

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2025

Bc. Tereza Kumrová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Srovnání různých způsobů vyhodnocení testů
cytotoxické aktivity u nádorových buněčných linií**

Diplomová práce

Bc. Tereza Kumrová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2025

Vedoucí práce: Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza KUMROVÁ**
Osobní číslo: **R230693**
Adresa: **Moravičany 87, Moravičany, 78982 Moravičany, Česká republika**
Téma práce: **Srovnání různých způsobů vyhodnocení testů cytotoxické aktivity u nádorových buněčných linií**
Téma práce anglicky: **Comparison of different methods of evaluation for cytotoxic activity tests in tumor cell lines**
Jazyk práce: **Čeština**
Vedoucí práce: **Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.**
Katedra biofyziky

Zásady pro vypracování:

- 1) Na základě studia relevantní literatury vypracovat rešerši na dané téma.
- 2) Osvojit si metodiky zahrnující kultivaci nádorových buněčných linií, barvení krystalovou violetí, MTT test a příslušné způsoby vyhodnocení výsledků.
- 3) Testovat antiproliferativní a cytotoxickou aktivitu vybraných látek na rychle a pomalu rostoucí nádorové buněčné linii s využitím výše uvedených kolorimetrických testů.
- 4) Vyhodnotit získané výsledky, srovnat různé možnosti vyhodnocení k uvedeným testům a určit, zda má způsob vyhodnocení výsledků vliv na konečná data.

Seznam doporučené literatury:

J Nilles, J Weiss, D Theile (2022): Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization, *Biotechniques*, 73, 131-135.
K Chiba, K Kawakami, K Tohyama (1998): Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells, *Toxicol In Vitro*, 12, 251-258.
L Wolff, SSM Bandaru, E Eger, HN Lam, M Napierkowski, D Baecker, C Schulzke, PJ Bednarski (2021): Comprehensive Evaluation of Biological Effects of Pentathiepins on Various Human Cancer Cell Lines and Insights into Their Mode of Action, *Int J Mol Sci*, 22, 7631.
E Grela, J Kozłowska, A Grabowiecka (1998): Current methodology of MTT assay in bacteria – A review, *Acta Histochem*, 120, 303-311.
M Ishiyama, H Tominaga, M Shiga, K Sasamoto, Y Ohkura, K Ueno (1996): A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet, *Biol Pharm Bull*, 19, 1518-1520.
E Borenfreund, H Babich, N Martin-Alguacil (1988): Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests, *Toxicol In Vitro*, 2, 1-6.

Podpis vedoucího práce:

Datum:

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Tereza Kumrová
Název práce:	Srovnání různých způsobů vyhodnocení testů cytotoxické aktivity u nádorových buněčných linií
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2025
Klíčová slova:	nádorové buňky, protinádorová léčiva, <i>in vitro</i> testování cytotoxicity, frakční viabilita, relativní viabilita
Počet stran:	57
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

SOUHRN

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou srovnání různých způsobů vyhodnocení testů cytotoxické aktivity u nádorových linií. Teoretická část je věnována přehledu v současnosti používaných chemoterapeutik, preklinickému hodnocení lékové odpovědi, buněčné odpovědi na léčiva a *in vitro* metodám testování buněčné odpovědi. Dále je zařazena i stručná charakteristika použitých testovacích látek. Náplní experimentální části bylo studium aktivity 5-fluorouracilu a nokodazolu na zvolených buněčných modelech (linie HCT 116 a BxPC3) pomocí MTT eseje a barvení trypanovou modří ve dvou zvolených časech (po 48 a 72 hodinách). Ze stanovených hodnot IC_{50} , relativních a frakčních viabilit vyplývá, že oba testy poskytují odlišné informace o cytotoxických vlastnostech testovacích látek. Pro získání nejpřesnějších výsledků a kompletního popisu stavu buněčné populace je tedy nejvhodnější kombinovat více metod pro stanovení cytotoxicity současně.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Bc. Tereza Kumrová
Title:	Comparison of different methods of evaluation for cytotoxic activity tests in tumor cell lines
Type of thesis:	Master's
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
Supervisor:	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation:	2025
Keywords:	tumour cells, anticancer drugs, <i>in vitro</i> cytotoxicity testing, fractional viability, relative viability
Number of pages:	57
Number of appendices:	0
Language:	Czech

SUMMARY

The presented thesis deals with comparison of various methods of evaluation of cytotoxic activity tests in tumour cell lines. The theoretical part is devoted to the overview of currently used chemotherapeutics, preclinical evaluation of drug response, cellular responses to drugs and *in vitro* techniques for testing cellular response. A brief description of the test substances is also included. The aim of the experimental part of the diploma thesis was to study the activity of the test substances 5-fluorouracil and nocodazole on selected cell models (HCT 116 and BxPC3 cell lines) using the MTT assay and trypan blue exclusion test at two selected time points (after 48 and 72 hours). The obtained IC₅₀ values, along with relative and fractional viabilities, indicate that the two assays provide different types of information regarding the cytotoxic properties of the tested substances. To obtain the most accurate results and a comprehensive description of the cell population, it is therefore most appropriate to combine multiple cytotoxicity assessment assays simultaneously.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jitky Prachařové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Tereza Kumrová

Poděkování

Ráda bych velmi poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala. Poděkování patří také celému kolektivu Laboratoře molekulární biofyziky a farmakologie za vstřícný přístup a příjemné prostředí po celou dobu práce.

Diplomová práce vznikla za podpory projektu studentské grantové soutěže Univerzity Palackého v Olomouci IGA_PrF_2025_028.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1	Současná léčiva užívaná v chemoterapii	3
3.2	Preklinické hodnocení lékové odpovědi biologicky aktivních látek	5
3.3	Buněčná odpověď na léčiva.....	6
3.3.1	Buněčná smrt.....	6
3.3.2	Snížení intenzity až úplné zastavení proliferace	10
3.3.3	Cytotoxicita a cytostáze v klinickém hodnocení léčiv	11
3.4	<i>In vitro</i> metody testování buněčné odpovědi.....	11
3.4.1	Relativní viabilita	12
3.4.2	Frakční viabilita.....	14
3.5	Charakteristika testovacích látek	15
3.5.1	5-fluorouracil.....	15
3.5.2	Nokodazol	18
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Biologický materiál	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21
4.4	Softwarové vybavení	22
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.5.1	Kultivace buněk, sazení.....	22
4.5.2	Test cytotoxicity (MTT esej).....	23
4.5.3	Barvení trypanovou modří	24
5	VÝSLEDKY	26

5.1	Výběr nádorových linií a testovacích látek	26
5.2	Měření relativní viability pomocí MTT eseje.....	26
5.3	Měření frakční viability prostřednictvím barvení trypanovou modří.....	33
5.4	Srovnání relativní a frakční viability na příkladu 5-fluorouracilu.....	36
5.5	Hodnocení rozsahu apoptózy pomocí inverzního mikroskopu	38
6	DISKUSE	40
7	ZÁVĚR.....	43
8	LITERATURA.....	44

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
ACD	Náhodná buněčná smrt, z angl. accidental cell death
APAF1	Apoptotickou proteázu aktivující faktor 1
ApoBs	Apoptotická tělíska, z angl. apoptotic bodies
ATP	Adenozintrifosfát, z angl. adenosine triphosphate
AUC	Plocha pod křivkou, z angl. area under the curve
CNT2	Koncentrativní nukleosidový transportér, z angl. concentrative nucleoside transporters
DHFU	5,6-dihydro-5-fluorouracil
DISC	Signalizační komplex indukující buněčnou smrt, z angl. death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPD	Dihydropyrimidin dehydrogenáza
EBM	z angl. evidence-based medicine
EC₅₀	Polovina maximální efektivní koncentrace
ECCAC	z angl. European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
E_{max}	Maximální efektivní koncentrace
ENT1	Ekvilibrativní nukleosidový transportér 1
ENT2	Ekvilibrativní nukleosidový transportér 2
FdUDP	Fluorodeoxyuridin difosfát, z angl. fluorodeoxyuridine diphosphate
FdUMP	Fluorodeoxyuridin monofosfát, z angl. fluorodeoxyuridine monophosphate
FdUTP	Fluorodeoxyuridin trifosfát, z angl. fluorodeoxyuridine triphosphate
FUDP	Fluorouridin difosfát, z angl. fluorouridine diphosphate
FUDR	Fluorodeoxyuridin, z angl. fluorodeoxyuridine
FUMP	Fluorouridin monofosfát, z angl. fluorouridine monophosphate
FUR	Fluorouridin
FUTP	Fluorouridin trifosfát, z angl. fluorouridine triphosphate
GTP	Guanozintrifosfát, z angl. guanosine triphosphate
IC₅₀	Polovina maximální inhibiční koncentrace
LDH	Laktátdehydrogenáza

MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NBT	2,2'-bis(4-nitrofenyl)-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen)-ditetrazolium chlorid
NOCO	nokodazol
NTC	2-(4-nitrofenyl)-3,5-difenyl-2H-tetrazolium chlorid
OPRT	Ororát fosforibosyl transferáza, z angl. orotate phosphoribosyltransferase
PBS	Fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline
Rb	Retinoblastomový protein
RCD	Regulovaná buněčná smrt, z angl. regulated cell death
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály, z angl. reactive oxygen species
RR	Ribonukleotid reduktáza
s. o.	Směrodatná odchylka
SASP	z angl. senescence associated secretory phenotype
SMAC	z angl. second mitochondria-derived activator of caspases
TK	Thymin kináza
TNBT	2,2',5,5'-tetra- <i>p</i> - nitrofenyl - 3,3'- (3,3'- dimethoxy - 4,4'- difenylen)-ditetrazolium chlorid
TNFα	Faktor nádorové nekrózy α , z angl. tumor necrosis factor α
TP	Thymin fosforyláza, z angl. thymidine phosphorylase
TS	Thymidylát syntáza
TuD	Tubulin-GDP
UK	Uridin kináza
UP	Uridin fosforyláza, z angl. uridine phosphorylase
XIAP	X-vázaný apoptózu blokující protein, z angl. X-linked inhibitor of apoptosis
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5sulfofenyl)-5-[(fenylamino)-karbonyl]-2H-tetrazolium

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Srovnání vnější a vnitřní apoptotické cesty (převzato a upraveno z Balaji <i>et al.</i> , 2021).....	9
Obrázek č. 2: Struktura 5-fluorouracilu.....	15
Obrázek č. 3: Metabolismus 5-fluorouracilu (převzato a upraveno z Longley <i>et al.</i> , 2003)..	17
Obrázek č. 4: Struktura nokodazolu	18
Obrázek č. 5: Nádorová linie HCT 116 48 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 μ M	38
Obrázek č. 6: Nádorová linie HCT 116 72 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 μ M	38
Obrázek č. 7: Nádorová linie HCT 116 48 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 μ M ...	38
Obrázek č. 8: Nádorová linie HCT 116 72 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 μ M ...	38
Obrázek č. 9: Kontrolní buňky nádorové linie HCT 116	38
Obrázek č. 10: Nádorová linie BxPC3 48 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 μ M.....	39
Obrázek č. 11: Nádorová linie BxPC3 72 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 μ M.....	39
Obrázek č. 12: Nádorová linie BxPC3 48 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 μ M.....	39
Obrázek č. 13: Nádorová linie BxPC3 72 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 μ M.....	39
Obrázek č. 14: Kontrolní buňky nádorové linie BxPC3	39

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Objem PBS, roztoku trypsin/EDTA a média v používaných kultivačních lahvích	23
Tabulka č. 2: Výsledný rozsah koncentrací testovacích látek v 200 μ l média při MTT eseji	24
Tabulka č. 3: Výsledná koncentrace 5-FU a nokodazolu v 500 μ l média při barvení trypanovou modří	25
Tabulka č. 4: Hodnoty IC_{50} (v μ mol $\cdot$ l $^{-1}$) a směrodatné odchylky získané MTT esejemi pro obě testovací látky, nádorová linie HCT 116.....	27
Tabulka č. 5: Hodnoty IC_{50} (v μ mol $\cdot$ l $^{-1}$) a směrodatné odchylky získané MTT esejemi pro obě testovací látky, nádorová linie BxPC3	30
Tabulka č. 6: Souhrnné výsledky – hodnoty IC_{50} (v μ mol $\cdot$ l $^{-1}$) a směrodatné odchylky získané MTT esejemi pro obě testovací látky, nádorová linie HCT 116 i BxPC3	33

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentraci 5-fluorouracilu [μM] 48 a 72 h po ošetření	27
Graf č. 2: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentraci nokodazolu [μM] 48 a 72 h po ošetření	28
Graf č. 3: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentracích testovacích látek [μM] 48 h po ošetření.....	29
Graf č. 4: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentracích testovacích látek [μM] 72 h po ošetření.....	29
Graf č. 5: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentraci 5-fluorouracilu [μM] 48 a 72 h po ošetření	30
Graf č. 6: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentraci nokodazolu [μM] 48 a 72 h po ošetření	31
Graf č. 7: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentracích testovacích látek [μM] 48 h po ošetření	32
Graf č. 8: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentracích testovacích látek [μM] 72 h po ošetření	32
Graf č. 9: Frakční viabilita nádorové linie HCT 116 48 h po ošetření 5-FU	34
Graf č. 10: Frakční viabilita nádorové linie HCT 116 72 h po ošetření 5-FU	34
Graf č. 11: Frakční viabilita nádorové linie HCT 116 48 h po ošetření NOCO	34
Graf č. 12: Frakční viabilita nádorové linie HCT 116 72 h po ošetření NOCO	34
Graf č. 13: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 48 h po ošetření 5-FU.....	35
Graf č. 14: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 72 h po ošetření 5-FU.....	35
Graf č. 15: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 48 h po ošetření NOCO.....	36
Graf č. 16: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 72 h po ošetření NOCO.....	36
Graf č. 17: Srovnání relativní a frakční viability buněk linie HCT 116 48 a 72 h po ošetření 5-fluorouracilem o koncentraci $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	37
Graf č. 18: Srovnání relativní a frakční viability buněk linie BxPC3 48 a 72 h po ošetření 5-fluorouracilem o koncentraci $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	37

1 ÚVOD

Rakovina je závažné onemocnění, se kterým se celosvětově potýkají miliony lidí. Současná protinádorová léčba je však zdoluhavá a zatížená celou řadou vážných vedlejších účinků. Ne vždy je možné dosáhnout kompletního vyléčení, a pokud rakovinné buňky vykazují rezistenci, je účinek terapie značně omezen. Řešením těchto problémů je vývoj nových, účinnějších a hlavně bezpečnějších chemoterapeutik. Tento proces je nicméně finančně i časově velmi náročný.

Nedílnou součástí výzkumu je hodnocení cytotoxického, případně antiproliferativního účinku kandidátních léčiv. Asi nejrozšířenějšími *in vitro* testy cytotoxicity jsou eseje založené na redukci tetrazoliových solí mitochondriálními dehydrogenázami (MTT, MTS, XTT atd.). V rámci těchto esejí dochází k normalizaci na kontrolu a obvyklým výstupem je hodnota IC_{50} . I přes to, že se v současnosti jedná o „zlatý standard“ pro hodnocení toxických vlastností látek, nemusí být získané výsledky zcela přesné. V podstatě každá metoda, včetně výše zmíněných esejí, je zatížena určitými chybami. Pokud jsou tyto nepřesnosti způsobené například vyhodnocením odhaleny, je možné je zohlednit, případně eliminovat a zefektivnit tak celý proces vývoje nových léčiv.

2 CÍLE PRÁCE

- Shromáždit odbornou literaturu a sepsat rešerši na dané téma.
- Vybrat vhodný model pro laboratorní testování.
- Studovat aktivitu vybraných látek na modelových buňkách s využitím MTT testu.
- Vyhodnotit výsledky výše zmíněného testu (zohlednění T_{48} , T_{72} MTT a počtu živých a mrtvých buněk před MTT – barvení trypanovou modří, stanovení frakční viability), diskutovat výsledky.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Současná léčiva užívaná v chemoterapii

Rakovina je závažným zdravotně-sociálním problémem 21. století a podle odhadů je celosvětově příčinou téměř každého šestého úmrtí. U mužů je nejčastěji diagnostikována rakovina prostaty, plic, jater, žaludku a kolorekta. U žen pak rakovina prsu a děložního čípku (Bray *et al.*, 2024). Rakovina je multigenní onemocnění charakterizované celou řadou znaků, zejména metabolickými změnami v nádorových buňkách (Ohshima *et al.*, 2021, Pavlova *et al.*, 2022). Vyžaduje tedy komplexní léčbu, která kromě chirurgického zákroku a radioterapie může zahrnovat také chemoterapii.

Chemoterapií se rozumí léčba chemickými látkami, přičemž v současnosti užívaná chemoterapeutika nepůsobí cíleně. Dostávají se však zejména do rychle se dělících buněk a na základě mechanismu jejich účinku je lze rozdělit do několika skupin. Mezi nejrozšířenější řadíme alkylační činidla, antimetabolity, inhibitory mitotického vřeténka, inhibitory topoizomeráz a antibiotika (Bukowski *et al.*, 2020).

Nejdéle užívanými protinádorovými léčivy jsou **alkylační činidla**, která jsou používána již od 40. let minulého století (Goodman *et al.*, 1946). Jejich cytotoxický účinek spočívá v přenosu alkylových funkčních skupin na DNA. Při použití bifunkčních alkylačních činidel dochází k trvalému zesíťování DNA řetězců, což následně narušuje proces replikace a transkripce. Dále může alkylace vyvolat chybné párování nukleotidů, které vede ke vzniku mutací. Vzhledem k mechanismu účinku může být léčba alkylačními činidly spojena se vznikem sekundárních nádorů (Weber, 2015). V současnosti je užíván například dakarbazin a temozolomid k léčbě metastatických melanomů (Wilson *et al.*, 2016) nebo temozolomid a prokarbazin při léčbě maligních gliomů (Kaina, 2023).

Velmi rozsáhlou skupinou protinádorových léčiv jsou **antimetabolity**. Strukturně jsou antimetabolity analogy přirozeně se v buňce vyskytujících metabolitů. V užším slova smyslu se jedná o analoga purinových a pyrimidinových bází, nukleosidů, nukleotidů a analoga kyseliny listové. (Pezzela *et al.*, 2019). Antimetabolity blokují syntézu nukleových kyselin kompeticí s normálními deoxyribonukleotidy. Pokud dojde k jejich začlenění do prodlužujícího se vlákna DNA, představují sterické překážky pro pohyb replikačních vidliček. Některé antimetabolity mohou iniciovat apoptózu přímo skrze aktivaci apoptozomu, prostřednictvím epigenetických modifikací (Ewald *et al.*, 2008) či inhibicí některých enzymů

(Hrubá *et al.*, 2023). V rámci terapie je řada antimetabolitů podávána ve formě proléčiv a k jejich aktivaci dochází až prostřednictvím aktivačních enzymů (kináz) v buňce. Antimetabolitů je dnes v praxi používáno velké množství, například cytrabin a fludarbin k léčbě hematologických malignit nebo 5-fluorouracil při léčbě rakoviny kolorekta a prsu (Hrubá *et al.*, 2023).

Inhibitory dělicího vřeténka, jinak také známé jako mitotické jedy, jsou efektivní při léčbě hematologických i solidních nádorů (Jordan *et al.*, 2004). Tato léčiva se mohou ve specifických místech vázat na molekuly tubulinu a to jak v roztoku, tak také ve struktuře mikrotubulů (Mukhtar *et al.*, 2014). Mikrotubuly jsou vysoce dynamická proteinová vlákna, která neustále procházejí polymerací a depolymerací a jsou zcela zásadní pro řadu buněčných procesů, včetně mitózy (Gudimchuk *et al.*, 2021). Mitotické jedy narušují polymerační dynamiku mikrotubulů a způsobují vznik aberantního dělicího vřeténka (Mukhtar *et al.*, 2014). Výsledkem působení těchto chemoterapeutik je zastavení buněčného cyklu v M fázi a často i následná iniciace apoptózy (Jordan, 2002). Na základě mechanismu účinku lze tato léčiva rozdělit do dvou skupin – na mikrotubuly stabilizující a mikrotubuly destabilizující látky. Mezi tzv. mikrotubuly stabilizující látky, které stimulují polymeraci mikrotubulů, řadíme paklitaxel, docetaxel (Mukhtar *et al.*, 2014) či novější taxany jako kabazitaxel (Muggia *et al.*, 2014). Vinca alkaloidy jako vinkristin, vinblastin nebo vindesin naopak polymeraci mikrotubulů inhibují a jsou označovány jako mikrotubuly destabilizující látky (Mukhtar *et al.*, 2014).

Cílem chemoterapeutik mohou být také pro buňku důležité enzymy jako například topoizomerázy (Baglini *et al.*, 2021). Topoizomerázy obecně katalyzují změny v topologii dvoušroubovice DNA. Tyto enzymy vytváří přechodné jedno-, nebo dvouřetězcové zlomy, které umožňují rozvolnění a rozvinutí DNA během replikace, transkripce či rekombinace (Dehshahri *et al.*, 2020, Singh *et al.*, 2023). Látky cílící na tyto enzymy označujeme jako **inhibitory topoizomeráz** a řadíme sem například irinotekan, topotekan, etoposid, belotekan apod. (Delgado *et al.*, 2018, Thomas *et al.*, 2019). Tato léčiva obvykle po navázání na topoizomerázu brání její vazbě na DNA, nebo naopak stabilizují a zpevňují komplex enzym-DNA. V obou případech je však výsledkem trvalé poškození DNA a znemožnění průběhu replikace (Dehshahri *et al.*, 2020).

Velmi podobný mechanismus účinku má také antibiotikum doxorubicin (Tacar *et al.*, 2013). Kromě doxorubicinu se při léčbě nádorových onemocnění užívají i další

antracyklinová antibiotika jako například mitoxantron nebo adriamycin. Z neantracyklinových pak bleomycin nebo aktinomycin (Gao *et al.*, 2020). Mechanismus účinku jednotlivých antibiotik je i vzhledem k jejich struktuře značně rozmanitý (Kwok *et al.* 2017).

3.2 Preklinické hodnocení lékové odpovědi biologicky aktivních látek

Klinická fáze testování každého léčiva je předcházena fází preklinickou, při které je odpověď na biologicky aktivní látku studována prostřednictvím *in vitro* a *in vivo* testů. *In vitro* studie, tedy studie „ve zkumavce“ a testy na zvířatech – *in vivo*, jsou v současnosti nenahraditelným nástrojem pro posouzení bezpečnosti a účinnosti kandidátního léčiva před vlastním klinickým výzkumem (Zhou *et al.*, 2021).

První dochované zmínky o testování na zvířatech za účelem biomedicínského výzkumu jsou datovány do 4. století př. n. l. do starověkého Řecka, kdy byly prováděny operace a pitvy zejména za účelem studia anatomie. V následujících stoletích testování na zvířatech umožnilo pochopení celé řady anatomických principů (Hajar, 2011, Franco, 2013). Toto rozsáhlé experimentování a testování položilo základy EBM (evidence-based medicine) praxi (Zeng *et al.*, 2015).

Zvířecí modely jsou v současnosti zásadní pro vývoj nových léčiv a medicínské techniky, hodnocení účinnosti experimentálních přípravků či testování bezpečnosti nejrozličnějších nemedicínských produktů, například kosmetiky (Kabene *et Baabel*, 2019, Sakat *et al.*, 2022). Nejčastěji jsou ve výzkumu využívány různé druhy hlodavců, plazů, dále také králíci, některé druhy ryb a bezobratlých (Sakat *et al.*, 2022).

I přes to, že je testování na zvířatech značně regulováno, vyvolává rozsáhlou debatu. V praxi by měla být implementována opatření, která omezí stres a bolest zapojených zvířat. Pokud je to možné, měly by být zváženy jiné metody testování, které živočichy nezahrnují vůbec. Pokud to možné není, měly by být využity fylogeneticky nižší druhy a počet zvířat by měl být snížen na minimum (Stokes *et Marsman*, 2013). Vzhledem k limitům a etickým problémům, které se pojí s využitím zvířecích modelů, byly vyvinuty alternativní formy testování.

Těmito alternativami se rozumí dnes hojně využívané *in vitro* metody. Konkrétně 2D buněčné kultury, 3D buněčné kultury, dále také organoidy, mikrofyzilogické systémy jako orgány na čípech, synteticky připravené tkáně apod. Pro propojení preklinického

testování a vlastní klinické fáze vývoje léku slouží rychle se zdokonalující *in silico* přístupy (Zhou *et al.*, 2021).

Zavedené buněčné kultury představují jednoduchý, rychlý a relativně levný způsob jak testovat efektivitu a toxicitu kandidátního léčiva. Buňky v těchto kulturách buďto vytváří vrstvy a v takovém případě se jedná o adherentní buněčné linie, nebo se nacházejí volně v médiu a jde o kultury suspenzní. Tyto modely nicméně neodrážejí komplexitu tkání mnohobuněčných organismů (Groff *et al.*, 2021, Zhou *et al.*, 2021) a představují spíše homogenní materiál vhodný k porozumění fungování buňky jako takové (Ravi *et al.*, 2015). Věrnější napodobení reálných podmínek poskytují 3D buněčné kultury. Jejich hlavní předností je možnost sledovat vzájemné buněčné interakce a hlavně interakce matrix-buňka, které 2D modely postrádají (Habangar *et al.*, 2021). Nejpokročilejšími modely jsou pak organoidy a tzv. orgány na čípech. Organoidy jsou v podstatě *in vitro* miniatury orgánů, které obsahují několik různých buněčných typů a napodobují funkci a dokonce i architekturu daného orgánu (Xu *et al.*, 2018). Orgány na čípech potom poskytují všechny výhody organoidů, ale kromě toho umožňují na buňky působit i vnějšími biomechanickými a elektrickými podněty (Ahmed *et Teixeira*, 2022).

3.3 Buněčná odpověď na léčiva

Vliv léčiva na buňku je dán celou řadou faktorů – například dávkou účinné látky, jejím uptake, efluxem a záleží také na fázi buněčného cyklu, ve kterém se buňka právě nachází (Tilsed *et al.*, 2022). Působení léčivého přípravku se navíc může měnit v čase, protože buňky mohou v průběhu léčby nabývat rezistence vůči použitému přípravku (Vasan *et al.*, 2019). Rezistence může být zapříčiněna zejména sníženou akumulací léčiva v buňce, a to ať už v důsledku jeho zrychleného výdeje, sníženého příjmu či intenzivního odbourávání na netoxické produkty. Dále zvýšenou intenzitou oprav poškozené DNA či schopností nádorových buněk uniknout apoptóze. Právě vznik rezistencí dnes představuje jednu z hlavních výzev při léčbě onkologických onemocnění (Pan *et al.*, 2016). Navíc bylo experimentálně zjištěno, že mezi jednotlivými nádorovými buňkami existují stochastické genetické, epigenetické a transkriptomické rozdíly. Tato heterogenita potom značně ovlivňuje citlivost nádoru na jednotlivá chemoterapeutika (Dagogo-Jack *et Shaw*, 2018).

3.3.1 Buněčná smrt

Proces buněčné smrti existuje v několika formách a může být vyvolán nejrozličnějšími vnějšími i vnitřními podněty (Xu *et al.*, 2019). Buněčnou smrt je možné na základě etiologie,

morfologie, biochemických charakteristik a následků pro organismus rozdělit do dvou kategorií – na regulovanou buněčnou smrt (RCD) a náhodnou buněčnou smrt (ACD) (Galluzi *et al.*, 2018).

Náhodnou buněčnou smrtí se rozumí neregulovaná nekróza (Majno *et Joris*, 1995). Nekróza je formou pasivní buněčné smrti, která nastává v podstatě okamžitě po vystavení extrémnímu fyzickému, chemickému nebo mechanickému stresu (Galluzi *et al.*, 2018). Často je spojená také se vznikem zánětlivé reakce (Newton *et al.*, 2024).

Hlavní formou regulované buněčné smrti je apoptóza. Tento termín jako první použil australský patolog J. F. R. Kerr v roce 1972 (Kerr *et al.*, 1972). Apoptóza někdy také označovaná jako buněčná sebevražda je proces zcela zásadní pro udržení homeostázi v mnohobuněčném organismu. Průběh apoptózy je přísně regulovaný a evolučně konzervovaný. Fyziologicky je apoptóza důležitá pro embryogenezi i postnatální vývoj, při kterém se podílí například na regeneraci a remodelingu tkání (Kerr *et al.*, 1972, Balaji *et al.*, 2021). Je také přirozenou ochranou před vznikem zhoubných onemocnění (Tong *et al.*, 2022). Pokud je však apoptóza aktivována nadměrně, může dojít ke vzniku neurodegenerativních, autoimunitních či srdečních chorob (Li *et al.*, 2021).

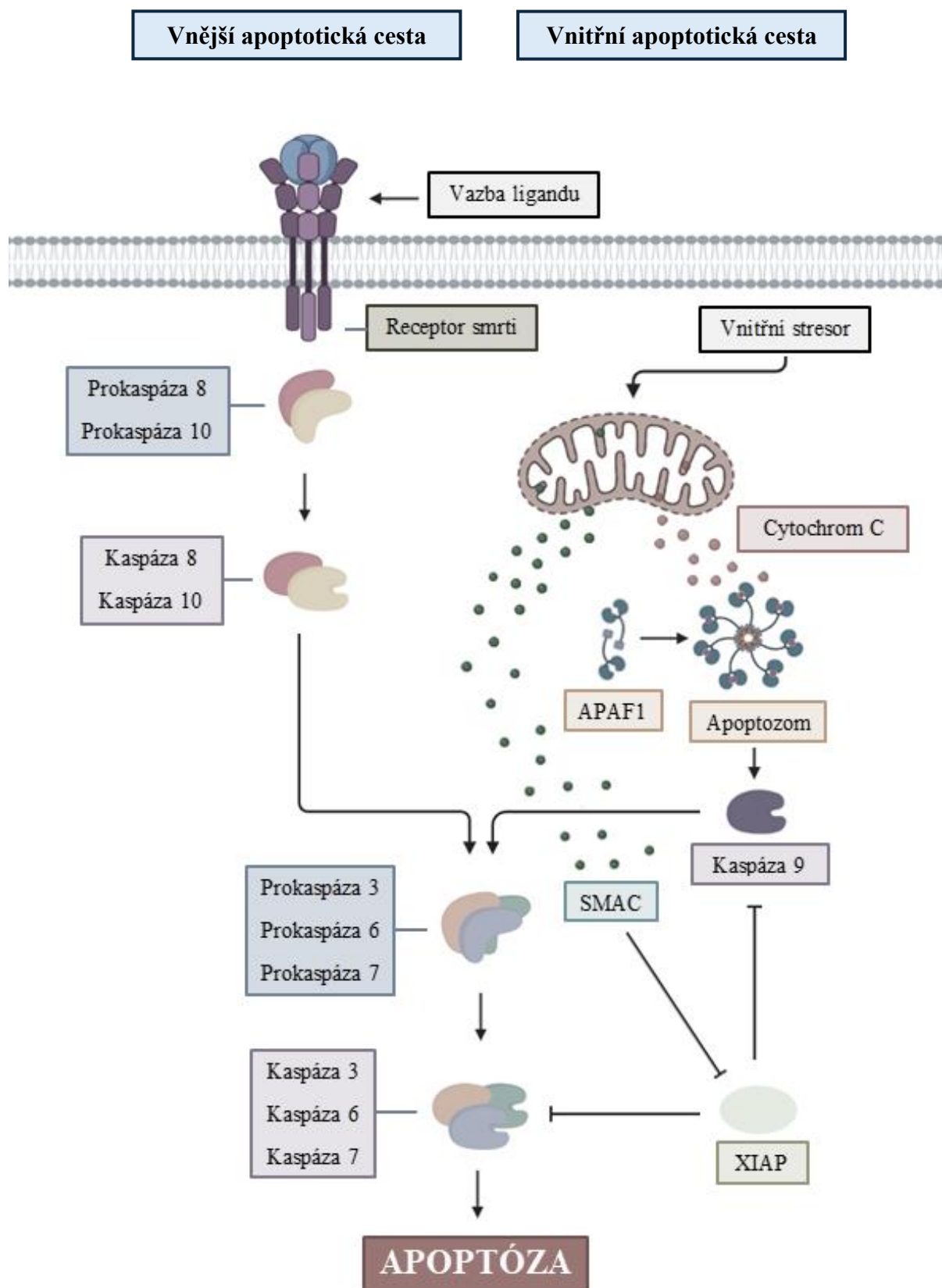
Proces apoptózy může probíhat dvěma způsoby – vnější nebo vnitřní cestou (Galluzi *et al.*, 2018, Balaji *et al.*, 2021), přičemž výsledkem obou mechanismů je aktivace speciálních cysteinových proteáz – kaspáz, které zprostředkují vlastní proces buněčné smrti (Galluzi *et al.*, 2018, Balaji *et al.*, 2021). Obvykle se jedná o reakci tolerogenní, či nulovou, tedy kompletně bez vlivu na imunitní systém (Kroemer *et al.*, 2013).

Vnitřní apoptotická cesta je vyvolána působením vnitřních faktorů jako je například hypoxie, replikační stres, poškození DNA, poruchy při mitotickém dělení, defekty mikrotubulů, aktivace onkogenů nebo zvýšení koncentrace reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Tento signál je následně přenesen do mitochondrií, což vede ke zvýšení permeability jejich vnější membrány a vyplavení apoptotických faktorů jako je SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) protein do cytoplazmy. SMAC inhibuje X-vázaný apoptózu inhibující protein (XIAP), čímž ruší jeho fyzickou vazbu s kaspázami. Současně je z mitochondrií uvolňován také cytochrom C, který se váže na APAF1 (apoptotickou proteázu aktivující faktor 1), ATP a prokaspázu 9 za vzniku tzv. apoptozomu. Apoptozom následně štěpí pro-kaspázu 9 a vzniklá iniciační kaspáza 9 poté proteolyticky aktivuje výkonné kaspázy 3, 6 a 7 (Galluzi *et al.*, 2018, Balaji *et al.*, 2021).

Vnější apoptotická cesta je na rozdíl od té vnitřní aktivována vazbou vnějších ligandů jako TNF α (faktor nádorové nekrózy α) nebo Fas ligand na tzv. receptory smrti. Aktivace receptorů smrti vede k tvorbě signalizačních komplexů indukujících buněčnou smrt (DISC). DISC následně autoproteolyticky aktivuje prokaspázu 8 a částečně prokaspázu 10. Již aktivní kaspáza 8 je uvolněna do cytosolu, kde aktivuje další výkonné kaspázy (Galluzi *et al.*, 2018, Balaji *et al.*, 2021). Srovnání vnější a vnitřní apoptotické cesty je znázorněno na Obrázku 1.

Projevy apoptózy jsou shodné jak v případě vnějšího, tak v případě vnitřního mechanismu, přičemž hlavním projevem je tvorba apoptotických tělísek (ApoBDs). Apoptotická tělíska jsou malé váčky, které vznikají rozpadem buněk, jež zahájily proces programované buněčné smrti. Před kompletním rozpadem a vznikem ApoBDs buňky procházejí rozsáhlými změnami – smršťují se a dochází k pyknóze, tedy k trvalé kondenzaci jaderného chromatinu. To je následováno karyorexi, neboli fragmentací jádra. V průběhu celého procesu se rozpadá cytoplazmatická membrána. Vzniklá apoptotická tělíska jsou následně pohlcena fagocytujícími buňkami, zejména makrofágy a neutrofily a degradována. Tento finální krok je prevencí před vylitím nebezpečného materiálu z ApoBDs a následným rozvojem zánětu (Xu *et al.*, 2019).

Kromě apoptózy bylo objeveno ještě několik dalších alternativních mechanismů regulované buněčné smrti – ferroptóza, nekroptóza, pyroptóza, kuproptóza, alkaloptóza, či autofágie (Galluzi *et al.*, 2018, Balaji *et al.*, 2021, Chen *et al.*, 2021). Na tyto další formy buněčné smrti je možné zacílit v rámci terapie chemorezistentních nádorů, které jsou schopny uniknout apoptóze (Balaji *et al.*, 2021).



Obrázek č. 1: Srovnání vnější a vnitřní apoptotické cesty (převzato a upraveno z Balaji *et al.*, 2021). APAF1: apoptotickou proteázu aktivující faktor 1, SMAC: z angl. second mitochondria-derived activator of caspases, XIAP: X-vázaný apoptózu blokující protein

3.3.2 Snížení intenzity až úplné zastavení proliferace

Rozhodnutí zda buňka zahájí buněčný cyklus a zda dojde k vlastnímu rozdělení, je ovlivněno celou řadou vnitřních i vnějších faktorů. Buňka vstupuje do buněčného cyklu pouze za vhodných podmínek, při kterých dochází k fosforylaci specifických proteinů včetně p107, p130 a retinoblastomového proteinu (Rb). Pokud není Rb protein fosforylován, brání svojí vazbou na chromatin transkripci genů, jež jsou zásadní pro proliferaci. Pokud jsou zmíněné proteiny fosforylovány a buněčný cyklus je zahájen, je regulován kaskádou enzymů označovaných jako cyklin-dependentní kinázy, které jsou řízeny regulačními proteiny cykliny (Pack *et al.*, 2019). V rámci buněčného cyklu existuje několik kontrolních bodů, skrze které buňka prochází. Pokud je při některé z kontrol odhalena chyba, musí být opravena, jinak není buňka schopná pokračovat do další fáze buněčného cyklu (Barnum *et al.*, 2014).

Vnější signálem zastavujícím buněčný cyklus a zpomalujícím proliferaci může být například vysoká denzita buněk charakteristická sníženou koncentrací růstových faktorů (Pack *et al.*, 2019). Vnitřním signálem pak může být poškození intracelulárních struktur, zejména DNA, vyvolané účinnou dávkou chemoterapeutika, vlivem ionizujícího záření při radioterapii či aktivace onkogenů (Wang *et al.*, 2022).

Toto stádium stagnace může být dočasné, ale také trvalé označované jako senescence (He *et al.*, 2017). Senescencí se rozumí nevratné zastavení buněčného cyklu, které je charakteristické indukcí antiproliferativních molekul jakými jsou inhibitory cyklin-dependentních kináz p16 a p21. Tyto inhibitory prostřednictvím defosforylace aktivují Rb protein a p53 signální dráhu (Pack *et al.*, 2019, Yasuda *et al.*, 2023).

Chemoterapie bohužel nevyvolává senescenci pouze v abnormálních nádorových buňkách, ale také v buňkách nenádorových. Buňky s tímto senescentním fenotypem se nepodrobují apoptóze, v organismu se postupem času hromadí a produkují značné množství tzv. SASP faktorů (chemokiny, interleukiny, růstové faktory a proteázy). To vede k rozvoji SASP fenotypu (senescence-associated secretory phenotype) a paradoxně také k další progresi onemocnění. Navíc nádorové buňky, které se dostaly do stavu senescence prostřednictvím terapie, často vykazují rezistenci vůči užívanému léčivu a současně mají také vyšší metastatický potenciál (Yasuda *et al.*, 2023).

3.3.3 Cytotoxicita a cytostáze v klinickém hodnocení léčiv

Většina léčiv dnes užívaných k léčbě rakoviny se řadí mezi tzv. cytotoxické látky. Tyto látky vyvolávají buněčnou smrt trvalým narušením integrity DNA, případně interferencí s procesem buněčného dělení (Blakeley *et* Grossman, 2012). Tato léčiva nejefektivněji usmrcují rychle se dělící buňky, kterými jsou jednak nádorové buňky, ale také buňky gastrointestinálního traktu, imunitního systému nebo vlasové folikuly. Z toho vyplývá, že užívání těchto látek vede jednak ke zmenšení nádoru, ale také k celé řadě vážných vedlejších účinků, včetně myelosuprese nebo alopecie (Serkova *et* Eckhardt, 2016). Právě existence vedlejších účinků je hnací silou pro vývoj nových šetrnějších léčiv, která působí na cíle specifické pro nádorové buňky. Tato cílená léčiva mohou působit cytotoxicky, avšak část z nich se řadí mezi tzv. cytostatika. Cílem těchto látek není vyvolání buněčné smrti, ale snížení proliferace, migrace a angiogeneze (Blakeley *et* Grossman, 2012). Nasazení těchto léčiv tedy nemusí vést ke zmenšení nádoru, ale ke zpomalení až zastavení jeho růstu, což je žádoucí například v metastatické fázi onemocnění (Kummar *et al.*, 2006, Blakeley *et* Grossman, 2012, Serkova *et* Eckhardt, 2016). Tato forma léčby obvykle nevede ke kompletnímu vyléčení pacienta, ale i přes to je cenná, protože zvyšuje délku dožití a kvalitu života. Případný odlišný mechanismus účinku konvenčních chemoterapeutik a cílených léčiv (širší terapeutické okno, nižší dávkování, delší doba pro nástup účinku cílených léčiv) je pak třeba zohlednit také v rámci klinického výzkumu (Kummar *et al.*, 2006).

Zda léčivo vykazuje cytotoxické nebo cytostatické vlastnosti není jednoduché určit, tyto vlastnosti se vzájemně nevylučují. Celá řada chemoterapeutik vyvolává u buněk senescenci, kdy nedochází k proliferaci, ale ani nejsou aktivovány proapoptotické signální dráhy (Wang *et al.*, 2022).

3.4 *In vitro* metody testování buněčné odpovědi

Hodnocení buněčné odpovědi *in vitro* je nedílnou součástí vývoje nových léčiv a v praxi je realizováno nejrozličnějšími metodami. Asi nejjednodušším, ale zároveň také nejméně efektivním způsobem hodnocení cytotoxicity je sledování morfologických změn na buňkách po vystavení testované látce pomocí mikroskopu (Shokrzadeh *et* Mondaloo, 2017). Pokud je látka cytotoxická, budou se buňky po histologickém barvení (např. hematoxylinem) jevit kulaté, případně oválné a intenzivně zbarvené. Typicky

je pozorovatelná také změna velikosti, buňky jsou menší a cytoplazma zahuštěná. Chromatin silně kondenzuje a dochází k fragmentaci jádra (Elmore, 2007, Chen *et al.*, 2024).

Efektivnější než studium morfologie jsou testy cytotoxicity ve vícejamkových deskách, v nichž jsou buňky zvolené buněčné linie ošetřeny širokým spektrem koncentrací testované látky a následně po určitou dobu inkubovány (Hafner *et al.*, 2016, Harris *et al.*, 2016). V závislosti na způsobu vyhodnocení a výpočtu pak výstupní informací těchto testů může být relativní nebo frakční viabilita. Používanější relativní viabilita popisuje životaschopnost populace ošetřené testovanou látkou, která je vztažena na neošetřenou kontrolu. Frakční viabilita pak definuje podíl živých a mrtvých buněk v rámci jedné (ošetřené) populace. Většina léčiv do určité míry ovlivňuje jak proliferaci, tak také buněčnou smrt, ale rozsah indukované inhibice proliferace a buněčné smrti se mezi jednotlivými léčivy liší (Schwartz *et al.*, 2020).

V současnosti jsou techniky pro měření viability často multiplexovány, což znamená, že je viabilita jednoho vzorku analyzována více metodami najednou. Měření více parametrů současně zvyšuje šanci odhalit toxické účinky látek. Tento přístup také zkracuje čas potřebný k analýze, snižuje spotřebu materiálu a tím i náklady testování. Navíc pokud jsou jednotlivé testy prováděny samostatně, existuje mezi nimi variabilita způsobená buňkami, materiálem a vybavením, na kterém jsou experimenty prováděny. V případě multiplexingu jsou tyto rozdíly značně omezeny (Gerets *et al.*, 2011).

3.4.1 Relativní viabilita

Relativní viabilitu lze měřit různými metodami, přičemž mezi ty nejpoužívanější patří kolorimetrické eseje založené na **redukci tetrazoliových solí** mitochondriálními dehydrogenázami (McCauley *et al.*, 2013, Stockert *et al.*, 2018). Mezi tyto soli řadíme žluté **MTT** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), které je přeměňováno na ve vodě nerozpustné formazanové krystaly, které je třeba rozpustit v organickém rozpouštědle, například v DMSO. Tento krok je vynechán při použití **MTS** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium) a **XTT** (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5 sulfofenyl)-5-[(fenylamino)-karbonyl]-2H-tetrazolium). Obě tyto soli jsou redukovány na v médiu rozpustný formazanový produkt. MTS je metabolizováno za vzniku fialového zbarvení, XTT pak za vzniku oranžového zbarvení (Adan *et al.*, 2016, Kabakov *et al.*, 2018, Shokrzadeh *et al.*, 2017). Kromě výše uvedených nejznámějších tetrazoliových solí existují také další, jako například NBT, NTC

nebo TNBT, které jsou užívány v histochemických analýzách (Stockert *et al.*, 2018). Výhodou těchto esejí je nízká cena a široké spektrum využití. Naopak nevýhodou je poměrně dlouhá doba experimentu, toxicita výchozích látek i vznikajících produktů a omezená citlivost (Adan *et al.*, 2016)

Další testy cytotoxicity založené na metabolismu buňky jsou LDH (laktátdehydrogenáza) esej, barvení Almarovou modří či kalcein-AM esej (Adan *et al.*, 2016). V rámci **LDH esej** je měřena aktivita cytoplazmatického enzymu laktátdehydrogenázy uvolněného do kultivačního média z poškozených buněk (Kumar *et al.*, 2018). Tato metoda má relativně nízkou citlivost a během experimentu může dojít ke kontaminaci vzorků endogenní LDH, což může vést k falešně pozitivním výsledkům (Adan *et al.*, 2016).

Velice jednoduchou metodou je **barvení Almarovou modří**. Almarová modř je netoxické barvivo, které je v buňce metabolicky přeměňováno na růžově fluoreskující resofurin. Intenzita fluorescence je přímo úměrná metabolismu a tedy i viabilitě buněk ve vzorku (Dinh *et al.*, 2024).

Kalcein-AM esej jak už její název napovídá, využívá diester kalcein-AM. Ten je rozpustný v lipidech a pasivně prochází cytoplazmatickou membránou. Po transportu do buňky je esterázami rozštěpen za vzniku kalceinu, který je už hydrofilní a akumuluje se v živých buňkách s intaktní plazmatickou membránou. Po excitaci kalcein vydává zelený fluorescenční signál, který je následně kvantifikován (Neri *et al.*, 2001).

Dalším hojně užívaným a vysoce citlivým testem cytotoxicity je **ATP esej**. V rámci tohoto testu je sledována hladina ATP, které je energetickým zdrojem buňky. Pokud je buňka jakkoliv poškozena, snižuje se jeho produkce. V rámci esej je k ošetřeným buňkám přidán enzym luciferáza a jeho substrát luciferin. Luciferin je v přítomnosti ATP luciferázou oxidován na oxyluciferin. Tato změna je doprovázena chemiluminiscencí, přičemž vznikající světlo je následně detekováno a kvantifikováno (Crouch *et al.*, 1993).

Dále existují testy hodnotící cytotoxicitu na základě detekce syntézy DNA, hodnocení formace kolonií apod. (Adan *et al.*, 2016, Shokrzadeh *et Mondaloo*, 2017).

Výstupem většiny těchto esejí je tzv. „dose-response“ křivka. Ta je obvykle sigmoidního tvaru a popisuje závislost buněčné odpovědi na dávce. Z těchto křivek lze odvodit dnes hojně užívané komparativní farmakologické parametry jako „maximal effective concentration“ (E_{max}), „half-maximal effective concentration“ (EC_{50}), „half-maximal

inhibitory concentration“ (IC₅₀) či plochu pod křivkou (AUC) (Hafner *et al.*, 2016, Harris *et al.*, 2016). I přes to, že jsou „dose-response“ křivky standardním způsobem vyhodnocení *in vitro* testů cytotoxicity, mohou poskytovat zkreslené informace o účinnosti testované látky (Haibe-Kains *et al.*, 2013) a to zejména při tzv. „end-point“ metodách, tedy pokud jsou výše uvedené parametry určovány pouze na základě počtu/stavu buněk na konci experimentu (Single *et al.*, 2015, Hafner *et al.*, 2016, Harris *et al.*, 2016).

3.4.2 Frakční viabilita

Při měření frakční viability je třeba do výpočtů zahrnout i tzv. mrtvou frakci, která je při testech měřících relativní viabilitu často ignorována. Stanovení frakční viability je poměrně náročné, protože je potřeba získat větší množství dat, než při měření relativní viability. Kromě podílu živých a mrtvých buněk, je totiž nutné stanovit také celkový počet buněk v dané populaci. Normalizace vůči kontrole se při měření frakční viability neprovádí. Využívány jsou zejména techniky single-cell analýzy jako průtoková cytometrie (Schwartz *et al.*, 2020).

Nicméně pokud je v průběhu experimentu zachována mrtvá frakce, je možné frakční viabilitu měřit i prostřednictvím některých kolorimetrických a fluorimetrických testů. **Barvení trypanovou modří** je založeno na aktivním vylučování barviva živými buňkami s intaktní cytoplazmatickou membránou. Usmrcené buňky trypanovou modř pouze absorbují a získávají tak sytě modré zbarvení (Strober, 2015, Chan *et al.*, 2020). Tato metoda je jednoduchá a relativně levná (Adan *et al.*, 2016), nicméně poměrně málo citlivá a subjektivní. Vyhodnocení by mělo proběhnout do několika minut od přidání barviva, po určité době totiž trypanová modř začíná pronikat i do životných buněk. Dále buňky, které v době měření právě procházejí apoptózou a nejsou ještě zcela usmrceny, mohou barvivo z části vylučovat. Naopak buňky, jejichž membrána je pouze dočasně poškozena, mohou být částečně obarveny a chybně vyhodnoceny jako mrtvé (Altman *et al.*, 1993, Strober, 2015). Vlastní barvení může být ovlivněno také přítomností séra v médiu (Bhuyan *et al.*, 1976). Pokud je třeba vysoce přesné stanovení frakční viability, je možné barvení trypanovou modří vyhodnotit pomocí průtokové cytometrie (Avelar-Freitas *et al.*, 2014).

Značení propidium jodidem je založeno na stejném principu jako barvení trypanovou modří. Propidium jodid je fluorochrom, který se interkaluje do dvoušroubovice DNA a po excitaci emituje světlo červené barvy (Crowley *et al.*, 2016). V kombinaci

s Annexinem V nebo fluorochromem Hoechst 33342 je značení propidium jodidem možné použít pro rozlišení programované buněčné smrti a nekrózy (Kabakov *et al.*, 2018).

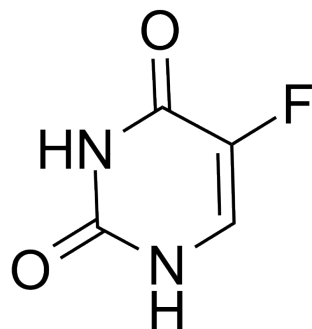
V současnosti jsou k dispozici také vysoce specializované eseje, které umožňují na základě buněčných markerů a příjmu fluorescenčního barviva měřit podíl mrtvých a živých buněk v reálném čase paralelně ve velkém množství vzorků (Forcina *et al.*, 2017).

3.5 Charakteristika testovacích látek

V rámci experimentální části diplomové práce bylo pracováno se dvěma látkami, pyrimidinovým antimetabolitem 5-fluorouracilem a destabilizátorem mikrotubulů nokodazolem.

3.5.1 5-fluorouracil

Fluoropyrimidinové léčivo 5-fluorouracil je řazeno do skupiny antimetabolitů. Syntetizováno bylo již v 50. letech minulého století (Duschinsky *et al.*, 1957) a v roce 1962 jej schválil americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Alzahrani *et al.*, 2023). Jak už název napovídá, strukturně se jedná o uracil. V pozici 5 pyrimidinového kruhu je však vodík substituován atomem fluoru (viz Obrázek 2) (de Bono *et al.*, 2001, Vodenková *et al.*, 2019).



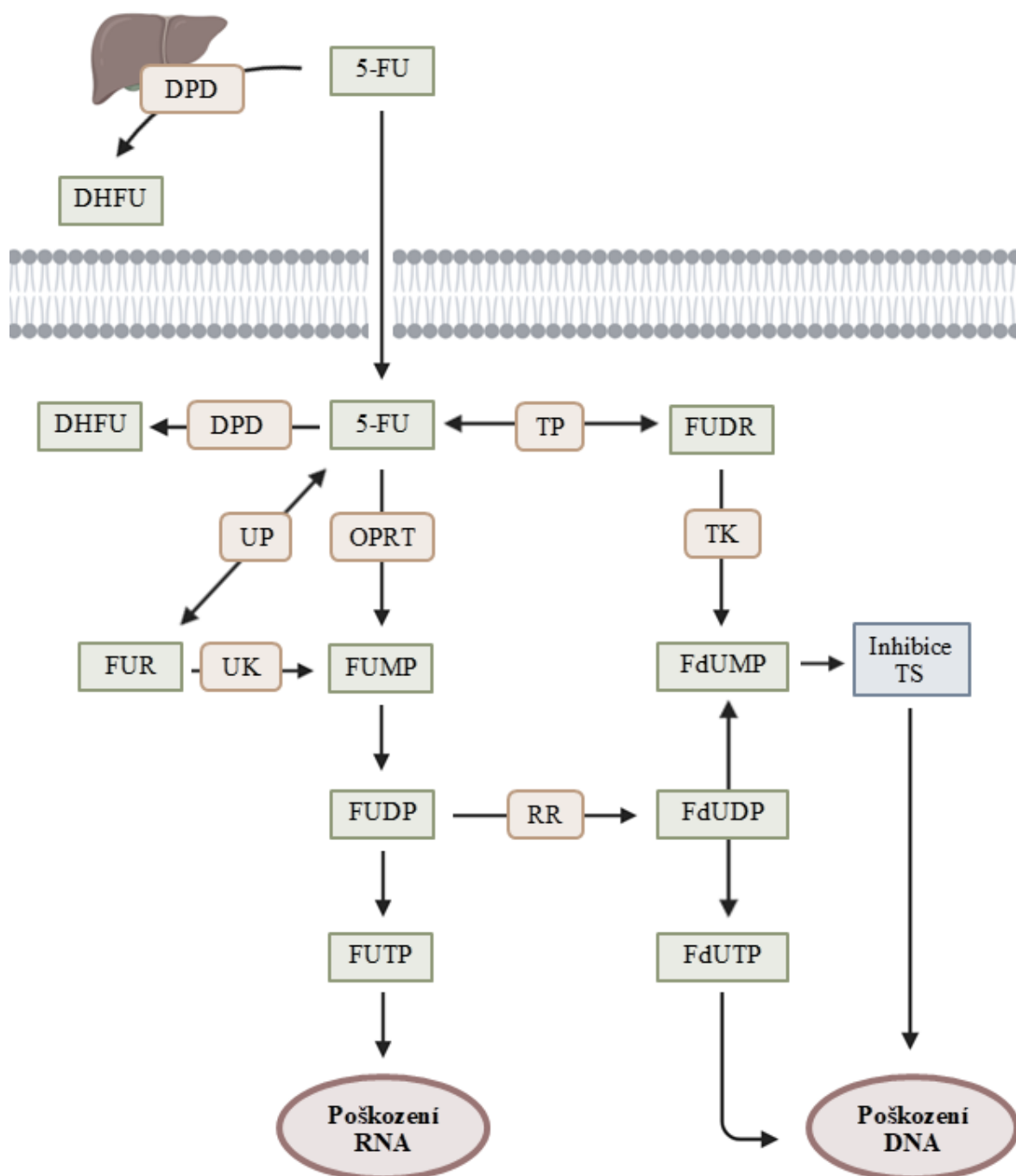
Obrázek č. 2: Struktura 5-fluorouracilu

V současnosti je 5-fluorouracil chemoterapeutikem užívaným k léčbě širokého spektra nádorových onemocnění, zejména pak rakoviny kolorekta (McQuade *et al.*, 2017) a prsu (Johnston *et al.*, 2001). Dále také vaječníků, prostaty, slinivky břišní nebo jater (Walko *et al.*, 2005). 5-fluorouracil je rozpustný ve vodě. Nejčastěji je podáván intravenózně ve formě infuze (Lee *et al.*, 2016) a v některých případech pak také orálně (Vodenková *et al.*, 2019). Pro zvýšení efektivity léčby je v různých režimech kombinován s dalšími léčivy jako například s irinotekanem (Montagnani *et al.*, 2010, Tummalala *et al.*, 2023), cisplatinou nebo oxaliplatinou (Giacchetti *et al.*, 2000, Al-Batran *et al.*, 2019). Mezi vedlejší účinky

5-fluorouracilu patří myelosuprese (Ishibashi *et al.*, 2021), reprodukční (Naren *et al.*, 2022, Pirzaman *et al.*, 2023) a kardiální toxicita (Alter *et al.*, 2006, More *et al.*, 2021) nebo mukozitida (Ribeiro *et al.*, 2016). Právě rozsah a závažnost vedlejších účinků spolu s dalšími faktory jako krátký biologický poločas, nízká absorpce a biodostupnost použití 5-fluorouracilu značně limitují (Entezar-Almahdi *et al.*, 2020). Za účelem snížení vlivu těchto negativních faktorů byla vyvinuta řada proléčiv, například tegafur, doxifluridin či kapecitabin (Hashimoto *et al.*, 2020).

Ihned po administraci je více než 80 % 5-fluorouracilu katabolizováno dihydropyrimidin dehydrogenázou (DPD) na neaktivní 5,6-dihydro-5-fluorouracil (DHFU). Tato deaktivace probíhá zejména v játrech, protože právě v nich je enzym DPD abundantní (Diasio *et al.*, 1989, Longley *et al.*, 2003, Miura *et al.*, 2010). Do buňky je 5-fluorouracil transportován prostřednictvím ekvilibračních nukleosidových transportérů ENT1/2 a koncentračního nukleosidového transportéru CNT2 (Kunicka *et al.*, 2016, Hrubá *et al.*, 2023).

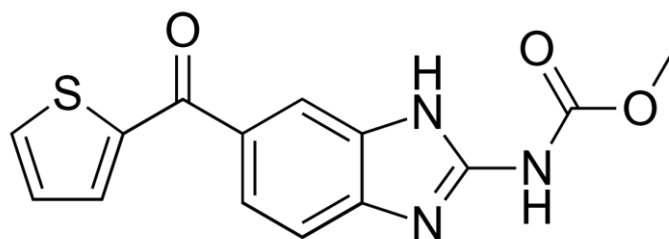
Aby 5-fluorouracil vykazoval účinek, musí být po vstupu do buňky kaskádou reakcí transformován na jeden ze tří aktivních metabolitů, což je znázorněno na Obrázku 3. Aktivace může být přímá prostřednictvím ororát fosforibosyl transferázy (OPRT) nebo nepřímá přes fluorouridin (FUR) za katalýzy uridin fosforylázy (UP) a uridin kinázy (UK). Takto vzniklý fluorouridin monofosfát (FUMP) je fosforylován až na **fluorouridin trifosfát** (FUTP), který svojí inkorporací poškozuje RNA. Druhou variantou je fosforylace FUMP pouze do druhého stupně na fluorouridin difosfát (FUDP). FUDP může být následně ribonukleotid reduktázou (RR) konvertován na **fluorodeoxyuridin difosfát** (FdUDP). Ten je fosforylován na **fluorodeoxyuridin trifosfát** (FdUTP), který následně může být začleněn do dvoušroubovice DNA, čímž způsobí její fragmentaci. Defosforylací FdUDP vzniká **fluorodeoxyuridin monofosfát** (FdUMP). Ten však může vznikat i alternativně přes fluorodeoxyuridin (FUDR) prostřednictvím thymidin fosforylázy (TP) a thymidin kinázy (TK). FdUMP potom vystupuje jako ireverzibilní inhibitor thymidylát syntázy (TS), vytváří s ní ternární komplex a snižuje tak její aktivitu. Díky tomu je inhibována syntéza deoxythymidin monofosfátů, které jsou potřeba při replikaci. Právě inhibice thymidylát syntázy je zřejmě hlavním mechanismem účinku 5-fluorouracilu (Longley *et al.*, 2003, Vodenková *et al.*, 2019, Hrubá *et al.*, 2023).



Obrázek č. 3: Metabolismus 5-fluorouracilu (převzato a upraveno z Longley *et al.*, 2003). 5-FU: 5-fluorouracil, DPD: dihydropyrimidin dehydrogenáza, DHFU: 5,6-dihydro-5-fluorouracil, TP: thymidin fosforyláza, FUDR: fluorodeoxyuridin, UP: uridin fosforyláza, OPRT: ororát fosforibosyl transferáza, TK: thymidin kináza, FUR: fluorouridin, UK: uridin kináza, FUMP: fluorouridin monofosfát, FdUMP: fluorodeoxyuridin monofosfát, TS: thymidylát syntáza, FUDP: fluorouridin difosfát, RR: ribonukleotid reduktáza, FdUDP: fluorodeoxyuridin difosfát, FUTP: fluorouridin trifosfát, FdUTP: fluorodeoxyuridin trifosfát

3.5.2 Nokodazol

Nokodazol je syntetická látka s antimitotickou aktivitou, vyvinutá de Brabanderem v 70. letech minulého století původně jako potenciální protinádorové léčivo (de Brabander *et al.*, 1976). Strukturně je odvozen od 2-aminobenzimidazolu. Na Obrázku 4 je znázorněno, že v pozici 2 je však amino skupina nahrazena methoxykarbonylovou funkční skupinou a v pozici 6 je navázána thiofen karbonylová funkční skupina (Kumar Nayak *et al.*, 2006)



Obrázek č. 4: Struktura nokodazolu

Nokodazol lze zařadit do stejné skupiny antimitotik jako kolchicin, mezi tzv. destabilizátory mikrotubulů. Obecně lze říci, že tyto látky působí buď depolymerizaci mikrotubulů, případně brání jejich další polymerizaci (Čermák *et al.*, 2020).

Nokodazol je vysoce afinitní k β -tubulinu, na který se prostřednictvím vodíkových můstků váže a mění tak konformaci $\alpha\beta$ tubulinového dimeru (Xu *et al.*, 2002, Khattab *et al.*, 2021). Vazba je reverzibilní a vazebné místo se částečně překrývá s vazebným místem pro kolchicin (Wang *et al.*, 2016), pro který je nokodazol v podstatě kompetitivním inhibitorem (Xu *et al.*, 2002, Florian *et al.*, 2016). Nokodazol také zvyšuje GTPázovou aktivitu tubulinu. Rychlejší štěpení GTP vede k tvorbě tzv. TuD podjednotek (tubulin-GDP), což značně modifikuje mikrotubulární dynamiku (Vasquez *et al.*, 1997). Kromě mikrotubulů nokodazol cílí také na některé onkogenní kinázy, například ABL, c-KIT, BRAF, MEK1, MEK2 a MET. Vodíkovými můstky se váže na ATP-vazebné domény těchto kináz a inhibuje tak jejich aktivitu, což je třeba vzít do úvahy při hodnocení jeho protinádorové aktivity (Park *et al.*, 2012).

Účinek nokodazolu na mikrotubulární systém buňky je silně koncentračně závislý. Zatímco vysoké (mikromolární) koncentrace vedou k úplné depolymerizaci mikrotubulů, nízké koncentrace narušují mikrotubulární dynamiku. V závislosti na dávce, dochází k fragmentaci centrozomů, zvyšuje se počet a délka astrálních mikrotubulů, naopak centrální mikrotubuly jsou zkráceny. Častým úkazem jsou také chromozomy nacházející se mimo

metafázní destičku (Jordan *et al.*, 1992, Vasquez *et al.*, 1997). Při kompletní depolymerizaci vznikají oligomery ve formě prstenců, případně dochází ke spiralizaci protofilament (Amos, 2011).

Z výše uvedených projevů jasně vyplývá, že účinek nokodazolu je nejvíce patrný na buňkách procházejících mitózou. Aberantní dělicí vřeténko, které při vystavení nokodazolu vzniká, není schopno správně zachytit a rozdělit chromozomy. Kontrolní systémy tedy inhibují přechod buňky z metafáze do anafáze a to v konečném důsledku vede k zastavení proliferace a k buněčné smrti (Cho *et al.*, 2006, Stanton *et al.*, 2011, Čermák *et al.*, 2020). Za určitých okolností může buňka vynechat proces cytokineze. Poté vstupuje do abnormální G1 fáze, ve které se nachází v tetraploidním stavu. Tento jev nastává zejména při dlouhodobém působení mitotického jedu (Hong *et al.*, 1999, Čermák *et al.*, 2020). Dle Blajeski *et al.* (2002) mohou mikrotubuly destabilizující látky způsobit zastavení proliferace také v G2 fázi buněčného cyklu.

Nokodazol je hojně využíván v primárním výzkumu, například pro synchronizaci buněk v M-fázi buněčného cyklu (Zieve *et al.*, 1980). A i přes to, že není v současné době schválen pro lékařské účely (Khattab *et al.*, 2021, Nicolai *et al.*, 2021) existuje celá řada pre-klinických studií dokazujících jeho terapeutický potenciál (Beswick *et al.*, 2006, Cho *et al.*, 2006, Khattab, 2020)

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Lidská adherentní nádorová linie **HCT 116** odvozená z karcinomu tlustého střeva, získaná z ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, kat.č. 91091005).

Lidská adherentní nádorová linie **BxPC3** odvozená z adenokarcinomu slinivky břišní, získaná z ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, kat.č. 93120816).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie:

- 5-fluorouracil (Sigma-Aldrich, kat.č. 343922)
- Nokodazol (Sigma-Aldrich, kat.č. 487928)
- Médium RPMI 1640 w/ L-Glutamine (Biosera, kat.č. LM-R1640/500)
- Médium DMEM High Glucose w/ Stable Glutamine w/ Sodium Pyruvate (Biosera, kat.č. LM-D1110/500)
- Trypsin – EDTA Solution 10× (Sigma-Aldrich, kat.č. T4174)
- DMSO p.a. (Penta, kat.č. 12640-11000)
- Trypan blue solution (0,4%) (Sigma-Aldrich, kat.č. T8154)
- MTT (Duchefa Biochemie, kat.č. M1415.0005)
- Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, kat.č. P4333)
- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, kat.č. F0850)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, kat.č. S9888)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, kat.č. P3911)
- Dihydrogentetraoxofosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, kat.č. P5655)
- Hydrogentetraoxofosforečnan sodný dodekahydrát (Sigma-Aldrich, kat.č. 04273)

Použité roztoky:

- **10× PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄ · 12H₂O a 2 g KH₂PO₄ rozpustit v 800 ml deionizované vody, upravit pH na hodnotu 7,4 pomocí NaOH
- **1× PBS:** smíchat 100 ml 10× PBS roztoku s 900 ml deionizované vody
- **0,5% roztok MTT:** ve 100 ml nesterilního roztoku 1× PBS rozpustit 0,5 g MTT, následně roztok přefiltrovat

- **Plnohodnotné médium DMEM/RPMI1640:** do obou médií přidat 5 ml streptomycinu (o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a penicilinu (o koncentraci $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 50 ml 10% (w/v) fetálního bovinního séra inaktivovaného při 56°C

Laboratorní pomůcky

- 96jamkové desky (TPP)
- 24jamkové desky (TPP)
- Kultivační lahve 25 cm^2 a 75 cm^2 (TPP)
- Centrifugační zkumavky 15 ml a 50 ml (TPP)
- Automatické pipety o rozsahu 0,1 až 2 μl ; 0,5 až 10 μl ; 5 až 50 μl ; 20 až 200 μl a 100 až 1000 μl (HTL)
- Automatická pipeta multikanálová o rozsahu 10 až 100 μl (Eppendorf)
- Špičky k automatickým pipetám o objemu 10 μl (Ahn, Eppendorf)
- Špičky k automatickým pipetám o objemu 200 μl (Ahn, Eppendorf)
- Špičky k automatickým pipetám o objemu 1000 μl (Eppendorf, GoldenGate)
- Sérologické pipety o objemu 5 ml; 10 ml a 25 ml (Capp)
- Pipetor (TPP)
- Ředící plasty (Biologix)
- Laboratorní plastové misky (Biologix)
- Mikrozukavky 0,6 ml; 1,75 ml a 2 ml (Biocentrix, Eppendorf)
- Škrabka na adherentní buněčné linie (Sarstedt)
- Komůrky do automatické počítačky buněk (Bio-Rad)
- Stojan na zkumavky (TPP)
- Stojan na mikrozukavky (LLG)
- Injekční stříkačka 20 ml (Braun)
- Filtr na injekční stříkačky s velikostí pórů $0,45 \mu\text{m}$ (TPP)
- Folie (Parafilm)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Inkubátor MCO-18ACUV-PE (Panasonic)
- Vodní lázeň SB-12L (Benchmark)
- Stolní centrifuga *miniSpin* plus (Eppendorf)
- Stolní centrifuga myFUGETMMini (Benchmark)
- Centrifuga SIGMA 3-18K (Sartorius)

- Vortex V-1 plus (bioSan)
- Třepačka Orbital shaker OS-20 (Boeco)
- Laminární box SafeFAST Classic 212 (FASTER)
- Inverzní mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- Fotoaparát Canon DS126621 (Canon)
- Multifunkční modulární reader SPARK (Tecan)
- Automatická počítka buněk TC20TM (Bio-Rad)
- Laboratorní váhy HM-200 (A&D)
- Systém pro úpravu vody Direct-Q 3 UV (Merck Milipore)
- Lednice a mrazák (Liebherr)

4.4 Softwarové vybavení

- GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software)
- Microsoft Office Excel (Microsoft)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 Kultivace buněk, sazení

V rámci experimentální části byly využity dvě adherentní nádorové buněčné linie lišící se svým původem a rychlostí dělení. Nádorová buněčná linie HCT 116 odvozená z karcinomu tlustého střeva, která jedním buněčným cyklem projde za 18 hodin (Esch *et al.*, 2020) a nádorová buněčná linie BxPC3 odvozená z adenokarcinomu slinivky břišní s délkou buněčného cyklu 48 až 60 hodin (Tan *et al.*, 1986).

Buňky nádorových linií HCT 116 i BxPC3 byly dlouhodobě uchovávány v tekutém dusíku v připravených alikvotech o objemu 1 ml. Před vlastní kultivací bylo třeba buňky obou linií rozmrazit. Rozmrazení bylo provedeno dle standardního protokolu.

Kultivace probíhala v kultivačních lahvích T75 a T25 v kompletních kultivačních médiích s přidavkem penicilinu ($10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$), streptomycinu ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 10% (w/v) tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra. Pro buněčnou linii HCT 116 bylo využíváno Dulbeccovo modifikované médium (DMEM) a v případě buněčné linie BxPC3 pak médium RPMI 1640. Buňky byly uchovávány v inkubátoru ve 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Po celou dobu experimentů byly buňky pravidelně pasážovány. Buněčná linie HCT 116 byla pasážována vždy dvakrát týdně, linie BxPC3 pouze jednou.

Před pasáží byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a byla zhodnocena jejich konfluence. Pasáž byla obvykle provedena, když konfluence dosáhla 90 % a více. Celý proces vždy probíhal za aseptických podmínek v laminárním boxu. V prvním kroku bylo odsáto staré kultivační médium a buňky byly opláchnuty 1× PBS. Následně byl na 3 minuty připipetován roztok trypsin/EDTA. Po uvolnění buněk ode dna kultivační lahve bylo přidáno dostatečné množství čerstvého kultivačního média. Buňky linie BxPC3 bylo třeba sklízet za pomoci speciální škrabky. Následně byly buňky důkladně resuspendovány, byl změřen jejich počet a viabilita pomocí automatické počítačky TC20TM. Na závěr bylo příslušné množství buněk přeneseno do nové kultivační lahve s čerstvým kultivačním médiem a ta byla umístěna zpět do inkubátoru. Objemy jednotlivých látek byly vždy přizpůsobeny objemu kultivační lahve, se kterou bylo pracováno (viz Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Objem PBS, roztoku trypsin/EDTA a média v používaných kultivačních lahvích

	Kultivační lahev 25 cm ² (T25)	Kultivační lahev 75 cm ² (T75)
1× PBS	3 ml	5 ml
Trypsin/EDTA	0,5 ml	1 ml
Celkový objem média v lahvi	4 ml	15 ml

Na kultivační lahev T25 bylo sazeno mezi 250 a 500 tisíci buněk. Na lahev T75 potom mezi 750 tisíci a 1 milionem buněk v závislosti na rychlosti jejich růstu. Současně s pasáží byly buňky také sazeny na desky pro jednotlivé experimenty.

4.5.2 Test cytotoxicity (MTT esej)

Relativní viabilita byla měřena prostřednictvím kolorimetrického MTT testu. Tento test je založen na přeměně rozpustné žluté methyltetrazoliové soli, tzv. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný fialový formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenylformazan). Tato konverze je možná pouze v metabolicky aktivních buňkách a je zprostředkována mitochondriálními dehydrogenázami. Množství vzniklých formazanových krystalů je tedy přímo úměrné aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz a tedy i životnosti buněk (Mosmann, 1983, Grela *et al.*, 2018).

MTT esej byla prováděna ve 48 a 72 hodinovém módu. První den byly buňky vysazeny na 96jamkové desky. V případě linie HCT 116 bylo sazeno 1500 buněk na jamku, u linie BxPC3 pak 5000 buněk na jamku, a to vždy ve 100 µl kultivačního média. Takto připravené desky byly uloženy v inkubátoru do druhého dne. Po 24 hodinách následovalo ošetření 5-fluorouracilem a nokodazolem v příslušných koncentracích (viz Tabulka 2). Obě léčiva byla rozpuštěna v DMSO a ředěna v kultivačním médiu, přičemž koncentrace rozpouštědla nikdy nepřesáhla 1 % (v/v).

Tabulka č. 2: Výsledný rozsah koncentrací testovacích látek v 200 µl média při MTT esejí

	Koncentrace 5-fluorouracilu	Koncentrace nokodazolu
HCT 116	0,781-200 µmol·l ⁻¹	0,098-25 µmol·l ⁻¹
BxPC3	0,488-250 µmol·l ⁻¹	0,01-5 µmol·l ⁻¹

Takto ošetřené byly buňky inkubovány po dobu 48 a 72 hodin za standardních kultivačních podmínek. Po uplynutí tohoto času, tedy čtvrtý, respektive pátý den bylo k buňkám přidáno 10 µl 0,5% MTT. Poté následovala 4 hodinová inkubace. Po ní bylo z desky odstraněno médium. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl 100% DMSO a desky byly na 30 minut umístěny na třepačku. Po úplném rozpuštění formazanových krystalů byla spektrofotometricky proměřena intenzita vzniklého fialového zbarvení při vlnové délce 570 nm (reference při 630 nm). Získané hodnoty byly dále zpracovávány v programech Excel a GraphPad Prism 8 a byla vypočtena relativní viabilita dle vzorce:

$$\text{relativní viabilita [\%]} = \frac{\text{průměrná absorbance ošetřených buněk}}{\text{průměrná absorbance kontrolních buněk}} \times 100$$

4.5.3 Barvení trypanovou modří

Barvení trypanovou modří je jednoduchá kolorimetrická metoda, která funguje na principu aktivního transportu modrého azo barviva derivovaného z toluidinu skrze buněčnou membránu (González-Martín-Moro, 2022). Po přidání barviva jsou mrtvé buňky výrazně modře obarveny. Živé buňky, které mají intaktní buněčnou membránu, naopak barvivo aktivně transportují ven (Avelar-Freitas *et al.*, 2014, Chan *et al.*, 2020, Strober, 2015). Prostřednictvím této metody byla měřena tzv. frakční viabilita.

Experimenty byly prováděny stejně jako MTT esej v 48 a 72 hodinovém módu, ale ve větších, 24 jamkových deskách. Sazeno bylo vždy 50 000 buněk na jamku v 250 µl

kultivačního média. Takto připravené desky byly po dobu 24 hodin uloženy v inkubátoru. Poté byly buňky ošetřeny zvolenými koncentracemi 5-fluorouracilu a nokodazolu (viz Tabulka 3).

Tabulka č. 3: Výsledná koncentrace 5-fluorouracilu a nokodazolu v 500 µl média při barvení trypanovou modří

5-fluorouracil	3,13 µmol·l ⁻¹	25 µmol·l ⁻¹	150 µmol·l ⁻¹	200 µmol·l ⁻¹
Nokodazol	0,098 µmol·l ⁻¹	0,195 µmol·l ⁻¹	0,391 µmol·l ⁻¹	0,781 µmol·l ⁻¹

Roztoky obou látek byly připraveny a naředěny stejně jako při MTT esaji. Ošetřené buňky byly inkubovány za standardních kultivačních podmínek po dobu 48, respektive 72 hodin. Aby bylo měření validní, bylo třeba uchovat i mrtvé buňky. Proto bylo z každé jamky odebráno kultivační médium a přeneseno do řádně označené 1,75ml mikrozkušavky. Následně byly živé přisedlé buňky promyty 250 µl roztoku 1× PBS, přičemž oplachové PBS následně uchováváno nebylo. Po promytí bylo k buňkám připipetováno 100 µl roztoku trypsin/EDTA. Po 4 minutách v inkubátoru bylo do jamek napipetováno 500 µl příslušného kultivačního média a buňky v něm byly důkladně resuspendovány. Buněčná suspenze byla následně kvantitativně přenesena do mikrozkušavky k odpovídající dříve odebrané mrtvé frakci. Obsah zkumavky byl důkladně promíchán. Poté bylo v 0,6ml mikrozkušavce smícháno 10 µl buněčné suspenze s 10 µl 0,4% roztoku trypanové modři a byla změřena buněčná viabilita na automatické počítačce TC20TM. Smíchání buněčné suspenze a trypanové modři bylo vždy provedeno těsně před vlastním měřením viability. Výpočet frakční viability proběhl dle vzorce:

$$\text{frakční viabilita [\%]} = \frac{\text{počet životaschopných buněk/ml}}{\text{celkový počet buněk/ml}} \times 100$$

5 VÝSLEDKY

5.1 Výběr nádorových linií a testovacích látek

Prvním úkolem předkládané diplomové práce bylo vybrat vhodný model pro testování relativní a frakční viability, konkrétně zvolit vhodné buněčné linie a látky pro testování. Pro experimentální práci byly vybrány dvě lidské nádorové linie. Linie HCT 116 odvozená z karcinomu tlustého střeva a linie BxPC3 odvozená z adenokarcinomu pankreatu. Hlavním kritériem při výběru těchto buněčných linií byla délka jejich buněčného cyklu, přičemž cílem bylo vybrat linie, jež se v tomto parametru co nejvíce liší. Buněčná linie HCT 116 byla zvolena jako rychle se dělící, buněčná linie BxPC3 pak jako pomalu se dělící.

Od výběru nádorových linií se následně odvíjela volba testovacích látek. Testovací látky byly nejdříve hledány na základě nádorových onemocnění, ze kterých jsou vybrané buněčné linie odvozeny. Dalším hodnotícím parametrem byl mechanismus jejich účinku. Pro přehlednost nebyly voleny kombinace léčiv, ale pouze samostatné látky.

Cílem bylo opět zvolit dvě různorodé sloučeniny. Jako zástupce cytotoxických látek byl vybrán 5-fluorouracil. Nokodazol byl zvolen jakožto zástupce látek cytostatických. Nokodazol momentálně není schváleným léčivem, nicméně je hojně využíván v primárním výzkumu a v laboratoři byl dostupný.

5.2 Měření relativní viability pomocí MTT eseje

Pomocí MTT eseje byla měřena relativní viabilita, přičemž veškeré výsledky byly normalizovány na kontrolu. Kontrolní buňky byly kultivovány v médiu a v médiu s přídavkem vehikula (DMSO). Výstupem byla hodnota IC_{50} , což je koncentrace, při které látka vykazuje 50 % svého maximálního inhibičního účinku (Aykul *et* Martinez-Hackert, 2016). Experimenty byly nejdříve prováděny na buněčné linii HCT 116 a až následně na linii BxPC3. Pro přehlednost výsledků je souhrnná Tabulka č. 6 rozdělena na dílčí části a ty jsou uvedeny v textu, který se k nim odkazuje.

Na základě publikací (Zhao *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2022, Ardil *et* Alper., 2022) bylo prvotní rozmezí koncentrací testovacích látek pro MTT esej na buněčné linii HCT 116 nastaveno na $0,195 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po prvním MTT testu se nicméně ukázalo, že v tomto rozsahu koncentrací nebude hodnota IC_{50} získána ani pro jednu z testovacích látek. Rozsah koncentrací byl tedy přehodnocen. Pro 5-fluorouracil bylo nutné testované rozmezí koncentrací zvýšit. Naopak pro nokodazol bylo třeba počáteční koncentraci snížit. V rámci

dalších testů bylo rozmezí koncentrací nastaveno na 0,781 až 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 5-fluorouracil a 0,049 až 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro nokodazol. V případě nokodazolu byl rozsah koncentrací z důvodu úspory testovací látky ještě jednou snížen, a to na 0,01 až 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Účinek obou testovacích látek byl hodnocen po 48 a 72 hodinách.

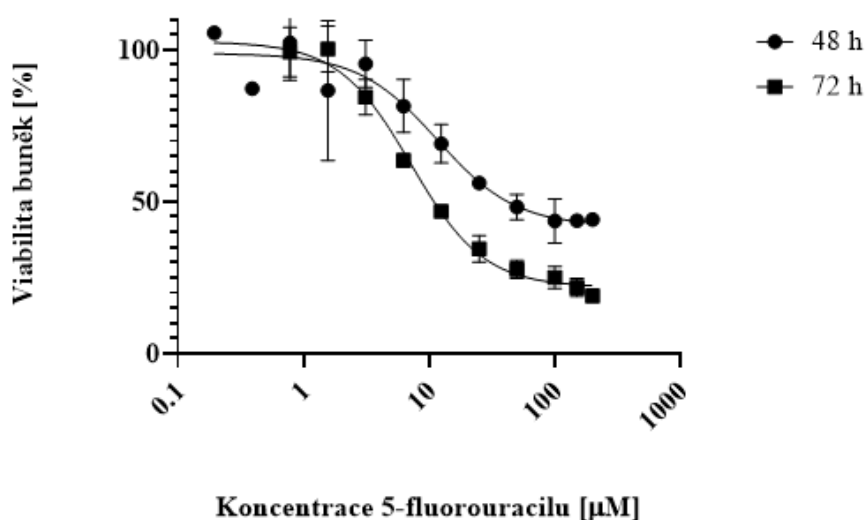
Hodnota IC_{50} 5-fluorouracilu 48 hodin po ošetření odpovídala $44,3 \pm 7,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, po 72 hodinách pak $11,0 \pm 1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 4). Hodnota IC_{50} 5-fluorouracilu byla po 72 hodinové inkubaci 4× nižší než po 48 hodinové inkubaci.

Tabulka č. 4: Hodnoty IC_{50} (v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatné odchylky získané MTT esejemi pro obě testovací látky, nádorová linie HCT 116

	5-fluorouracil				Nokodazol			
	48 h		72 h		48 h		72 h	
	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.
HCT116	44,3	7,4	11,0	1,5	0,095	0,016	0,036	0,011

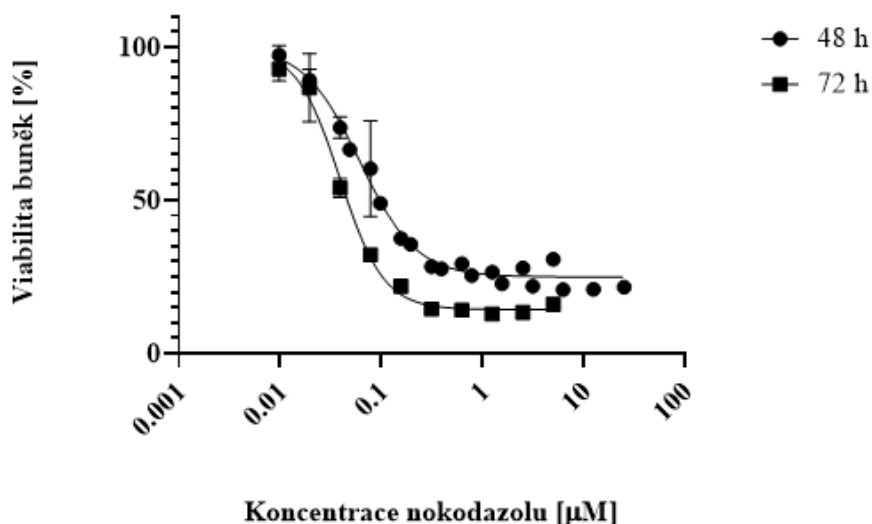
Výsledky jsou uvedeny jako průměry $\pm$ směrodatná odchylka (s. o.) získané ze tří nezávislých měření provedených v duplikátu

Závislost viability buněk nádorové linie HCT 116 na koncentraci 5-fluorouracilu je zobrazen v Grafu č. 1. „Dose response“ křivka ukazuje, že viabilita buněk klesá se rostoucí koncentrací léčiva. Nástup účinku 5-fluorouracilu je pozvolný a s prodlužujícím se časem se účinek zvyšuje.



Graf č. 1: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentraci 5-fluorouracilu [μM] 48 a 72 h po ošetření

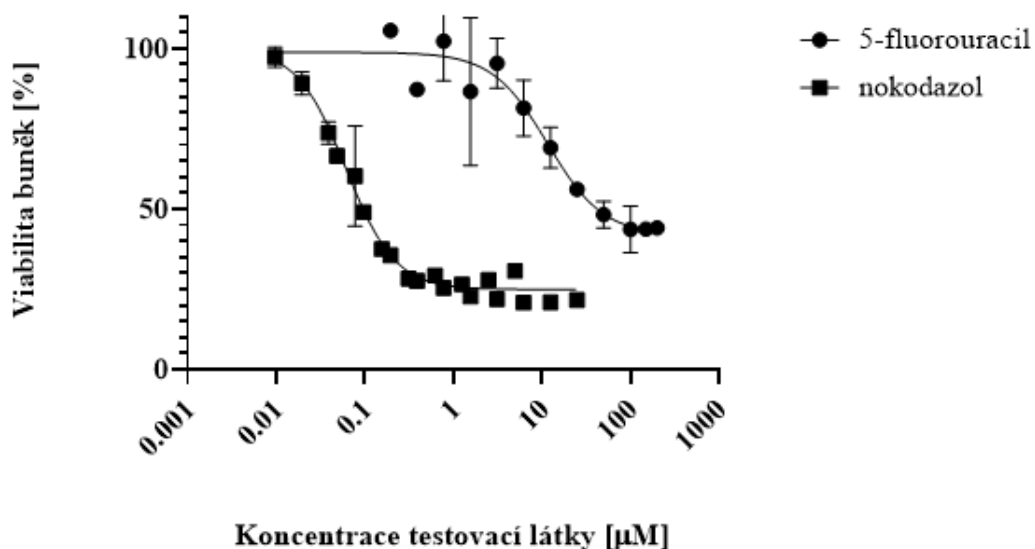
Nokodazol při všech provedených MTT testech vykazoval výrazně vyšší účinek a to i při nižších koncentracích než 5-fluorouracil. Po 48 hodinové inkubaci byla hodnota IC_{50} nokodazolu $0,095 \pm 0,016 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, po 72 hodinách potom $0,036 \pm 0,011 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 4). Zaznamenán byl tedy téměř trojnásobný pokles – rozdíl mezi jednotlivými časy není tak výrazný jako u 5-fluorouracilu. Účinek různých koncentrací nokodazolu na buňky nádorové linie BxPC3 po 48 i 72 hodinách je zobrazen na Grafu č. 2.



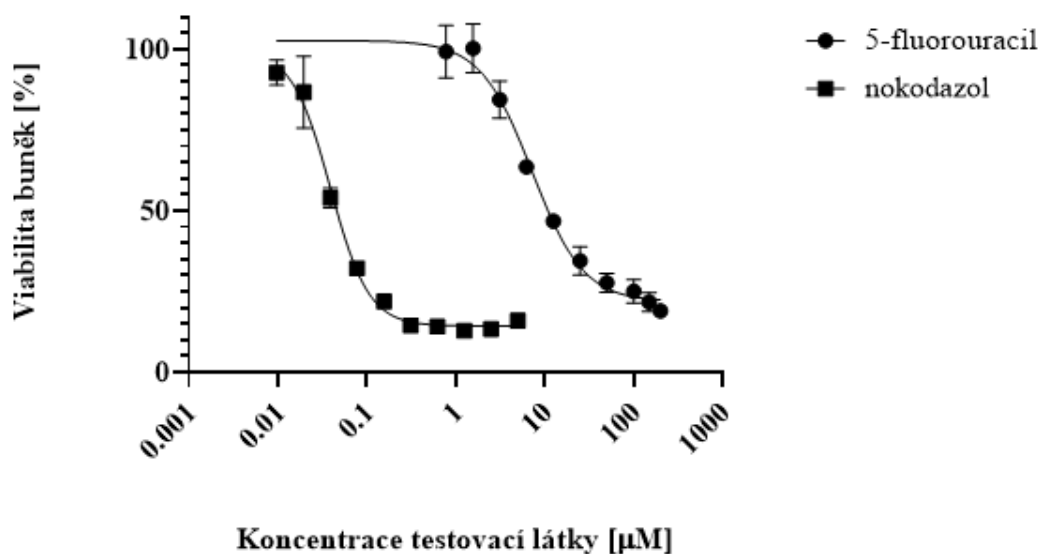
Graf č. 2: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentraci nokodazolu [μM] 48 a 72 h po ošetření

Srovnání působení 5-fluorouracilu a nokodazolu po 48 hodinách je znázorněno na Grafu č. 3. Z tohoto grafu vyplývá, že účinek nokodazolu nastupuje při nižších koncentracích a mechanismus účinku je pravděpodobně jiný než u 5-fluorouracilu. Průběh křivek také ukazuje, že 5-fluorouracil nedosahuje stejně vysokého účinku jako nokodazol, a to ani v nejvyšších testovaných koncentracích. IC_{50} 5-fluorouracilu je pro tento čas téměř 466× vyšší než IC_{50} nokodazolu (viz Tabulka č. 4).

Porovnání účinku obou látek po 72 hodinách je znázorněno na Grafu č. 4. Zde je patrné, že se účinek 5-fluorouracilu přiblížil maximálnímu pozorovanému účinku nokodazolu více, než tomu bylo po 48 hodinách. Při srovnání hodnot IC_{50} však stále nalezneme výrazný rozdíl. Hodnota IC_{50} 5-fluorouracilu je téměř 306× vyšší, z čehož vyplývá, že nokodazol byl v rámci této buněčné linie potentnějším léčivem.



Graf č. 3: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentracích testovacích látek [μM] 48 h po ošetření



Graf č. 4: Závislost viability nádorové linie HCT 116 na koncentracích testovacích látek [μM] 72 h po ošetření

V počátcích práce s buněčnou linií BxPC3 bylo využito optimalizace provedené na linii HCT 116. Rozptyl koncentrací pro 5-fluorouracil byl nejdříve nastaven na $0,781 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Stanovení hodnoty IC_{50} však nebylo v rámci tohoto rozmezí příliš úspěšné. Rozsah koncentrací byl následně upraven na $0,488 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až 250

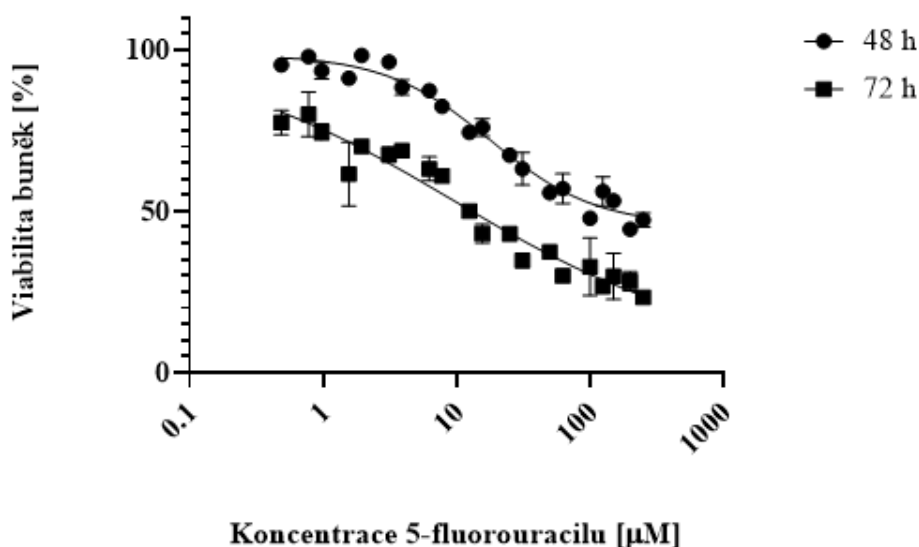
$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace nokodazolu byla pro všechna měření zachována v rozsahu $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabulka č. 5: Hodnoty IC_{50} (v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatné odchylky získané MTT esejemi pro obě testovací látky, nádorová linie BxPC3

	5-fluorouracil				Nokodazol			
	48 h		72 h		48 h		72 h	
	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.
BxPC3	104,2	13,3	13,1	1,8	0,045	0,005	0,032	0,006

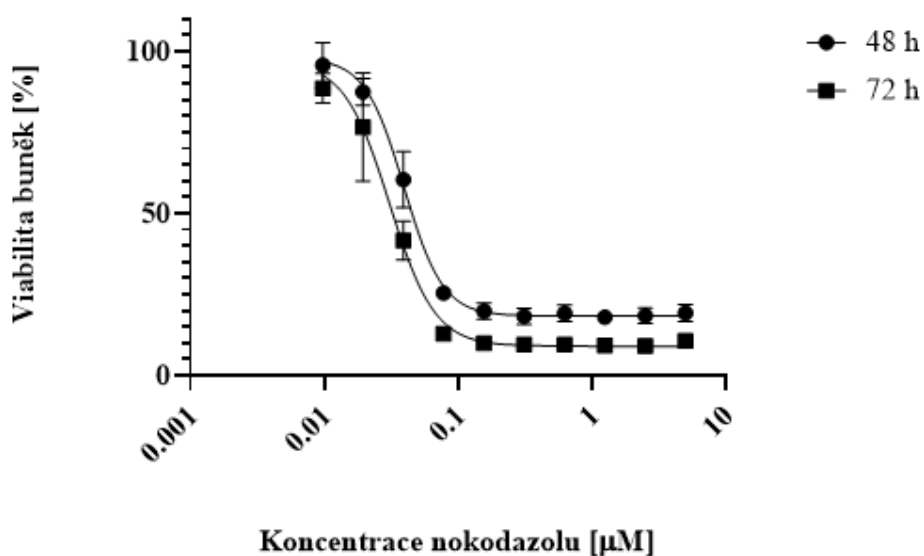
Výsledky jsou uvedeny jako průměry $\pm$ směrodatná odchylka (s. o.) získané ze tří nezávislých měření provedených v duplikátu

Hodnota IC_{50} 5-fluorouracilu při vyhodnocení po 48 hodinách odpovídala $104,2 \pm 13,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a po 72 hodinách $13,1 \pm 1,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 5). Mezi jednotlivými časy je tedy zjevné výrazné snížení, konkrétně 8 $\times$. Závislost viability buněk nádorové linie BxPC3 na koncentraci 5-fluorouracilu je zobrazena na Grafu č. 5. Z tohoto grafu vyplývá, že s rostoucí koncentrací a s prodlužujícím se časem, se zvyšuje účinnost testovací látky. Obdobný průběh má také „dose response“ křivka 5-fluorouracilu pro buněčnou linii HCT 116.



Graf č. 5: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentraci 5-fluorouracilu [μM] 48 a 72 h po ošetření

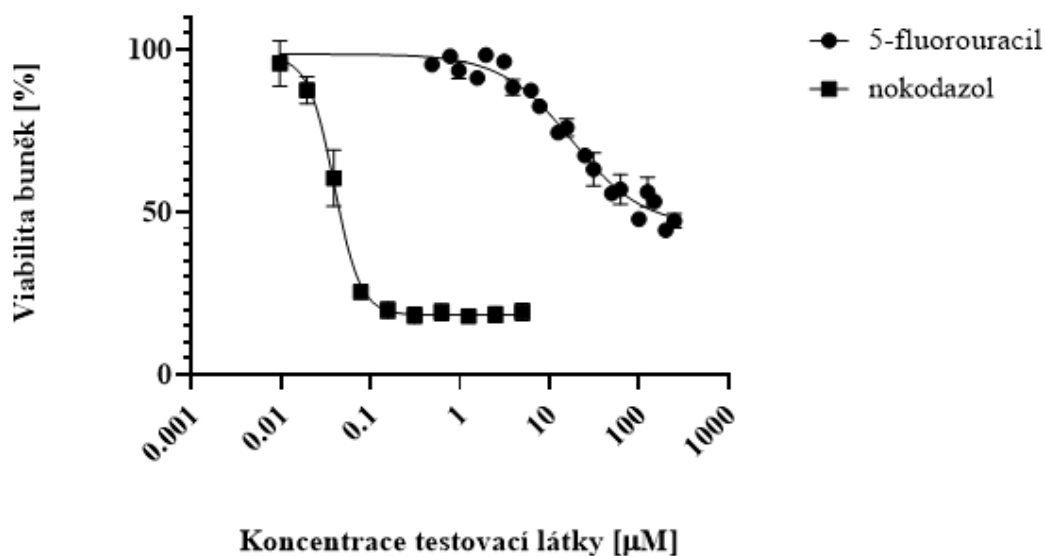
Hodnota IC_{50} nokodazolu 48 hodin po ošetření odpovídala $0,045 \pm 0,005 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a po 72 hodinách pak $0,032 \pm 0,006 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 5). Jedná se o nejméně výrazné snížení hodnoty IC_{50} ze všech testovaných variant – pouze 1,4×. Z Grafu č. 6 je patrné, že účinek nokodazolu na buněčnou linii BxPC3 je značný již po 48 hodinách. Průběh „dose response“ křivek odpovídá průběhu sledovanému u nádorové linie HCT 116.



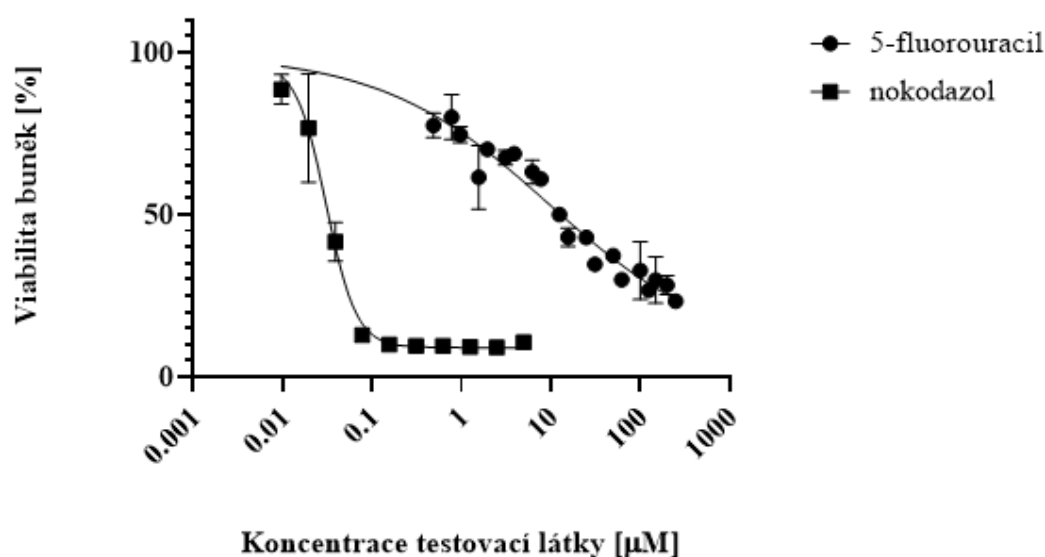
Graf č. 6: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentraci nokodazolu [μM] 48 a 72 h po ošetření

Účinek 5-fluorouracilu a nokodazolu na buněčnou linii BxPC3 po 48 hodinách je znázorněn na Grafu č. 7. Hodnota IC_{50} 5-fluorouracilu je 2316× vyšší než IC_{50} nokodazolu (viz Tabulka č. 5). Na Grafu č. 7 je vidět, že opět ani nejvyšší testovaná koncentrace 5-fluorouracilu nedosahuje stejného účinku jako řádově nižší dávky nokodazolu.

Po 72 hodinách je patrný stejný trend (viz Graf č. 8), i když nejvyšší testované koncentrace 5-fluorouracilu se k maximálnímu pozorovanému účinku nokodazolu přibližují více. IC_{50} 5-fluorouracilu je 409× vyšší než IC_{50} nokodazolu (viz Tabulka č. 5). Podobný průběh křivek bylo možné pozorovat také u linie HCT 116.



Graf č. 7: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentracích testovacích látek [μM] 48 h po ošetření



Graf č. 8: Závislost viability nádorové linie BxPC3 na koncentracích testovacích látek [μM] 72 h po ošetření

Celkově z provedených MTT esejí a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že potentnější testovací látkou byl v případě obou linií nokodazol (viz Tabulka č. 6). U 5-fluorouracilu byl na druhou stranu viditelný výraznější pokles viability mezi studovanými časy. Z pohledu léčiv byl 5-fluorouracil účinnější na nádorové linii HCT 116, nokodazol potom na linii BxPC3.

Tabulka č. 6: Souhrnné výsledky – hodnoty IC_{50} (v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatné odchylky získané MTT esejemi pro obě testovací látky, nádorová linie HCT 116 i BxPC3

	5-fluorouracil				Nokodazol			
	48 h		72 h		48 h		72 h	
	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.	IC_{50}	s. o.
HCT116	44,3	7,4	11,0	1,5	0,095	0,016	0,036	0,011
BxPC3	104,2	13,3	13,1	1,8	0,045	0,005	0,032	0,006

Výsledky jsou uvedeny jako průměry $\pm$ směrodatná odchylka (s. o.) získané ze tří nezávislých měření provedených v duplikátu

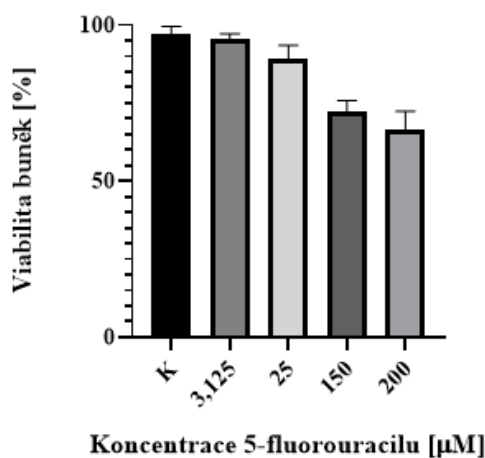
Z tvaru křivek popisujících závislost viability na koncentraci 5-fluorouracilu (viz Graf č. 1 a 5) vyplývá, že by bylo vhodné testovat i vyšší koncentrace léčiva. Na rozdíl od nokodazolu, nebylo ani jednou dosaženo plateau fáze a je tedy možné, že při vyšších koncentracích by se viabilita buněk ještě dále snižovala. Průběh křivek také odpovídá mechanismu účinku testovacích látek.

5.3 Měření frakční viability prostřednictvím barvení trypanovou modří

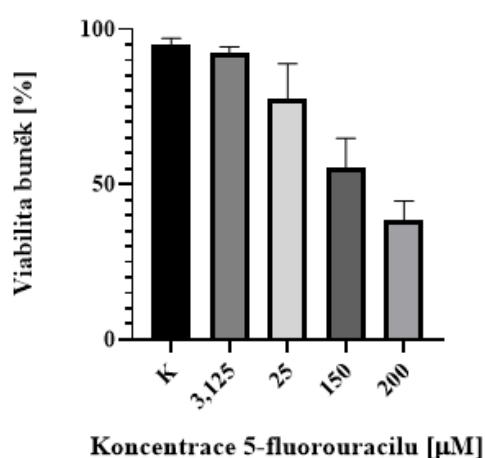
Pomocí barvení trypanovou modří byla stanovována frakční viabilita. Na rozdíl od MTT esejí nebyla v rámci těchto měření provedena normalizace na kontrolu. Experimenty stejně jako v případě MTT esejí byly nejdříve prováděny na buněčné linii HCT 116 a až následně na linii BxPC3. Koncentrace testovacích látek byly stanoveny na základě výsledků MTT testů. Pro 5-fluorouracil byly zvoleny koncentrace 3,125; 25; 150 a 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro nokodazol pak 0,098; 0,195; 0,391 a 0,781 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kontroly byly zachovány jako při MTT esejích, nicméně pro přehlednost jsou v grafech zaneseny pouze kontroly bez vehikula (kontroly s vehikulem vykazovaly viabilitu srovnatelnou s kontrolami bez něj). Vyhodnocení proběhlo opět po 48 a 72 hodinách. Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí Studentova t-testu, přičemž hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní. Experimenty byly prováděny v triplicátu a ve třech nezávislých opakováních.

Frakční viabilita buněk nádorové linie HCT 116 48 a 72 hodin po ošetření 5-fluorouracilem je znázorněna na Grafu č. 9 a č. 10. Z Grafu č. 9 vyplývá, že 48 hodin po ošetření je stále více než 50 % buněk životných a to i v případě nejvyšší použité koncentrace. Po 72 hodinách je patrný pokles viability buněk kultivovaných s přidavkem 150 a 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5-fluorouracilu. Právě mezi těmito hodnotami byl nalezen statisticky významný rozdíl. U koncentrace 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ také došlo ke snížení viability, nicméně tento

pokles nebyl statisticky signifikantní. Z grafů lze dále vyčíst, že s prodlužujícím se časem účinek 5-fluorouracilu roste.

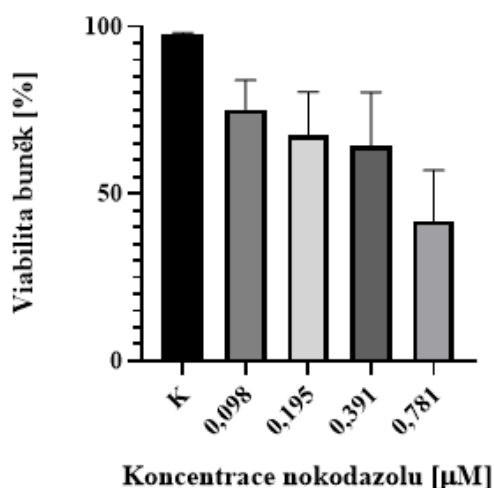


Graf č. 9: Frakční viabilita nádorové
linie HCT 116 48 h po ošetření 5-FU

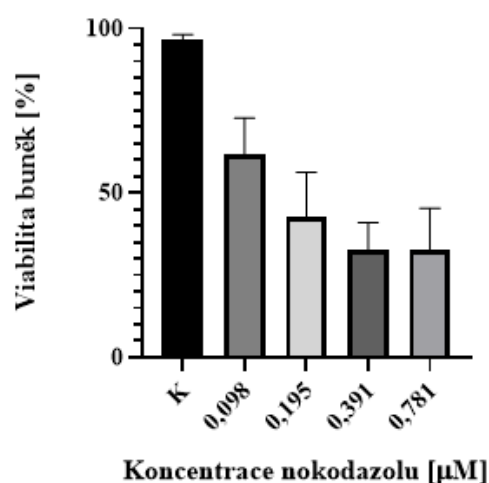


Graf č. 10: Frakční viabilita nádorové
linie HCT 116 72 h po ošetření 5-FU

Frakční viabilita buněk linie HCT 116 po ošetření nokodazolem je znázorněna na Grafech č. 11 a 12. V tomto případě byl statisticky signifikantní rozdíl nalezen mezi koncentracemi $0,195 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,391 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mezi nejvyšší a nejnižší užitou koncentrací nokodazolu statisticky významný rozdíl nalezen nebyl. Z toho lze usuzovat, že nokodazol v koncentraci $0,781 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyvolal maximální pozorovanou, případně jí blízkou odpověď již po 48 hodinách.



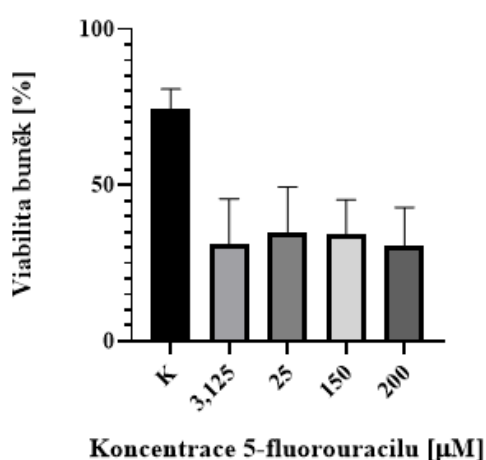
Graf č. 11: Frakční viabilita nádorové
linie HCT 116 48 h po ošetření NOCO



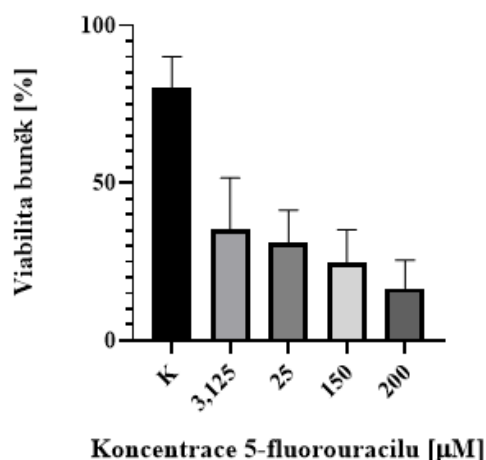
Graf č. 12: Frakční viabilita nádorové
linie HCT 116 72 h po ošetření NOCO

Ze srovnání Grafů č. 9, 10, 11 a 12 vyplývá, že nokodazol snížil viabilitu buněk linie HCT 116 více a současně v nižších koncentracích než 5-fluorouracil. Na základě toho lze konstatovat, že nokodazol je potentnější testovací látkou než 5-fluorouracil.

Výsledky měření frakční viability buněk nádorové linie BxPC3 48 a 72 hodin po ošetření 5-fluorouracilem jsou znázorněny na Grafech č. 13 a 14. U této buněčné linie byl pozorován výraznější pokles viability po ošetření 5-fluorouracilem než u buněk linie HCT 116. Pomocí t-testu ($p < 0,05$) byl statisticky signifikantní rozdíl odhalen u nejvyšších užitých koncentrací – 150 a 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechny testované koncentrace 5-fluorouracilu, včetně nejnižší usmrtily více než 50 % buněk.

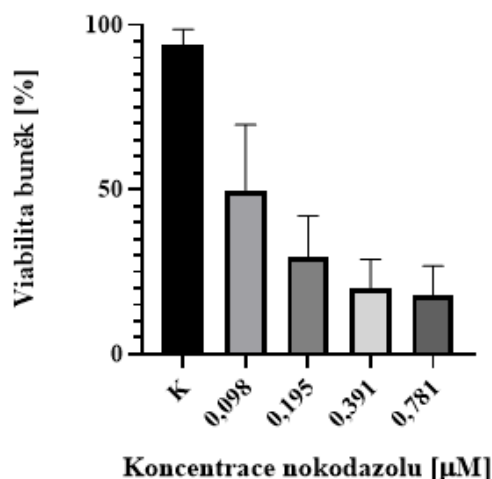


Graf č. 13: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 48 h po ošetření 5-FU

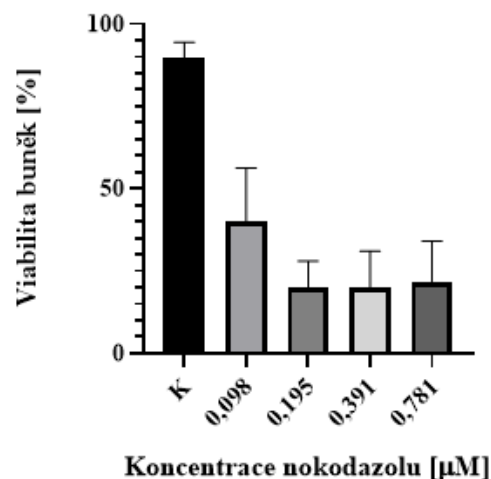


Graf č. 14: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 72 h po ošetření 5-FU

Frakční viabilita buněk linie BxPC3 48 a 72 hodin po ošetření nokodazolem je znázorněna na Grafech 15 a 16. Statisticky signifikantní rozdíl byl pomocí t-testu ($p < 0,05$) nalezen pouze u koncentrace 0,195 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf č. 15: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 48 h po ošetření NOCO



Graf č. 16: Frakční viabilita nádorové linie BxPC3 72 h po ošetření NOCO

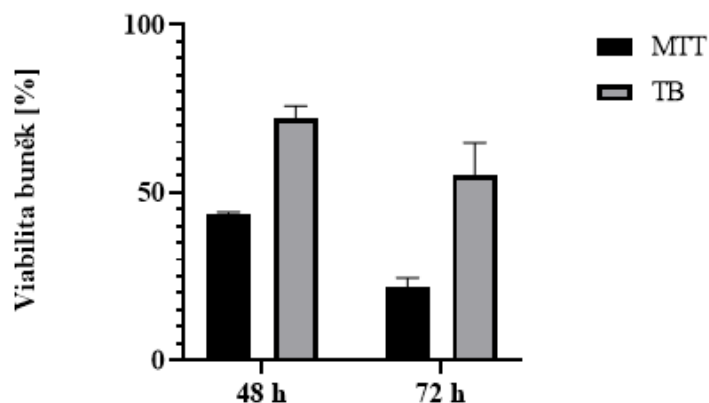
Obě látky již po 48 hodinách usmrtily více než 50 % buněk (viz Graf 13, 14, 15 a 16), nicméně nokodazol opět snižoval viabilitu buněk linie BxPC3 výrazněji než 5-fluorouracil v řádově nižších koncentracích a lze tedy konstatovat, že je na pro tuto buněčnou linii potentnější. Ze srovnání Grafů č. 9, 10, 13 a 14 vyplývá, že celkově byl účinek 5-fluorouracilu na buněčnou linii BxPC3 výraznější než na linii HCT 116. Nokodazol taktéž vykazoval vyšší potenci pro linii BxPC3 (viz Graf č. 11, 12, 15 a 16).

Z výsledků barvení trypanovou modří vyplývá, že pro obě buněčné linie je potentnější testovací látkou nokodazol. Stejně jako MTT eseje i barvení trypanovou modří potvrdilo, že 5-fluorouracil vyžaduje delší inkubační dobu pro plné rozvinutí účinku a naopak, že účinek nokodazolu nastupuje rychleji.

5.4 Srovnání relativní a frakční viability na příkladu 5-fluorouracilu

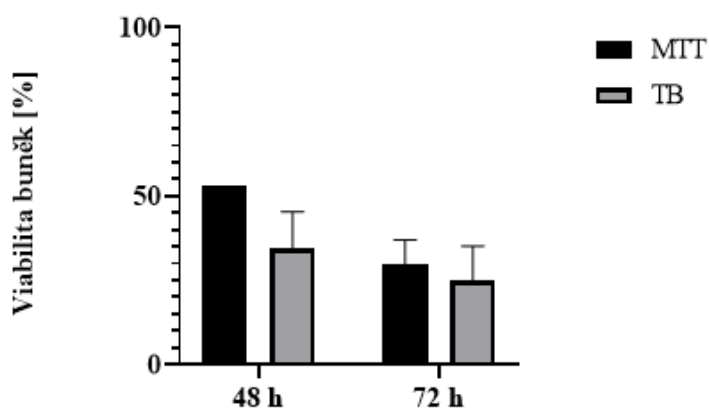
Na základě MTT eseje nelze určit, zda buňky prošly apoptózou a jsou mrtvé, nebo u nich došlo k zastavení proliferace, případně k snížení metabolické aktivity. To je při testování třeba rozlišit a možné to je například srovnáním relativní viability získané MTT esejí a frakční viability změřené pomocí barvení trypanovou modří.

Srovnání relativní a frakční viability buněk linie HCT 116 48 a 72 hodin po ošetření 5-fluorouracilem o koncentraci $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je zobrazeno v Grafu č. 17. Z grafu je patrné, že frakční viabilita získaná pomocí barvení trypanovou modří je výrazně vyšší než relativní viabilita změřená MTT esejí, přičemž rozdíl je signifikantnější 72 hodin po ošetření.



Graf č. 17: Srovnání relativní a frakční viability buněk linie HCT 116 48 a 72 h po ošetření 5-fluorouracilem o koncentraci $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

V Grafu č. 18 je znázorněno srovnání relativní a frakční viability buněk nádorové linie BxPC3 48 a 72 hodin po ošetření. Po 72 hodinách je frakční a relativní viabilita téměř totožná a ani pomocí t-tetu nebyl mezi hodnotami nalezen statisticky signifikantní rozdíl. Po 48 hodinách rozdíl mezi frakční a relativní viabilitou výraznější, přičemž relativní viabilita je vyšší.

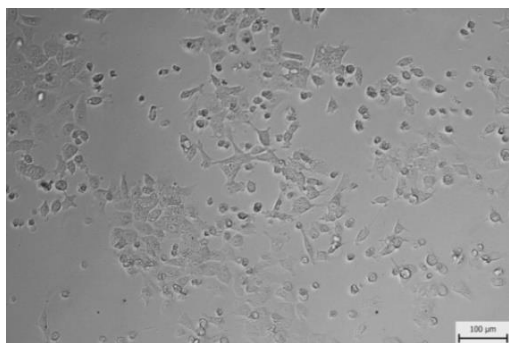


Graf č. 18: Srovnání relativní a frakční viability buněk linie BxPC3 48 a 72 h po ošetření 5-fluorouracilem o koncentraci $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

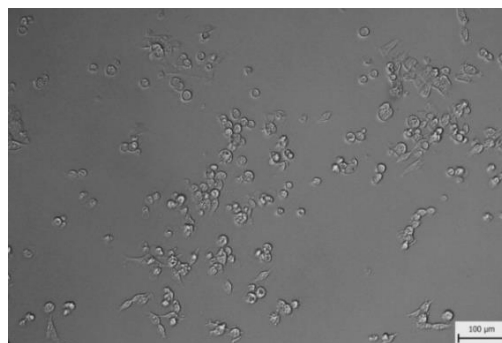
Při srovnání Grafů 17 a 18 lze vidět, že výraznější rozdíly mezi relativní a frakční viabilitou byly zaznamenány u rychle se dělící nádorové linie HCT 116. To naznačuje, že cytotoxicita 5-fluorouracilu pro linii HCT 116 by mohla být v důsledku namnožení kontroly nadhodnocena.

5.5 Hodnocení rozsahu apoptózy pomocí inverzního mikroskopu

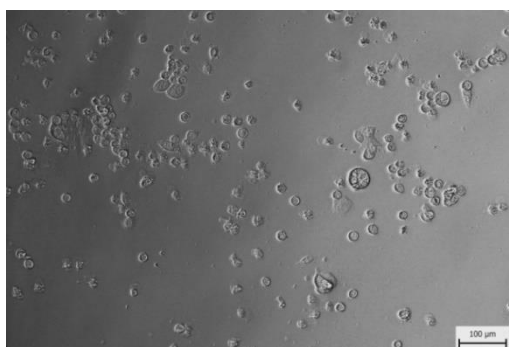
Veškerým experimentům předcházela vizuální kontrola buněk pomocí inverzního mikroskopu s následnou fotografickou dokumentací (foceno při zvětšení 20×). Po ošetření buněk testovacími látkami byly pozorovány charakteristické projevy apoptózy jako změna objemu, fragmentace jader i celých buněk. (viz Obrázek č. 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 a 13). Sledován byl také dobrý stav kontrolních populací (viz Obrázek č. 9 a 14).



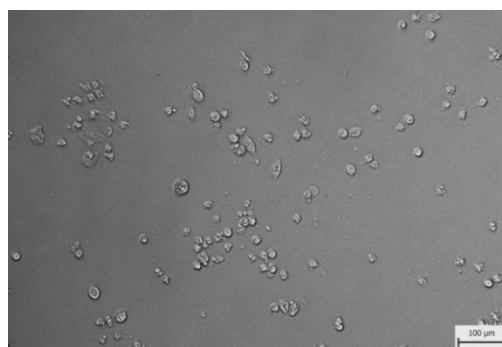
Obrázek č. 5: Nádorová linie HCT 116 48 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 µM



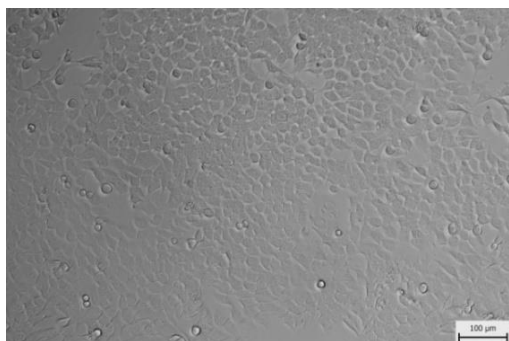
Obrázek č. 6: Nádorová linie HCT 116 72 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 µM



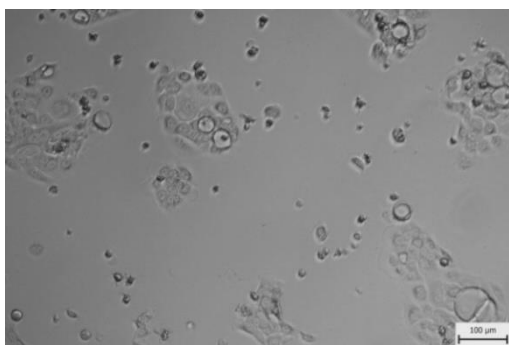
Obrázek č. 7: Nádorová linie HCT 116 48 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 µM



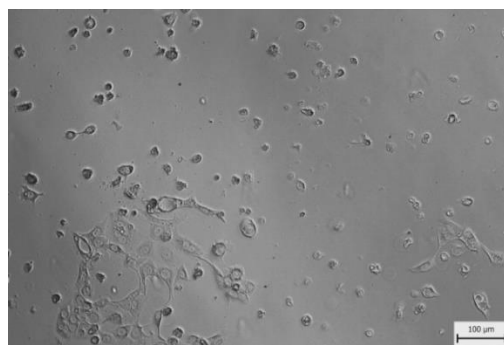
Obrázek č. 8: Nádorová linie HCT 116 72 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 µM



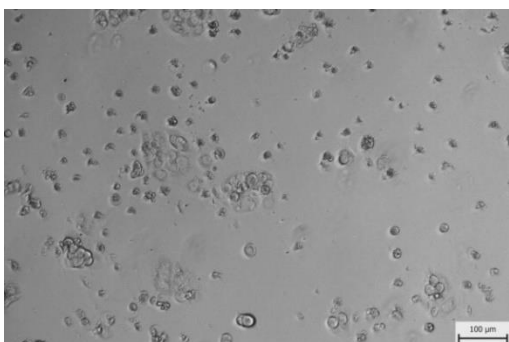
Obrázek č. 9: Kontrolní buňky nádorové linie HCT 116



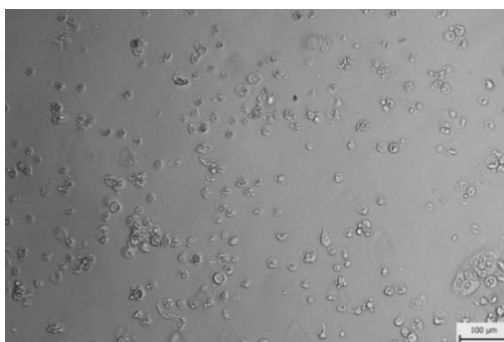
Obrázek č. 10: Nádorová linie BxPC3 48 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 µM



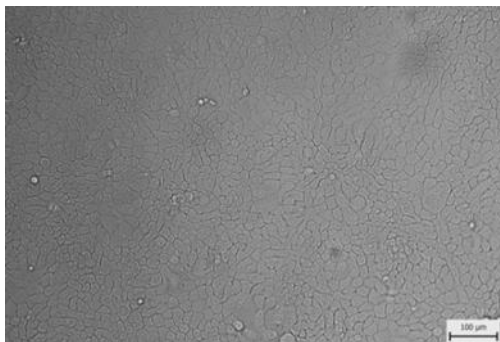
Obrázek č. 11: Nádorová linie BxPC3 72 h po ošetření 5-FU o koncentraci 200 µM



Obrázek č. 12: Nádorová linie BxPC3 48 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 µM



Obrázek č. 13: Nádorová linie BxPC3 72 h po ošetření NOCO o koncentraci 0,781 µM



Obrázek č. 14: Kontrolní buňky nádorové linie BxPC3

6 DISKUSE

Předložená diplomová práce si kladla za cíl studovat aktivitu dvou testovacích látek na zvolených buněčných modelech pomocí dvou *in vitro* testů cytotoxicity – MTT eseje a barvení trypanovou modří. Pomocí obou těchto testů je hodnocena buněčná viabilita, ale vždy jiného charakteru. MTT esejí je měřena tzv. relativní viabilita, při barvení trypanovou modří pak viabilita frakční. Tyto testy byly vybrány záměrně, protože jsou v Laboratoři molekulární biofyziky a farmakologie dobře zavedeny. Navíc je MTT esej dnes považována za „zlatý standard“ pro hodnocení cytotoxicity potenciálních léčiv a je v primárním výzkumu rutinní záležitostí. Tato metoda nicméně vykazuje celou řadu limitací, které je třeba vzít v úvahu před zahájením vlastních experimentů. Dnes je možné dohledat mnoho publikací, které se problematice srovnání různých testů cytotoxicity věnují (Borenfreund *et al.*, 1988, Petty *et al.*, 1995, Schröterová *et al.*, 2009, Zwolak, 2013).

Experimenty byly prováděny na nádorové linii HCT 116 odvozené z kolorektálního karcinomu a na linii BxPC3 odvozené z adenokarcinomu slinivky břišní. Testovacími látkami byl 5-fluorouracil a nokodazol. Oba testy byly vyhodnocovány po 48 a 72 hodinách.

V rámci experimentální části se podařilo úspěšně stanovit frakční viabilitu buněk i hodnoty IC_{50} . Na základě těchto získaných výsledků lze konstatovat, že potentnější testovací látkou jak pro linii HCT 116, tak také pro linii BxPC3 byl nokodazol. Dále lze říci, že obě metody poskytují značně odlišné výsledky. Nesoulad v hodnocení viability pomocí MTT eseje a přímého počítání buněk zaznamenali například také Stepanenko *et al.* (2015) nebo Zwolak (2013).

Viabilita buněk byla na základě barvení trypanovou modří ve většině případů výrazně vyšší než viabilita stanovená MTT testy. Větší diskrepance byly nalezeny u vyhodnocení po 48 hodinách. Tyto rozdíly mohou naznačovat, že MTT esej nadhodnocuje cytotoxické účinky testovaných látek. Buňky, které jsou metabolicky méně aktivní nebo je ovlivněna jejich proliferace totiž mohou být na základě MTT eseje nesprávně determinovány jako mrtvé. Snížený metabolismus však neovlivní výsledky barvení trypanovou modří. Při něm se tyto buňky budou stále jevit jako životné.

Dalším faktorem, který by potenciálně mohl k pozorovaným rozdílům přispět je i nadhodnocení viability, které popisuje Altman (1993). Podle něj jsou buňky v raných fázích

apoptózy schopné barvivo částečně vylučovat a mohou tak být nesprávně vyhodnoceny jako životné.

Vysoké směrodatné odchylky a naopak nižší viabilita (ve srovnání s výsledkem MTT eseje) zaznamenaná u linie BxPC3 po ošetření 5-fluorouracilem byla pravděpodobně zapříčiněna způsobem provedení a vlastní metodikou. Zpracování vzorků pro toto barvení je mnohokrokový proces, který zahrnuje trypsinizaci a sklizení buněk. Právě proces trypsinizace představoval největší riziko snížení viability vzorku. Příliš dlouhá expozice trypsinu totiž může vést k usmrcení původně živých buněk. Obě buněčné linie byly adherentní, nicméně během trypsinizace se chovaly odlišně. Buňky linie HCT 116 se ode dna desky uvolňovaly snadno. S buňkami linie BxPC3 byla práce komplikovanější. Ani po prodloužené inkubaci s trypsinem se od podkladu téměř neuvolňovaly. Buňky tedy bylo potřeba sklízet škrabkou. Po uvolnění se navíc držely v okrajích jamek destičky a bylo nutné je důkladně resuspendovat. Po sklizení příslušné buněčné populace vždy pro jistotu proběhla také kontrola dna jamky pomocí mikroskopu. Proces sklizení však byl pro buňky poměrně náročný a v průběhu mohlo dojít k jejich mechanickému poškození.

Pro vlastní počítání buněk nebyla v rámci experimentů využívána Bürkerova komůrka, ale automatická počítačka TC20TM od společnosti Bio-Rad. Vlastní hodnocení, zda je buňka obarvená, či nikoliv tedy nebylo zatíženo lidským faktorem. Drobnou překážku představovalo rozmezí (5×10^4 až 1×10^7 buněk/mililitr), ve kterém použitá počítačka pracuje. Sklizené množství buněk bylo po aplikaci zejména vysokých koncentrací testovacích látek velmi nízké. Buňky byly také silně naředěné a v některých případech počítačka nebyla schopná koncentraci buněčné suspenze změřit. Celkově lze říci, že reprodukovatelnost barvení trypanovou modří byla ve srovnání s MTT esejemi nižší. Před nepřesnostmi stanovování viability pomocí barvení trypanovou modří varovala již Tennant (1964) a to zejména, pokud je předpokládána viabilita buněčné populace nižší.

Další nevýhodou barvení trypanovou modří bylo, že neposkytovala žádnou informaci o buněčném metabolismu (Schwartz *et al.*, 2020).

Ze získaných výsledků dále vyplývá, že obě metody jsou poměrně dobré pro demonstraci závislosti účinku testované látky na čase. Nokodazol i 5-fluorouracil ve vysokých koncentracích způsobovaly signifikantní snížení viability u obou buněčných linií, nicméně jednotlivé linie vykazovaly odlišnou sensitivu k testovacím látkám. Na základě hodnot IC₅₀ byla vůči nokodazolu rezistentnější linie HCT 116. Vůči 5-fluorouracilu pak

buněčná linie BxPC3, což odpovídá předpokladu. Mechanismus účinku 5-fluorouracilu totiž spočívá v inhibici thymidylát syntázy a v interferenci s replikací DNA (Longley *et al.*, 2003, Voděnková *et al.*, 2020, Hruha *et al.*, 2023), z čehož vyplývá, že na rozdíl od nokodazolu, se účinek 5-fluorouracilu bude postupně s časem a prodělanými buněčnými cykly výrazněji zvyšovat. To MTT esej potvrdila a stejných výsledků dosáhl také například Ardil *et al.* (2022).

Poměrně překvapivé však bylo, že rozdíl v poklesu hodnot IC_{50} 5-fluorouracilu byl dvakrát větší právě pro pomalu se dělící linii BxPC3. I když je tento rozdíl možný, nebylo očekáváno, že bude až tak výrazný.

Čím je tato sledovaná skutečnost způsobena, není jasné. Jednou z možných variant je snížení viability kontrolních buněk linie HCT 116. Při vyhodnocení MTT esej dochází k normalizaci na tyto kontrolní buňky a předpokládá se, že jejich viabilita je 100% (Krebs *et al.*, 2018). Pokud tomu tak není a životnost kontroly je nějakým negativním způsobem ovlivněna, může dojít ke zkreslení výsledku testu. V tomto případě buňky linie HCT 116 rostly velmi rychle a při vizuální kontrole před vlastní MTT esejí dosahovaly vždy (téměř) 100% konfluence. Právě vysoká konfluence může negativně ovlivňovat viabilitu buněk.

Při srovnání frakční a relativní viability byly větší rozdíly zaznamenány naopak u linie HCT 116. U linie BxPC3 nebyl po 72 hodinách rozdíl zaznamenán, po 48 hodinách rozdíl zaznamenán byl, nicméně menší než u linie HCT 116. Vzhledem k tomu, že se buňky linie HCT 116 dělí přibližně třikrát rychleji než buňky linie BxPC3, je možné, že hodnota IC_{50} 5-fluorouracilu byla u linie HCT 116 ovlivněna intenzivním nárůstem neošetřených kontrolních buněk. Pokud se buňky kontroly intenzivně dělí, dochází v důsledku normalizace k nadhodnocení cytotoxického účinku testované látky a tedy i ke snížení hodnoty IC_{50} .

Kromě výše uvedených nedostatků MTT esej způsobených zejména nutností normalizace vůči kontrole může být účinek testované látky nadhodnocen, či podhodnocen v důsledku dalších faktorů. Jak uvádí Stepanenko *et al.* (2015) expozice některým léčivům může v buňkách vyvolat metabolické adaptivní změny, které mohou zasáhnout také dehydrogenázy zajišťující redukci MTT. Podle Ulukaya *et al.*, 2004 je také vhodné před esejí ověřit, zda testované léčivo s MTT chemicky neinteraguje. Navíc určitou diskrepanci do výsledků vnáší také případné promývací kroky (Campling *et al.*, 1991). Naopak výhodou MTT esej oproti barvení trypanovou modří je určitě možnost automatizace a menší časová náročnost.

7 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou faktorů ovlivňujících vyhodnocení *in vitro* testů cytotoxicity. Teoretická část je věnována zejména preklinickému hodnocení lékové odpovědi biologicky aktivních látek, apoptóze a ovlivnění proliferace. Uveden je také přehled *in vitro* metod pro studium relativní a frakční viability, stručný výčet v současnosti užívaných chemoterapeutik a krátká charakteristika užitých testovacích látek. Náplní experimentální části diplomové práce bylo provedení MTT esejí a tzv. trypan blue exclusion esejí (barvení trypanovou modří). Pracováno bylo se dvěma odlišnými buněčnými liniemi a dvěma testovacími látkami. Vyhodnocení experimentů probíhalo vždy po 48 a 72 hodinách.

Prostřednictvím MTT testů byly úspěšně stanoveny hodnoty IC_{50} pro obě testovací látky na obou buněčných liniích. Tyto hodnoty byly následně srovnávány s výsledky barvení trypanovou modří. Obě metody potvrdily, že 5-fluorouracil i nokodazol ve vysokých koncentracích významně snižují viabilitu. Potence testovacích látek zjištěná jednotlivými testy se však výrazně lišila. Ve většině případů barvení trypanovou modří vykazovalo větší viabilitu než MTT esej.

. Bylo dokázáno, že MTT esej i barvení trypanovou modří mají své nedostatky. V případě obou metod může dojít k nadhodnocení, případně podhodnocení viability, respektive cytotoxických vlastností testovaných látek. Barvení trypanovou modří neposkytuje informace o metabolické aktivitě buněk. Na základě MTT esejí pak nelze určit, zda buňky prošly apoptózou, či jsou pouze metabolicky méně aktivní. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou navíc závislé na mechanismu účinku testované látky, čase vyhodnocení, ale také na rychlosti proliferace buněčné linie, na které jsou experimenty prováděny. Závěrem tedy lze konstatovat, že pro získání uceleného obrázku o viabilitě buněčné populace a toxicitě studované látky je nejvhodnější současně kombinovat více různorodých *in vitro* technik.

8 LITERATURA

1. Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y. (2016): Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17(14): 1213–1221.
2. Ahmed, H. M. M. A. M., Teixeira, L. S. M. (2022): New endeavors of (micro)tissue engineering: Cells tissues organs on-chip and communication thereof. *Cells Tissues Organs* 211(6): 721–735.
3. Al-Batran, S. E., Homann, N., Pauligk, C., Goetze, T. O., Meiler, J., Kasper, S., Kopp, H. G., Mayer, F., Haag, G. M., Luley, K., Lindig, U., Schmiegel, W., Pohl, M., Stoehlmacher, J., Folprecht, G., Probst, S., Prasnikar, N., Fischbach, W., Mahlberg, R., ... Hofheinz, R. D. (2019): Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *The Lancet* 393(10184): 1948–1957.
4. Alter, P., Herzum, M., Soufi, M., Schaefer, J. R., Maisch, B. (2006): Cardiotoxicity of 5-fluorouracil. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 4: 1–5.
5. Altman, S. A., Randers, L., Rao, G. (1993): Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology Progress* 9(6): 671–674.
6. Alzahrani, S. M., al Doghaither, H. A., Al-Ghafari, A. B., Pushparaj, P. N. (2023): 5-fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer (Review). *Oncology Reports* 50(4): 175.
7. Amos, L. A. (2011): What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22 (9), 916–926.
8. Ardıl, B., Alper, M. (2022): Potential cancer treatment effects of brusatol or eriodictyol combined with 5-fluorouracil (5-FU) in colorectal cancer cell. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 395(9): 1109–1123.
9. Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., Brito-Melo, G. E. A. (2014): Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47(4): 307–315.

10. Baglini, E., Salerno, S., Barresi, E., Robello, M., da Settimo, F., Taliani, S., Marini, A. M. (2021): Multiple Topoisomerase I (TopoI), Topoisomerase II (TopoII) and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (TDP) inhibitors in the development of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 156: 105594.
11. Balaji, S., Terrero, D., Tiwari, A. K., Ashby, C. R., Raman, D. (2021): Alternative approaches to overcome chemoresistance to apoptosis in cancer. In: Donev R. (Ed.): *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 126, pp. 91–122, Academic Press Inc., New York
12. Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014): Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology* 1170: 29–40.
13. Beswick, R. W., Ambrose, H. E., Wagner, S. D. (2006): Nocodazole, a microtubule depolymerising agent, induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia cells associated with changes in Bcl-2 phosphorylation and expression. *Leukemia Research* 30(4): 427–436.
14. Bhuyan, B. K., Loughman, B. E., Fraser, T. J., Day, K. J. (1976): Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Experimental Cell Research* 97: 275–280.
15. Blajeski, A. L., Phan, V. A., Kottke, T. J., Kaufmann, S. H. (2002): G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *Journal of Clinical Investigation* 110(1): 91–99.
16. Blakeley, J., Grossman, S. A. (2012): Chemotherapy with cytotoxic and cytostatic agents in brain cancer. In: Aminoff M. J., Boller F., Swaab Dick F. (Eds.): *Handbook of Clinical Neurology* 104, pp. 229–254, Elsevier B.V., Amsterdam
17. Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N. (1988): Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro* 2(1): 1–6.
18. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A. (2024): Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74(3): 229–263.
19. Bukowski, K., Kciuk, M., Kontek, R. (2020): Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 21(9): 3233.

20. Campling, B. G., Pym, J., Baker, H. M., Cole, S. P. C., Lam, Y.-M. (1991): Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *British Journal of Cancer* 63: 75–83.
21. Čermák, V., Dostál, V., Jelínek, M., Libusová, L., Kovář, J., Rösel, D., Brábek, J. (2020): Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *European Journal of Cell Biology* 99(4): 151075.
22. Chan, L. L. Y., Rice, W. L., Qiu, J. (2020): Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS ONE* 15(1): e0227950.
23. Chen, X., Zeh, H. J., Kang, R., Kroemer, G., Tang, D. (2021): Cell death in pancreatic cancer: From pathogenesis to therapy. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 18(11): 804–823.
24. Chen, Y., Li, X., Yang, M., Liu, S. B. (2024): Research progress on morphology and mechanism of programmed cell death. *Cell Death and Disease* 15(5): 327.
25. Cho, S. G., Sihm, C. R., Yoo, S. J., Cho, K. K., Lee, H. gu, Choi, Y. J., Kim, S. H. (2006): Analysis of gene expression induced by microtubule-disrupting agents in HeLa cells using microarray. *Cancer Letters* 241(1): 110–117.
26. Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., Fletcher, J. (1993): The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 160: 81–88.
27. Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., Waterhouse, N. J. (2016): Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(7): 647–651.
28. Dagogo-Jack, I., Shaw, A. T. (2018): Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15(2): 81–94.
29. de Bono, J. S., Twelves, C. J. (2001): The oral fluorinated pyrimidines. *Investigational New Drugs* 19: 41–59.
30. de Brabander, M. J., van de Veire, R. M., Aerts, F. E., Borgers, M., Janssen, P. A. (1976): The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured *in vitro*. *Cancer Research* 36(3): 905–916.

31. Dehshahri, A., Ashrafizadeh, M., Ghasemipour Afshar, E., Pardakhty, A., Mandegary, A., Mohammadinejad, R., Sethi, G. (2020): Topoisomerase inhibitors: Pharmacology and emerging nanoscale delivery systems. *Pharmacological Research* 151: 104551.
32. Delgado, J. L., Hsieh, C. M., Chan, N. L., Hiasa, H. (2018): Topoisomerases as anticancer targets. *Biochemical Journal* 475(2): 373–398.
33. Diasio, R. B., Harris, B. E. (1989): Pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics* 16: 215–237.
34. Dinh, M. N., Hitomi, M., Al-Turaihi, Z. A., Scott, J. G. (2024): Alamar Blue assay optimization to minimize drug interference and inter assay viability. *MethodsX* 13: 103024.
35. Duschinsky, R., Plevin, E., Heidelberger, C. (1957): The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *Journal of the American Chemical Society*, 79 (16), 4559–4560.
36. Elmore, S. (2007): Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495–516.
37. Entezar-Almahdi, E., Mohammadi-Samani, S., Tayebi, L., Farjadian, F. (2020): Recent advances in designing 5-fluorouracil delivery systems: A stepping stone in the safe treatment of colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine* 15: 5445–5458.
38. Esch, J. S. A., Windmüller, B. A., Hanewinkel, J., Storm, J., Förster, C., Wilkens, L., Krüger, M., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C. (2020): Isolation and characterization of two novel colorectal cancer cell lines, containing a subpopulation with potential stem-like properties: Treatment options by MYC/NMYC inhibition. *Cancers* 12(9): 1–35.
39. Ewald, B., Sampath, D., Plunkett, W. (2008): Nucleoside analogs: Molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* 27(50): 6522–6537.
40. Florian, S., Mitchison, T. J. (2016): Anti-microtubule drugs. In: Chang, P., Ohi, R. (Eds.): *The Mitotic Spindle: Methods and Protocols* 1413, pp. 403–421, Humana Press Inc., New York
41. Forcina, G. C., Conlon, M., Wells, A., Cao, J. Y., Dixon, S. J. (2017): Systematic quantification of population cell death kinetics in mammalian cells HHS public Access. *Cell Systems* 4(6): 600–610.

42. Franco, N. H. (2013): Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. *Animals* 3(1): 238–273.
43. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. v., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018): Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* 25(3): 486–541.
44. Gao, Y., Shang, Q., Li, W., Guo, W., Stojadinovic, A., Mannion, C., Man, Y. G., Chen, T. (2020): Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. *Journal of Cancer* 11(17): 5135–5149.
45. Gerets, H. H. J., Dhalluin, S., Atienzar, F. A. (2011): Multiplexing cell viability assays. In: Stoddart, M. J. (Ed.): *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* 740, pp. 91–101, Humana Press Inc., New York
46. Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Chollet, P., Llory, J. F., Letourneau, Y., Coudert, B., Bertheaut-Cvitkovic, F., Larregain-Fournier, D., le Rol, A., Walter, S., Adam, R., Misset, J. L., Lévi, F. (2000): Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil–leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 18(1): 136–147.
47. González-Martín-Moro, J. (2022): Trypan blue: A tale of a die. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)* 97(9): 481–482.
48. Goodman, L. S., Wintrobe, M. M., Dameshek, W., Goodman, M. J., Gilman, A., McLennan, M. T. (1946): Nitrogen mustard therapy. *Journal of the American Medical Association* 132(3): 126–132.
49. Grela, E., Kozłowska, J., Grabowiecka, A. (2018): Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* 120(4): 303–311.
50. Groff, K., Evans, S. J., Doak, S. H., Pfuhler, S., Corvi, R., Saunders, S., Stoddart, G. (2021): *In vitro* and integrated in vivo strategies to reduce animal use in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 36(6): 389–400.
51. Gudimchuk, N. B., McIntosh, J. R. (2021): Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22(12): 777–795.

52. Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., Delort, L. (2021): 3D cell culture systems: Tumor application, advantages, and disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences* 22(22): 12200.
53. Hafner, M., Niepel, M., Chung, M., Sorger, P. K. (2016): Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nature Methods* 13(6): 521–527.
54. Haibe-Kains, B., El-Hachem, N., Birkbak, N. J., Jin, A. C., Beck, A. H., Aerts, H. J. W. L., Quackenbush, J. (2013): Inconsistency in large pharmacogenomic studies. *Nature* 504(7480): 389–393.
55. Hajar, R. (2011): Animal testing and medicine. *Heart Views* 12(1): 42.
56. Harris, L. A., Frick, P. L., Garbett, S. P., Hardeman, K. N., Paudel, B. B., Lopez, C. F., Quaranta, V., Tyson, D. R. (2016): An unbiased metric of antiproliferative drug effect *in vitro*. *Nature Methods* 13(6): 497–500.
57. Hashimoto, Y., Yoshida, Y., Yamada, T., Aisu, N., Yoshimatsu, G., Yoshimura, F., Hasegawa, S. (2020): Current status of therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil prodrugs. *Anticancer Research* 40(8): 4655–4661.
58. He, S., Sharpless, N. E. (2017): Senescence in health and disease. *Cell* 169(6): 1000–1011.
59. Hong, F. D., Chen, J., Donovan, S., Schneider, N., Nisen, P. D. (1999): Taxol, vincristine or nocodazole induces lethality in G1-checkpoint-defective human astrocytoma U373MG cells by triggering hyperploid progression. *Carcinogenesis* 20(7): 1161–1168.
60. Hrubá, L., Das, V., Hajduch, M., Dzubak, P. (2023): Nucleoside-based anticancer drugs: Mechanism of action and drug resistance. *Biochemical Pharmacology* 215: 115741.
61. Ishibashi, M., Ishii, M., Yamamoto, S., Mori, Y., Shimizu, S. (2021): Possible involvement of TRPM2 activation in 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice. *European Journal of Pharmacology* 891: 173671.
62. Johnston, P. G., Kaye, S. (2001): Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anti-Cancer Drugs* 12: 639–646.
63. Jordan, M. A. (2002): Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* 2(1): 1–17.

64. Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L. (1992): Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *Journal of Cell Science* 102: 401–416.
65. Jordan, M. A., Wilson, L. (2004): Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 4: 253–265.
66. Kabakov, A. E., Gabai, V. L. (2018): Cell death and survival assays. In: Calderwood, S. K., Prince, T. L. (Eds.): *Chaperones* 1709, pp. 107–127, Humana Press Inc., New York
67. Kabene, S., Baadel, S. (2019): Bioethics: a look at animal testing in medicine and cosmetics in the UK. *Journal of Medical Ethics and History of Medicine* 12(15): 1–11.
68. Kaina, B. (2023): Temozolomide, Procarbazine and Nitrosoureas in the therapy of malignant gliomas: Update of mechanisms, drug resistance and therapeutic implications. *Journal of Clinical Medicine* 12(23): 7442.
69. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Curriet, A. R. (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239.
70. Khattab, M. (2020): Theoretical study of the geometric and electronic characterization of carbendazim-based drug (Nocodazole). *Heliyon* 6(6): e04055.
71. Khattab, M., Al-Karmalawy, A. A. (2021): Revisiting activity of some nocodazole analogues as a potential anticancer drugs using molecular docking and DFT calculations. *Frontiers in Chemistry* 9: 628398.
72. Krebs, A., Nyffeler, J., Rahnenführer, J., Leist, M. (2018): Normalization of data for viability and relative cell function curves. *ALTEX*, 35(2): 269–271
73. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., Zitvogel, L. (2013): Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology* 31: 51–72.
74. Kumar Nayak, S., Singh Panesar, P., Kumar, H. (2009): p53-Induced apoptosis and inhibitors of p53. *Current Medicinal Chemistry* 16: 2627–2640.
75. Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. D. (2018): Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018(6): 465–468.
76. Kummur, S., Gutierrez, M., Doroshov, J. H., Murgu, A. J. (2006): Drug development in oncology: Classical cytotoxics and molecularly targeted agents. *British Journal of Clinical Pharmacology* 62(1): 15–26.

77. Kunicka, T., Prochazka, P., Krus, I., Bendova, P., Protivova, M., Susova, S., Hlavac, V., Liska, V., Novak, P., Schneiderova, M., Pitule, P., Bruha, J., Vycital, O., Vodicka, P., Soucek, P. (2016): Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer* 16(1).
78. Kwok, K. K., Vincent, E. C., Gibson, J. N. (2017): Antineoplastic Drugs. In: Dowd, F. J., Johnson, B., Mariotti A. (Eds.): *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, pp. 530–562, Elsevier, Amsterdam
79. Lee, J. J., Beumer, J. H., Chu, E. (2016): Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78(3): 447–464.
80. Li, K., van Delft, M. F., Dewson, G. (2021): Too much death can kill you: Inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease. *The EMBO Journal* 40(14): e107341.
81. Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003): 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3(5): 330–338.
82. Majno, G., Joris, I. (1995): Review apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146(1): 3–15.
83. McCauley, J., Zivanovic, A., Skropeta, D. (2013): Bioassays for anticancer activities. In: Roessner, U., Dias, D. A. (Eds.): *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery* 1055, pp. 191–205, Humana Press Inc., New York
84. McQuade, R. M., Stojanovska, V., Bornstein, J. C., Nurgali, K. (2017): Colorectal cancer chemotherapy: The evolution of treatment and new approaches. *Current Medicinal Chemistry* 24: 1–21.
85. Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C., Sasaki, I. (2010): 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers* 2(3): 1717–1730.
86. Montagnani, F., Chiriatti, A., Licitra, S., Aliberti, C., Fiorentini, G. (2010): Differences in efficacy and safety between capecitabine and infusional 5-fluorouracil when combined with irinotecan for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 9(4): 243–247.
87. More, L. A., Lane, S., Asnani, A. (2021): 5-FU cardiotoxicity: vasospasm, myocarditis, and sudden death. *Current Cardiology Reports* 23(3): 17.

88. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
89. Muggia, F., Kudlowitz, D. (2014): Novel taxanes. *Anti-Cancer Drugs* 25(5): 593–598.
90. Mukhtar, E., Adhami, V. M., Mukhtar, H. (2014): Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 13(2): 275–284.
91. Naren, G., Guo, J., Bai, Q., Fan, N., Nashun, B. (2022): Reproductive and developmental toxicities of 5-fluorouracil in model organisms and humans. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 24: e9.
92. Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., Facchini, A. (2001): Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8(6): 1131–1135.
93. Newton, K., Strasser, A., Kayagaki, N., Dixit, V. M. (2024): Cell death. *Cell* 187(2): 235–256.
94. Nicolai, A., Madia, V. N., Messore, A., de Vita, D., de Leo, A., Ialongo, D., Tudino, V., Tortorella, E., Scipione, L., Taurone, S., Pergolizzi, T., Artico, M., di Santo, R., Costi, R., Scarpa, S. (2021): Anti-tumoral effects of a (1H-pyrrol-1-yl)methyl-1H-benzoimidazole carbamate ester derivative on head and neck squamous carcinoma cell lines. *Pharmaceuticals* 14(6): 564.
95. Ohshima, K., Morii, E. (2021): Metabolic reprogramming of cancer cells during tumor progression and metastasis. *Metabolites* 11(1): 1–23.
96. Pack, L. R., Daigh, L. H., Meyer, T. (2019): Putting the brakes on the cell cycle: Mechanisms of cellular growth arrest. *Current Opinion in Cell Biology*, 60, 106–113.
97. Pan, S. T., Li, Z. L., He, Z. X., Qiu, J. X., Zhou, S. F. (2016): Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43(8): 723–737.
98. Park, H., Hong, S., Hong, S. (2012): Nocodazole is a high-affinity ligand for the cancer-related kinases ABL, c-KIT, BRAF, and MEK. *ChemMedChem*, 7(1), 53–56.
99. Pavlova, N. N., Zhu, J., Thompson, C. B. (2022): The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metabolism* 34(3): 355–377.

100. 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. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 10: 29–34.
101. Pezella, F., Tavassoli, M., & Kerr, D. (Eds.) (2019): Principles of chemotherapy. In: *Oxford Textbook of Cancer Biology*, pp. 413–422, Oxford University Press, Oxford
102. Pirzaman, A. T., Ebrahimi, P., Doostmohamadian, S., Karim, B., Almasi, D., Madani, F., Moghadamnia, A., Kazemi, S. (2023): 5-Flourouracil-induced toxicity in both male and female reproductive systems: A narrative review. *Human and Experimental Toxicology* 42: 1–11.
103. Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., Paul Solomon, F. D. (2015): 3D cell culture systems: Advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology* 230(1): 16–26.
104. Ribeiro, R. A., Wanderley, C. W. S., Wong, D. V. T., Mota, J. M. S. C., Leite, C. A. V. G., Souza, M. H. L. P., Cunha, F. Q., Lima-Júnior, R. C. P. (2016): Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78(5): 881–893.
105. Sakat, S. S., Bagade, O., Mhaske, G., Taru, P., Sagar, M., Rastogi, M. (2022): Significance of animal experimentation in biomedical research in the current era: Narrative review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 12(10): 011–019.
106. Schröterová, L., Králová, V., Voráčová, A., Hašková, P., Rudolf, E., Červinka, M. (2009): Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro* 23(7): 1406–1411.
107. Schwartz, H. R., Richards, R., Fontana, R. E., Joyce, A. J., Honeywell, M. E., Lee, M. J. (2020): Drug GRADE: An integrated analysis of population growth and cell death reveals drug-specific and cancer subtype-specific response Profiles. *Cell Reports* 31(12).
108. Serkova, N. J., Eckhardt, S. G. (2016): Metabolic imaging to assess treatment response to cytotoxic and cytostatic agents. *Frontiers in Oncology* 6: 1–9.
109. Shokrzadeh, M., Modanloo, M. (2017): An overview of the most common methods for assessing cell viability. *Journal of Research in Medical and Dental Science* 5(2): 33–41.

110. Singh, V., Afshan, T., Tyagi, P., Varadwaj, P. K., Sahoo, A. K. (2023): Recent development of multi-targeted inhibitors of human topoisomerase II enzyme as potent cancer therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 226: 473–484.
111. Single, A., Beetham, H., Telford, B. J., Guilford, P., Chen, A. (2015): A comparison of real-time and endpoint cell viability assays for improved synthetic lethal drug validation. *Journal of Biomolecular Screening* 20(10): 1286–1293.
112. Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H., Aneja, R. (2011): Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Medicinal Research Reviews* 31(3): 443–481.
113. Stepanenko, A. A., Dmitrenko, V. V. (2015): Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 574(2): 193–203.
114. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018): Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. In: *Acta Histochemica* 120, pp. 159–167, Elsevier GmbH, Amsterdam
115. Stokes, W. S., Marsman, D. S. (2013): Animal welfare considerations in biomedical research and testing. In: Bayne, K., Turner, P. (Eds.): *Laboratory Animal Welfare*, pp. 115–140, Elsevier Inc., Amsterdam
116. Strober, W. (2015): Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology* 111(1): A3.B.1-A3.B.3.
117. Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R. (2013): Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65(2): 157–170.
118. Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., Pickren, J. W., Berjian, R., Douglass, H., Chu, T. M. (1986): Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Investigation* 4(1): 15–23.
119. Tennant, J. R. (1964): Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2(6): 685–694.
120. Thomas, A., Pommier, Y. (2019): Targeting topoisomerase I in the era of precision medicine. *Clinical Cancer Research* 25(22): 6581–6589.

121. Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., Lesterhuis, W. J. (2022): Cancer chemotherapy: Insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Frontiers in Oncology* 12.
122. Tong, X., Tang, R., Xiao, M., Xu, J., Wang, W., Zhang, B., Liu, J., Yu, X., Shi, S. (2022): Targeting cell death pathways for cancer therapy: Recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *Journal of Hematology and Oncology* 15(1): 174.
123. Tummala, T., Sevilla Uruchurtu, A. S., Cruz, A. D. la, Huntington, K. E., George, A., Liguori, N. R., Zhang, L., Zhou, L., Abbas, A. E., Azzoli, C. G., El-Deiry, W. S. (2023): Preclinical synergistic combination therapy of lurbinectedin with irinotecan and 5-fluorouracil in pancreatic cancer. *Current Oncology* 30(11): 9611–9626.
124. Ulukaya, E., Colakogullari, M., Wood, E. J. (2004): Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy* 50(1): 43–50.
125. Vasan, N., Baselga, J., Hyman, D. M. (2019): A view on drug resistance in cancer. *Nature* 575(7782): 299–309.
126. Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A.-M. C., Wadsworth, P., Cassimeris, L. (1997): Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Biology of the Cell* 8: 973–985.
127. Vodenkova, S., Buchler, T., Cervená, K., Veskrnová, V., Vodicka, P., Vymetalková, V. (2019): 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology and Therapeutics* 206: 107447.
128. Walko, C. M., Lindley, C. (2005): Capecitabine: A review. *Clinical Therapeutics* 27(1): 23–44.
129. Wang, L., Lankhorst, L., Bernards, R. (2022): Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer* 22(6): 340–355.
130. Wang, Y., Zhang, H., Gigant, B., Yu, Y., Wu, Y., Chen, X., Lai, Q., Yang, Z., Chen, Q., Yang, J. (2016): Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS Journal* 283(1): 102–111.
131. Weber, G. F. (2015): DNA Damaging Drugs. *Molecular Therapies of Cancer*. Springer International Publishing, Cham.

132. Wilson, M. A., Schuchter, L. M. (2016): Chemotherapy for melanoma. In: Kaufman H. L., Mehnert, J. M. (Eds.): *Melanoma. Cancer Treatment and Research* 167, pp. 209–229, Springer International Publishing, Cham.
133. Xu, H., Jiao, Y., Qin, S., Zhao, W., Chu, Q., Wu, K. (2018): Organoid technology in disease modelling, drug development, personalized treatment and regeneration medicine. *Experimental Hematology and Oncology* 7(1): 30.
134. Xu, K., Schwarz, P. M., Ludueña, R. F. (2002): Interaction of nocodazole with tubulin isotopes. *Drug Development Research* 55(2): 91–96.
135. Xu, X., Lai, Y., Hua, Z. C. (2019): Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports* 39(1).
136. Yasuda, T., Baba, H., Ishimoto, T. (2023): Cellular senescence in the tumor microenvironment and context-specific cancer treatment strategies. *FEBS Journal* 290(5): 1290–1302.
137. Zeng, X., Zhang, Y., Kwong, J. S. W., Zhang, C., Li, S., Sun, F., Niu, Y., Du, L. (2015): The methodological quality assessment tools for preclinical and clinical studies, systematic review and meta-analysis, and clinical practice guideline: A systematic review. *Journal of Evidence-Based Medicine* 8(1): 2–10.
138. Zhang, K., Zhang, T., Yang, Y., Tu, W., Huang, H., Wang, Y., Chen, Y., Pan, K., Chen, Z. (2022): N6-methyladenosine-mediated LDHA induction potentiates chemoresistance of colorectal cancer cells through metabolic reprogramming. *Theranostics* 12(10): 4802–4817.
139. Zhao, J., Shi, X., Dong, C., Liu, R., Su, L., Cao, C. (2022): 5-fluorouracil suppresses stem cell-like properties by inhibiting p38 in pancreatic cancer cell line PANC-1. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 60(1): 55–65.
140. Zhou, Z., Zhu, J., Jiang, M., Sang, L., Hao, K., He, H. (2021): The combination of cell cultured technology and in silico model to inform the drug development. *Pharmaceutics* 13: 704.
141. Zieve, G. W., Turnbull, D., Mullins, J. M., McIntosh, J. R. (1980): Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Experimental Cell Research* 126: 397–405.

142. Zwolak, I. (2013): Comparison of five different *in vitro* assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 line). *Toxicology and Industrial Health* 31(8): 677–690.