jaká je u látek, které jsou již na trhu (Trist, 2011). Jelikož většina látek selže již v první nebo druhé fázi vývoje, je jedním ze základů úspěchu mít dostatečné znalosti o biologické podstatě choroby, vůči které je hledáno léčivo. Díky tomu je poté možné určit vhodný cíl léčiva. Dalším podstatným předpokladem k úspěchu je dostupnost kvalitních preklinických testů, které musí být dostatečně citlivé a spolehlivé a které umožňují ověření bezpečnosti testovaných látek (Matthews *et al.*, 2016).

2.1.4 Formy testů ve vývoji léčiv

2.1.4.1 Testy využívající buněčné kultury

Po mnoho let jsou buněčné kultury jedním z nejdůležitějších zdrojů informací o nových kandidátech na léčiva. K testování vlivu látek na buněčné linie jsou obvykle používány klasické (2D) buněčné kultury. Využití buněčných kultur na *in vitro* testování působení sledovaných látek na konkrétní orgán je velmi vhodné, jelikož mohou být použity buněčné kultury odvozené přímo z daného orgánu. Nevýhodou těchto metod je jejich nedostatečná složitost, jelikož dostatečně neimitují prostředí v původní tkáni (Jaroch *et al.*, 2018). Na druhou stranu je však jejich používání snadné a pohodlné. Velkou výhodou je, že je lze snadno využít při miniaturizovaných testech a tudíž přizpůsobit do HTS podmínek. Z toho důvodu je jejich používání stále velmi rozšířené (Schneider, 2018).

I přesto je však snaha o neustálé zdokonalování buněčných modelů tak, aby se jejich vlastnosti co nejvíce přiblížily vlastnostem původní tkáně. Proto jsou kromě 2D kultur vytvářeny 3D kultury, které v současné době nejlépe napodobují interakce mezi buňkami (Duelen *et al.*, 2019). Při prováděných testech je ve 2D kulturách dostupnost testované sloučeniny pro každou buňku stejná. Oproti tomu u 3D kultur působí testovaná sloučenina pouze na okrajové vrstvy buněk. Kromě toho u 3D kultur dochází k expresi proteinů tak, jako se očekává u původních tkání. 3D kultury mají však také své nevýhody. Jelikož neumožňují proniknutí chromoforů a fluoroforů do vnitřních vrstev, dochází k tvorbě falešných výsledků. V neposlední řadě je nevýhodou i finanční

stránka. Náklady na zařízení a kultivaci takových kultur jsou totiž velmi vysoké (Jaroch *et al.*, 2018).

Ani využití 3D modelů však není ve všech situacích ideální. Společným problémem 2D i 3D kultur je, že jsou tvořeny pouze jednou linií buněk, což neodpovídá situaci v organismu (Jaroch *et al.*, 2018). Proto jsou vytvářeny „kokultury“. Jedná se o kultury, ve kterých je v jedné jamce během experimentu přítomno více typů buněk (více linií). To s sebou nese značné výhody. Hlavní výhodou takových kultur je, že se mohou snadno navzájem ovlivňovat. K ovlivnění může docházet buď přímým kontaktem, nebo nepřímo prostřednictvím mediátorů, které vylučují do média. Tím je ještě o něco lépe napodoben stav v původním organismu (Paschos *et al.*, 2015). Nevýhodou takových kultur je však nutnost vlastnit speciální zařízení pro kokultivaci, která jsou velmi drahá a techniky kultivace takových linií jsou komplikované. Proto použití kokultur není příliš vhodné pro podmínky HTS (Jaroch *et al.*, 2018).

2.1.4.2 Testy využívající laboratorní zvířata

Veškeré preklinické studie nových léčiv vyžadují testování na zvířecích modelech. Jsou posledním stupněm v sérii mnoha preklinických testů a přímo předchází klinickým studiím (Jaroch *et al.*, 2018). Využívání laboratorních zvířat však vyvolává spoustu otázek, zejména etických, jelikož některé testy mohou zvířatům způsobovat bolest a utrpení (Xia *et al.*, 2008). Z toho důvodu byla snaha o nastavení pravidel pro práci s laboratorními zvířaty. V roce 1959 Russell a Burch definovali pravidlo 3R, které se stalo základem současných etických principů pro humánní práci se zvířaty (Jaroch *et al.*, 2018). Toto pravidlo zahrnuje 3 body: „replace“ - nahradit, „reduce“ - snížit počet a „refine“ - zjemnit. „Replace“, tedy nahradit, znamená, že má být neustálá snaha nahradit testy na zvířatech *in vitro* metodami a to všude tam, kde je to možné. „Reduce“, tedy snížit, znamená, že má být snaha zmenšit počet testovaných zvířat pouze na nejnutnější množství. „Refine“, tedy zjemnit, znamená, že má být snaha co nejvíce eliminovat stres a bolest zvířete a to nejen během testů, ale během celé doby chování zvířete (Richmond, 2002). V roce 2005 bylo k pravidlu 3R přidáno ještě „rehabilitation“ a pravidlo je proto v současné době někdy uváděno jako 4R (Pereira a Tettamanti, 2005).

Testování na zvířecích modelech s sebou nese velkou spoustu výhod, které souvisí zejména s jejich podobností s člověkem. Další velkou výhodou je, že při aplikaci testovaných látek na zvířecí modely lze přímo sledovat distribuci léku v daném zvířeti

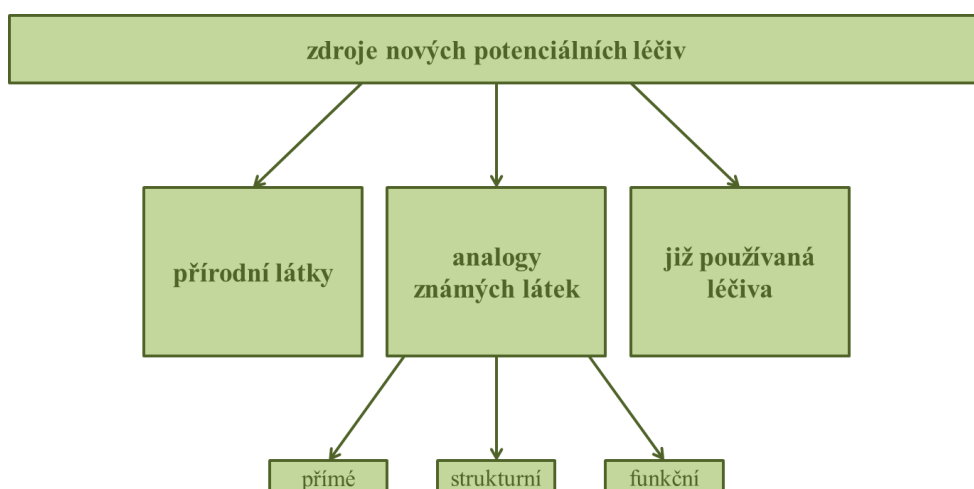
a následnou reakci léčiva na požadovaný cíl. Tím je možno potvrdit a kvantifikovat přímý účinek léku na organismus (Rudin a Weissleder, 2003).

2.1.4.3 Virtuální studie

Výpočetní technika se stále více začíná prosazovat ve všech odvětvích výzkumu. V posledních letech byla výkonná technika a získané nové poznatky transformovány do metod, které měly velký dopad na moderní vývoj léčiv. V současné době existují dva hlavní přístupy k virtuálním studiím. Prvním přístupem je strukturní virtuální screening (structure-based virtual screening- SBVS). Tento screening se opírá o znalost 3D struktur cílových proteinů. Na základě této znalosti je možné vybrat sloučeniny podle jejich komplementarity s vazebným místem. Druhým přístupem je virtuální screening založený na ligandu (ligand-based virtual screening- LBVS). Při tomto screeningu nejsou potřebné žádné informace o proteinu, ale k vyhledávání v databázi nových molekul se používají sloučeniny, o kterých je známo, že se váží na protein se stejnou biologickou aktivitou. Velmi výhodné je propojení virtuálního screeningu a HTS. Virtuální screening lze totiž použít na výběr předpokládaných vhodných kandidátů, čímž se sníží počet látek, které je třeba fyzicky otestovat pomocí HTS (Guido *et al.*, 2011).

2.1.5 Zdroje nových potenciálních léčiv

Dostatek dobrých zdrojů potenciálních látek je zásadní podmínkou pro vývoj nových léčiv. Zdroje léčiv je možné obecně rozdělit do tří hlavních skupin: přírodní látky, analogy známých látek anebo již známá a jinde používaná léčiva (Obr. 2).

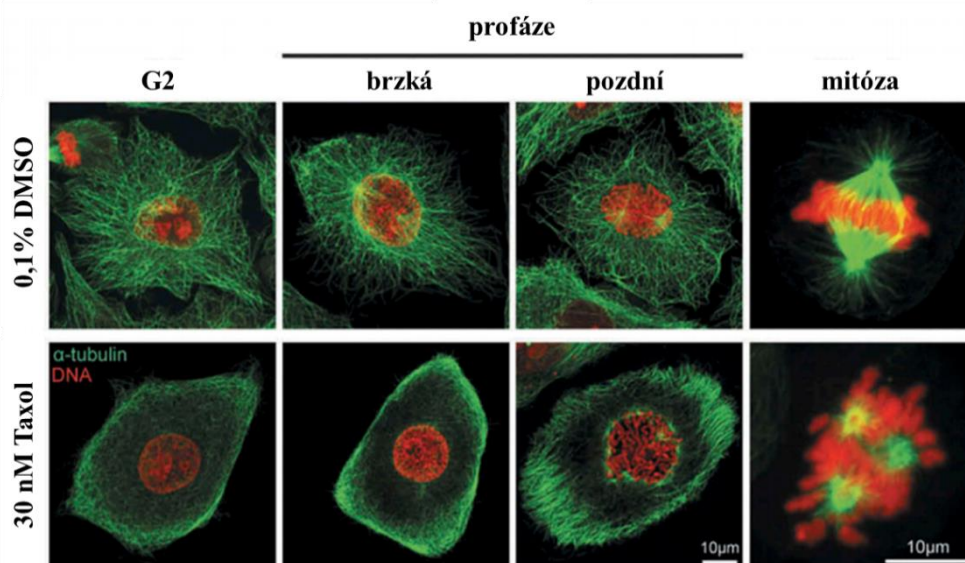


Obr. 2: Přehled zdrojů nových potenciálních léčiv.

2.1.5.1 Přírodní látky

Přírodní produkty jsou historicky hlavním zdrojem nových chemických látek. Po staletí byl vývoj léčiv na základě přírodních produktů oblastí velkého zájmu jak ze stran lékařských a vědeckých komunit, tak i ze strany farmaceutického průmyslu. Rozmanitost přírodních látek totiž poskytuje téměř neomezený zdroj nových kandidátů na léčiva (Amirkia a Heinrich, 2015). Společně se svými deriváty tvoří přírodní produkty v současnosti téměř 30 % dostupných nízkomolekulárních léčiv. Jedním z hlavních cílů při snaze objevit nová léčiva založená na přírodních produktech, je identifikace a výběr konkrétních sloučenin zodpovědných za požadovanou vlastnost. Obecně platí, že jakmile byl identifikován vzorek se slibnou biologickou aktivitou, provedou se další biologické testy, aby se izolovaly aktivní složky. Izolace aktivních složek je možné dosáhnout díky velkým pokrokům v extrakci, purifikaci a v analytických a spektroskopických technikách (Guido *et al.*, 2011).

Příkladem úspěšného vývoje léku z přírodních produktů je objev paclitaxelu (Taxol®). Jedná se o jedno z nejvýkonnějších a komerčně nejúspěšnějších protinádorových léčiv, jehož mechanismem působení je stabilizace mikrotubulů (Obr. 3). Používá se k léčbě rakoviny prsu, vaječníků a nemalobuněčných karcinomů plic (Kingston, 2007). Tento i další objevy naznačují, že využívání přírodních produktů k identifikaci kvalitních potenciálních aktivních látek bude i nadále důležitou součástí vývoje nových léčiv (Guido *et al.*, 2011).



Obr. 3: Vliv Taxolu na stabilizaci mikrotubulů (upraveno podle Leung a Cassimeris, 2019).

2.1.5.2 Analogy známých látek

Dalším zdrojem nových potenciálně aktivních látek je tvorba analogů z již známých sloučenin. Analogy jsou takové molekuly, které jsou strukturně nebo farmakologicky podobné s původní sloučeninou. Nově vytvořené analogy jsou rozděleny do tří skupin na základě typu analogie: přímé analogy (molekuly vykazující chemické a farmakologické podobnosti), strukturní analogy (molekuly vykazující strukturní podobnosti) a funkční analogy (chemicky odlišné molekuly vykazující podobné farmakologické vlastnosti).

Do první kategorie spadají látky, které jsou vylepšenými verzemi komerčně dostupných léčiv. Tyto typy analogů mají lepší farmakologické a farmakodynamické vlastnosti a do této skupiny spadají například inhibitory HMG-CoA reduktasy. Druhou kategorií jsou strukturní analogy. Do této kategorie jsou řazeny sloučeniny, které byly při vývoji navrženy jako strukturní analogy původního léku, ale které získaly novou biologickou aktivitu. Jako zástupce takových látek může být uveden například sildenafil. Poslední kategorie je popisována jako funkční analogy. Do této kategorie spadají molekuly, které sice nemají žádnou strukturní podobnost, ale u kterých byla pozorována podobná funkce (Wermuth, 2006). V současné době je navrhování analogů značně podpořeno *in silico* technikami, jelikož aplikace počítačové techniky značně usnadnila hledání analogů a souvislostí mezi strukturou a aktivitou látek (Guido *et al.*, 2011).

2.1.5.3 Využití již používaných léčiv

Jinou možností je využití látek, které jsou v současné době již používány v klinické praxi. Tyto látky vzhledem k jejich velkému množství představují bohatý zdroj nových potenciálních léčiv. Proces, při kterém jsou známé látky použity k jiným účelům, bývá nazýván jako „drug repurposing“. Při tomto procesu jsou aplikovány dva hlavní přístupy. Principem prvního přístupu je snaha o nalezení nového terapeutického cíle pro léčivo s určitým známým mechanismem účinku. Druhý přístup má za cíl naopak nalézt nové dosud nepopsané mechanismy účinku určitého léčiva. V současné době je již známo několik takových léčiv. Mezi léčiva, která jsou využívána i k jinému účelu, než byl původní záměr, patří například talidomid, metformin nebo fenretinid.

Výhodou tohoto procesu je nejen dostupnost takto využívaných látek, ale zejména fakt, že je ve většině případů známý mechanismus jejich účinku. Navíc u takových

sloučenin již dříve proběhly preklinické testy, které proto není nutné opakovat. Díky tomu je ušetřen nejen čas, ale i náklady investované do výzkumu. I přes velký potenciál má však využití tohoto přístupu své limitace, jelikož fáze II a III klinického testování zůstávají nezměněny a léčivo jimi musí při procesu vývoje projít (Konečný *et al.*, 2015).

2.2 Vysokokapacitní screening

Vysokokapacitní screening neboli HTS (High Throughput screening), je metoda založená na současném testování velkého počtu chemických látek za účelem identifikace potenciálních kandidátů na nová léčiva. Původně byl vyvinut farmaceutickým průmyslem, avšak v současné době se využívá i v akademické sféře (Xia *et al.*, 2008).

Před rokem 1985 byl veškerý screening prováděn manuálně, díky čemuž byla kapacita screeningových metod značně omezená a bylo možné otestovat jen řádově několik stovek vzorků týdně (Entzeroth *et al.*, 2009).

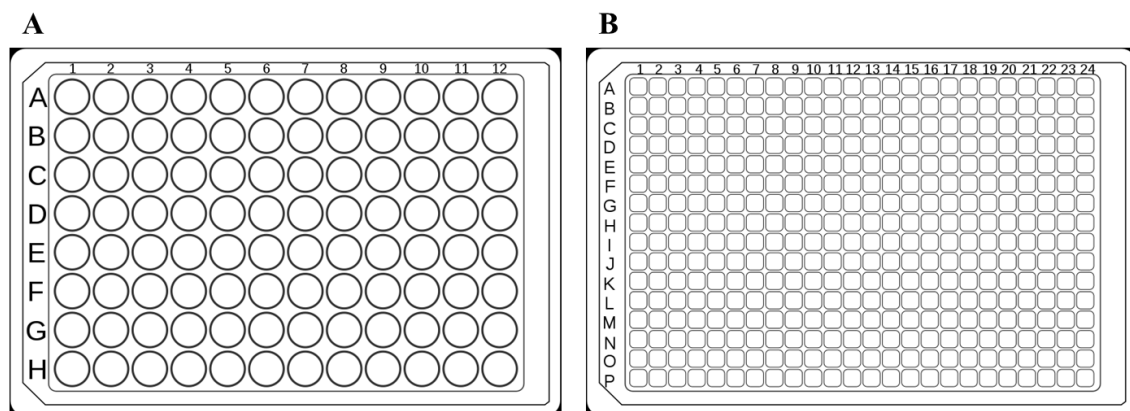
Díky pokrokům v molekulární biologii a genetice a zároveň díky narůstajícímu množství nově produkovaných chemických sloučenin byly na HTS systémy kladeny stále větší nároky (zvyšovala se poptávka) a tudíž bylo třeba vylepšit jejich vlastnosti. Z toho důvodu prošly HTS technologie v druhé polovině devadesátých let revolucí. Tato revoluce vedla k vývoji ultraHTS (uHTS) metod, čímž se značně zvýšil počet vzorků, které mohly být testovány za jeden den. Jestliže pomocí původních HTS metod bylo možno otestovat tisíce vzorků denně, po zavedení uHTS se tento počet zvýšil na 100 000 a více vzorků otestovaných za jeden den. Zvýšení kapacity však mělo za následek zvýšení poptávky po reagentech, které jsou potřebné k průběhu screeningu. I když byla okamžitou reakcí vyšší produkce těchto látek, nabídka nebyla dostatečná. HTS laboratoře proto byly donuceny upravit průběh testů, což vedlo k jejich miniaturizaci (Hertzberg a Pope, 2000).

2.2.1 Miniaturizace a automatizace

HTS testy se standardně provádějí v mikrotitračních destičkách (Obr. 4), které mají definovaný standardní formát (například přesně definovanou pozici a výšku jamek pro jednotlivé typy desek). Díky tomu je zajištěna kompatibilita desek s většinou HTS zařízení. V současné době jsou za minimální formát považovány 96-jamkové destičky. Jelikož je však neustálá snaha o zvyšování kapacity a o současné snižování nákladů testů, byly z 96-jamkového formátu odvozeny další. Nejpoužívanější z nich jsou destičky s 384 a 1536 jamkami, dostupné jsou však i desky obsahující 2288, 3456 a 9600 jamek (Entzeroth *et al.*, 2009).

Dalším důležitým aspektem miniaturizace testů je manipulace s testovanými látkami. Hlavním cílem byl vývoj zařízení schopných rychlého přenosu malých objemů látek, které by odpovídaly miniaturizovaným formátům. Miniaturizace s sebou však nese i několik problémů, zejména s ucpáváním, tvořením bublin plynu nebo s nadměrným odpařováním reakčních látek (Hertzberg a Pope, 2000).

Zároveň s miniaturizací testů byla rozvíjena i jejich automatizace, které bylo dosaženo zavedením robotických zařízení do HTS laboratoří. Díky tomu mohou být testy prováděny rychleji a snížil se i počet manipulačních kroků. Miniaturizace a automatizace kromě zvýšení kapacity a rychlosti testů také značně snížily náklady, jelikož není používáno tolik spotřebního materiálu. Uvádí se, že použitím miniaturizovaných formátů lze ušetřit až 97 % nákladů (Entzeroth *et al.*, 2009).



Obr. 4: Typy mikrotitračních desek. A- deska s 96 jamkami, B- deska s 384 jamkami. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Microplate>, navštíveno dne 15. 4. 2021)

2.2.2 Skladování vzorků

Vzorky jsou obvykle skladovány v suchém, inertním a chladném (-20°C - $+4^{\circ}\text{C}$) prostředí, aby se zabránilo degradaci a srážení uskladněných sloučenin. Jednou z forem skladování vzorků je skladování ve formě kapalin. Standardně jsou vzorky rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). Toto rozpouštědlo je vhodné hned z několika důvodů. Prvním z nich je, že se v něm rozpouští většina chemických sloučenin. Druhým důvodem je, že malé množství DMSO (0,1%- 1%) neovlivňuje průběh většiny testů. Navíc je ideálním rozpouštědlem i z hlediska přepravy vzorků, jelikož má teplotu tání až $18,5^{\circ}\text{C}$.

Jinou možností je skladování vzorků ve formě suchých filmů. Tato forma skladování chemických sloučenin má své výhody i nevýhody. Výhodou je, že je snížena citlivost vzorků k oxidaci. Naopak nevýhodou je, že ne všechny sloučeniny mohou být opětovně rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle (Entzeroth *et al.*, 2009).

2.2.3 Chemické knihovny

Chemické sloučeniny určené k HTS testům jsou obvykle seskupovány do chemických knihoven, které většinou obsahují několik set tisíc sloučenin (Entzeroth *et al.*, 2009). Některé knihovny mohou dosáhnout velikost 1-2 milionů látek (Eder a Herrling, 2016). V chemických knihovnách jednotlivých společností jsou dlouhá léta ukládány látky objevené (přírodní) nebo syntetizované danou společností, která knihovnu vlastní. V osmdesátých letech však došlo k rozvoji kombinatorické chemie, která umožnila rychlou syntézu velkého množství sloučenin. V té době začaly historicky tvořené knihovny ztrácet na důležitosti, protože se předpokládalo, že veškeré požadované látky mohou být rychle syntetizovány. To však bylo brzy vyvráceno, jelikož se ukázalo, že nově syntetizované kombinatorické knihovny jsou závislé spíše na chemických parametrech než na potenciální biologické aktivitě. Původní chemické knihovny se tak opět staly cenným zdrojem biologicky aktivních sloučenin (Eder a Herrling, 2016).

Aby byly knihovny považovány za kvalitní, musí být splněno několik podmínek. Hlavní podmínkou je, že knihovna musí mít dostatečnou diverzitu a látky v ní musí být dostatečně rozmanité, například strukturně různorodé. Pokud by knihovna obsahovala pouze látky s podobnou chemickou strukturou, šance identifikovat „hity“ v takové knihovně by byla značně nízká. Neméně důležité je, aby knihovna obsahovala látky v dostatečném množství a kvalitě. V počátcích HTS testů nebyly knihovny skladovány

za optimálních podmínek a u některých látek docházelo ke změnám a případně i k degradaci. Během HTS testu pak byly testovány jiné látky, než které byly ukládány do knihoven a tím docházelo ke špatné interpretaci výsledků. Naštěstí se toto již téměř neděje, jelikož jsou látky většinou skladovány ve vhodných podmínkách (Entzeroth *et al.*, 2009).

2.2.4 Typy HTS testů

Volba vhodného HTS testu je zásadním krokem celého procesu. Testy využívané v HTS by měly splňovat několik kritérií, zejména by měly být biologicky relevantní, citlivé, robustní a ekonomické. Obecně jsou HTS testy rozdělovány na dvě skupiny, na testy biochemické a na testy buněčné (Blay *et al.*, 2020). Přehled typů HTS testů je uveden v tabulce (Tab. 1).

2.2.4.1 Biochemické testy

Biochemické testy jsou založeny na použití purifikovaných cílových proteinů zájmu. Obvykle je při těchto testech měřena vazba ligandu na protein nebo inhibice aktivity proteinu *in vitro*. Mechanismus biochemických testů je zpravidla založen na kompetitivní inhibici, kdy musí testovaná látka vytěsnit jiný známý ligand nebo substrát cílového proteinu zájmu (Blay *et al.*, 2020). Mezi biochemické testy se řadí například radiometrické, fluorescenční a kolorimetrické testy.

Tab. 1: Přehled typů HTS testů.

biochemické testy	radiometrické testy	
	fluorescenční testy	
	kolorimetrické testy	
buněčné testy	testy životaschopnosti buněk	testy na bázi tetrazoliových solí
		testy založené na měření ATP
	testy založené na sekundárních poslech	
	testy založené na reportérových genech	
	mikroskopické testy	

2.2.4.1.1 Radiometrické metody

Původním hojně používaným typem metod v HTS jsou radiometrické metody. I když je snaha o omezování těchto metod kvůli známým potížím při jejich používání, v malé míře jsou stále využívány. Hlavními nevýhodami při aplikaci těchto metod je zejména jejich nebezpečnost a limitovaná stabilita reagensů (Hertzberg a Pope, 2000). Příkladem radiometrických metod je třeba scintilační proximní test (scintillation proximity assay- SPA; Cook, 1996). Tento test je vhodný pro použití v HTS podmínkách, jelikož může být adaptován na testy v 1536-jamkových destičkách (Hertzberg a Pope, 2000).

2.2.4.1.2 Fluorescenční metody

Fluorescenční metody z velké části nahradily radiometrické metody a staly se jednou z hlavních detekčních metod používaných v HTS. Tato metoda je pro HTS velmi vhodná, jelikož má obvykle velkou senzitivitu a je značně flexibilní (Blay *et al.*, 2020). Díky tomu je umožněna snadná miniaturizace a aplikace v uHTS testech, metoda byla aplikována na měření v 1536-jamkových destičkách (Haupts *et al.*, 2000). Jedinou velkou nevýhodou této metody je omezení na fluorogenní substráty a současně nedostatek nových fluorescenčních značek. Z toho důvodu je snaha alespoň upravit stávající fluorescenční značky tak, aby měly co nejlepší jas a fotostabilitu (Hertzberg a Pope, 2000). Příkladem používaných fluorescenčních metod jsou fluorescenční anizotropie (fluorescent anisotropy- FA) nebo časově odlišený přenos energie (time-resolved energy transfer- TRET; Haupts *et al.*, 2000).

2.2.4.1.3 Kolorimetrické testy

Dalším typem biochemických testů jsou kolorimetrické testy. Principem těchto testů je měření enzymatické aktivity, které probíhá na základě detekce změny barvy. Změna barvy se obvykle projeví v průběhu reakce a následně je detekována spektrofotometrem. Díky tomu lze provádět jak kvantitativní tak i kvalitativní měření (Yu *et al.*, 2011).

Enzymatická aktivita je obvykle měřena prostřednictvím určitého biochemického markeru, který je do měřené enzymatické reakce zapojen. Velmi často se jedná o NADH a NADPH, které v reakci následně slouží jako zdroje elektronů. Díky nim dochází k redukci specifických barviv, což má za následek požadovanou změnu barvy, která je detekována. Výhodou kolorimetrických testů je jejich snadná proveditelnost a finanční nenáročnost (Präbst *et al.*, 2017).

2.2.4.2 Buněčné testy

Dalším typem HTS testů jsou buněčné testy. Hlavním rysem buněčných testů je skutečnost, že je výsledek ovlivněn metabolismem buněk a ne jen konkrétními molekulami (Blay *et al.*, 2020). K buněčným testům jsou využívány buněčné kultury. Rozlišujeme dva typy buněčných kultur, primární a imortalizované. Primární buněčné kultury jsou kultury odebrané přímo z požadované tkáně. Tyto kultury se však v HTS testech často nepoužívají, jelikož nejsou dostatečně stabilní a životaschopné a proto nejsou vhodné pro dlouhodobé experimenty. Imortalizované kultury tyto limitace nemají a proto jsou obvykle používány pro HTS experimenty. I tyto linie však mají určité nevýhody, jelikož mohou časem získat jiné vlastnosti, než měla původní tkáň (Jaroch *et al.*, 2018). Jedním typem imortalizovaných linií jsou reportérové buněčné linie. Tyto linie obsahují reportérové geny, jako je luciferasa nebo β -galaktosidasa, které jsou funkčně spojené s dobře definovanými regulačními sekvencemi. Použití těchto linií v HTS testování je velmi výhodné, protože mohou poskytovat vysoce reprodukovatelné a snadno měřitelné výsledky. Navíc mohou být navrženy tak, aby kvantifikovaly indukci nebo potlačení na úrovni transkripce velmi specifických buněčných molekulárních cílů (Natsch a Emter, 2015).

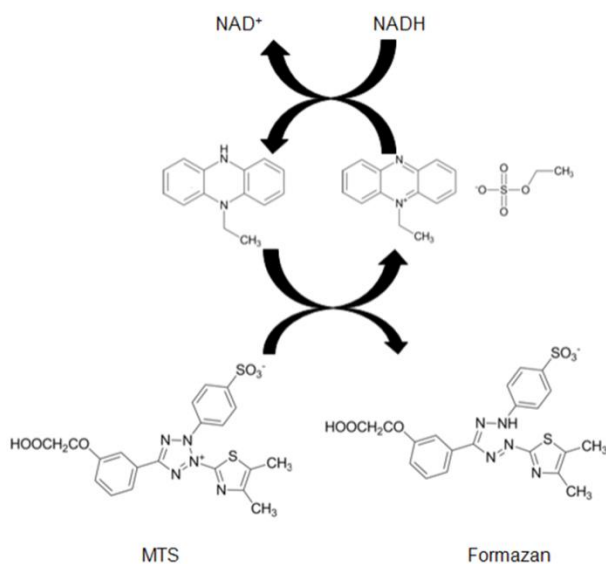
Buněčné linie jsou obvykle dostupné ve dvou formátech. Buď jsou ve formátu buněk naočkovaných na přilnavý plastový materiál, nebo jako buňky pěstované v suspenzi (Jaroch *et al.*, 2018). Při použití standardních kultivačních metod dochází v průběhu experimentu ke změnám v kultivačním médiu, zejména k vyčerpání živin a k nahromadění odpadních metabolických produktů. Díky tomu je snaha kultivovat buňky v bioreaktorech, kde lze pravidelnou kontinuální výměnou média snáze napodobovat podmínky *in vivo* (Ginai *et al.*, 2013).

Buněčné testy jsou využívány zejména v případech, kdy není známý molekulární cíl, požadovaný cíl není možno testovat biochemickými metodami anebo pozorovaný fenotyp existuje pouze u celistvých buněk. Do buněčných testů se řadí testy životaschopnosti buněk, testy založené na sekundárních poslech, testy založené na reportérových genech a mikroskopické testy (Blay *et al.*, 2020). Jelikož byly v praktické části této práce při testování cytotoxicity látek použity testy životaschopnosti buněk, budou tyto testy blíže popsány. Mezi testy životaschopnosti buněk řadíme dvě skupiny testů: testy na bázi tetrazoliových solí a testy založené na měření ATP.

2.2.4.2.1 Testy na bázi tetrazoliových solí

Tento typ testů je založen na redukci tetrazoliových solí. K redukci dochází pomocí mitochondriálních dehydrogenas, přičemž redukcí tetrazoliových solí vznikají formazany (Huang *et al.*, 2004). Detekce vzniklých formazanů probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm (Lai *et al.*, 2014).

Tato metoda je v současné době široce využívána, jelikož je velmi efektivní a finančně nenáročná. Původně bylo k těmto testům používáno MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid; Huang *et al.*, 2004). Redukované soli MTT však nejsou rozpustné ve vodě, a proto byly navrženy alternativní formy MTT, které tvoří ve vodě rozpustné formazany (Obr. 5; Goodwin *et al.*, 1995). Jednou z takových forem je MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium). Reakce probíhá na stejném principu, jako je popsán výše - životoschopné buňky přeměňují tetrazoliovou sůl na barevný rozpustný formazanový produkt, přičemž množství vytvořeného formazanového produktu je přímo úměrné počtu živých buněk v jamce (Fard *et al.*, 2015). Na rozdíl od MTT požaduje MTS k proběhnutí reakce ještě přidání PMS (phenazin methosulfát), který slouží jako akceptor elektronů. Tím dochází k urychlení bioredukce a k rychlejší produkci formazanů (Goodwin *et al.*, 1995).

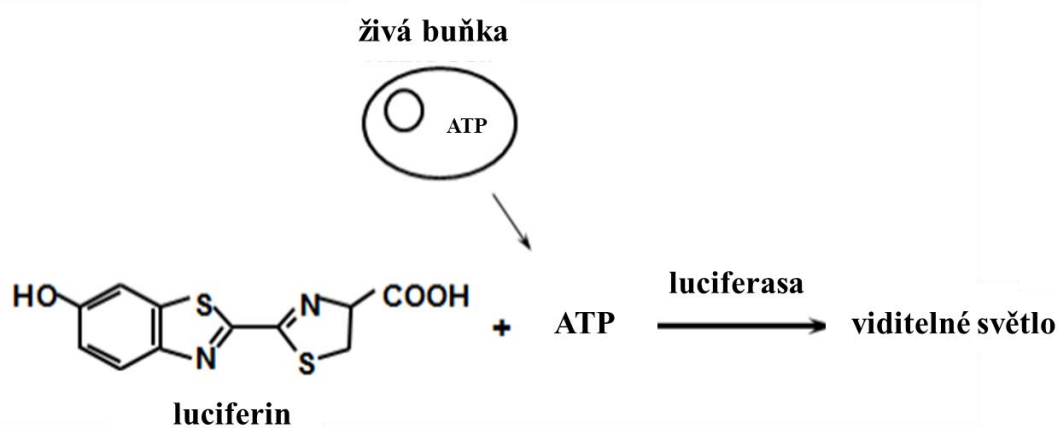


Obr. 5: Redukce MTS za vzniku formazanového produktu (Riss *et al.*, 2016).

2.2.4.2 Testy založené na měření ATP

Jiným typem testů životaschopnosti buněk jsou testy založené na měření ATP. Jedná se o nejrychlejší a nejčastěji využívanou metodu při měření životaschopnosti buněk v podmínkách HTS (Riss *et al.*, 2016). Principem metody je, že dochází k detekci ATP luciferin-luciferasovou reakcí (Obr. 6). Při této reakci jsou luciferin a ATP přeměněni na oxoluciferin a viditelné světlo. Viditelné světlo je poté detekováno, přičemž intenzita světla odpovídá množství ATP, které bylo vytvořeno přeživšími buňkami (Paciello *et al.*, 2013). Při poškození buněk dochází ke ztrátě integrity membrány, což má za následek ztrátu schopnosti buněk syntetizovat ATP. ATP, které zůstalo v cytoplasmě, je navíc rychle spotřebováno endogenními ATPasami. Díky tomu dochází k poklesu detekovaného signálu (Riss *et al.*, 2016).

ATP luminiscenční testy mají spoustu výhod. Jednou z nich je jejich vysoká citlivost. Pomocí tohoto typu testů je možno detekovat méně než 10 buněk v jedné jamce (Blay *et al.*, 2020). Další výhodou je, že je v současné době k jejich provedení potřebné pouze jediné činidlo a výsledný luminiscenční signál lze detekovat po dobu až několika hodin. Detekční činidlo obsahuje detergent pro lýzu buněk, inhibitory ATPasy pro stabilizaci uvolněného ATP, luciferin jako substrát a stabilní formu luciferázy, která katalyzuje reakci a díky které je možná bezproblémová aplikace testu do podmínek HTS. Výhodou oproti testům na bázi tetrazoliových solí je navíc skutečnost, že není nutné se spoléhat na inkubaci substrátu s živými buňkami za účelem vzniku barevného produktu (Riss *et al.*, 2016).



Obr. 6: Luciferin-luciferasová reakce. Luciferin a ATP reagují v přítomnosti luciferasy za vzniku viditelného světla (upraveno podle Riss *et al.*, 2016).

2.3 Cytotoxicita

Termín cytotoxicita se používá k popisu kumulativního účinku sloučeniny za dané časové období na počet buněk, ať už má za následek apoptózu, nekrózu nebo snížení rychlosti buněčné proliferace (Xia *et al.*, 2008). Testování cytotoxicity pomocí HTS metod je zásadní pro zvýšení pravděpodobnosti úspěchu v detekci nových potenciálních léčiv, jelikož je tím možno identifikovat sloučeniny s malou nebo žádnou cytotoxicitou, které byly původně identifikovány jako „hity“ (Lee *et al.*, 2020).

Testování cytotoxicity se používá k předpovědi nežádoucích účinků testovaných látek na člověka (Xia *et al.*, 2008). Původně k tomu byla využívána výhradně laboratorní zvířata, zejména hlodavci (Jaroch *et al.*, 2018). Vychází se u nich z předpokladu, že na zvířata budou mít testované látky stejný vliv, jako by měly na člověka. Je prováděna škála toxikologických testů, které jsou zaměřeny zejména na orální, dermální, reprodukční a vývojovou toxicitu a imunotoxicitu (Xia *et al.*, 2008).

Testování toxicity na zvířecích modelech však s sebou nese i spoustu nevýhod. Hlavní nevýhodou je, že odlišné druhy mohou reagovat na testovanou látku odlišně (Duelen *et al.*, 2019). Zatímco konzervativní geny kódují metabolické dráhy, proteiny a buněčné transportéry u všech savců stejně, v reakci na xenobiotika se vyskytují mezidruhové rozdíly (Jaroch *et al.*, 2018). Dalším problémem je vysoká cena takových testů a jejich časová náročnost (Duelen *et al.*, 2019).

Vzhledem k výše uvedeným nevýhodám testování na laboratorních zvířatech byl kladen důraz na využití alternativních metod. Jako nejvhodnější z nich se jeví využití buněčných kultur. K testování cytotoxicity na buněčných kulturách se využívá kvantitativní HTS (qHTS). Jelikož se při původním HTS testuje obvykle jen jedna koncentrace testované látky (obvykle 10 μ M nebo vyšší), vyskytuje se při vyhodnocení velké množství falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků. Naproti tomu u qHTS jsou jednotlivé testované látky testovány ve více koncentracích a je sledována rozdílná reakce na danou látku při její zvyšující se koncentraci. Tím je umožněno přesnější hodnocení biologické aktivity testované látky. (Xia *et al.*, 2008).

In vitro testování je založeno obvykle na měření buněčné smrti nebo inhibice buněčné proliferace. Pokud však není znám mechanismus působení testované látky na buňky, je velmi obtížné převést získané poznatky do *in vivo* podmínek. Proto je kladen stále větší důraz na výzkum související s mechanismy působení a nikoli pouze na stanovení stupně inhibice (Jaroch *et al.*, 2018).

Jako měřítko účinnosti inhibice buněk způsobené testovanou látkou je nejčastěji považována hodnota poloviční maximální inhibiční koncentrace IC50. Je to hodnota, která určuje koncentraci testované látky potřebnou k 50% inhibici biologického cíle *in vitro*. Hodnota IC50 je obvykle zjišťována experimentálně z „dose-response“ křivky (křivky závislosti procenta inhibice na dávce; Bag a Ghorai, 2016).

2.3.1 Metody detekce při testování cytotoxicity

Volba vhodné metody pro vyhodnocení testu na cytotoxicitu je nejdůležitějším bodem celého procesu. Historicky se ke zhodnocení vlivu testovaných látek využívalo přímé měření počtu buněk. Jelikož však měření cytotoxicity probíhá obvykle v miniaturizovaných formátech na mikrotitračních deskách, přímé měření počtu buněk se ukázalo jako velmi nevýhodné a zdlouhavé. Z toho důvodu začaly být k detekci cytotoxicity testovaných sloučenin využívány metody nepřímé (Chan *et al.*, 2013). Tyto metody jsou založené na různých funkcích buněk, jako je například permeabilita buněčné membrány, aktivita určitého enzymu, produkce ATP nebo produkce koenzymů (Aslantürk, 2017). Nepřímé metody tedy neurčují absolutní množství přeživších buněk, ale vychází se u nich z předpokladu, že mezi počtem buněk a signálem, který je při použití dané metody detekován, existuje lineární vztah (Chan *et al.*, 2013).

2.3.1.1 Ověření kvality testu

Pro ověření kvality provedeného testu slouží Z' -faktor. K výpočtu Z' -faktoru jsou využita pouze kontrolní data, není tedy nijak ovlivněn testovanými látkami. Z' -faktor je vypočítán dle následujícího vzorce:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|},$$

kde σ_{c+} je standardní odchylka pozitivních kontrol, σ_{c-} je standardní odchylka negativních kontrol, μ_{c+} je průměr signálu pozitivních kontrol a μ_{c-} je průměr signálu negativních kontrol. V případě HTS je potřebné, aby hodnota Z' -faktoru byla alespoň 0,5. Jestliže je vypočítaná hodnota Z' -faktoru menší, znamená to, že u použitého testu pravděpodobně nedošlo k optimalizaci a že tento test není pro dané využití vhodný (Zhang *et al.*, 1999).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. 1 Materiál

3.1.1 Přístrojové a laboratorní vybavení

Analytické váhy (Scaltech)

Centrifuga 5810R (Eppendorf)

CO₂ inkubátor (Thermo Fisher Scientific)

Echo 550 (LabCyte)

EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)

FlowBox HeraSafe (Thermo Fisher Scientific)

Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific)

pH metr Ultra Basic (P-LAB)

Vortex IKA Genius 3 (P-LAB)

Výrobce (stát): Eppendorf (Německo), LabCyte (USA), Perkin Elmer (USA), P-LAB (Česká republika), Scaltech (USA), Thermo Fisher Scientific (USA)

3.1.2 Použité chemikálie

5-fluoruracil (Sigma-Aldrich)

Aktinomycin D (APExBIO)

CellTiter-Glo® 2.0 Reagent (Promega)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Lach-Ner)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)

Doxorubicin hydrochloridum (Teva Pharmaceuticals)

Ethanol 99% (Dr. Kulich Pharma)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (LachNer)

Chlorid draselný (KCl) (Sigma-Aldrich)

Chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich)

Mitomycin C (APExBIO)

MTS reakční pudr (Promega)

Phenazin methosulfát (PMS) (Sigma-Aldrich)

Semi-synthetic paclitaxel (Sigma-Aldrich)

Výrobce (stát): APExBIO (USA), Dr. Kulich Pharma (Česká republika), Lach-Ner (Česká republika), Merck&Co. Inc. (USA), NORDIC Pharma (Česká republika), Promega (USA), Sigma-Aldrich (USA), Teva Pharmaceuticals (Česká republika)

3.1.3 Použité roztoky

70% Ethanol: 707 ml 99% ethanol, 293 ml destilovaná voda

10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 , rozmícháno v 800 ml destilované vody, pH upraveno na 6,8

1x PBS: 100 ml 10x PBS, 900 ml destilovaná voda, pH upraveno na 7,4

roztok PMS: 0,1 g PMS rozpuštěno ve 20 ml 1x PBS, roztok byl rozpipetován po 1 ml do mikroskopavek, uchováno zamraženo

roztok MTS: 2g MTS reakčního pudru rozpuštěny v 1 litru 1x PBS, pH upraveno na 6-6,5, roztok rozdávkován po 100 ml, uchováno zamraženo

3.1.4 Použité buněčné linie a jejich charakteristika

A549 (ATCC,USA)- nádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: adenokarcinom plic, kultivační médium: DMEM

BJ (ATCC, USA) - nenádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: fibroblasty, kultivační médium: EMEM

CCRF-CEM (ATCC,USA) - nádorová buněčná linie, suspenzní, původ linie: akutní lymfoblastická leukémie, kultivační médium: RPMI-1640 médium

CEM-DNR (Laboratoř tkáňových kultur, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR) - nádorová buněčná linie, suspenzní, původ linie: akutní lymfoblastická leukémie, kultivační médium: RPMI-1640 médium

HCT116 (Horizon, UK) - nádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: kolorektální karcinom, kultivační médium: McCoy médium

HCT116 p53 -/- (Horizon, UK) - nádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: kolorektální karcinom, kultivační médium: McCoy médium

HEK293 (ATCC) – nenádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: embryonální buňky ledvin, kultivační médium: EMEM

K562 (ATCC,USA) - nádorová buněčná linie, suspenzní, původ linie: erytromyeloblastická leukémie, kultivační médium: Iscové médium

K562-TAX (Laboratoř tkáňových kultur, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR) - nádorová buněčná linie, suspenzní, původ linie: erytromyeloblastická leukémie, kultivační médium: Iscové médium

MRC-5 (ATCC,USA) - nenádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: fibroblasty, kultivační médium: EMEM

U2OS (Dr. Martin Mistrík, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR) - nádorová buněčná linie, adherentní, původ linie: osteosarkom, kultivační médium: McCoy médium

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení cytotoxicity na úrovni HTS pomocí kolorimetrického MTS testu

3.2.1.1 Příprava testovaných látek

Sloučeniny určené k testování byly uloženy ve šroubovacích vialkách ve formě 10 mM roztoku v DMSO a byly skladovány při -20°C. Před samotným testováním byly sloučeniny rozmrazeny a rozpipetovány na 384-jamkovou zdrojovou desku. V případě primárního screeningu, při kterém byly testovány látky pouze v jedné koncentraci, byly všechny testované látky napipetovány do 384-LVD zdrojové destičky. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno vždy 12 μ l dané látky, koncentrace látek byla 10 mM. V případě sekundárního screeningu byly do 384-PP zdrojové destičky pipetovány pouze aktivní látky. Ty byly na desce ve třech koncentracích: 10 mM, 1 mM a 0,1 mM. Rozložení jednotlivých koncentrací na desce je ukázáno na obrázku 7.

	1	2	3	4
A	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM
B	0,1 mM		0,1 mM	
C	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM
D	0,1 mM		0,1 mM	

Obr. 7: Rozložení jednotlivých koncentrací testovaných sloučenin pro sekundární screening na zdrojové desce. Každá sloučenina byla na desce ve třech koncentracích: 10 mM, 1 mM a 0,1 mM.

3.2.1.2 Primární screening

Prvním krokem při primárním screeningu byla příprava desek s buňkami. Při tomto testu byly použity 384-jamkové desky. Na desky bylo do prvního a posledního sloupce napipetováno RPMI médium (30 μ l), které sloužilo jako slepý vzorek. Do ostatních sloupců (2-23) byla napipetována připravená buněčná suspenze (buňky v RPMI médiu), do každé jamky 30 μ l. Koncentrace jednotlivých linií jsou uvedeny v tabulce 2. Mezi pipetováním jednotlivých linií musela být pipetovací kazeta vždy propláchnuta etanolem a čistým médiem, aby se zamezilo promíchání jednotlivých buněčných linií. Takto připravené desky byly uloženy do inkubátoru s 37°C a 5 % CO₂.

Další den byly k buňkám přidány testované sloučeniny. Pomocí bezkontaktního pipetovacího přístroje Echo 550 (řízeného softwarem Echo Plate Reformat) byly do určených jamek napipetovány kontroly. Jako pozitivní kontroly byly použity mitomycin C (10 mM) a aktinomycin D (0,1 mM), jako negativní kontrola bylo použito DMSO (0,5 % DMSO). Samotné testované látky byly pipetovány za pomoci softwaru Echo CherryPick. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 150 nl testovaných sloučenin o původní koncentraci 10 mM, takže finální koncentrace v jednotlivých jamkách byla 50 μ M. Každá sloučenina byla pipetována v triplicátech, na jedné desce tedy bylo možné testovat 98 látek. Rozložení látek na desce je znázorněno na obrázku 8. Po ukončení pipetování byly desky uloženy do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂).

Tab. 2: Koncentrace buněk v pipetované suspenzi.

buněčná linie	počet buněk na jamku (30 μl)	počet buněk v 1 ml
CCRF-CEM	1,2 x 10 ³	4 x 10 ⁴
CEM-DNR	5 x 10 ²	1,6 x 10 ⁴
K562	8 x 10 ²	2,7 x 10 ⁴
K562-TAX	5 x 10 ²	1,6 x 10 ⁴
A549	5 x 10 ²	1,6 x 10 ⁴
HCT116	8 x 10 ²	2,7 x 10 ⁴
HCT116 p53-/-	8 x 10 ²	2,7 x 10 ⁴
U2OS	8 x 10 ²	2,7 x 10 ⁴
BJ	2,1 x 10 ³	7 x 10 ⁴
MRC5	2,1 x 10 ³	7 x 10 ⁴

	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.15.1	S.15.2	S.15.3	S.29.1	S.29.2	S.29.3	S.43.1	S.43.2	S.43.3	S.57.1	S.57.2	S.57.3	S.71.1	S.71.2	S.71.3	S.85.1	S.85.2	S.85.3	B 3.2.B3
C	B 1.3.B1	H 1.2.H1	S.2.1	S.2.2	S.2.3	S.16.1	S.16.2	S.16.3	S.30.1	S.30.2	S.30.3	S.44.1	S.44.2	S.44.3	S.58.1	S.58.2	S.58.3	S.72.1	S.72.2	S.72.3	S.86.1	S.86.2	S.86.3	B 3.3.B3
D	B 1.4.B1	H 1.3.H1	S.3.1	S.3.2	S.3.3	S.17.1	S.17.2	S.17.3	S.31.1	S.31.2	S.31.3	S.45.1	S.45.2	S.45.3	S.59.1	S.59.2	S.59.3	S.73.1	S.73.2	S.73.3	S.87.1	S.87.2	S.87.3	B 3.4.B3
E	B 1.5.B1	H 1.4.H1	S.4.1	S.4.2	S.4.3	S.18.1	S.18.2	S.18.3	S.32.1	S.32.2	S.32.3	S.46.1	S.46.2	S.46.3	S.60.1	S.60.2	S.60.3	S.74.1	S.74.2	S.74.3	S.88.1	S.88.2	S.88.3	B 3.5.B3
F	B 1.6.B1	H 1.5.H1	S.5.1	S.5.2	S.5.3	S.19.1	S.19.2	S.19.3	S.33.1	S.33.2	S.33.3	S.47.1	S.47.2	S.47.3	S.61.1	S.61.2	S.61.3	S.75.1	S.75.2	S.75.3	S.89.1	S.89.2	S.89.3	B 3.6.B3
G	B 1.7.B1	H 1.6.H1	S.6.1	S.6.2	S.6.3	S.20.1	S.20.2	S.20.3	S.34.1	S.34.2	S.34.3	S.48.1	S.48.2	S.48.3	S.62.1	S.62.2	S.62.3	S.76.1	S.76.2	S.76.3	S.90.1	S.90.2	S.90.3	B 3.7.B3
H	B 1.8.B1	H 1.7.H1	S.7.1	S.7.2	S.7.3	S.21.1	S.21.2	S.21.3	S.35.1	S.35.2	S.35.3	S.49.1	S.49.2	S.49.3	S.63.1	S.63.2	S.63.3	S.77.1	S.77.2	S.77.3	S.91.1	S.91.2	S.91.3	B 3.8.B3
I	L 8.1.L8	L 9.1.L9	S.8.1	S.8.2	S.8.3	S.22.1	S.22.2	S.22.3	S.36.1	S.36.2	S.36.3	S.50.1	S.50.2	S.50.3	S.64.1	S.64.2	S.64.3	S.78.1	S.78.2	S.78.3	S.92.1	S.92.2	S.92.3	B 3.9.B3
J	L 8.2.L8	L 9.2.L9	S.9.1	S.9.2	S.9.3	S.23.1	S.23.2	S.23.3	S.37.1	S.37.2	S.37.3	S.51.1	S.51.2	S.51.3	S.65.1	S.65.2	S.65.3	S.79.1	S.79.2	S.79.3	S.93.1	S.93.2	S.93.3	B 3.10.B3
K	L 8.3.L8	L 9.3.L9	S.10.1	S.10.2	S.10.3	S.24.1	S.24.2	S.24.3	S.38.1	S.38.2	S.38.3	S.52.1	S.52.2	S.52.3	S.66.1	S.66.2	S.66.3	S.80.1	S.80.2	S.80.3	S.94.1	S.94.2	S.94.3	B 3.11.B3
L	L 8.4.L8	L 9.4.L9	S.11.1	S.11.2	S.11.3	S.25.1	S.25.2	S.25.3	S.39.1	S.39.2	S.39.3	S.53.1	S.53.2	S.53.3	S.67.1	S.67.2	S.67.3	S.81.1	S.81.2	S.81.3	S.95.1	S.95.2	S.95.3	B 3.12.B3
M	L 8.5.L8	L 9.5.L9	S.12.1	S.12.2	S.12.3	S.26.1	S.26.2	S.26.3	S.40.1	S.40.2	S.40.3	S.54.1	S.54.2	S.54.3	S.68.1	S.68.2	S.68.3	S.82.1	S.82.2	S.82.3	S.96.1	S.96.2	S.96.3	B 3.13.B3
N	L 8.6.L8	L 9.6.L9	S.13.1	S.13.2	S.13.3	S.27.1	S.27.2	S.27.3	S.41.1	S.41.2	S.41.3	S.55.1	S.55.2	S.55.3	S.69.1	S.69.2	S.69.3	S.83.1	S.83.2	S.83.3	S.97.1	S.97.2	S.97.3	B 3.14.B3
O	L 8.7.L8	L 9.7.L9	S.14.1	S.14.2	S.14.3	S.28.1	S.28.2	S.28.3	S.42.1	S.42.2	S.42.3	S.56.1	S.56.2	S.56.3	S.70.1	S.70.2	S.70.3	S.84.1	S.84.2	S.84.3	S.98.1	S.98.2	S.98.3	B 3.15.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

Obr. 8: Rozložení testovaných sloučenin na desce. B- slepý vzorek, C- buňky bez ošetření, H- negativní kontrola, L- pozitivní kontrola, S- testované sloučeniny.

Po 72-hodinové inkubaci buněk s testovanými látkami byly desky vytaženy z inkubátoru a do každé jamky byly pomocí přístroje MultiDrop Combi napipetovány 4 µl roztoku MTS+PMS. Poté byly desky opět vloženy do inkubátoru k inkubaci (37°C, 5 % CO₂). Zhruba za hodinu byly desky vytaženy a pomocí přístroje EnVision Multimode Plate Reader byla změřena v jednotlivých jamkách absorbance vzorků při vlnové délce 490 nm. Naměřená data byla přenesena do softwaru Dotmatics, který pomocí PI analýzy stanovil pro každou látku hodnotu PI (procento inhibice). Všechny látky byly testované ve třech technických a ve dvou biologických opakováních.

PI, neboli procento inhibice, je údaj udávající procento buněk, které jsou při dané koncentraci již neživotoschopné (inhibované). PI byl vypočítán následovně:

$$PI = 100 - \frac{x_i - \bar{c}_{MIN}}{|\bar{c}_{MAX} - \bar{c}_{MIN}|} * 100,$$

přičemž x_i je naměřená hodnota pro danou testovanou sloučeninu, c_{MIN} je minimální signál a c_{MAX} je maximální signál. Na základě hodnot PI byly všechny testované sloučeniny rozřazeny do dvou skupin- na aktivní a neaktivní. Jako prahová hodnota bylo určeno 50 %. Sloučeniny, jejichž PI bylo větší než 50 %, byly tedy označeny za aktivní a sloučeniny, jejichž PI bylo menší než 50 %, byly označeny za neaktivní.

3.2.1.3 Sekundární screening

Sekundární screening byl proveden na 384-jamkových deskách. První den byly do desek do sloupců 2-23 napipetovány jednotlivé buněčné linie (koncentrace linií jsou uvedeny v tabulce 2), do prvního a posledního sloupce bylo jako slepý vzorek napipetováno čisté médium. Pipetování probíhalo pomocí přístroje MultiDrop Combi, který do každé jamky nanesl 30 μ l buněčné suspenze (buňky v RPMI médiu). Takto připravené desky byly uloženy do inkubátoru, ve kterém byla teplota 37°C a 5 % koncentrace CO₂.

Následující den byly buňky ošetřeny testovanými sloučeninami. Pomocí bezkontaktního pipetovacího přístroje Echo 550 (software Echo Plate Reformat) byly do určených jamek napipetovány pozitivní kontroly (10 μ M mitomycin C a 0,1 μ M aktinomycin D) a negativní kontrola (0,5% DMSO). Testované sloučeniny byly uloženy ve 384-PP zdrojové desce ve 3 koncentracích (10 mM, 1 mM a 0,1 mM). Přenos testovaných sloučenin do jamek s buňkami byl zprostředkován zařízením Echo 550 (Dose-Response software). Každá sloučenina byla pipetována v duplikátech v sedmi různých koncentracích, dle tabulky 3. Na jedné destičce tedy bylo možné otestovat celkem 21 látek, jejichž celkové rozložení je zobrazeno na obrázku 9. Stejný postup byl opakován pro všechny desky. Takto ošetřené desky byly opětovně uloženy do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂).

	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	C	L	L	L	L	L	L	L	H	H	H	H	H	H	H	C	C	C	C	C	C	C	B
	1.1.B1	1.1.C1	3.1.L3	4.1.L4	5.1.L5	6.1.L6	7.1.L7	8.1.L8	9.1.L9	2.1.H2	3.1.H3	4.1.H4	5.1.H5	6.1.H6	7.1.H7	8.1.H8	3.1.C3	4.1.C4	5.1.C5	6.1.C6	7.1.C7	8.1.C8	9.1.C9	3.1.B3
B	B	H	S.1.1	S.1.2	S.1.3	S.1.4	S.1.5	S.1.6	S.1.7	S.15.1	S.15.2	S.15.3	S.15.4	S.15.5	S.15.6	S.15.7	S.29.1	S.29.2	S.29.3	S.29.4	S.29.5	S.29.6	S.29.7	B
	1.2.B1	1.1.H1																						3.2.B3
C	B	H	S.2.1	S.2.2	S.2.3	S.2.4	S.2.5	S.2.6	S.2.7	S.16.1	S.16.2	S.16.3	S.16.4	S.16.5	S.16.6	S.16.7	S.30.1	S.30.2	S.30.3	S.30.4	S.30.5	S.30.6	S.30.7	B
	1.3.B1	1.2.H1																						3.3.B3
D	B	H	S.3.1	S.3.2	S.3.3	S.3.4	S.3.5	S.3.6	S.3.7	S.17.1	S.17.2	S.17.3	S.17.4	S.17.5	S.17.6	S.17.7	S.31.1	S.31.2	S.31.3	S.31.4	S.31.5	S.31.6	S.31.7	B
	1.4.B1	1.3.H1																						3.4.B3
E	B	H	S.4.1	S.4.2	S.4.3	S.4.4	S.4.5	S.4.6	S.4.7	S.18.1	S.18.2	S.18.3	S.18.4	S.18.5	S.18.6	S.18.7	S.32.1	S.32.2	S.32.3	S.32.4	S.32.5	S.32.6	S.32.7	B
	1.5.B1	1.4.H1																						3.5.B3
F	B	H	S.5.1	S.5.2	S.5.3	S.5.4	S.5.5	S.5.6	S.5.7	S.19.1	S.19.2	S.19.3	S.19.4	S.19.5	S.19.6	S.19.7	S.33.1	S.33.2	S.33.3	S.33.4	S.33.5	S.33.6	S.33.7	B
	1.6.B1	1.5.H1																						3.6.B3
G	B	H	S.6.1	S.6.2	S.6.3	S.6.4	S.6.5	S.6.6	S.6.7	S.20.1	S.20.2	S.20.3	S.20.4	S.20.5	S.20.6	S.20.7	S.34.1	S.34.2	S.34.3	S.34.4	S.34.5	S.34.6	S.34.7	B
	1.7.B1	1.6.H1																						3.7.B3
H	B	H	S.7.1	S.7.2	S.7.3	S.7.4	S.7.5	S.7.6	S.7.7	S.21.1	S.21.2	S.21.3	S.21.4	S.21.5	S.21.6	S.21.7	S.35.1	S.35.2	S.35.3	S.35.4	S.35.5	S.35.6	S.35.7	B
	1.8.B1	1.7.H1																						3.8.B3
I	L	L	S.8.1	S.8.2	S.8.3	S.8.4	S.8.5	S.8.6	S.8.7	S.22.1	S.22.2	S.22.3	S.22.4	S.22.5	S.22.6	S.22.7	S.36.1	S.36.2	S.36.3	S.36.4	S.36.5	S.36.6	S.36.7	B
	1.1.L1	2.1.L2																						3.9.B3
J	L	L	S.9.1	S.9.2	S.9.3	S.9.4	S.9.5	S.9.6	S.9.7	S.23.1	S.23.2	S.23.3	S.23.4	S.23.5	S.23.6	S.23.7	S.37.1	S.37.2	S.37.3	S.37.4	S.37.5	S.37.6	S.37.7	B
	1.2.L1	2.2.L2																						3.10.B3
K	L	L	S.10.1	S.10.2	S.10.3	S.10.4	S.10.5	S.10.6	S.10.7	S.24.1	S.24.2	S.24.3	S.24.4	S.24.5	S.24.6	S.24.7	S.38.1	S.38.2	S.38.3	S.38.4	S.38.5	S.38.6	S.38.7	B
	1.3.L1	2.3.L2																						3.11.B3
L	L	L	S.11.1	S.11.2	S.11.3	S.11.4	S.11.5	S.11.6	S.11.7	S.25.1	S.25.2	S.25.3	S.25.4	S.25.5	S.25.6	S.25.7	S.39.1	S.39.2	S.39.3	S.39.4	S.39.5	S.39.6	S.39.7	B
	1.4.L1	2.4.L2																						3.12.B3
M	L	L	S.12.1	S.12.2	S.12.3	S.12.4	S.12.5	S.12.6	S.12.7	S.26.1	S.26.2	S.26.3	S.26.4	S.26.5	S.26.6	S.26.7	S.40.1	S.40.2	S.40.3	S.40.4	S.40.5	S.40.6	S.40.7	B
	1.5.L1	2.5.L2																						3.13.B3
N	L	L	S.13.1	S.13.2	S.13.3	S.13.4	S.13.5	S.13.6	S.13.7	S.27.1	S.27.2	S.27.3	S.27.4	S.27.5	S.27.6	S.27.7	S.41.1	S.41.2	S.41.3	S.41.4	S.41.5	S.41.6	S.41.7	B
	1.6.L1	2.6.L2																						3.14.B3
O	L	L	S.14.1	S.14.2	S.14.3	S.14.4	S.14.5	S.14.6	S.14.7	S.28.1	S.28.2	S.28.3	S.28.4	S.28.5	S.28.6	S.28.7	S.42.1	S.42.2	S.42.3	S.42.4	S.42.5	S.42.6	S.42.7	B
	1.7.L1	2.7.L2																						3.15.B3
P	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B
	2.1.B2	2.1.C2	10.1.C10	11.1.C11	12.1.C12	13.1.C13	14.1.C14	15.1.C15	16.1.C16	17.1.C17	18.1.C18	19.1.C19	20.1.C20	21.1.C21	22.1.C22	23.1.C23	24.1.C24	25.1.C25	26.1.C26	27.1.C27	28.1.C28	29.1.C29	30.1.C30	3.16.B3

Obr. 9: Rozložení testovaných sloučenin na desce. B-slepý vzorek, C- buňky bez ošetření, H- negativní kontrola, L- pozitivní kontrola, S- testované sloučeniny.

Tab. 3: Pipetované objemy testovaných sloučenin a jejich koncentrace.

	koncentrace zásobního roztoku (mM)	pipetovaný objem (nl)	finální koncentrace v jamce (μM)
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

Po 72-hodinové inkubaci buněk s testovanými látkami byl k buňkám do jednotlivých jamek přidán roztok MTS+PMS. Celý postup byl shodný s postupem u primárního screeningu. Všechny látky byly testované ve dvou technických a ve třech biologických opakováních. Naměřená data byla přenesena do softwaru Dotmatics, kde byla pro jednotlivé testované látky pomocí IC50 analýzy stanovena křivka závislosti procenta inhibice na koncentraci látky a byla vypočítána hodnota IC50. Hodnoty IC50 byly exportovány do MS Excel, kde byly následně zpracovány.

3.2.2 Zavedení luminiscenčního ATP testu do podmínek HTS

3.2.2.1 Měření závislosti intenzity signálu na počtu buněk v jamce

První den byly na bílou 384-jamkovou desku vysazeny pomocí přístroje MultiDrop Combi buňky linie HEK293 a to tak, že ve třech sloupcích bylo do každé jamky nasazeno 500 buněk ve 25 μl suspenze, v dalších třech sloupcích 800 buněk ve 25 μl suspenze a v dalších třech sloupcích 1 000 buněk ve 25 μl suspenze. Deska byla následně uložena do inkubátoru s 37°C a 5 % CO₂.

Po 48-hodinové inkubaci byla deska vytažena z inkubátoru a ponechána 30 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byl k buňkám pomocí přístroje MultiDrop přidán CellTiter-GLO 2.0 Reagent, 20 μl do každé jamky. Deska byla dána na míchačku a její obsah byl 2 minuty míchán, čímž byla indukována lýze buněk. Poté bylo míchání zastaveno a deska byla 10 minut inkubována při pokojové teplotě, což vedlo ke stabilizaci luminiscenčního signálu. Pomocí přístroje EnVision Multimode

Plate Reader byla změřena luminiscence a data byla uložena v programu MS Excel. Naměřená data byla následně dále zpracována.

3.2.2.2 Validace ATP testu pro HTS podmínky

První den bylo nejprve na 384-jamkovou desku OptiPlate naneseno pomocí přístroje MultiDrop Combi do prvního a posledního sloupce kultivační médium, které sloužilo jako slepý vzorek (25 µl média do každé jamky). Do ostatních sloupců (2-23) bylo naneseno do každé jamky 25 µl buněčné suspenze HEK293, přičemž koncentrace byla 1000 buněk na jednu jamku. Takto připravené desky byly uloženy do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂).

Další den byly na buňky pomocí přístroje Echo Labcyte 550 aplikovány pozitivní (10 µM mitomycin C, 0,1 µM aktinomycin D, 10 µM doxorubicin) a negativní kontroly (0,1% DMSO), vždy o objemu 25 nl. Rozložení kontrol na desce je zobrazeno na obrázku 10. Poté byly desky opět uloženy do inkubátoru s 37°C a 5 % CO₂.

Po 72-hodinové inkubaci byly desky vytaženy a ponechány 30 minut na pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byl k deskám pomocí přístroje MultiDrop Combi přidán Glo Reagent, 20 µl do každé jamky. Poté byla deska jednu minutu míchána. Po ukončení míchání byla deska nechána inkubovat 10 minut při pokojové teplotě. Intenzita luminiscence byla následně měřena pomocí přístroje EnVision Plate Reader.

	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		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO										B	
B	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
C	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
D	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
E	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
F	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
G	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
H	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
I	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
J	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
K	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
L	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
M	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
N	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
O	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B
P	B		NC			PC	Mit.C			PC	Act.D			PC	DOXO											B

Obr. 10: Rozložení pozitivních a negativních kontrol na desce. B- slepý vzorek, NC- negativní kontrola (0,1% DMSO), PC- pozitivní kontrola (Mit.C- mitomycin C, Act.D- aktinomycin D, Doxo- doxorubicin).

3.2.2.3 Porovnání testování cytotoxicity pomocí luminiscenčního ATP testu a pomocí kolorimetrického MTS testu

První den byly připraveny 384-jamkové desky dvou typů- OptiPlate a SpectraPlate. Deska OptiPlate byla využita ke stanovení cytotoxicity pomocí luminiscenčního měření ATP a deska SpectraPlate byla využita ke stanovení cytotoxicity pomocí MTS. Na desky bylo do každé jamky napipetováno 1000 buněk (ve 25 μ l suspenze). Poté byly desky uloženy do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂).

Následující den byla k buňkám pomocí bezkontaktního pipetovacího přístroje Echo 550 přidána cytostatika, každé v duplikátech v osmi koncentracích. Aktinomycin D byl aplikován v koncentracích 500 nM, 125 nM, 31,25 nM, 7,81 nM, 1,95 nM, 0,49 nM, 0,12 nM a 0,03 nM. Ostatní cytostatika byla aplikována v koncentracích 50 μ M, 12,5 μ M, 3,125 μ M, 0,781 μ M, 0,195 μ M, 0,049 μ M, 0,012 μ M a 0,003 μ M. Rozložení cytostatik na desce je zobrazeno na obrázku 11. Takto ošetřené desky byly opět uloženy do inkubátoru (37°C, 5 % CO₂).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMSO										
B		DMSO										
C		DMSO	500 nM	125 nM	31,25 nM	7,81 nM	1,95 nM	0,49 nM	0,12 nM	0,03 nM		
D		DMSO	500 nM	125 nM	31,25 nM	7,81 nM	1,95 nM	0,49 nM	0,12 nM	0,03 nM		
E		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
F		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
G		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
H		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
I		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
J		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
K		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
L		DMSO	50 μ M	12,5 μ M	3,125 μ M	0,781 μ M	0,195 μ M	0,049 μ M	0,012 μ M	0,003 μ M		
M		DMSO										
N		DMSO										
O		DMSO										
P		DMSO										

Obr. 11: Rozložení cytostatik na desce. Oranžová- aktinomycin D, modrá- mitomycin C, zelená- paclitaxel, žlutá- doxorubicin, červená- 5-fluoruracil.

Po 72-hodinové inkubaci buněk s cytostatiky byla provedena detekce. Deska Optiplate byla nejprve vytažena z inkubátoru a nechána 30 minut na pokojové teplotě. Poté k ní byl přidán CellTiter-GLO 2.0 Reagent, 20 μ l do každé jamky. Deska byla jednu minutu míchána na přístroji MultiDrop Combi a následně byla opět nechána na pokojové teplotě, tentokrát po dobu 10 minut. Nakonec byla pomocí přístroje EnVision Multimode Plate Reader změřena luminiscence a naměřená data byla zpracována v programu Dotmatics.

K buňkám na desce SpectraPlate byly přidány 4 μ l roztoku MTS+PMS a dále následoval postup jako v kapitole 3.2.1.2. Naměřená data byla zpracována softwarem Dotmatics. Pomocí IC50 analýzy byly vypočítány hodnoty IC50 pro jednotlivá cytostatika a tyto hodnoty byly exportovány do MS Excel. Získaná data z obou typů testů byla porovnána mezi sebou.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení cytotoxicity na úrovni HTS pomocí kolorimetrického MTS testu

4.1.1 Primární screening

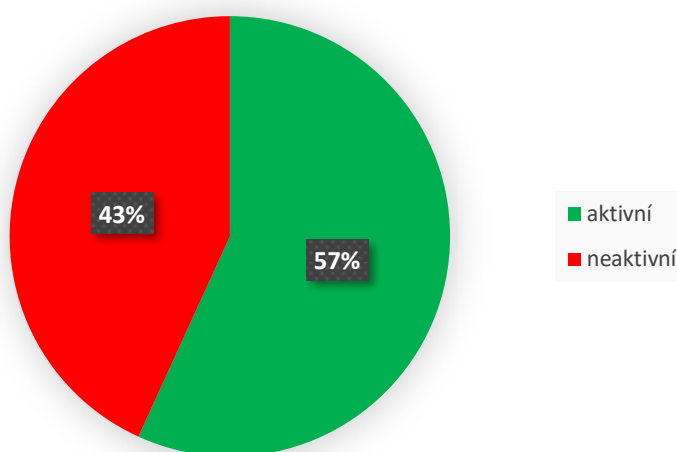
plate	well	sample id	PI	pass	conc	inc	✓	✗
1 (Plate 1)	B3	LEM00023545	36.949	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	B4	LEM00023545	24.108	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	B5	LEM00023545	19.568	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C3	LEM00023546	34.484	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	C4	LEM00023546	20.087	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C5	LEM00023546	17.622	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D3	LEM00023547	37.597	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	D4	LEM00023547	22.81	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D5	LEM00023547	18.141	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E3	LEM00023548	38.116	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	E4	LEM00023548	25.145	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E5	LEM00023548	16.584	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F3	LEM00023549	43.175	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	F4	LEM00023549	29.166	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F5	LEM00023549	23.2	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G3	LEM00023550	78.326	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	G4	LEM00023550	75.343	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G5	LEM00023550	76.38	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H3	LEM00023551	37.597	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	H4	LEM00023551	26.313	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H5	LEM00023551	17.752	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I3	LEM00023552	35.133	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	I4	LEM00023552	28.128	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I5	LEM00023552	17.622	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J3	LEM00023553	39.154	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	J4	LEM00023553	25.275	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J5	LEM00023553	21.124	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	K3	LEM00023554	58.091	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	K4	LEM00023554	51.606	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	K5	LEM00023554	53.681	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	L3	LEM00023555	70.154	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	L4	LEM00023555	65.355	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	L5	LEM00023555	62.112	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	M3	LEM00023556	47.325	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	M4	LEM00023556	44.731	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	M5	LEM00023556	40.062	●	50.0uM	+		

Obr. 12: Ukázka zobrazení výsledků získaných primárním screeningem. Zelená tečka- aktivní sloučeniny, červená tečka- neaktivní sloučeniny.

Na obrázku 12 je příklad výsledků, které byly získány při primárním screeningu. Během tohoto měření bylo testováno 88 sloučenin (každá o koncentraci 50 μ M), kterými byly ovlivněné testované buněčné linie. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny v programu Dotmatics a pro jednotlivé látky jsme získali hodnoty PI. Na obrázku je vidět, že pro každou sloučeninu byly získány 3 hodnoty PI a to proto, že každá sloučenina byla na jedné desce testována ve třech technických opakováních.

Na základě výsledných hodnot PI, které byly průměrem šesti hodnot získaných při třech technických opakováních a dvou biologických opakováních, byly všechny testované sloučeniny rozřazeny na aktivní a neaktivní. Sloučeniny, jejichž PI bylo větší než 50 %, byly označeny za aktivní. Těmto sloučeninám je na obrázku 12 přiřazena zelená tečka. Sloučeniny, jejichž PI bylo menší než 50 %, byly označeny za neaktivní a na obrázku 12 jim je přiřazena červená tečka. Na základě tohoto kritéria bylo rozřazeno všech 88 testovaných sloučenin. Jako je ukázáno na obrázku 13, do skupiny neaktivních látek bylo zařazeno 38 sloučenin (43 % ze všech testovaných sloučenin) a do skupiny aktivních látek bylo zařazeno 50 sloučenin (57 %).

Následně bylo provedeno další třídění. Testované sloučeniny byly na základě získaných hodnot PI opět rozřazeny na aktivní a neaktivní, avšak třídění nebylo provedeno celkově pro všechny testované buněčné linie (jako v předchozím případě), ale pro jednotlivé linie samostatně.

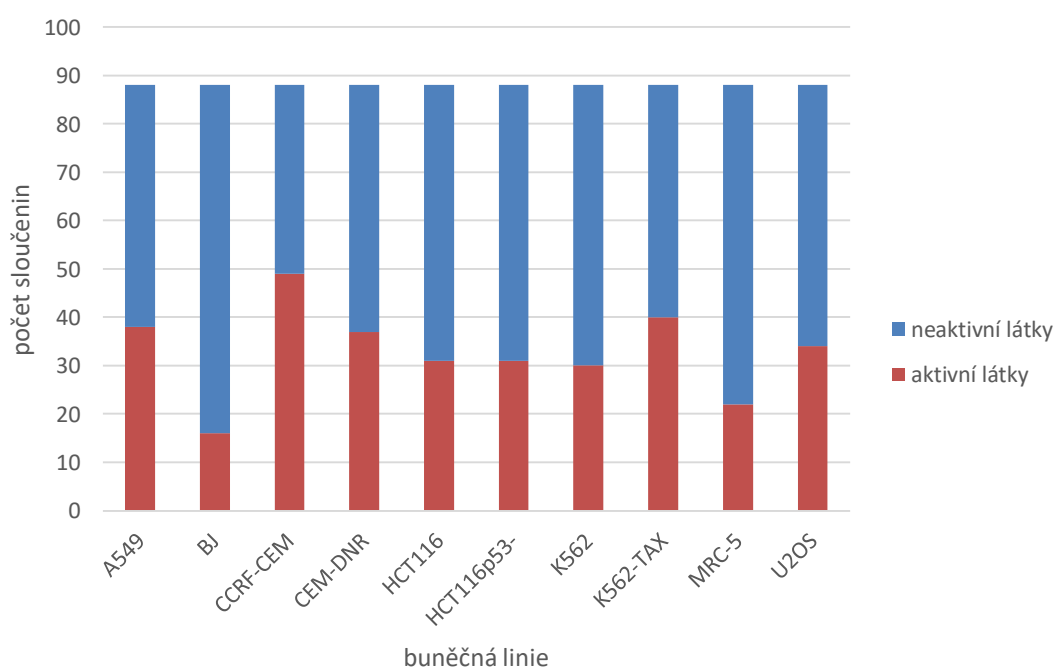


Obr. 13: Graf zobrazující procentuální zastoupení aktivních a neaktivních látek v 88 testovaných sloučeninách. Zpracováno v programu MS Excel.

Tab. 4: Rozdělení aktivních a neaktivních látek pro jednotlivé testované buněčné linie.

	A549	BJ	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HCT116p53-	K562	K562-TAX	MRC-5	U2OS
neaktivní látky	50	72	39	51	57	57	58	48	66	54
aktivní látky	38	16	49	37	31	31	30	40	22	34

Získané počty aktivních a neaktivních látek pro jednotlivé buněčné linie jsou uvedeny v tabulce 4. Pro lepší přehlednost byla data převedena do grafického zobrazení a jsou ukázána na obrázku 14. Z výsledků vyplývá, že nejvíce aktivních látek bylo identifikováno u buněčných linií CCRF-CEM a K562-TAX, naopak nejméně aktivních látek bylo identifikováno u buněčných linií MRC-5 a BJ.



Obr. 14: Grafické zobrazení aktivních a neaktivních látek pro jednotlivé buněčné linie. Modrá- neaktivní látky, červená- aktivní látky. Zpracováno v programu MS Excel.

Tab. 5: Hodnoty Z'-faktoru pro jednotlivé desky při primárním screeningu.

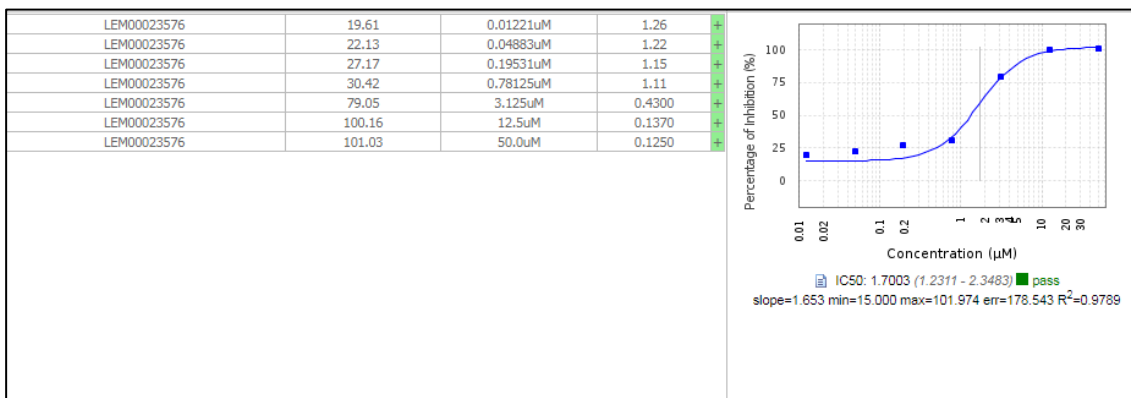
buněčná linie	první opakování	druhé opakování
A549	0,77	0,86
BJ	0,68	0,66
CCRF-CEM	0,70	0,69
CEM-DNR	0,59	0,62
HCT116	0,78	0,75
HCT116P53-/-	0,57	0,66
K562	0,71	0,75
K562-TAX	0,54	0,57
MRC5	0,64	0,61
U2OS	0,86	0,90

Pro každou desku byl vypočítán Z'-faktor, který slouží k ověření kvality provedeného testu. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5. Pro testy prováděné v podmínkách HTS je požadováno, aby byla hodnota Z'-faktoru větší než 0,5. Všechny získané hodnoty tento požadavek splňují.

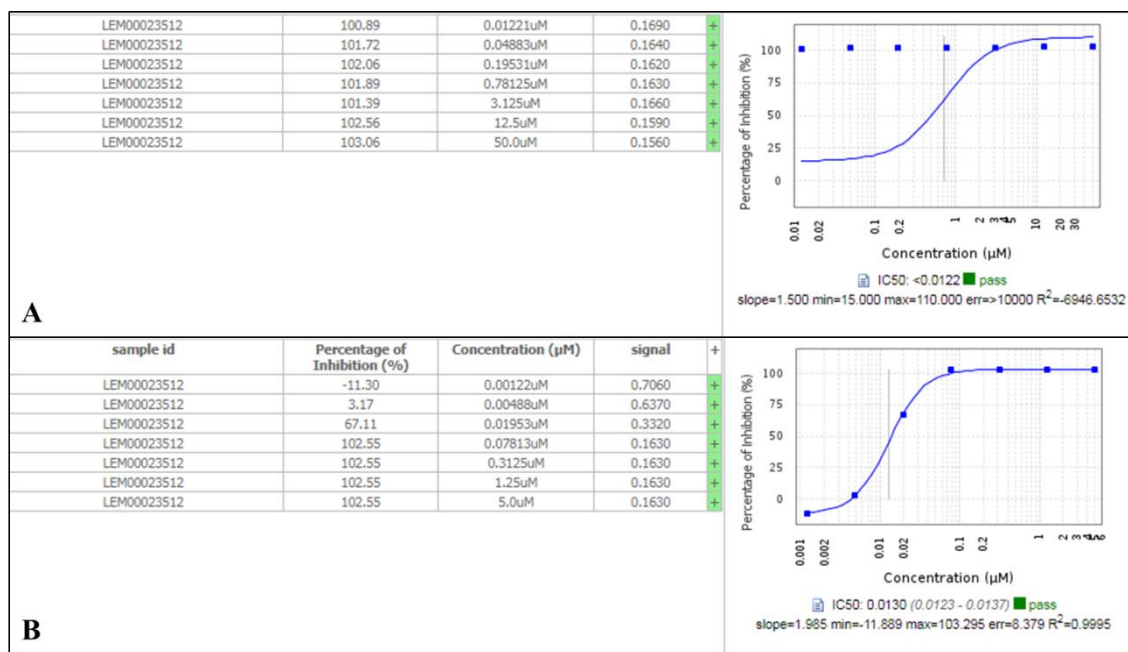
4.1.2 Sekundární screening

Následně byl u 50 sloučenin, které byly identifikovány jako aktivní, proveden sekundární screening. V tomto případě již nebyly testovány sloučeniny jen v jedné koncentraci, ale testovaných koncentrací bylo sedm pro každou testovanou látku a každou buněčnou linii. Měřením byla získána pro každou látku a každou buněčnou linii hodnota IC50. IC50 je hodnota, která určuje koncentraci testované látky potřebnou k 50 % inhibici biologického cíle *in vitro*.

Ukázka výsledku měření je na obrázku 15. V levé části obrázku je v prvním sloupci uvedeno ID testované sloučeniny, ve druhém sloupci je uvedeno procento inhibice u konkrétní koncentrace, ve třetím sloupci je testovaná koncentrace a v posledním sloupci je intenzita měřeného signálu (absorbance). V pravé části obrázku je graf závislosti procenta inhibice na koncentraci testované látky. Pod grafem je uvedena hodnota IC50, která je zároveň vyznačena i svislou čarou v grafu. Výsledná hodnota IC50 (vypočítaná jako průměr minimálně šesti hodnot) byla získána pro všechny buněčné linie a všechny testované sloučeniny. V případě látky LEM00023512 však nebylo možné v rozsahu testovaných koncentrací hodnotu IC50 získat. Proto byla tato látka znovu testována v nižším rozsahu koncentrací (nejvyšší koncentrace byla 5 μM). Výsledky jsou ukázány na obrázku 16.



Obr. 15: Ukázka dat získaných při sekundárním screeningu. Levá část: první sloupec- ID testované látky, druhý sloupec- procento inhibice konkrétní koncentrace, třetí sloupec- testovaná koncentrace, čtvrtý sloupec- absorbance. Pravá část: graf závislosti procenta inhibice na koncentraci testované látky.

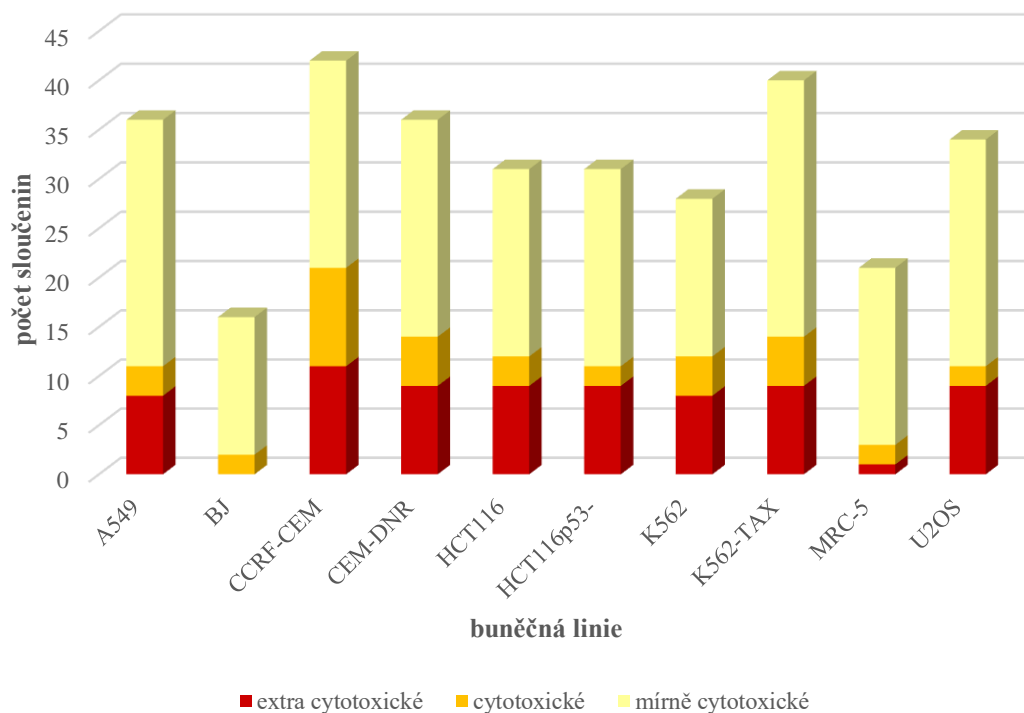


Obr. 16: Výsledky sekundárního screeningu pro látku LEM00023521. Levá část: první sloupec- ID testované látky, druhý sloupec- procento inhibice konkrétní koncentrace, třetí sloupec- testovaná koncentrace, čtvrtý sloupec- absorbance. Pravá část: graf závislosti procenta inhibice na koncentraci testované látky. A- výsledek při vyšším rozsahu koncentrací, B- výsledek při nižším rozsahu koncentrací.

Sloučeniny byly pro každou buněčnou linii na základě získaných hodnot IC50 rozděleny do třech skupin: na látky mírně cytotoxické, cytotoxické a extra cytotoxické. Za mírně cytotoxické látky jsou považovány ty, jejichž hodnota IC50 je v rozmezí 50 μ M- 10 μ M. Do látek cytotoxických řadíme ty látky, jejichž IC50 je v rozmezí 10 μ M-1 μ M. Jako extra cytotoxické poté považujeme látky, jejichž hodnota IC50 je menší než 1 μ M. Počty testovaných sloučenin, které spadají do jednotlivých skupin pro jednotlivé buněčné linie, jsou uvedeny v tabulce 6, respektive po grafickém převedení na obrázku 17. Pro některé buněčné linie nejsou údaje kompletní a to z důvodu nutnosti opakování měření.

Tab. 6: Rozdělení aktivních látek na mírně cytotoxické (IC50 v rozmezí 50 μ M – 10 μ M), cytotoxické (IC50 v rozmezí 10 μ M- 1 μ M) a extra cytotoxické (IC50 menší než 1 μ M) pro jednotlivé buněčné linie.

	mírně cytotoxické	cytotoxické	extra cytotoxické
A549	25	3	8
BJ	14	2	0
CCRF-CEM	21	10	11
CEM-DNR	22	5	9
HCT116	19	3	9
HCT116p53-	20	2	9
K562	16	4	8
K562-TAX	26	5	9
MRC-5	18	2	1
U2OS	23	2	9



Obr. 17: Grafické zobrazení rozdělení látek pro jednotlivé buněčné linie na základě velikosti jejich IC50. Červená- extra cytotoxické (IC50 menší než 1 μM), oranžová- cytotoxické (IC50 v rozmezí 10 μM- 1 μM), žlutá- mírně cytotoxické (IC50 v rozmezí 50 μM – 10 μM). Zpracováno v programu MS Excel.

Následně byl ze získaných hodnot IC50 vypočítán pro jednotlivé testované sloučeniny terapeutický index (TI). Terapeutický index je hodnota, která nám říká, nakolik je daná sloučenina selektivní vůči nádorovým buněčným liniím. Jeho výpočet se provádí na základě hodnot IC50 testované látky pro jednotlivé buněčné linie takto:

$$TI = \frac{\text{aritmetický průměr hodnot IC50 nenádorových linií}}{\text{aritmetický průměr hodnot IC50 nádorových linií}}$$

Čím vyšší tedy hodnota TI je, tím daná látka selektivněji působí na nádorové linie. Jako zástupci nenádorových linií byly použity linie BJ a MRC-5, jako nádorové jsou počítány všechny ostatní testované linie (A569, CCRF-CEM, CEM-DNR, HCT116, HCT116p53-, K562, K562-TAX, U2OS).

Tab. 7: Sloučeniny s nejvyšším TI. Červeně jsou zvýrazněny sloučeniny, které se jeví jako zajímavé (jejich TI je vyšší než 30).

	BJ	MRC-5	A549	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HCT116 p53-	K562	K562-TAX	U2OS	TI
LEM-00023512	50		0,034	0,018	0,029	0,017	0,021	0,013	0,03	0,018	2222,22
LEM-00023510	50	49,75	0,26	0,13	0,13	0,13	0,19		0,13	0,23	290,94
LEM-00023511	50	0,21	0,15	0,086	0,086	0,08	0,1	0,042	0,082	0,087	281,68
LEM-00023517	50	50	0,44	0,19	0,26	0,15	0,19	0,11	0,14	0,2	238,10
LEM-00023286	50	50	0,69	0,057	0,45	0,59	0,63	0,036	0,055	0,09	153,96
LEM-00023509	47,05	44,52	0,76	0,22	0,34	0,32	0,62	0,15	0,27	0,33	121,69
LEM-00023515	50	13,49	0,7	0,29	0,36	0,45	0,66	0,15	0,36	0,34	76,73
LEM-00023516	26,17	12,37	0,74	0,19	0,27	0,24	0,47	0,11	0,25	0,28	60,45
LEM-00023507	46,47	24,63	1,49	0,65	0,86	0,61	0,71	0,44	0,72	0,78	45,43
LEM-00023508	50	48,01	21,77	8,41	13,92	15,12	12,85	5,55	13,13	16,05	3,67
LEM-00023566	50	50	10,98	5,23	14,91	13,39	19,18	25,43	12,21	19,77	3,30
LEM-00023563	50	50	12,62	6,78	13,19	15,82	19,93	27,61	10,33	22,79	3,10

V tabulce 7 jsou uvedeny testované sloučeniny, které mají nejvyšší TI. Sloučeniny jsou seřazeny postupně od těch s nejvyšším TI, po ty s nejnižším. Za zajímavé jsou považovány ty sloučeniny, jejichž TI je vyšší než 30. Z tabulky vyplývá, že takových sloučenin bylo identifikováno 9 (označeny červeným rámečkem). Některá data v tabulce stejně jako v předchozích případech chybí, opět je to důsledek nutnosti opakování experimentu.

Stejně jako v případě primárního screeningu byl i u sekundárního screeningu vypočítán pro jednotlivé desky Z'-faktor, který slouží k ověření kvality testu. Hodnoty Z'-faktoru jsou uvedeny v tabulce 8. U všech desek bylo dosaženo minimální požadované hodnoty Z'-faktoru, tedy hodnoty vyšší než 0,5.

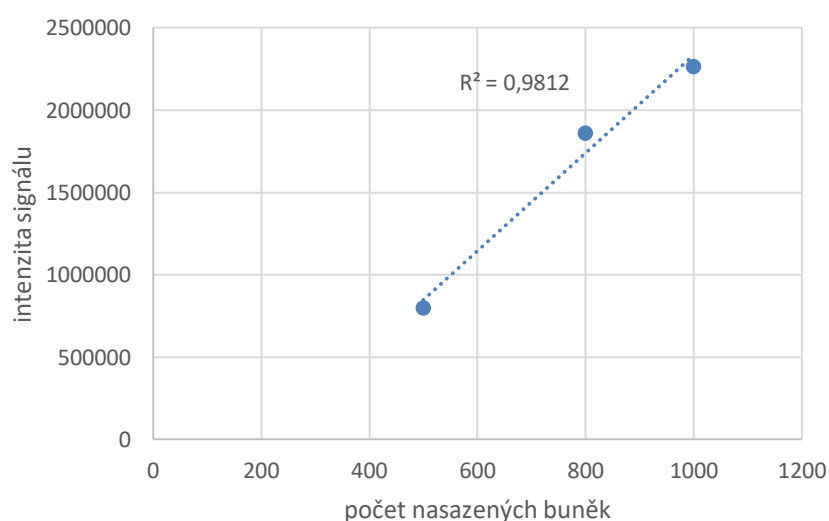
Tab. 8: Hodnoty Z'-faktoru pro jednotlivé desky při sekundárním screeningu.

buněčná linie	první opakování	druhé opakování	třetí opakování
A549	0,77	0,74	0,72
BJ	0,58	0,65	0,73
CCRF-CEM	0,82	0,58	0,68
CEM-DNR	0,67	0,69	0,67
HCT116	0,84	0,86	0,73
HCT116P53-/-	0,69	0,76	0,59
K562	0,76	0,81	0,70
K562-TAX	0,86	0,72	0,82
MRC5	0,80	0,82	0,81
U2OS	0,69	0,82	0,86

4.2 Zavedení luminiscenčního ATP testu do podmínek HTS

4.2.1 Měření závislosti intenzity signálu na počtu buněk v jamce

Tento test sloužil k potvrzení lineární závislosti intenzity naměřeného signálu na počtu buněk v jamce. Buňky byly do jamek vysazeny ve třech koncentracích, každá koncentrace do třech sloupců 384-jamkové desky. Z dat získaných po měření luminiscence byl pro každou koncentraci vypočítán aritmetický průměr. Následně byl vytvořen graf závislosti intenzity signálu na počtu buněk, který je zobrazen na obrázku 18. Z grafu jasně vyplývá, že závislost je lineární. Koeficient determinace R^2 je roven přibližně 0,98.



Obr. 18: Graf závislosti intenzity signálu na počtu nasazených buněk.

4.2.2 Validace ATP testu pro HTS podmínky

Při tomto testu bylo provedeno měření vlivu cytostatik na buněčnou linii HEK293 za účelem validace ATP testu v HTS podmínkách. Při testu byla použita tři cytostatika (mitomycin C, aktinomycin D a doxorubicin) jako pozitivní kontroly a 0,1% DMSO jako negativní kontrola. Měření bylo provedeno ve dvou biologických opakováních.

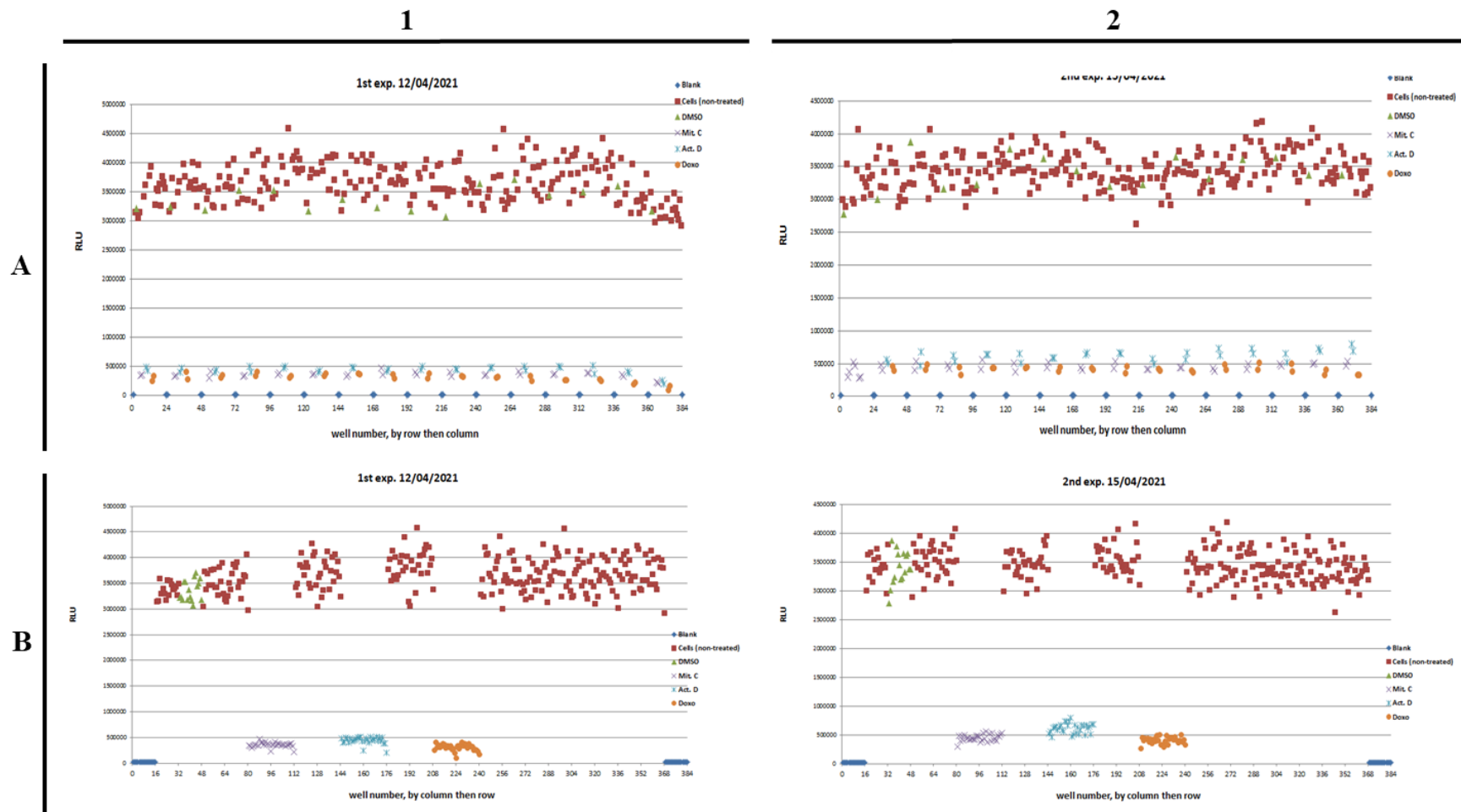
Ze získaných výsledků byl pro každou pozitivní kontrolu (tedy každé cytostatikum) vypočítán Z' -faktor. Získané hodnoty Z' -faktoru jsou uvedeny v tabulce 9.

Poté byl z hodnot vypočítán průměrný Z' -faktor, jehož hodnota byla 0,68. Jelikož je vypočítaná průměrná hodnota vyšší než 0,5, je tento test vhodný pro použití v podmínkách HTS.

Kromě výpočtu Z' -faktoru byla naměřená data využita k zobrazení distribuce luminiscenčního signálu na celé desce. Data byla zobrazena dvěma způsoby, které jsou zobrazeny na obrázku 19. Prvním způsobem je zobrazení po řádcích (A), druhým způsobem je zobrazení po sloupcích (B). Díky tomuto dvojitému zobrazení je možné najít případné přesné místo na desce, kde by luminiscenční signál byl ovlivněn okolními vlivy.

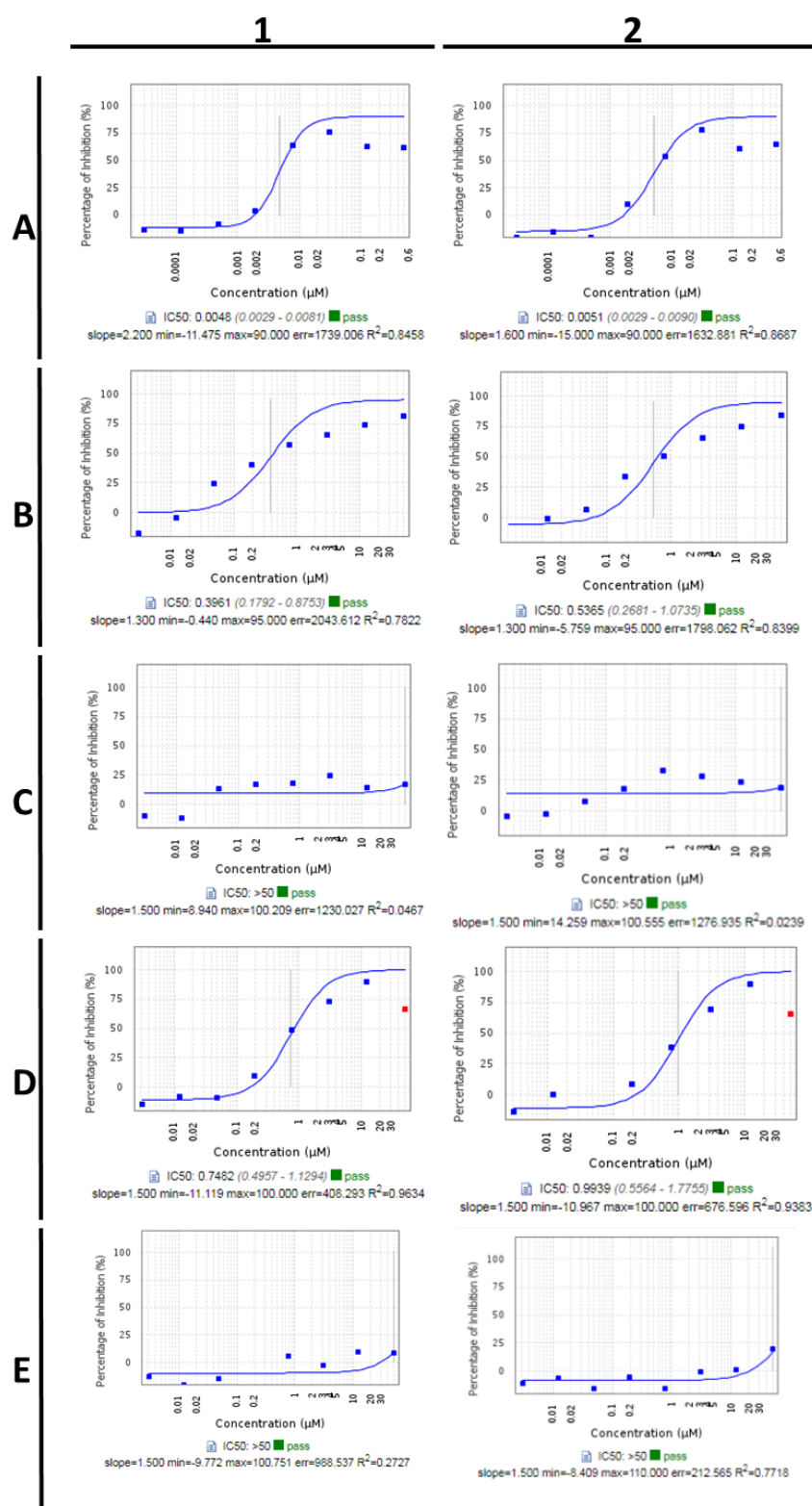
Tab. 9: Hodnoty Z' -faktoru pro jednotlivé pozitivní kontroly. Měření bylo provedeno ve dvou opakováních.

	první opakování	druhé opakování
Z' -faktor mitomycin C	0,75	0,64
Z' -faktor aktinomycin D	0,72	0,59
Z' -faktor doxorubicin	0,73	0,65

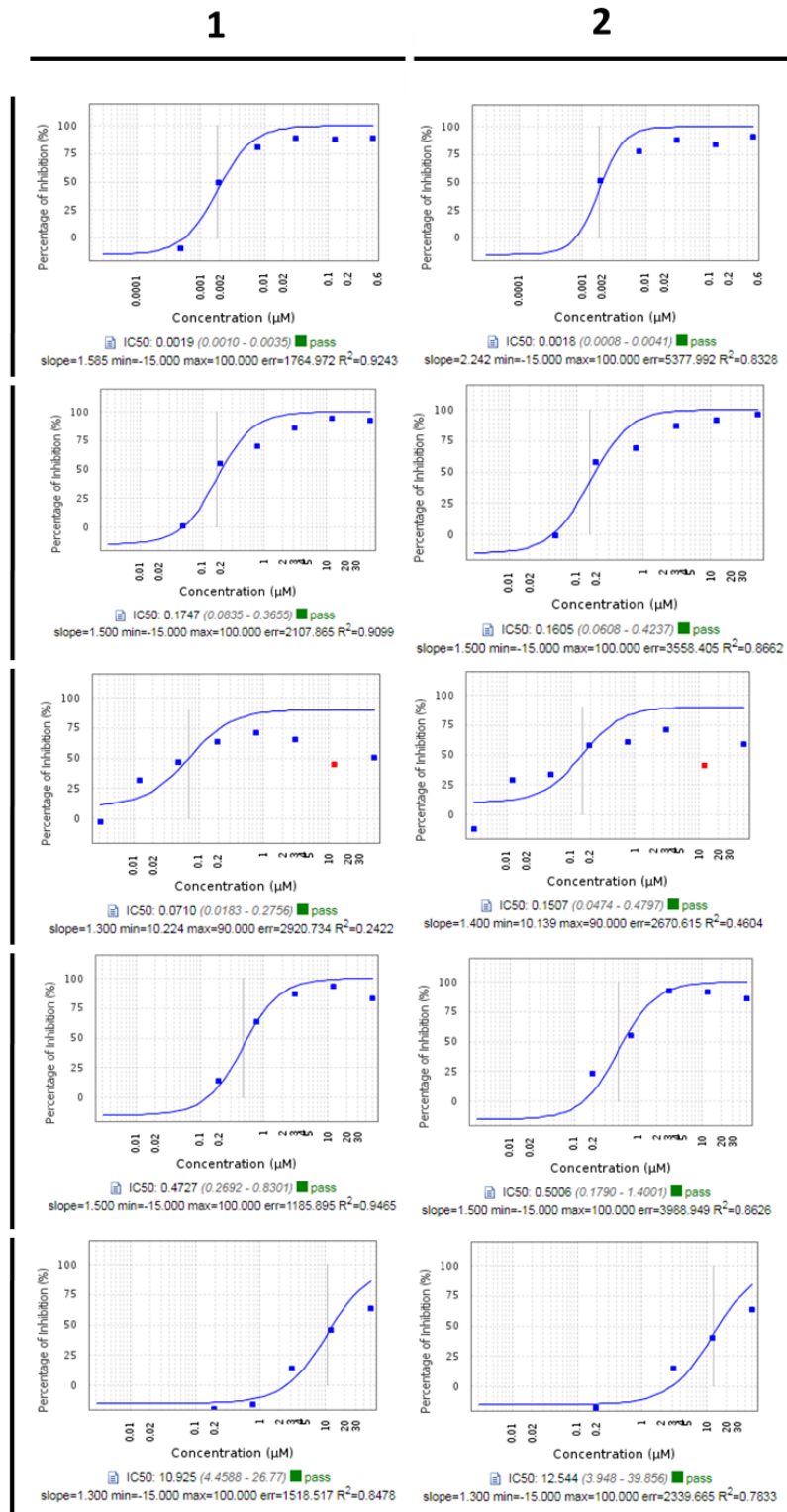


Obr. 19: Zobrazení distribuce luminiscenčního signálu na celé desce. 1- první biologické opakování, 2- druhé biologické opakování. A- zobrazení po řádcích, B- zobrazení po sloupcích.

4.2.3 Porovnání testování cytotoxicity pomocí luminiscenčního ATP testu a pomocí kolorimetrického MTS testu



Obr. 20: Souhrnné zobrazení výsledků získaných z ATP luminiscenčního testu. 1- první opakování, 2- druhé opakování. A- aktinomycin D, B- mitomycin C, C- paclitaxel, D- doxorubicin, E- 5-fluoruracil.



Obr. 21: Souhrnné zobrazení výsledků získaných z MTS testu. 1- první opakování, 2- druhé opakování. A- aktinomycin D, B- mitomycin C, C- paclitaxel, D- doxorubicin, E- 5-fluoruracil.

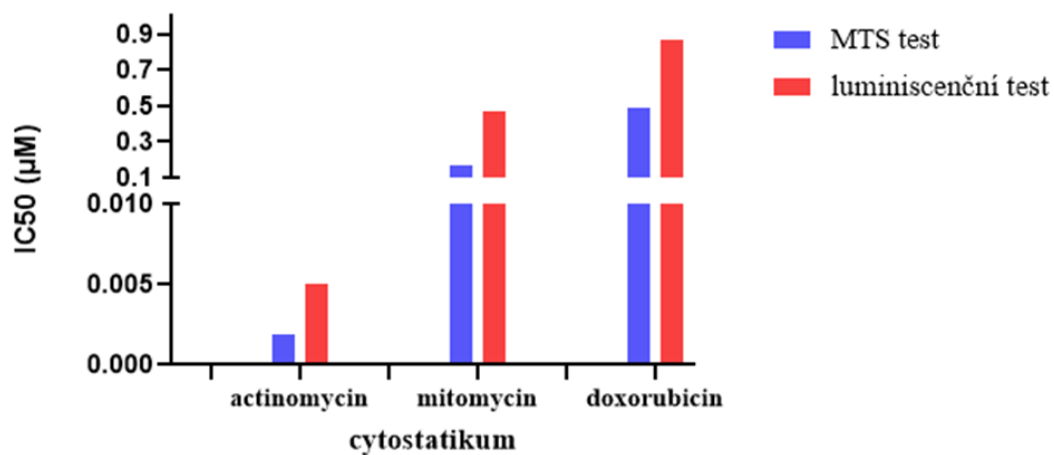
Bylo provedeno měření vlivu cytostatik na buňky linie HEK293 pomocí luminiscenčního ATP testu a kolorimetrického MTS testu. Měření bylo provedeno za účelem porovnání těchto dvou možností detekce. Souhrny získaných výsledků jsou zobrazeny na obrázku 20 (data z luminiscenčního testu) a na obrázku 21 (data z MTS testu). Měření bylo pro každé cytostatikum provedeno ve dvou opakováních, která jsou v obrázcích zobrazena pod čísly 1 a 2. Jednotlivé řádky označené písmeny udávají použitá cytostatika.

Z naměřených dat byla získána pro každé cytostatikum a každé opakování hodnota IC50. Z hodnot IC50 byl pro každé cytostatikum vytvořen aritmetický průměr a data byla zanesena do tabulky 10. V případě MTS testu mohla být použita všechna data, avšak v případě ATP luminiscenčního testu dvě cytostatika, paclitaxel a 5-fluoruracil, nevykazovala žádnou aktivitu.

Jednotlivé aritmetické průměry IC50 pro tři cytostatika (aktinomycin, mitomycin a doxorubicin) byly mezi sebou porovnány a to tak, že pro každé cytostatikum byla porovnána hodnota získaná při detekci pomocí luminiscenčního testu a při detekci pomocí MTS testu. Porovnání je zobrazeno na obrázku 22. Z grafu vyplývá, že u MTS testu jsou detekované hodnoty IC50 nižší než u luminiscenčního ATP testu. Poměr mezi hodnotami z luminiscenčního testu a MTS testu však zůstává podobný.

Tab. 10: Hodnoty získané měřením vlivu cytostatik na linii HEK293, detekce pomocí luminiscenčního ATP testu a kolorimetrického MTS testu.

	luminiscenční- test IC50 (μM)	luminiscenční test- IC50- průměr (μM)	MTS test- IC50 (μM)	MTS test- IC50- průměr (μM)
aktinomycin	0,0048	0,00495	0,0019	0,00185
	0,0051		0,0018	
mitomycin	0,3961	0,4663	0,1747	0,1676
	0,5365		0,1605	
paclitaxel	>50		0,071	0,11085
	>50		0,1507	
doxorubicin	0,7482	0,87105	0,4727	0,48665
	0,9939		0,5006	
5-fluoruracil	>50		10,925	11,7345
	>50		12,544	



Obr. 22: Grafické porovnání hodnot IC50 tří cytostatik získané pomocí luminiscenčního ATP testu a kolorimetrického MTS testu. Modrá- MTS test, červená- luminiscenční ATP test. Zpracováno v programu GraphPad Prism 9.

5 DISKUZE

HTS je metoda založená na screeningu velkých chemických knihoven vůči požadovanému molekulárnímu cíli (Ashenden, 2018). Chemické knihovny obsahují statisíce látek, které mají odlišnou strukturu a vlastnosti (Entzeroth *et al.*, 2009). Kvalitní chemické knihovny obsahují látky, jejichž základní biologické vlastnosti důležité pro vývoj léčiv (fyzikální, chemické i biologické) jsou již známé. Mezi nejvýznamnější vlastnosti těchto látek patří například jejich agregace, rozpustnost, interference s běžnými bioluminiscenčními reportéry a jejich cytotoxické, antibakteriální a antifungální účinky. Toto tzv. „bioprofilování“ umožňuje v raných fázích identifikovat látky, které mohou ovlivňovat naměřená data. Tím je možné redukovat falešně pozitivní výsledky (například z důvodu autofluorescence nebo inhibice luciferázy).

Diplomová práce je zaměřena na testování cytotoxických účinků nových látek v unikátní knihovně UMTM (Ústav molekulární a translační medicíny). Obecně se nejčastěji v HTS na testování cytotoxicity nejvíce využívají kolorimetrické a luminiscenční metody. První úkol praktické části diplomové práce se zabývá stanovením cytotoxicity 88 sloučenin na úrovni HTS. Byl využit kolorimetrický MTS test, který je v HTS podmínkách standardně používaný (Veselovská *et al.*, 2020; Borková *et al.*, 2019). Tento test je založen na měření metabolické aktivity mitochondriálních dehydrogenas (Huang *et al.*, 2004). V primárním screeningu byly na buňky aplikovány sloučeniny v koncentraci 50 μM , testování probíhalo na deseti různých buněčných liniích. Cílem bylo první rozdělení látek na aktivní a neaktivní. Rozdělení bylo provedeno na základě hodnot PI, které byly měřením získány. Hodnota PI, neboli procento inhibice, nám říká, kolik procent buněk při dané koncentraci bylo inhibováno. Za hraniční hodnotu v tomto testu bylo zvoleno 50 %. Sloučeniny, jejichž PI bylo vyšší než 50 %, tedy inhibovaly více než 50 % buněk v jamce. Takové sloučeniny byly vyhodnoceny jako aktivní. Naopak sloučeniny s PI nižším než 50 % neinhibovaly dostatečné množství buněk v jamce a byly vyhodnoceny jako neaktivní. Pomocí primárního screeningu bylo vyhodnoceno 57 % (50) aktivních sloučenin a 43 % (38) neaktivních sloučenin.

Aktivní sloučeniny byly následně vybrány a byl u nich proveden sekundární screening. U tohoto screeningu již není testována látka pouze v jedné koncentraci, ale je použito koncentrací několik (v případě této práce konkrétně sedm). Více koncentrací je použito ke konkrétnější detekci změn, ke kterým dochází v jamkách s buňkami při

aplikaci různých koncentrací testované látky. Tento test sloužil k přesnějšímu určení dávky, která je nutná k dosažení požadované inhibice (Xia *et al.*, 2008). Obvykle je požadováno, aby bylo inhibováno 50 % buněk. Je tedy zjišťována poloviční inhibiční koncentrace, označovaná jako IC50 (Bag a Ghorai, 2016). Na základě této koncentrace byly testované sloučeniny rozděleny do tří skupin. Sloučeniny, jejichž koncentrace potřebná k inhibici 50 % buněk v jamce byla relativně vysoká, byly zařazeny do skupiny mírně cytotoxických sloučenin, naopak sloučeniny s velmi nízkou poloviční inhibiční koncentrací byly zařazeny do skupiny extra cytotoxických sloučenin. Všechny ostatní sloučeniny, jejichž IC50 byla mezi těmito dvěma skupinami, byly zařazeny do skupiny cytotoxických sloučenin. Jelikož však každá buněčná linie vykazuje vůči testovaným látkám odlišnou citlivost, sloučeniny zařazeny do jedné skupiny pro jednu buněčnou linii byly u odlišné buněčné linie zařazeny do skupiny jiné. Nejvíce citlivé byly nádorové linie CCRF-CEM a K562-TAX, nejméně citlivé byly naopak nenádorové linie BJ a MRC-5.

Ze získaných hodnot IC50 byl následně pro každou aktivní sloučeninu vypočítán terapeutický index. Ten je vypočítán jako podíl aritmetického průměru hodnot IC50 nenádorových linií a aritmetického průměru hodnot IC50 nádorových linií. Říká nám tedy, jak daná testovaná sloučenina ovlivňuje nádorové linie. Jelikož je cílem najít sloučeniny, které by cytotoxicky působily na nádorové linie, ale nenádorové linie by neovlivnily, jsou hledány sloučeniny s co nejvyšší hodnotou terapeutického indexu. Jako hraniční hodnota byla pro TI určena hodnota 30 a sloučeniny, které mají hodnotu TI vyšší jsou považovány za terapeuticky zajímavé. Takových látek bylo v této práci identifikováno devět.

Druhým úkolem v praktické části bylo zavedení luminiscenčního testu, který sleduje produkci ATP, do podmínek HTS. Tento test se velmi často používá v podmínkách HTS (Swiss *et al.*, 2013; Sykes a Avery, 2009; Mackey *et al.*, 2006). Byla potvrzena lineární závislost intenzity signálu na počtu buněk v jamce. To je důležité vzhledem k dalšímu měření, kdy je možné na základě naměřeného signálu v kontrolní jamce a v jamce ošetřené testovanou sloučeninou určit koncentraci testované látky, při které je inhibována polovina buněk jamky. Byla provedena validace testu pro HTS podmínky, kdy byl stanovován Z'-faktor pro tři cytostatika. Výsledky ukazují, že test poskytl homogenní signál a vykazoval dostatečný rozdíl mezi pozitivní a negativní kontrolou. Výsledný Z'-faktor byl 0,68, tedy odpovídá podmínce, že musí být vyšší než 0,5 (Sykes a Avery, 2009) a byla tudíž potvrzena vhodnost tohoto testu pro podmínky HTS.

Následně bylo provedeno měření k porovnání ATP luminiscenčního testu a kolorimetrického MTS testu. Na měření bylo použito pět různých cytostatik, u kterých je známá cytotoxická aktivita. Každé cytostatikum bylo měřeno v osmi koncentracích, aby bylo následně možné určit hodnotu IC50. U obou testů byla použita stejná buněčná linie (HEK293) a testy byly prováděny souběžně, aby bylo co nejvíce zamezeno ovlivnění okolím. Získané hodnoty IC50 z jednotlivých testů byly následně porovnány. Bylo zjištěno, že hodnoty IC50 jsou u kolorimetrického MTS testu nižší než u ATP luminiscenčního testu.

Mohly být však porovnány hodnoty IC50 pouze pro tři cytostatika, jelikož při použití ATP luminiscenčního testu byl pro paclitaxel a 5-fluoruracil detekován stejný signál jako v případě negativní kontroly a tudíž u nich nebyl pozorován žádný cytotoxický efekt. V případě paclitaxelu již bylo publikováno, že po jeho aplikaci došlo ke zvýšení luminiscenčního signálu. Paclitaxel pravděpodobně působí na luciferasu a ovlivňuje ji tak, že luciferasa následně poskytuje vyšší luminiscenční signál (Theile *et al.*, 2013). Díky tomu tedy mohla být naměřena hodnota signálu, která odpovídala hodnotám signálu u neovlivněných jamek.

V případě 5-fluoruracilu bylo publikováno, že nízká koncentrace 5-fluoruracilu způsobuje lehké zvýšení hladiny mitochondriálního ATP. Po aplikaci 5-fluoruracilu sice dochází k poškození mitochondrií, ale díky kompenzační funkci mitochondrií dochází ke zvýšení obsahu ATP (Zhang a Ma, 2018). Na základě těchto informací je možno usoudit, že tento typ testu není pro detekci cytotoxicity paclitaxelu a 5-fluoruracilu vhodný.

Při srovnání bioluminiscenčních testů a testů využívajících tetrazoliové soli (například MTS) jsou bioluminiscenční testy asi stokrát citlivější. Bioluminiscenční testy jsou také mnohem rychlejší, na proběhnutí a ustálení reakce potřebují pouze několik minut, zatímco testy na bázi tetrazoliových solí i několik hodin (Fan a Wood, 2007). Na druhou stranu jsou luminiscenční testy značně dražší (Mueller *et al.*, 2004; Petty *et al.*, 1995). Další nevýhodou bioluminiscenčních testů je, že některé látky mohou ovlivňovat luciferasu a tím způsobovat falešné výsledky, tak jako bylo popsáno výše (Theile *et al.*, 2013). Falešné výsledky však mohou být i u testů využívajících tetrazoliové soli (Karakas *et al.*, 2017, Funk *et al.*, 2007). Bez ohledu na zvolenou metodu je však důležité pro reprodukovatelnost výsledků pracovat s kontrolovaným a konzistentním zdrojem buněčných linií, aplikovat vhodné koncentrace používaných reagensů a dodržovat inkubační časy.

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byly zpracovány v současnosti dostupné informace týkající se tématu práce. Byly popsány obecné poznatky o vývoji léčiv (historickém i moderním) a byl popsán proces vývoje nového léčiva, od prvních laboratorních testů až po jeho uvedení na trh. Dále byly popsány zdroje nových léčiv a testy, které se při vývoji léčiv využívají. Druhý úsek teoretické části práce byl věnován vysokokapacitnímu screeningu, jehož zapojení je při vývoji nových léčiv velmi důležité. Byl popsán princip a vývoj (včetně nutnosti miniaturizace a automatizace) tohoto typu screeningu, byly popsány chemické knihovny a formy uskladňování vzorků určených na screening. Poté byly popsány nejčastěji využívané testy, které byly aplikovány do podmínek vysokokapacitního screeningu- biochemické a buněčné. Poslední úsek teoretické části práce byl věnován cytotoxicitě, jejímu testování a možnostem její detekce.

V prvním úseku praktické části práce bylo cílem otestovat cytotoxicitu 88 sloučenin s využitím MTS testu. Nejdříve byly dodané sloučeniny připraveny tak, aby mohly být testovány v prostředí HTS. Poté byl proveden primární screening všech 88 dodaných sloučenin, při kterém byly získány hodnoty PI. Na základě PI byly testované sloučeniny rozděleny na aktivní a neaktivní. Bylo vybráno 50 sloučenin, které byly vyhodnoceny jako aktivní, a s těmito sloučeninami bylo dále pracováno. Byla testována odpověď jednotlivých buněčných linií na rozdílné koncentrace těchto látek (sekundární screening), čímž byla získána pro každou testovanou sloučeninu hodnota IC₅₀. Na základě IC₅₀ byly látky rozděleny na mírně cytotoxické, cytotoxické a extrémně cytotoxické a byl vypočítán jejich terapeutický index.

V dalším úseku praktické části bylo cílem zavedení luminiscenčního ATP testu do podmínek HTS. Nejprve byla potvrzena lineární závislost intenzity získaného signálu na počtu vysazených buněk a byla provedena validace testu. Poté byl testován vliv cytostatik na buněčnou linii HEK293 a byla porovnána data získaná luminiscenčním ATP testem a kolorimetrickým MTS testem.

7 LITERATURA

Amirkia V., Heinrich M. (2015): Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. *Front Pharmacol* **6**, 237.

Ashenden S.K. (2018): Screening Library Design. *Methods Enzymol* **610**, 73-96.

Aslantürk Ö .S. (2017): In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. *IntechOpen* 1-17.

Bag A., Ghorai P.K. (2016): Development of Quantum Chemical Method to Calculate Half Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀). *Mol Inform* **35**, 199-206.

Blay V., Tolani B., Ho S.P., Arkin M.R. (2020): High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discov Today* **12**, 1807-1821.

Borková L., Frydrych I., Jakubcová N., Adámek R., Lišková B., Gurská S., Medvedíková M., Hajdúch M., Urban M. (2019): Synthesis and biological evaluation of triterpenoid thiazoles derived from betulonic acid, dihydrobetulonic acid, and ursonic acid. *Eur J Med Chem.* **185**, 111806.

Cook N. D. (1996): Scintillation proximity assay: a versatile high-throughput screening technology. *Drug Discovery Today* **7**, 287-294.

Doogue M.P., Polasek T.M. (2013): The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf* **4**, 5-7.

Duelen R., Corvelyn M., Tortorella I., Leonardi L., Chai Y.C., Sampaolesi M. (2019): *Medicinal Biotechnology for Disease Modeling, Clinical Therapy, and Drug Discovery and Development*. Springer, strany 89-128.

Eder J., Herrling P.L. (2016): Trends in Modern Drug Discovery. *Handb Exp Pharmacol* **232**, 3-22.

Entzeroth M., Flotow H., Condron P. (2009): Overview of high-throughput screening. *Curr Protoc Pharmacol* **9**.

Fan F., Wood K.V. (2007): Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* **5**, 127-36.

Fard J.K., Jafari S., Eghbal M.A. (2015): A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Adv Pharm Bull* **5**, 447-54.

Funk D., Schrenk H.H., Frei E. (2007): Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *Biotechniques* **43**, 178-182.

Ginai M., Elsby R., Hewitt C.J., Surry D., Fenner K., Coopman K. (2013): The use of bioreactors as in vitro models in pharmaceutical research. *Drug Discov Today* **18**, 922-35.

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.

Guido R.V., Oliva G., Andricopulo A.D. (2011): Modern drug discovery technologies: opportunities and challenges in lead discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* **14**, 830-9.

Haupts U., Rüdiger M., Pope A.J. (2000): Macroscopic versus microscopic fluorescence techniques in (ultra)-high-throughput screening. *Drug Discovery Today* **5**, 3-9.

- Hertzberg R.P., Pope A.J. (2000): High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 445-51
- Huang K.T., Chen Y.H., Walker A.M. (2004): Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *Biotechniques* **37**, 406-412.
- Chan G.K., Kleinheinz T.L., Peterson D., Moffat J.G. (2013): A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *PLoS One* **8**.
- Jaroch K., Jaroch A., Bojko B. (2018): Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *J Pharm Biomed Anal* **147**, 297-312.
- Karakaş D., Ari F., Ulukaya E. (2017): The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol* **41**, 919-925.
- Kingston D.G. (2007): The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds. *Phytochemistry* **68**, 1844-54.
- Konečný P., Gurská S., Znojek P., Schadich E., Hajduch M., Džubák P. (2015): Reprofilování jako úspěšná strategie hledání nových léčiv. *Farmakologická léčba* **4**, 12-18.
- Lai Y., Xiang M., Liu S., Li E., Che Y., Liu X. (2014): A novel high-throughput nematocidal assay using embryo cells and larvae of *Caenorhabditis elegans*. *Exp Parasitol* **139**, 33-41.
- Lee O.W., Austin S., Gamma M., Cheff D.M., Lee T.D., Wilson K.M., Johnson J., Travers J., Braisted J.C., Guha R., Klumpp-Thomas C., Shen M., Hall M.D. (2020): Cytotoxic Profiling of Annotated and Diverse Chemical Libraries Using Quantitative High-Throughput Screening. *SLAS Discov* **25**, 9-20.
- Leung J.C., Cassimeris L. (2019): Reorganization of paclitaxel-stabilized microtubule arrays at mitotic entry: roles of depolymerizing kinesins and severing proteins. *Cancer Biol Ther* **20**, 1337-1347.
- Lombardino J.G., Lowe J.A. (2004): The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 853-62.
- Mackey Z.B., Baca A.M., Mallari J.P., Apsel B., Shelat A., Hansell E.J., Chiang P.K., Wolff B., Guy K.R., Williams J., McKerrow J.H. (2006): Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*. *Chem Biol Drug Des* **67**, 355-63.
- Matthews H., Hanison J., Nirmalan N. (2016): "Omics"-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes* **4**, 28.
- Mueller H., Kassack M.U., Wiese M. (2004): Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* **9**, 506-15.
- Natsch A., Emter R. (2015): Reporter cell lines for skin sensitization testing. *Arch Toxicol* **89**, 1645-68.
- Paciello L., Falco F.C., Landi C., Parascandola P. (2013): Strengths and weaknesses in the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability by ATP-based bioluminescence assay. *Enzyme Microb Technol* **52**, 157-62.
- Paschos N.K., Brown W.E., Eswaramoorthy R., Hu J.C., Athanasiou K.A. (2015): Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, 488-503.

- Pereira S., Tettamanti M. (2005): Ahimsa and alternatives -- the concept of the 4th R. The CPCSEA in India. *ALTEX* **22**, 3-6.
- Petty R.D., Sutherland L.A., Hunter E.M., Cree I.A. (1995): Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* **10**, 29-34.
- Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. (2017) Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol* **1601**, 1-17.
- Richmond J. (2002): Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework. *ILAR J* **43**, 63-8.
- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. (2016): Cell Viability Assays. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- Rudin M., Weissleder R. (2003): Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 123-31.
- Schneider G. (2018): Automating drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 97-113.
- Swiss R., Niles A., Cali J.J., Nadanaciva S., Will Y. (2013): Validation of a HTS-amenable assay to detect drug-induced mitochondrial toxicity in the absence and presence of cell death. *Toxicol In Vitro* **27**, 1789-97.
- Sykes M.L., Avery V.M. (2009): A luciferase based viability assay for ATP detection in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream form strain 427. *Parasit Vectors* **2**, 54.
- Theile D., Spalwicz A., Weiss J. (2013): Watch out for reporter gene assays with Renilla luciferase and paclitaxel. *Anal Biochem* **437**, 109-10.
- Trist D.G. (2011): Scientific process, pharmacology and drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 528-33.
- Veselovská L., Kudlová N., Gurská S., Lišková B., Medvedíková M., Hodek O., Tloušťová E., Milisavljevic N., Tichý M., Perlíková P., Mertlíková-Kaiserová H., Trylčová J., Pohl R., Klepetářová B., Džubák P., Hajdúch M., Hocek M. (2020): Synthesis and Cytotoxic and Antiviral Activity Profiling of All-Four Isomeric Series of Pyrido-Fused 7-Deazapurine Ribonucleosides. *Chemistry* **26**, 13002-13015.
- Wermuth C.G. (2006): Similarity in drugs: reflections on analogue design. *Drug Discov Today* **11**, 348-54.
- Wikipedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Microplate> (15. 4. 2021).
- Xia M., Huang R., Witt K.L., Southall N., Fostel J., Cho M.H., Jadhav A., Smith C.S., Inglese J., Portier C.J., Tice R.R., Austin C.P. (2008): Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect* **116**, 284-91.
- Yu K., Hu S., Huang J., Mei L.H. (2011): A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase. *Enzyme Microb Technol* **49**, 272-6.
- Zhang J.H., Chung T.D., Oldenburg K.R. (1999): A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**, 67-73.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADME	absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace
ATCC	American tissue and cultures collection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FA	fluorescenční anizotropie
FBS	fragmentovaný screening
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FTIH	poprvé podáno člověku („first time in human“)
HTS	vysokokapacitní screening
IC50	poloviční maximální inhibiční koncentrace
LBVS	virtuální screening založený na ligandu
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
PI	procento inhibice
PMS	phenazin methosulfát
qHTS	kvantitativní HTS
SBVS	strukturní virtuální screening
SPA	scintilační proximitní test
TI	terapeutický index
TRET	časově odlišený přenos energie
uHTS	ultraHTS
UMTM	Ústav molekulární a translační medicíny