

Rola i wykorzystanie badań wysokoprzepustowych w poszukiwaniu związków chemicznych o działaniu terapeutycznym

mgr Natalia Karczewska¹,

mgr Monika Pyc^{1✉},

dr Krzysztof Żukowski¹,

dr hab. Joanna Kosman^{1,2},

dr Dorota Kwiatek¹,

dr hab. Jacek Ł. Kolanowski¹

¹Centrum Biologii Chemicznej, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

²Zakład Chemii Bioanalitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_528

✉ autor korespondujący: mpyc@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: badania wysokoprzepustowe, skrining, odkrywanie leku, biblioteki związków chemicznych, automatyzacja

Wykaz stosowanych skrótów: AI (ang. *Artificial Intelligence*) – Sztuczna Inteligencja; AlphaScreen (ang. *Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen*); BRET (ang. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) – Bioluminescencyjne Rezonansowe Przeniesienie Energii; FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) – Fluorescencyjne Rezonansowe Przeniesienie Energii, FP (ang. *Fluorescence Polarization Assay*) – Polaryzacja Fluorescencji; HCI (ang. *High-Content Imaging*) – Wieloparametryczne Obrazowanie Mikroskopowe; HTS (ang. *High-Throughput Screening*) – Wysokoprzepustowe Badania Przesiewowe

STRESZCZENIE

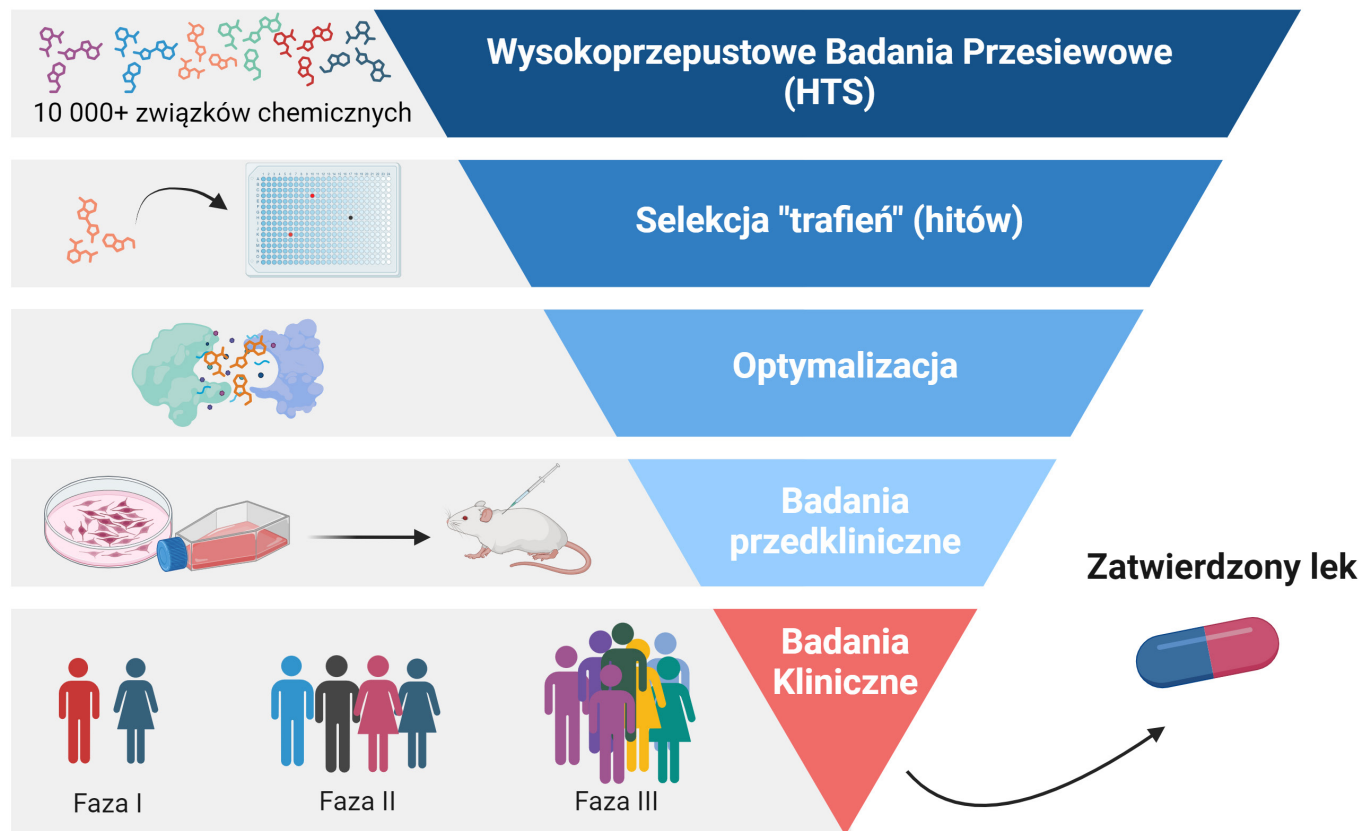
Wraz z rozwojem medycyny i starzeniem się społeczeństwa wciąż rośnie zapotrzebowanie na nowe, skuteczniejsze terapie. Narzędziem, które przyczynia się do efektywniejszego poszukiwania oraz wprowadzania nowych leków terapeutycznych na rynek są wysokoprzepustowe badania przesiewowe. Badania te, będące szerokim zbiorem różnorodnych testów pozwalają na przetestowanie setek tysięcy związków chemicznych w krótkim czasie. Celem jest trafna identyfikacja związków aktywnych, które mogą stać się potencjalnym kandydatem terapeutycznym w przemyśle farmaceutycznym. Badania wysokoprzepustowe stanowią pierwszy etap poszukiwania potencjalnych leków. Są one jednym z podstawowych i kluczowych badań, od ich wyników zależy czy potencjalny kandydat na lek zostanie odkryty. W niniejszym artykule przeglądowym opisane zostaną poszczególne etapy wysokoprzepustowych badań przesiewowych, a także metody, które są w nich wykorzystywane. Przedstawione zostaną również niezbędne kroki w optymalizacji tych badań, dobór aparatury i jej automatyzacja oraz kluczowe parametry kontroli jakości niezbędne do przeprowadzenia rzetelnych badań przesiewowych.

WPROWADZENIE

Poszukiwanie nowych leków terapeutycznych jest bardzo kosztowne i długotrwałe. Proces od odkrycia przez zatwierdzenie do wprowadzenia na rynek może trwać nawet kilkanaście lat [1]. Warto zauważyć, że związane z tym koszty i czas różnią się w zależności od leku oraz docelowej choroby, a kwoty mogą wynosić miliardy dolarów [2]. Poszukiwanie leków wpływających na udoskonalenie istniejących już terapii może trwać znacznie dłużej niż w przypadku pilnie potrzebnego leku, który ze względu na nagłe zapotrzebowanie przechodzi taki proces w trybie priorytetowym [1,2].

Obecnie zaawansowane technologie w znaczny sposób umożliwiły rozwój terapii spersonalizowanych oraz przyspieszyły proces poszukiwania nowych leków. Pomimo to, wciąż poszukuje się nowych metodologii przyspieszających odkrycia i poszerzających obszary badawcze, by w jak najbardziej wydajny i efektywny sposób wprowadzać nowe związki terapeutyczne na rynek [3]. Wciąż dużym wyzwaniem dla instytucji naukowych i przemysłu farmaceutycznego pozostaje identyfikacja solidnego i skutecznego kandydata, od momentu wytypowania do faktycznego użytkowania. Na szczególną uwagę zasługuje rozwój wysokoprzepustowych badań przesiewowych (inaczej nazywane skriningiem) (ang. *High-Throughput Screening*, HTS) i kolekcjonowanych bibliotek małowymiarowych związków chemicznych, co przyczyniło się do powstania nowej ery odkrywania leków [1,3]. Od lat 90. XX wieku HTS stał się główną metodą w odkrywaniu leków, w wyniku ogromnego postępu w technologii, automatyzacji oraz chemii kombinatorycznej [4]. Ta metoda syntezy umożliwiła tworzenie dużych kolekcji związków chemicznych o właściwościach lekopodobnych poprzez zastosowanie mieszaniny poszczególnych związków oraz projektowanie struktur chemicznych komputerowo [5-7]. Przykładem leków, które zostały zidentyfikowane z wykorzystaniem wysokoprzepustowych badań przesiewowych jest Maraviroc, służący do leczenia pacjentów zakażonych wirusem HIV, lub Erlotinib stosowany w leczeniu nowotworów [7]. Badania HTS znalazły wykorzystanie również w czasie pandemii COVID-19, pozwalając na szybką identyfikację potencjalnych leków przeciwwirusowych takich jak Remdesivir lub Chlorochina [8]. Do pierwszych liderów badań wysokoprzepustowych należały firmy farmaceutyczne takie jak Pfizer czy GlaxoSmithKline. W ciągu ostatnich dwudziestu lat dołączyło wiele akademickich jednostek i setki ośrodków badań wysokoprzepustowych na całym świecie [9].

Testy HTS mogą być również wykorzystywane w modelach komórkowych poprzez bezpośrednie wiązanie się z wytypowanymi celami w komórkach, szlakach molekularnych, czy też oceniając wpływ badanej substancji na znane



Rycina 1. Proces przedstawiający etapy poszukiwania leku terapeutycznego począwszy od wysokoprzepustowych badań przesiewowych selekcyjnych potencjalne związki aktywne do momentu wprowadzenia leku na rynek. Rycinę wykonano z użyciem programu BioRender [https://www.biorender.com]. Zaadaptowano z „Drug Discovery & Development Funnel”, autorstwa BioRender.com (2024). Źródło: <https://app.biorender.com/biorender-templates>

biomarkery. Tym samym można ocenić zmiany morfologiczne w komórkach, ich kształt czy mechanizmy śmierci komórkowych [10]. Celem podstawowych badań przesiewowych w skriningach komórkowych jest również odkrywanie spośród ogromnej populacji potencjalnych związków biologicznie czynnych, substancji regulujących dany szlak molekularny. Mimo wielu znanych leków, nie znamy wciąż ich szczegółowego mechanizmu działania. Dlatego ważne jest zaprojektowanie takiego testu molekularnego, które pozwoli nam na uzyskanie nowych, niezbędnych informacji do ich lepszego poznania [11].

Wysokoprzepustowa metoda przesiewowa testuje od kilku tysięcy do nawet miliona różnych związków chemicznych w krótkim odstępie czasowym [10]. Pozwala to na identyfikację związków pozytywnych, tzw. „trafień” (ang. *hits*), uznawanych za potencjalnie aktywne w danym eksperymencie. W przyszłości mogą być badane w dalszych etapach opracowywania leków [12]. Ze względu na brak właściwego nazewnictwa w języku polskim, w dalszej części publikacji „trafienie” będzie określane również jako hit. Uzyskane hity są grupowane oraz selekcyjonowane na podstawie struktury oraz aktywności [13]. Następnie „trafienia” są modyfikowane syntetycznie w celu zwiększenia ich skuteczności, selektywności wobec danego celu molekularnego lub zmiany we właściwościach fizykochemicznych, tworząc związki wiodące (ang. *hit to lead*). Końcowym etapem badań jest dalsza optymalizacja struktury związków wiodących, które mogą zostać następnie przetestowane w badaniach przedklinicznych (ang. *lead optimization*) [14].

Zanim lek trafi do powszechnego użycia musi zostać odpowiednio przebadany i zatwierdzony przez szereg grup badawczych. Po identyfikacji związku o potencjalnym działaniu terapeutycznym muszą zostać wykonane badania *in vitro*, następnie testy na modelu zwierzęcym *in vivo*. Badania te znane są jako przedkliniczne, w których sprawdzana jest skuteczność, bezpieczeństwo użycia oraz wstępne określenie dawki substancji [15]. Następnie w badaniach klinicznych występują cztery fazy. W fazie I grupę badawczą stanowi 20-80 zdrowych ludzi. W fazie II bierze udział większa grupa populacji składająca się z 100-500 zdrowych osób. Na ostatnim etapie przed zatwierdzeniem leku w fazie III potencjalny związek terapeutyczny testowany jest na tysiącach pacjentów [2]. Faza IV opiera się na monitorowaniu już wprowadzonego do obrotu leku, w celu obserwacji występowania skutków ubocznych przy dłuższym zażywaniu terapeutyku [2,15] (Ryc. 1).

BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH

Podstawowym elementem wykorzystywanym we wszystkich badaniach przesiewowych są biblioteki związków chemicznych. Ze względu na ogromną skalę badań HTS, małowzrostkowe związki chemiczne są odpowiednio kolekcjonowane i katalogowane w oparciu o ich właściwości [16]. Tworzenie bibliotek związków chemicznych pozwala na przetestowanie dużej ilości substancji oraz automatyzację całego procesu [17]. Obecnie biblioteki są kolekcjonowane przez różne instytucje, takie jak konsor-

cja, prywatne firmy, w tym koncerny farmaceutyczne lub środowiska akademickie z całego świata, które posiadają nakłady finansowe i infrastrukturę potrzebną do tworzenia bibliotek [13]. Występują także firmy tworzące swoje własne kolekcje bibliotek oraz sprzedające je jako komercyjnie dostępne biblioteki związków [16–18]. W związku z tym, że wysokoprzepustowe badania przesiewowe wiążą się identyfikacją hitów, kluczem do wykonania udanego badania przesiewowego, a tym samym uzyskania danych o wysokiej powtarzalności oraz identyfikacji "trafiień" jest jakość zgromadzonych związków chemicznych, a także sposób ich kolekcjonowania [13,18]. Obecnie biblioteki chemiczne zawierają najczęściej od kilkuset tysięcy do kilku milionów gromadzonych związków [7]. Spośród tak dużych grup związków, wyłaniane są także mniejsze, dedykowane biblioteki, które pozwalają np. na przeprowadzenie badań wysokoprzepustowych z użyciem dobrze scharakteryzowanego celu molekularnego (ang. *molecular target*) [19]. Ze względu na skalę tematyki bibliotek chemicznych powstają instytucje zajmujące się zarządzaniem kolekcjonowanych związków. Ich rolą jest odpowiednie gromadzenie, organizacja i katalogowanie syntezowanych lub zakupionych związków oraz ich prawidłowe przechowywanie [20]. Istotnym elementem jest również monitorowanie obecności zanieczyszczeń, a także ocena czystości, stężenia, czy stabilności związku chemicznego. Substancje te są następnie odpowiednio rozpuszczone i przenoszone na płytki wielodółkowe, co pozwala na ich wysyłkę do miejsca, w którym biblioteka będzie wykorzystywana do badania HTS. Ze względu na dużą ilość magazynowanych substancji, działania związane z zarządzaniem kolekcją związków wymagają zaawansowanego sprzętu oraz automatyzacji [21].

Przykładem jednostki zajmującej się kolekcjonowaniem i tworzeniem bibliotek chemicznych jest europejskie konsorcjum EU-OPENSSCREEN (ERIC). Konsorcjum to zrzesza 31 jednostek naukowych zajmujących się tematyką wysokoprzepustowych badań przesiewowych w 9 krajach europejskich. Jego rolą jest rozwój oraz szerzenie ekspertyzy w tematyce wysokoprzepustowych badań przesiewowych, zapewnienie dostępu naukowcom do narzędzi i rozwiązań usprawniających przeprowadzenie badań przesiewowych oraz nawiązywanie współpracy między członkowskimi jednostkami naukowymi [22]. Dodatkowo, konsorcjum EU-OPENSSCREEN (ERIC) posiada własną kolekcję związków chemicznych, która podzielona jest na 4 główne biblioteki: biblioteka Pilot (ok. 5 000 związków), biblioteka ECBL/Diversity (ok. 100 000 związków o wysokim stopniu różnorodności), biblioteka EACL (w trakcie rozwoju, planowane do 40 000 związków chemicznych przekazywanych przez chemików z całego świata) oraz biblioteka Fragment (ok. 1 000 fragmentów związków o niskiej masie cząsteczkowej) [23]. Konsorcjum udostępnia biblioteki związków chemicznych jednostkom członkowskim. Od 2018 roku platforma przeprowadzająca wysokoprzepustowe badania przesiewowe będąca częścią Centrum Biologii Chemicznej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu jest akredytowanym członkiem konsorcjum EU-OPENSSCREEN (ERIC), co pozwala na dostęp do bibliotek związków chemicznych, wykonywanie wysokoprzepustowych badań przesiewowych dla użytkowników oraz podjęcie współpracy z jednostkami z innych państw członkowskich.

PROJEKTOWANIE I RODZAJE BIBLIOTEK CHEMICZNYCH

Proces projektowania bibliotek małowcząsteczkowych związków chemicznych polega na podziale całej puli kolekcjonowanych związków na mniejsze, odrębne grupy w oparciu o ich cechy [16]. Aby móc utworzyć bibliotekę, związki chemiczne są najczęściej grupowane ze względu na ich właściwości fizykochemiczne, mechanizm działania, strukturę, czy ich aktywność biologiczną, co pozwala na dużą różnorodność i ilość kombinacji. Istotna jest również ilość związków, która zostanie uwzględniona w bibliotece, a także ilość i rodzaj dostępnych informacji na temat związku [18]. Do najczęściej występujących bibliotek małowcząsteczkowych związków chemicznych możemy zaliczyć biblioteki składające się ze związków o wysokiej różnorodności strukturalnej, co może zwiększyć szansę na identyfikację hitów. Przykładem takiego zbioru jest biblioteka ECBL/Diversity z kolekcji EU-OPENSSCREEN, składająca się ze 100 000 związków o dużym zróżnicowaniu strukturalnym [24]. W skład najpopularniejszych bibliotek wchodzi również te składające się ze związków posiadających aktywność biologiczną mających zdolność do przenikania do wnętrza komórek, co jest istotne w przypadku badań na liniach komórkowych. Związki chemiczne w ramach tej biblioteki mają określone cele molekularne i pozwalają na pełniejszą interpretację otrzymanych wyników [9,11]. Oprócz bibliotek związków chemicznych o wysokiej różnorodności lub o wysokiej aktywności, występują również biblioteki składające się ze związków o podobnych właściwościach i strukturze do zatwierdzonych już leków (ang. *drug-like libraries*) lub biblioteki związków skupiających się i wchodzących w interakcję z konkretnym celem molekularnym (ang. *target-oriented libraries*) [12,16,18].

Dość popularnymi bibliotekami wykorzystywanymi w HTS są kolekcje składające się z określonych fragmentów strukturalnych (ang. *fragment libraries*). Są to małe biblioteki związków chemicznych o niskiej masie cząsteczkowej (<250 Da) [13]. Ich wykorzystanie pozwala na wyselekcjonowanie fragmentów związków wiążących się do wybranego celu molekularnego, które następnie mogą posłużyć jako „moduły” do wytworzenia związków chemicznych o zwiększonym powinowactwie [13,14,18]. Umożliwiają one efektywniejszą ocenę zależności strukturalnych od ich odpowiedzi w przeprowadzonym teście molekularnym, co redukuje ilość testowanych związków w kolejnym etapie skryningowym (dalsze związki podlegające testowaniu są selekcjonowane na podstawie wyników skryningu biblioteki fragmentów).

Katalogowanie związków chemicznych na dedykowane biblioteki jest procesem istotnym dla badań HTS, ponieważ to jak zostanie skomponowana biblioteka będzie mieć wpływ na efektywność skryningu, a tym samym na identyfikację hitów [19].

Wraz z rozwojem technologii wysokoprzepustowych badań przesiewowych nastąpił również ogromny postęp w projektowaniu nowych bibliotek chemicznych. Oprócz bibliotek opartych na katalogowaniu pojedynczych małowcząsteczkowych związków chemicznych, istnieją także bi-

bioteki kombinatoryczne, w których skład wchodzi mieszaniny związków chemicznych w różnej kombinacji (ang. *combinatorial libraries*) [18]. Z czasem na rynku pojawiła się również możliwość otrzymania bibliotek opartych na innych makrocząsteczkach, takich jak fragmenty kwasów nukleinowych lub peptydów [8,10].

RODZAJE TESTÓW W WYSOKOPRZEPUSTOWYCH BADANIACH PRZESIEWOWYCH

Głównym celem przeprowadzenia wysokoprzepustowych badań przesiewowych jest identyfikacja związków chemicznych o pożądanej aktywności. Aby tego dokonać, przeprowadzane są specjalnie zaprojektowane testy molekularne (ang. *assay*), które pozwalają na szybką oraz pewną ocenę obecności interakcji danego związku chemicznego z określonym białkiem, enzymem lub szlakiem komórkowym. Ocena ta jest najczęściej oparta na detekcji absorpcyjnej, luminescencyjnej i jej pochodnych (fluorescencji, bioluminescencji i chemiluminescencji) [5]. W wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych wyróżnia się 2 główne grupy eksperymentów, pozwalające na identyfikację hitów: testy biochemiczne, a także testy na liniach komórkowych [8,11].

PROJEKTOWANIE TESTU MOLEKULARNEGO DO UŻYCIA W HTS

Jednym z pierwszych i najistotniejszych kroków w HTS jest dobór i adaptacja odpowiedniego testu molekularnego w taki sposób, by za jego wykorzystaniem możliwa była identyfikacja potencjalnie aktywnych związków o oczekiwanym efekcie biologicznym w możliwie jak najbardziej zmminiaturyzowanej formie. Miniaturyzacja testu pozwala na mniejsze zużycie materiału badawczego, odczynników i materiałów zużywalnych co jest istotne z punktu widzenia ekonomicznego i ekologicznego [12]. Natomiast wybrana strategia analityczna powinna charakteryzować się wysoką czułością, powtarzalnością w wynikach oraz powinna ona być odpowiednia do założonego celu badawczego [11]. Z uwagi na skalę przeprowadzanego skринingu, dobór odczynników powinien być relatywnie tani, a sam przeprowadzany test powinien posiadać jak najmniej kroków by był jak najprostsz i możliwy do późniejszego wykonania z użyciem automatyki [25].

TESTY BIOCHEMICZNE

Testy biochemiczne oparte są na badaniu *in-vitro* interakcji pomiędzy badanym związkiem chemicznym z biblioteki, a wybranym celem biologicznym, takim jak np. białko w postaci enzymu lub receptora [14]. Aby przeprowadzić test, cel ten należy uprzednio zidentyfikować, a następnie odpowiednio przygotować np. poprzez oczyszczenie białka [8]. Testy biochemiczne są najczęściej oparte na detekcji inhibicji reakcji enzymatycznej przez testowany związek chemiczny lub zdolności testowanego związku do wypierania ligandu lub substratu wiążącego się do celu biologicznego [11].

Istnieje wiele strategii w testach biochemicznych do identyfikacji związków, które wchodzi w interakcje z wybranym celem molekularnym. Zalicza się do nich techniki ta-

kie jak: FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*), BRET (ang. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), polaryzacja fluorescencji (ang. *Fluorescence Polarization Assay*, FP) czy też AlphaScreen (ang. *Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen*).

FRET - FLUORESCENCYJNE REZONANSOWE PRZENIESIENIE ENERGII

Technika FRET oparta jest na obecności dwóch cząsteczek fluorescencyjnych zwanych donorem i akceptorem. Gdy cząsteczka donoru wchodzi w stan wzbudzony oraz znajduje się w bardzo bliskiej odległości do cząsteczki akceptora (ok. 1-10 nanometrów), następuje transfer energii z donoru do akceptora, czego efektem jest pojawienie się sygnału fluorescencji [12]. Istotnym warunkiem wpływającym na efektywność procesu FRET jest również nakładanie się widma emisji donoru na widmo wzbudzenia akceptora [8]. Ze względu na to, że sygnał pojawia się tylko w bardzo bliskiej odległości pomiędzy donorem i akceptorem, technika FRET wykorzystywana jest np. do detekcji interakcji pomiędzy dwoma białkami. Pozwala to tym samym na identyfikację związków, które stabilizują lub dezintegrują kompleks białko-białko [11]. W pracy opublikowanej przez Lee i in. 2019 stworzono sondę do techniki FRET poprzez przyłączenie cząsteczki donoru i akceptora do sekwencji peptydowej amyloidu beta. Peptydy te gromadzą się tworząc blaszki amyloidowe, które powiązane są z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera lub Parkinsona. Amyloid posiada zdolność do interakcji z jonami metali, w tym z jonami cynku Zn (II), co może przyczynić się do zmiany w ich konformacji oraz postępującej agregacji. W celu identyfikacji związków hamujących tworzenie się kompleksów beta-amyloidowych z jonami cynku, przeprowadzono skринing 145 związków o pochodzeniu naturalnym, z czego zidentyfikowano 6 związków o najwyższym potencjale hamującym agregację [26].

BRET - BIOLUMINESCENCYJNE REZONANSOWE PRZENIESIENIE ENERGII

Pomimo szerokiego zastosowania techniki FRET, procedura ta posiada pewne ograniczenia, które należy wziąć pod uwagę podczas projektowania testu do badań przesiewowych [8]. Ze względu na konieczność zastosowania zewnętrznego źródła promieniowania do zapoczątkowania transferu energii z cząsteczki donoru do akceptora, cząsteczka akceptora może ulec dodatkowemu wzbudzeniu, tym samym powodując foto-wybielenie (ang. *photo-bleaching*) w wyniku czego fluorofor traci swoją zdolność do fluorescencji [12]. W związku z tym technikę FRET można zastąpić analogiczną techniką bioluminescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (BRET). Proces ten zachodzi podobnie jak w przypadku FRET z tą różnicą, że zamiast fluoroforu, donorem fotonu jest układ zdolny do bioluminescencji (np. lucyferaza w obecności odpowiedniego substratu) [9,11]. W wyniku reakcji chemicznej dochodzi do emisji światła o długości fali odpowiadającej widmu wzbudzenia akceptora, który w następstwie wzbudzenia jest zdolny do fluorescencji. Natomiast cząsteczką akceptora może być np. YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*). W technice BRET eliminuje się konieczność użycia zewnętrznego źródła światła, co wpływa na zmniejszenie sygnału pochodzącego z tła [11].

Technika BRET została wykorzystana w publikacji przygotowanej przez Chappe i in. do przeprowadzenia skriningu 1 200 związków chemicznych z biblioteki Prestwick, w celu identyfikacji inhibitorów wiązania się kanału jonowego TRPV1 (ang. *Transient Receptor Potential channel 1*) z aktywatorem tego kanału – kalmoduliną, co może być potencjalnym, interesującym celem terapeutycznym [27].

POLARYZACJA FLUORESCENCJI

Polaryzacja fluorescencji jest techniką, która pozwala ocenić obecność wiązania między dwoma cząsteczkami na podstawie zmian w ich właściwościach fotofizycznych [28]. W standardowych pomiarach, gdy fluorofor zostanie wzbudzony wiązką światła spolaryzowanego, cząsteczka ta pochłania energię i ulega rotacji emitując światło, które ulega depolaryzacji. W przypadku, gdy fluorofor związany zostanie z większą cząsteczką np. białkiem, fluorofor rotuje wolniej, powodując jej unieruchomienie, co zmienia właściwości emisyjne przez co emitowane światło ulega polaryzacji [12,29]. Zmiany w polaryzacji emitowanego światła są następnie odczytywane, co pozwala na obliczenie polaryzacji lub anizotropii fluorescencji, a tym samym na ocenę wiązania pomiędzy mniejszą cząsteczką znakowaną fluoroforem a białkiem [11]. Główną zaletą techniki polaryzacji fluorescencji jest jej uniwersalność, co umożliwia identyfikację różnych typów kompleksów (np. białko-białko, białko-peptyd lub białko-kwas nukleinowy), a także pozwala na śledzenie zmian strukturalnych enzymów zachodzących w reakcjach enzymatycznych [11,29]. W publikacji Hall i wsp., autorzy zidentyfikowali w 2015 ok. 1 000 różnych testów wysokoprzepustowych opartych na polaryzacji fluorescencji. Większość z nich (ok. 85%) została wykorzystana w badaniach HTS jako metoda służąca do przeprowadzenia dodatkowych, walidacyjnych skriningów w celu wykrycia hitów fałszywie pozytywnych oraz potwierdzenia czy wyselekcjonowany związek wchodzi w interakcję z badanym kompleksem [29].

TECHNIKA ALPHASCREEN

Inną z technik badania interakcji między dwoma biomolekułami jest AlphaScreen. Opiera się ona na nanocząstkach opłaszczonych warstwą hydrożelową, które dzielą się na nanocząstki donorowe i akceptorowe. Zastosowanie promieniowania o odpowiedniej długości fali (680 nm) powoduje, że wzbudzona nanocząstka donorowa generuje cząsteczki tlenu singletowego [11]. Następnie, gdy dwie badane molekuly, do których przyłączone są nanocząstki donorowe jak i akceptorowe znajdują się w bliskiej odległości między sobą, wytworzony przez nanocząstkę donorową, tlen singletowy powoduje wytworzenie reakcji chemiluminescencyjnej przez nanocząstkę akceptora, co z kolei powoduje wzbudzenie fluoroforów zlokalizowanych na tej samej cząstce wynikiem czego dochodzi do emisji światła o określonej długości fali (520–620 nm) [30]. Technika AlphaScreen została przykładowo wykorzystana w skriningu, którego celem była identyfikacja inhibitorów ludzkiego białka wiążącego DNA – HMGA2, którego działanie związane jest prawdopodobnie z otyłością oraz z procesem nowotworzenia [31]. Dodatkowo, test ten opracowano w taki sposób, że może on zostać wykorzystany do ultra-wysokoprzepustowych

badania przesiewowych, podczas których testuje się powyżej 100 000 związków chemicznych dziennie w sposób w pełni zautomatyzowany [10,28].

TESTY KOMÓRKOWE

Testy na liniach komórkowych to szeroki termin obejmujący badania wysokoprzepustowe wykonywane na modelach biologicznych, występujących najczęściej w postaci adherentnych, dwuwymiarowych linii komórkowych. Obecnie, rosnącą popularnością odznaczają się również trójwymiarowe linie komórkowe [32]. W odróżnieniu do testów biochemicznych, w których cel biologiczny taki jak białko, kompleks białko-białko lub receptor jest dokładnie sprecyzowany przed wykonaniem skriningu, testy komórkowe wykonuje się, gdy cel nie jest do końca znany lub występuje on tylko w modelach komórkowych, w związku z tym nie ma możliwości wykonania skriningu w oparciu o testy biochemiczne [11]. Dodatkowo, przeprowadzenie badań HTS na liniach komórkowych pozwala na uzyskanie bardziej kompleksowych informacji dotyczących mechanizmu działania związku oraz identyfikację celów biologicznych w komórce, na które testowany związek wpływa w porównaniu do badań *in vitro* [33]. Zaletą wykorzystania testów komórkowych w badaniach przesiewowych poza identyfikacją różnych mechanizmów, jest również możliwość oceny cytotoksyczności, a także stopnia przenikalności związku przez błonę komórkową, co pozwala na szybsze odrzucenie testowanego związku na wcześniejszym etapie badań [5,11]. Pomimo tego, że dużą zaletą testów komórkowych jest ich wykonanie na modelach istotnych biologicznie, są one również związane z pewnymi ograniczeniami ze względu na to, że dwuwymiarowe hodowle komórkowe bardzo często nie oddają złożoności procesu chorobowego. Przez to testowany związek może mieć zupełnie odmienne działanie w organizmie [33]. Na potrzeby tego artykułu, omówione zostaną główne testy komórkowe wykorzystywane w HTS, takie jak testy przeżywalności, z wykorzystaniem genu reporterowego oraz wieloparametryczne obrazowanie mikroskopowe HCI (ang. *High-Content Imaging*), w tym technika "Cell Painting".

TESTY PRZEŻYWALNOŚCI

Testy przeżywalności wykorzystywane są głównie do oceny proliferacji oraz do detekcji śmierci komórki, co pozwala na ogólną ocenę kondycji komórek [10,34]. W związku z ich uniwersalnością, w HTS pozwalają one na ocenę cytotoksyczności testowanych związków chemicznych, a także identyfikację związków, które prowadzą do śmierci komórek nowotworowych [11,35]. Jednym z najpopularniejszych testów używanych do oszacowania ilości żywych komórek oraz aktywności mitochondrialnej jest test aktywności cytotoksycznej MTT. Test ten opiera się na substracie MTT (roztwór soli tetrazolowej) o żółtym zabarwieniu, który po dodatku do komórek i inkubacji jest redukowany tylko przez żywe komórki do formazanu o purpurowym zabarwieniu, co można zaobserwować przy pomiarze absorbancji przy 570 nm. Ze względu na to, że komórki martwe nie potrafią zredukować MTT do formazanu, powstały sygnał analityczny jest proporcjonalny do ilości żywych komórek [34]. Oprócz testu MTT, do najczęściej wykorzysty-

wanych badań żywotności komórek stosuje się testy oparte na resazuryinie, aktywności proteaz oraz detekcji ATP w komórkach [11,34].

TESTY Z WYKORZYSTANIEM GENU REPORTEROWEGO

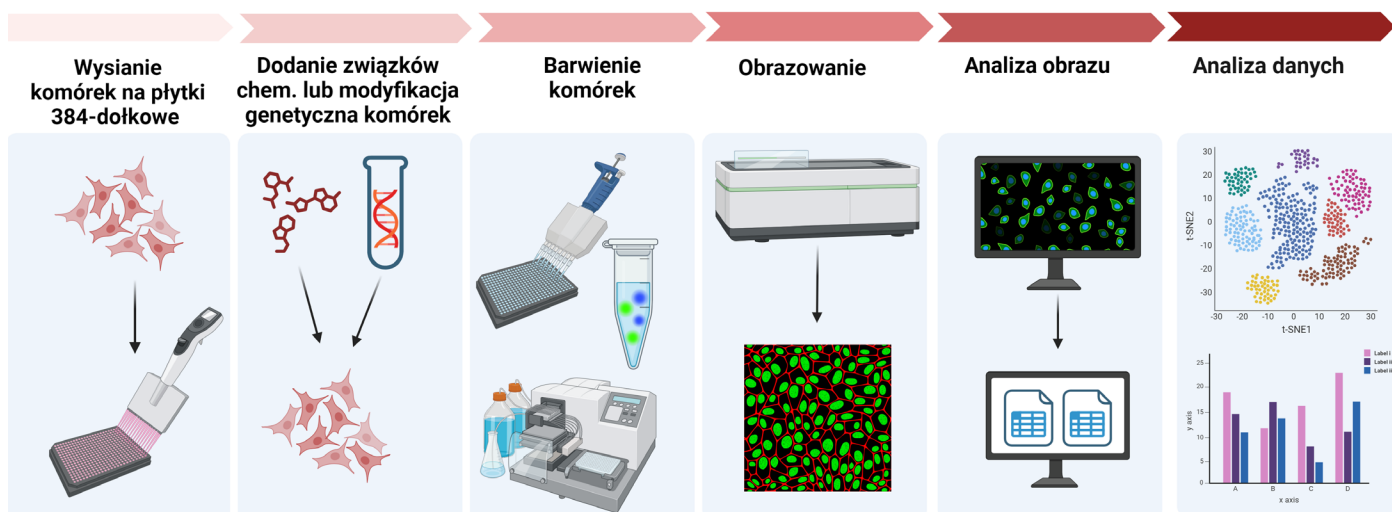
W wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych testy z genem reporterowym wykorzystywane są głównie do badań nad ekspresją genów, a przede wszystkim do badań nad wpływem danego związku chemicznego na proces transkrypcji i translacji [8–10]. W testach tych gen reporterowy, którego ekspresja zależna jest od promotora badanego genu, występuje w postaci sekwencji DNA kodującej białko umożliwiające detekcję sygnału fluorescencji, takie jak np. białko zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescent Protein*, GFP) lub sygnału luminescencji np. białka lucyferazy Renilla lub Firefly [5,11]. Obecność sygnału pochodzącego od białka syntezowanego na bazie genu reporterowego, zależna jest więc od aktywności sekwencji promotora, a także od ingerencji testowanego związku w mechanizm ekspresji genu reporterowego [11]. Gen reporterowy najczęściej występuje w postaci plazmidu, będącego kolistą cząsteczką DNA [8,28].

WIELOPARAMETRYCZNE OBRAZOWANIE MIKROSKOPOWE (HCI)

Wieloparametryczne obrazowanie mikroskopowe jest przykładem testu przeprowadzanego na liniach komórkowych, które w ostatnich latach zyskuje na popularności. Wieloparametryczne obrazowanie mikroskopowe (ang. *High-Content Imaging*, HCI), nazywane również wieloparametrycznym skriningiem (ang. *High-Content Screening*, HCS), a także wieloparametryczną analizą (ang. *High-Content Analysis*, HCA) to szeroka grupa testów, w których wpływ badanego związku chemicznego określa się na podstawie zmian morfologicznych w komórkach obserwowanych na zdjęciach mikroskopowych [11,36]. W przeciwieństwie do standardowych testów na liniach komórkowych, w których mierzona jest intensywność emisji luminescencji i jej pochodnych uśredniona dla wszystkich komórek w dołku, zastosowanie technik mikroskopowych wiąże się z

uzyskaniem kompleksowych danych numerycznych opisujących rozmiar, intensywność fluorescencji, kształt czy teksturę organelli komórkowych dla każdej komórki znajdującej się w dołku [32].

W standardowej procedurze testu pierwszym krokiem jest wysianie komórek w odpowiedniej gęstości na płytce wielodołkowej z użyciem automatycznych dyspenserów cieczy [36]. Po wysianiu, do komórek dodawane są testowane związki chemiczne, również z użyciem automatycznych dyspenserów cieczy. Po kolejnej dobie komórki wybarwiają się wybranymi barwnikami fluorescencyjnymi, a następnie wykonuje zdjęcia komórek znajdujących się w dołkach z użyciem mikroskopu dedykowanego do HCS [11,37]. Po otrzymaniu zdjęć, kolejnym etapem jest analiza obrazu, zwana również segmentacją, w której program identyfikuje wybarwione struktury komórkowe oraz ich właściwości [32,38]. Następnie program z użyciem algorytmów ekstrahuje dane numeryczne, które zawierają szczegółowe informacje dotyczące wielkości, długości, kształtu, powierzchni, intensywności czy tekstury, a także dane na temat ich organizacji przestrzennej [11]. Finalnie, z uzyskanych wieloparametrycznych danych opisujących kondycję komórek "potraktowanych" biblioteką związków chemicznych, wybierane są parametry, które są w stanie w najlepszy sposób scharakteryzować to, w jaki sposób testowany związek wpływa na kondycję komórek [32]. Jednym z najbardziej złożonych wieloparametrycznych testów mikroskopowych jest technika "Cell Painting", stworzona przez Instytut Broad (Broad Institute of Harvard and MIT), w której komórki po wysianiu i "potraktowaniu" związkami chemicznymi wybarwione są określonym zestawem sześciu barwników fluorescencyjnych. Pozwala to na identyfikację i uzyskanie wieloparametrycznych danych opisujących osiem organelli w komórce - jądro komórkowe, filamenty aktynowe, błonę komórkową, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, jąderko, cytoplazmatyczne RNA oraz mitochondrium [38]. Przeprowadzenie techniki barwienia umożliwia zmaksymalizowanie ilości uzyskanych danych numerycznych opisujących właściwości organelli, co przekłada się na bardziej szczegółowy oraz skomplikowany profil morfolo-



Rycina 2. Przedstawienie poszczególnych etapów standardowego testu opartego na wieloparametrycznym obrazowaniu mikroskopowym od wysiania komórek do analizy danych. Rycinę wykonano z użyciem programu BioRender [https://www.biorender.com]. Zaadaptowano z „The Drug Discovery Process”, autorstwa BioRender.com (2024). Źródło: https://app.biorender.com/biorender-templates.

giczny komórek poddanych działaniu danego związku chemicznego [32,35,38] (Ryc. 2).

ETAPY OPTIMALIZACJI SKRININGU

Po wcześniejszym doborze odpowiedniej metodyki oraz wstępnym przygotowaniu reakcji niezbędny jest szereg działań, aby test uznać za gotowy do wykonania przy pomocy badań wysokoprzepustowych. Konieczne jest opracowanie strategii automatyzacji i walidacji testów kontrolnych przed przystąpieniem do rozpoczęcia skriningu. Jeżeli test nie jest odpowiednio zwalidowany i parametry obliczeniowe wykazują nieprawidłowości nie powinno się rozpoczynać tego typu badań przy wykorzystaniu HTS [25].

W kolejnej części artykułu zostaną opisane istotne kroki, które są kluczowe do odpowiedniej optymalizacji, walidacji etapów działania, analizy danych w taki sposób, by w jak najbardziej rzetelny sposób przeprowadzić proces skriningowy.

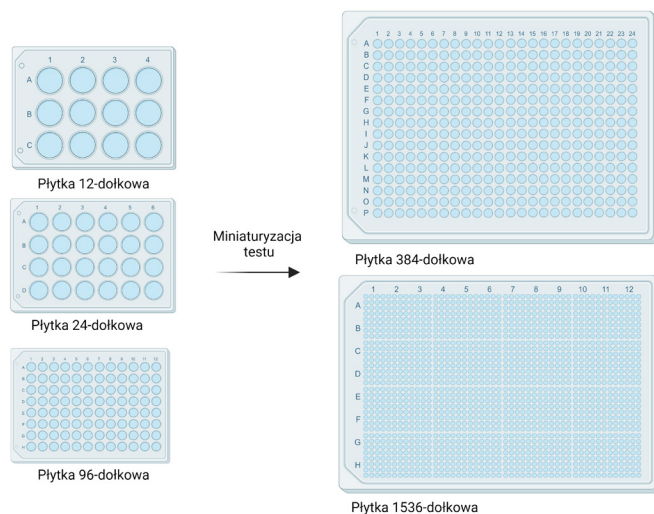
DOBÓR CZYNNIKÓW KONTROLNYCH REAKCJI DO SKRININGU

Na jakość badań wysokoprzepustowych, interpretowanie danych oraz wyniki analizy wpływa dobór kontroli reakcyjnych, ponieważ w oparciu o nie stosuje się wzory matematyczne sprawdzające rzetelność skriningu i obliczany jest procent aktywności badanych związków chemicznych [25]. Stąd kluczowy jest odpowiednio dobrany zestaw związków referencyjnych. W testach stosuje się kontrolę pozytywną, reprezentującą oczekiwaną reakcję i negatywną, czyli niewywołującą oczekiwanego efektu [17]. Naukowcy powinni być świadomi celu poszukiwanego w badaniach i zastanowić się nad najlepszym wyborem kontroli reakcyjnych. Przykładowo, w identyfikacji inhibitorów można jako kontrolę pozytywną wykorzystać inny komercyjnie dostępny związek chemiczny wykazujący inhibicję danego procesu biochemicznego. Ma to na celu wskazanie związków o podobnym działaniu lub hamujących reakcję w wyższym stopniu niż wybrana kontrola. W przypadku, gdy nie mamy komercyjnie dostępnej substancji hamującej reakcję, lub mieści się ona poza zakresem budżetowym albo jest niedozwolona w użyciu, można zastosować reakcję chemiczną bez dodatku enzymu reakcyjnego [39]. Nieprawidłowy dobór kontroli jakości testu może spowodować stratę czasu, dużych nakładów finansowych oraz zasobów. Dodatkowo rozmieszczenie kontroli na płytkach monitoruje i pomaga wychwytywać błędy techniczne podczas procesu skriningowego [17].

MINIATURYZACJA PROCESU

Ze względu na wysokie koszty badań wysokoprzepustowych badacze dążą do zmniejszenia objętości reakcji, a co za tym idzie ilości odczynników potrzebnych do jej wykonania. Miniaturyzacja to technologia opierająca się na użyciu w metodyce minimalnych objętości reakcyjnych przy otrzymaniu wiarygodnych wyników podczas testowania dużej ilości związków chemicznych. Rozwój miniaturyzacji wprowadza wykorzystanie mikropłytek wielodołkowych zwiększając tym samym czułość reakcji i redukując koszty

całego procesu [8,12,40]. Pierwszym etapem jest wybór ilości dołków reakcyjnych znajdujących się na płytce pomiarowej. Wśród komercyjnie dostępnych wariantów w procesie miniaturyzacji coraz częściej wykorzystuje się płytki w formacie 384, 1 536 i 3 854-dołkowym [8]. Im większa ilość studzienek na płytce, tym mniejsza objętość finalnie zużywanych odczynników. Przykładowo, objętość reakcji zmniejsza się z 10–20 ml na uzupełnienie wszystkich dołków płytki 384-dołkowej do < 2ml na płytce 1 536-dołkowej [25] (Ryc. 3).



Rycina 3. Schemat przedstawiający przykładowe formaty płytek wielodołkowych i przeskalowanie badań do wykorzystania skriningowego. Przykłady płytek wielodołkowych przed etapem miniaturyzacji wykorzystywanych w laboratorium (z lewej). Przeskalowanie i optymalizacja do mniejszej objętości reakcyjnej na płytce z większą ilością dołków (z prawej). Rycinę wykonano z użyciem programu BioRender [https://www.biorender.com].

Dozowanie płynów w tak małych objętościach w zależności od metodyki reakcyjnej może być trudniejsze i wymagać bardziej wyspecjalizowanej aparatury. Przeszkodę w wykonywaniu testów mogą stanowić związki lepkie, pieniące się lub rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. W przypadku testów opartych na hodowlach komórkowych naukowcy mierzą się również z tzw. efektem brzegowym płytki, którego skutkiem jest nierównomierna proliferacja komórkowa [8]. Często komórki będące na brzegach i krawędziach płytek rosną szybciej niż te w pozostałej części płytki, wynika to z nierównomiernego parowania cieczy w obrębie wnętrza płytki. W związku z tym w przypadku skriningu komórkowego najczęściej wybiera się jednak płytki 384-dołkowe zamiast formatu 1 536-dołkowego, ponieważ efekt brzegowy jest mniejszy [8,12]. Całkowita wydajność będzie ostatecznie zależec od różnych czynników technicznych w tym używanego sprzętu (np. szybkość czytnika płytek) i właściwości samej metodyki badawczej takiej jak stabilność odczytu czy dostępność odczynników [36]. Oprócz zmniejszenia kosztów eksperymentów, miniaturyzacja zapobiega niepotrzebnemu zużyciu cennych zasobów związków lub odczynników oraz zmniejsza ilość utylizowanych odpadów [12].



Rycina 4. Schemat przedstawiający dobór płytek w badaniach wysokoprzepustowych w zależności od metodyki badawczej [36]. Rycinę wykonano z użyciem programu BioRender [https://www.biorender.com]. Zaadaptowano z „The Drug Discovery Process”, autorstwa BioRender.com (2024). Źródło: https://app.biorender.com/biorender-templates.

WYBÓR PŁYTEK SKRININGOWYCH

Dobór płytek wielodołkowych nie zależy tylko i wyłącznie od ilości dołków na płytce i najniższych kosztów, ale również materiału, z jakiego wykonana jest płytka. Mikroplanki przeznaczone do testów biologicznych powinny posiadać określone właściwości takie jak: stabilność w różnych warunkach temperatury i wilgotności, kształt dna dołka: F-kształtny (płaski), U-kształtny, V-kształtny, lub C-kształtny oraz kompatybilność z odczynnikami chemicznymi, które są wykorzystywane w badaniu [36]. Ponadto, w testach fluorescencyjnych istotnym parametrem jest dobór płytek z niską autofluorescencją oraz dopasowanie do detekcji optycznej sygnału [36,41]. Dla modeli biologicznych ważnym parametrem są płytki adherentne do prowadzenia kultur komórkowych, lub też dla bardziej wymagających linii - płytki pokryte dedykowaną powłoką zwiększającą przyczepność komórek do podłoża [11,42]. W zależności od testu oraz preferowanego systemu detekcji wybór tworzywa jest istotnym czynnikiem. Można wyróżnić tworzywa, takie jak: polistyren (PS), polipropylen (PP), cykliczny kopolimer olefinowy (COC), czy cykliczny polimer olefinowy (COP) [41]. By zmaksymalizować ogólny sukces testu oraz zminimalizować zmienność i niewłaściwe interpretacje odczytu sygnału, należy pamiętać o prawidłowym dobraniu powierzchni mikroplanki.

Wybór koloru płytki nie jest czynnikiem przypadkowym, lecz zależnym od metodyki badawczej. Mikroplanki dostępne są w różnych kolorach: czarnym, białym oraz szarym [41]. Do odczytów luminescencyjnych najczęściej stosuje się płytki białe, bowiem minimalizują problemy związane

z przechodzeniem mierzonego sygnału na sąsiednie dołki [36]. Jednocześnie kolor biały wzmacnia sygnał luminescencji poprzez lepsze odbicie światła. Płytki czarne nadają się do pomiarów fluorescencyjnych, ponieważ nie wymagają dodatkowego wzmocnienia sygnału. Podobnie jak w przypadku białych płytek, kolor czarny chroni przed przechodzeniem sygnałów pomiędzy dołkami [41]. Kolor szary jest próbą kompromisu pomiędzy modelami czarnymi i białymi, gdy wymaga tego dany system detekcji w niektórych modelach badawczych, jest również rzadziej stosowany. Podczas pomiarów absorbancji nie pojawiają się problemy związane z intensywnością sygnału zaburzającą odczyty w dołkach sąsiadujących ze sobą. Dodatkowo źródło przechodzącego światła pada od dołu płytki stąd konieczne jest wykorzystanie płytek przezroczystych [36,41]. Produkowane są również płytki czarne z przezroczystym dnem, co ma zastosowanie w testach komórkowych z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, pozwalającej na obserwację komórek, ocenę fenotypu komórkowego lub optymalizację gęstości wysiania komórek [11,33,36,41] (Ryc. 4).

KONTROLA JAKOŚCI SKRININGU

Wysokoprzepustowe badania przesiewowe są jedną z najbardziej efektywnych strategii w identyfikacji związków biologicznie czynnych. Wiąże się to natomiast z generowaniem dużej ilości danych, a skala tych badań wymaga odpowiedniej kontroli jakości otrzymanych wyników skринingowych z zachowaniem ich istotności statystycznej [43]. W tym celu używa się różnych parametrów statystycznych, które umożliwiają ocenę jakości otrzymanych wyników, a ich odpowiednia kontrola pozwala na uniknięcie powtórze-

Tabela 1. Kryteria wykorzystywane w HTS do oceny jakości testu potwierdzające akceptację optymalizacji warunków eksperymentu do rozpoczęcia badań wysokoprzepustowych. Kryteria te są wykorzystywane przez jednostki skryningowe i farmaceutyczne zarówno do testów komórkowych jak i biochemicznych [25,43,45].

Parametr	Kryterium	Komentarz
Współczynnik Z'	≥ 0,5	Obliczenia wykonane dla 3 osobnych płytek jako walidacyjny test przed rozpoczęciem skryningu Obliczenie z wykorzystaniem pełnych danych bez wcześniejszego usuwania skrajnych wartości Obliczenia dla minimum 16 powtórzeń dla kontroli dodatniej i ujemnej na każdej płytce wielodołkowej Mniej niż 10% płytek o wartości 0.4>
Współczynnik zmienności (%CV)	≤10%	Obliczone dla powtórzeń reakcji i osobno dla kontroli dodatniej Wartość graniczna jest też zależna od modelu biologicznego
S/B	>3	Im większa wartość różnicy sygnału do tła reakcyjnego tym lepsza jakość skryningu
Odchylenie standardowe		Im mniejsze odchylenie tym lepszej jakości dane
Prawidłowa wizualizacja płytki		Brak powtarzalności wyników skorelowanych z lokalizacją na płytkach (powtarzające się tendencje) Widoczne pojedyncze hity

nia procesu. Zanim przeprowadzi się taki skryning warto również posłużyć się tymi parametrami na etapie optymalizacji i adaptacji testu molekularnego do procesu skryningowego [41].

Dopiero po uzyskaniu powtarzalnych i akceptowalnych wyników można uznać optymalizację za zakończoną, a odpowiednia kontrola jakości na tym etapie pozwala na zniwelowanie potencjalnych błędów w trakcie skryningu [44]. Taki test charakteryzuje się możliwie uproszczoną procedurą (mniej kroków w procedurze skutkuje mniejszym obciążeniem testu potencjalnymi błędami), dokładnością, a użyte kontrole negatywne i pozytywne powinny różnicować się na tyle, by móc zaobserwować oczekiwany efekt biologiczny badanych związków [25].

Kluczowym i oczekiwanym rezultatem wykonywanego skryningu jest otrzymanie różnic w otrzymanych wynikach populacji związków potencjalnie aktywnych oraz tych, które nie wywołują oczekiwanego efektu [12]. Obie populacje testowanych związków po obliczeniu ich procentu aktywności normalizując otrzymane wyniki do stosowanych kontroli powinny różnicować się na tyle, by możliwe było wyznaczenie istotnej statystycznie granicznej wartości procentu aktywności, która pozwala na jasne określenie aktywności takiego związku [25].

Właściwym podejściem do interpretacji danych przesiewowych jest wykorzystanie odpowiednich narzędzi statystycznych w analizie eksperymentów. Jednym z nich jest parametr Z', który jest miarą różnicowania się obu zastosowanych kontroli [12,25].

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma \text{ kontroli dodatniej} + 3\sigma \text{ kontroli ujemnej})}{|\mu \text{ kontroli dodatniej} - \mu \text{ kontroli ujemnej}|}$$

gdzie σ to odchylenie standardowe, μ to średnia dla odpowiedniej kontroli. Wartość współczynnika Z' jest oceną jakości otrzymanych wyników dla każdej testowanej płytki. Bezwymiarowa skala tego parametru mieści się w zakresie 0-1 [5]. Z' pozwala na ocenę jakości testu molekularnego (czy test ten jest przystosowany do użycia w HTS) oraz wykonanego skryningu. Monitorowanie jego wartości umożliwia nam wytypowanie płytek wymagających powtórzenia,

a jego tendencje pozwalają na weryfikację błędów technicznych związanych z automatycznym systemem dozowania cieczy [5,25]. Wyniki większe bądź równe 0,5 potwierdzają dobrą jakość otrzymanych wyników, natomiast wyniki poniżej 0,5 świadczą o słabszej jakości eksperymentu lub są całkowicie nieakceptowalne [43]. Współczynnik Z' określa czułość, powtarzalność wyników na różnych płytkach oraz wydajność testu. Parametr ten jest standardem obliczeniowym we wszystkich grupach badawczych wykonujących badania wysokoprzepustowe [25,42].

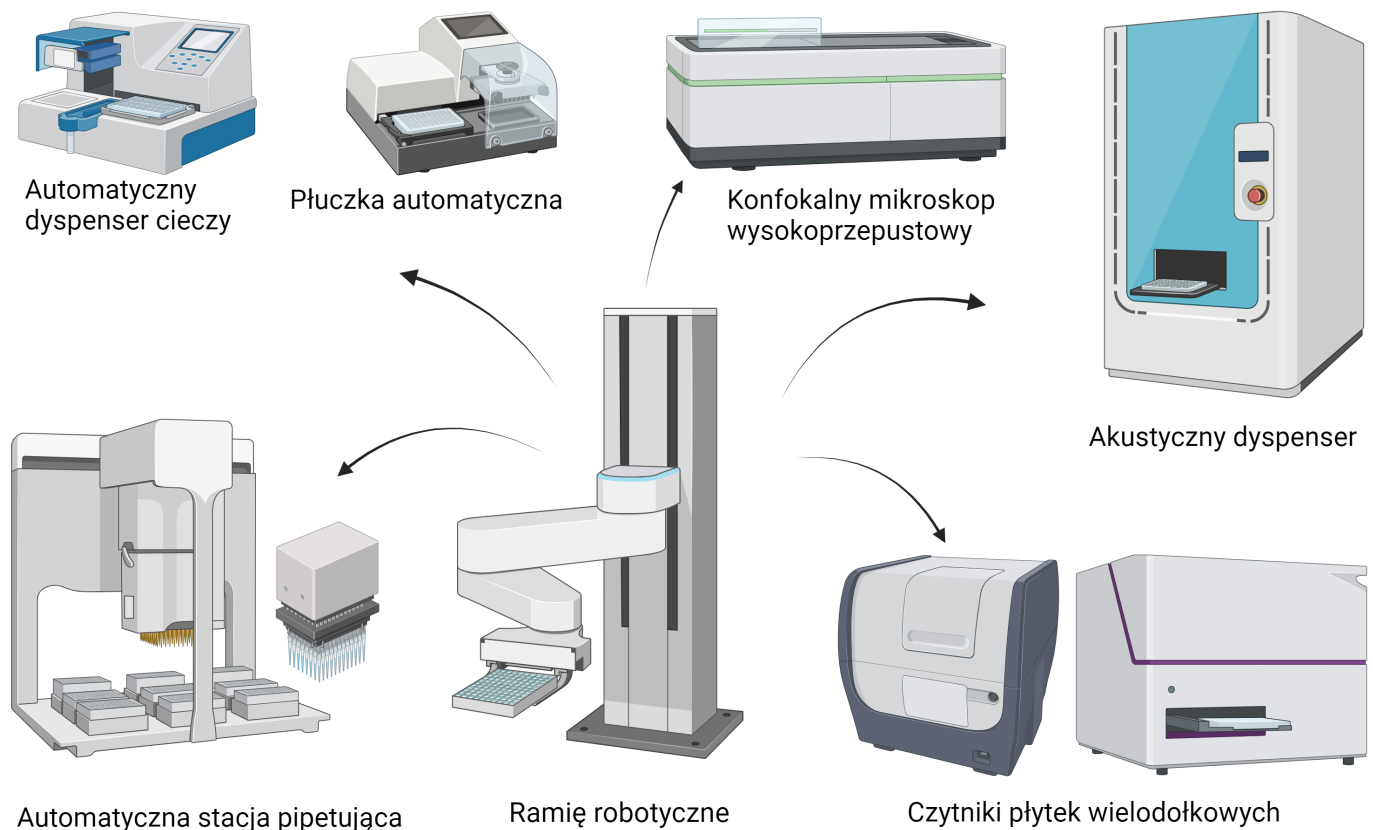
Podstawę wiarygodnego testu stanowi współczynnik zmienności (%CV), co potwierdza odpowiednie dozowanie odczynników, czyli sprawdza działanie sprzętu automatycznego oraz czy czytniki działają prawidłowo.

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\mu} * 100$$

gdzie σ to odchylenie standardowe, μ to średnia dla odpowiedniej kontroli [5].

Innym parametrem obliczeniowym jest stosunek wartości sygnału obu kontroli tzw. stosunek sygnału (kontrola pozytywna) do tła (kontrola negatywna) S/B (ang. *signal to background*) [5,25]. Niskie różnice tego parametru świadczą o słabej jakości testu, ponieważ nie zostaje zapewniona odpowiednia przestrzeń do wychwycenia aktywności badanej substancji i rozróżnienia tła reakcyjnego [25]. Zebrane kryteria są zestawione w Tabeli 1.

Podczas wykonywania badań wysokoprzepustowych z wykorzystaniem większej ilości płytek mogą pojawić się błędy związane ze sprzętem, przykładowo z dyspenserami cieczy. Obserwuje się wtedy efekt sygnałowy odbiegający od normy w postaci kolumn, wierszy lub powtarzających się miejsc na płytce w przypadku płuczek wieloigłowych. Tendencje otrzymanych wyników związane z ich rozmieszczeniem na płytce to tzw. efekt płytki [43]. Bagatelizowanie tego typu wyników może zaburzyć analizę danych dla całego skryningu, stąd bardzo ważne jest wychwycenie tych błędów. Dlatego kluczowym etapem jest wizualizacja danych dla całych płytek, co stanowi kontrolę procesu. Istnieje kilka metod obliczeniowych, które stają się przydatne w korekcji danych lub wyselekcjonowaniu odstających wyników po-



Rycina 5. Przykładowy schemat automatyzacji wykorzystywanej w laboratoriach HTS. W obrębie ramienia robotycznego są podłączone i zintegrowane sprzęty wykorzystywane w procesie skringowym. Rozmieszczenie, rodzaj sprzętów oraz systemy automatyzacji są zależne od zapotrzebowania danego laboratorium. Rycinę wykonano z użyciem programu BioRender [https://www.biorender.com].

magających zwizualizować nieprawidłowości i skłonić do powtórzenia konkretnych płytek reakcyjnych [43,46]. Więcej szczegółowych informacji o dyspenserach cieczy oraz wizualizacji danych w analizie skringowej zostanie omówionych w dalszych rozdziałach publikacji.

WALIDACJA PROCESU PRZED ROZPOCZĘCIEM SKRINGOWANIA

Przed rozpoczęciem procedury skringowej należy ostatecznie upewnić się, że przygotowane działania są powtarzalne i nadają się do testowania dużej grupy związków chemicznych [5]. Eksperymenty walidacyjne wykonuje się w trzech różnych dniach najlepiej przez różne osoby. Zestaw płytek walidacyjnych powinien składać się z większej ilości kontroli ujemnych i dodatnich rozmieszczonych na całej płytce pomiarowej. Po wykonaniu doświadczeń należy sprawdzić powtarzalność wyników, czy są zachowane wszystkie kryteria skringowe. Jeżeli parametry mieszczą się w granicach akceptowalnych oraz nie występuje opisany wcześniej efekt płytki, można uznać etapy optymalizacji, miniaturyzacji i automatyzacji za zakończone i test jest gotowy do badań wysokoprzepustowych [39].

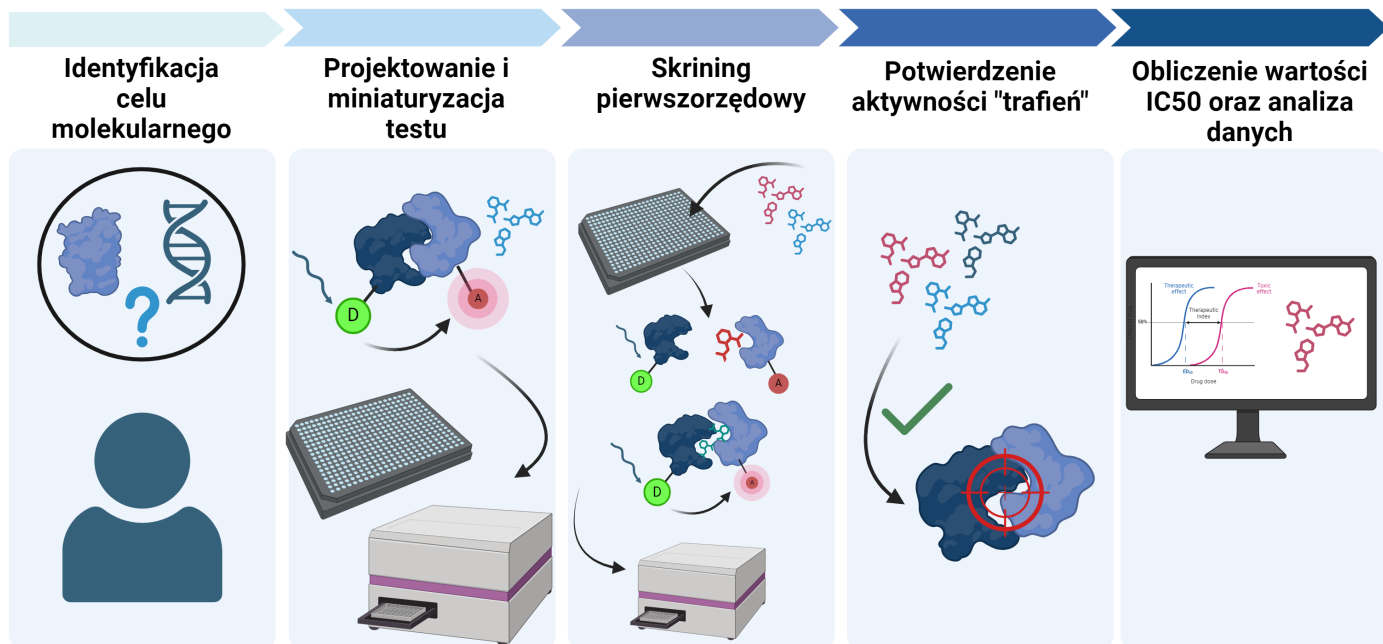
AUTOMATYZACJA PROCESU SKRINGOWEGO

Automatyzacja stanowi podstawę eksperymentów mikroilościowych oraz analiz na szeroką skalę. HTS integruje

ze sobą szereg ciągłych i zautomatyzowanych operacji eksperymentalnych. Sprzęt wykorzystywany w skringach obejmuje systemy do przenoszenia/dozowania cieczy, wielofunkcyjne czytniki płytek obsługiwane z poziomu dedykowanych do tego programów [4]. Ponadto w pętli automatycznej posiadającej w systemie ramiona robotyczne mogą zostać zaadaptowane urządzenia takie jak: dyspensery, wirówki, maszyny do reakcji PCR, lodówki, zamrażarki, zaklejarki płytek, czy etykietownice [4,41]. Centralne ramię robotyczne jest wyposażone w chwytak umożliwiający przenoszenie płytek wielodołkowych pomiędzy zaadaptowanymi sprzętami automatycznymi umieszczonymi w zasięgu pracy robota [10] (Ryc. 5).

W momencie miniaturyzacji procesów oraz przechodzenia na mniejszą skalę płytek, dokładne i precyzyjne obchodzenie się z cieczami jest istotne, ponieważ pozwala zachować powtarzalność wykonywanych testów. Dlatego proces automatyzacji i miniaturyzacji takiego testu przeprowadza się równoległe [8,31,40].

Celem automatyzacji jest zniwelowanie kroków manualnych oraz zapewnienie powtarzalności wyników poprzez wyeliminowanie błędu ludzkiego [4]. Robotyzacja dodatku cieczy okazała się bardzo przydatna spełniając warunki automatyzacji, powtarzalności i dużej przepustowości na tak konkurencyjnym rynku jak nauki przyrodnicze [31,40]. Automatyzacja musi być dopasowana do potrzeb i możliwości



Rycina 6. Przedstawienie kolejności wykonywania standardowych działań w skriningach wysokoprzepustowych. Rycinę wykonano z użyciem programu BioRender [https://www.biorender.com]. Zaadaptowano z „The Drug Discovery Process”, autorstwa BioRender.com (2024). Źródło: https://app.biorender.com/biorender-templates.

laboratorium oraz dostosowana do wymagań testu molekularnego. Bardzo ważnym aspektem jest mieszanie się cieczy w dołkach podczas ich dodatku na płytce [4]. Jednakże należy pamiętać o tym, że niektóre białka mogą być wrażliwe na zbyt intensywne parametry ich dodawania. Z tego względu trzeba znaleźć kompromis pomiędzy odpowiednim mieszaniem cieczy w dołku, a sposobem dozowania w danym doświadczeniu, stąd istotny jest zarówno wybór sprzętu jak i optymalizacja parametrów wybranego urządzenia [44].

Dozowanie można również przeprowadzić dzięki metodzie kontaktowej lub bezkontaktowej, przy czym wariant bezkontaktowy pozwala uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego pomiędzy dołkami na płytce. Obsługa cieczy za pomocą urządzeń automatycznych może odbywać się na kilka sposobów, zarówno poprzez pipetowanie jak i za pomocą fal akustycznych, a obie techniki nadają się do nanoszenia bardzo małych objętości cieczy [31,40]. Do dozowania cieczy na płytki wielodołkowe wykorzystuje się automatyczne dyspensery. W swojej budowie najczęściej posiadają pompy perystaltyczne wykorzystujące wyporność i ściskające elastyczną rurkę przy pomocy obracających się rolek. Pompowany płyn utrzymuje się w rurkach pomiędzy przesuwaniem płytki wielodołkowej, dlatego nie dochodzi do kontaktu zewnętrznego pomiędzy dołkami. System rurek w łatwy sposób można demontować i wymieniać. W przypadku dyspenserów akustycznych metoda opiera się na transferze kropli cieczy o objętości 1-10nl z płytki bibliotecyjnej na płytkę docelową (skriningową). Dozowanie kropli zachodzi bardzo szybko poprzez przyrost wielkości nakładanych na siebie kropli [41].

Skriningi można wykonywać na różne sposoby z wykorzystaniem automatyki np. poprzez zastosowanie pełnej integracji procesu, obsługiwane płytek odpowiednimi partia-

mi oraz w sposób półautomatyczny. Systemy te różnią się w zależności od funkcji takich jak możliwość pozostawienia procesu do samodzielnego działania bez ingerencji człowieka, elastyczność, złożoność oraz ilość zadań. Przykładowo w trybie wsadowym proces jest zależny od pracy człowieka poprzez wkładanie stosów płytek pomiarowych, co wiąże się z dodatkową ilością etapów wykonywanych manualnie. Z drugiej strony pełna integracja z automatyką pozwala na wiele kroków automatycznych z wykorzystaniem ramion robotycznych, co umożliwia wydłużenie czasu pracy całego procesu [8].

ETAPY SKRININGU

Zwykle badania wysokoprzepustowe HTS dzieli się na trzy etapy. Pierwszy etap to podstawowe badanie przesiewowe inaczej nazywane skriningiem pierwszorzędowym (ang. *primary screening*), drugi to ponowne badanie w celu potwierdzenia trafności wytypowanych związków (ang. *hit confirmation*). W ostatnim kroku wykonuje się validację potwierdzonych trafień i przetestowanie ich w szerokim zakresie stężeń w celu wytypowania stężenia wywołującego połowę oczekiwanego efektu (IC_{50} i EC_{50}). Parametr IC_{50} (ang. *inhibitory concentration at half maximum*) określa stężenie badanego związku, które jest konieczne aby zahamować aktywność o 50%. Natomiast, EC_{50} (ang. *effective concentration at half maximum*) jest to takie stężenie substancji, które wywołuje 50% maksymalnej odpowiedzi [47].

W skriningu pierwszorzędowym testuje się całą wybraną bibliotekę związków chemicznych zazwyczaj w jednym powtórzeniu, w tych samych warunkach przy wykorzystaniu zoptymalizowanej wcześniej procedury i automatyzacji. Selekcje potencjalnie aktywnych związków dokonuje się poprzez przekroczenie wyznaczonej granicznej wartości %

aktywności badanego związku, która różnicuje populacje potencjalnie aktywnych i nieaktywnych substancji [48].

W statystyce można wyróżnić dwa rodzaje błędów, które mogą pojawić się podczas interpretacji danych. Są to wcześniej już wspomniane wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne. W badaniach wysokoprzepustowych wynik fałszywie dodatni oznacza wytypowanie badanego związku jako aktywny, jednak tak naprawdę nie wykazuje on żadnej aktywności. Natomiast wynik fałszywie ujemny jest błędem, polegającym na niezidentyfikowaniu faktycznej aktywności i tym samym oznaczenie aktywnego związku jako nieaktywny. By zminimalizować ryzyko nieprawidłowych oznaczeń, idealnym rozwiązaniem jest przetestowanie badanych związków chemicznych w dwóch powtórzeniach. Jednak ze względu na duże ilości testowanych substancji i nakładów finansowych nie zawsze jest to możliwe podczas pierwszego etapu skringingu [9].

Po wykonaniu skringingu pierwszorzędowego kolejnym etapem jest potwierdzenie aktywności wyselekcjonowanych związków. Polega na ponownym przetestowaniu w kilku powtórzeniach substancji bibliotek chemicznych o potencjalnym działaniu w danym modelu badawczym. Celem jest wyeliminowanie wyników fałszywie dodatnich. Skringing potwierdzający wykonuje się w tych samych warunkach co skringing pierwszorzędowy. Jeżeli trafienie zostanie potwierdzone, dana substancja zostaje wytypowana do dalszych testów [8,11]. Tak wyselekcjonowane związki testowane są następnie w etapie trzecim, w którym bada się zakres stężeń i oblicza wartości EC50 dla każdej substancji [10] (Ryc. 6).

Postępy w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych umożliwiły oznaczenie dużej grupy związków chemicznych wykazujących działanie zależne od badanego stężenia: dawka-odpowiedź (ang. *dose response*). Kombinacje oceniające różny zakres aktywności zależny od stężenia dają bardzo wiele informacji na temat działania danych substancji i przyczyniają się w ogromnym stopniu do poszukiwania dobrych kandydatów na leki [49].

Do odrzucenia artefaktów fałszywie dodatnich można również dodatkowo przeprowadzić kontr-skrining (ang. *counter screening*). Proces ten ma kluczowe znaczenie dla eliminacji związków zakłócających odczyty w zastosowanej technologii przesiewowej (interferencja technologii testowej). Kontr-skrining mówi nam o interferencji badanego związku z przeprowadzanym testem i systemem jego detekcji. Podczas skringingu pojawiające się wyniki fałszywie dodatnie mogą wynikać z właściwości związków chemicznych, dlatego ważna jest ich szczegółowa charakterystyka. Wykonanie tego rodzaju skringingu następuje bez obecności np. badanego białka, dzięki temu można ocenić czy właściwości badanego związku dają odpowiedź w przeprowadzanym teście. Kontr-skrining pozwala na wychwycenie związków chemicznych dających sygnał pozytywny jednak wynikający przykładowo z autofluorescencji, wygaszania sygnału, wygaszania tlenu singletowego, rozproszenia światła. W takich przypadkach wyniki dodatnie nie wynikają z faktycznej reakcji i trafienia wyznaczonego celu molekularnego, lecz

metodologii odczytu [35,50]. Istnieją również tzw. skringingi ortogonalne (ang. *orthogonal screening*), których celem jest zastosowanie komplementarnych technologii do potwierdzenia specyficznej bioaktywności na podstawie wcześniej wytypowanych hitów w badaniu przesiewowym [35].

ANALIZA I WIZUALIZACJA DANYCH SKRININGOWYCH

W badaniach przesiewowych mamy do czynienia z dużą ilością wygenerowanych danych skringingowych. Do właściwej identyfikacji związków potencjalnie aktywnych niezbędne są odpowiednie narzędzia analityczne. Ocenę aktywności oznacza się na podstawie kryteriów odcięcia, często z trzema odchyleniami standardowymi w stosunku do średniej procenta inhibicji (3σ). Istnieją również alternatywne formy selekcji związków na podstawie odcięcia, jednak konieczna jest dodatkowa wiedza z zakresu biostatystyki. Licząca zwykle od setek do setek tysięcy danych liczbowych analiza wymaga umiejętności prawidłowej selekcji związków, aby uzyskać mniejszy podzbiór do dalszych etapów eksperymentalnych. Proces ten opiera się wykorzystaniu metod statystycznych, czasami metod chemometrycznych czy chemoinformatyki [13]. Należy obliczyć współczynnik Z' dla każdej płytki skringingowej, jeżeli wyniki nie mieszczą się w standardzie wcześniej opisanych kryteriów kontrolnych należy powtórzyć proces dla wytypowanych płytek [25]. By prawidłowo porównywać ze sobą wyniki znajdujące się na różnych płytkach należy obliczyć % inhibicji lub aktywacji, który w dużej mierze zależy od jakości danych w dołkach kontrolnych [43]. Na podstawie obliczeń dopasowanych do metodyki badań, związki chemiczne w skringingu wysokoprzepustowym oznaczane są jako *aktywne*, *nieaktywne* lub *niejednoznaczne* [51].

By zidentyfikować powstały efekt płytki wspomnianej podczas kontroli jakości parametrów skringingowych, najlepszą metodą jest wspomniana wyżej wizualizacja danych. Jest to weryfikacja wygenerowanych wyników, nie tylko w trakcie optymalizacji procesu, ale również jako kontrola jakości po wykonanym skringingu. Ze względu na utratę prawdziwego sygnału, dołki na płytce z artefaktem należy wykluczyć i usunąć z analizy lub wytypować płytki skringingowe do powtórzenia. Podczas kontroli wizualnej tzw. mapy ciepła (ang. *Heat map*), lokalne artefakty wewnątrzpłytkowe oznaczone jako trafienia występują jako obszary obejmujące sąsiadujące ze sobą regiony na płytce. Im większy obszar, tym mniejsze prawdopodobieństwo prawidłowego odczytu, ponieważ biblioteki chemiczne są tak zaprojektowane na płytkach, by uwzględnić różnorodność chemiczną. Prawidłowe cele wyników skringingowych przy testowaniu bibliotek związków nie przekraczają zwykle 1% wyników. Usuwanie artefaktów tylko wizualnie może być bardzo pomocne i niezawodne, ale również bardzo pracochłonne. Stąd istnieją badania nad połączeniem standardowych technik przetwarzania obrazu z wynikami symulacji statystycznej w celu usunięcia błędnych trafień skringingowych bez interwencji człowieka [45].

PROGRAMY DO ANALIZY HTS

Ze względu na wysoki proces automatyzacji oraz dostęp do bibliotek chemicznych składających się z setek tysięcy związków do przetestowania, analiza danych i identyfikacja hitów jest procesem wieloetapowym oraz bardzo złożonym [52]. Ilość przetestowanych związków przekłada się na dużą ilość wygenerowanych danych, co wymaga zastosowania zaawansowanych narzędzi, które pozwolą na ich przetworzenie, przeprowadzenie analizy, wizualizację i prawidłową interpretację. W związku z tym, do analizy danych uzyskanych z badań HTS pożądane są programy, które są relatywnie proste w obsłudze i przyjazne dla użytkownika. Dodatkowo, ze względu na różnorodność testów oraz systemów detekcji, preferowane są programy, wykazujące się dużą elastycznością, w których poszczególne kroki można łatwo modyfikować w zależności od potrzeb. W badaniach HTS istotnym elementem jest kontrola jakości danych, w związku z tym wykorzystywane programy powinny umożliwiać przeprowadzenie zaawansowanych obliczeń statystycznych. Jednym z podstawowych programów do analizy danych jest ogólnodostępny i darmowy program KNIME. Pozwala on na stworzenie pełnego procesu analizy danych (od organizacji danych surowych do ich wizualizacji) poprzez wbudowane moduły, bez konieczności znajomości programowania (<https://www.knime.com/solutions/versatile-and-open-analytics-life-sciences>). Kolejnym popularnym oprogramowaniem w analizie danych jest Spotfire (TIBCO) (<https://www.spotfire.com>), który jest wykorzystywany przede wszystkim do przeprowadzenia zaawansowanej wizualizacji uzyskanych danych. Jest to szczególnie istotny element kontroli jakości danych pochodzących ze skringingu, ponieważ pozwala ona na dokładniejsze i łatwiejsze, wizualne monitorowanie jakości setek tysięcy pojedynczych wyników w celu oceny czy procedura skringingowa została wykonana poprawnie [28]. Obecnie wiele firm wprowadza rozwiązania programowe umożliwiające analizę oraz zarządzanie otrzymanych danych skringingowych.

SZTUCZNA INTELIGENCJA

Od lat 60. XX wieku sztuczna inteligencja (ang. *Artificial Intelligence*, AI) znalazła zastosowanie w chemii medycznej w projektowaniu związków i odkrywaniu leków. Obecnie zastosowanie sztucznej inteligencji rozszerzyło się do analizy obrazu, sterowania robotyką i logistyką procesów automatyzacji [8]. Dodatkowo, narzędzia sztucznej inteligencji wykorzystuje się również do projektowania bibliotek związków chemicznych [16]. AI jest ściśle powiązana z procesem poszukiwania nowych leków terapeutycznych i skorelowana z generowanymi danymi skringingów wysokoprzepustowych. Dzięki jej zastosowaniu można przewidywać trafienia, analizować dane i poszerzać predykcje. Jest niezwykle ważnym narzędziem w przemyśle farmaceutycznym [53].

Sztuczna inteligencja w tematyce HTS znalazła również zastosowanie w przypadku skringingu opartego na wieloparametrycznym obrazowaniu mikroskopowym przeprowadzonym na liniach komórkowych. Ze względu na to, że technika ta pozwala na obrazowanie oraz obserwację nawet

subtelnych zmian morfologicznych w komórkach potraktowanych danym związkiem chemicznym, ilość wygenerowanych szczegółowych danych numerycznych opisujących profil morfologiczny komórek staje się problematyczna dla naukowców w dalszej analizie i wizualizacji [37]. Obecnie, do analizy zdjęć komórkowych uzyskanych w testach HCI wykorzystuje się algorytmy uczenia maszynowego, które trenuje się na zestawach obrazów mikroskopowych w celu nauki identyfikacji komórek, segmentacji i ekstrakcji parametrów opisujących kondycję komórek, a następnie wyborze statystycznie istotnych parametrów. W oparciu o trening, algorytm dokonuje predykcji jak dany związek wpłynął na fenotyp komórek, pozwalając na uzyskanie informacji dotyczących mechanizmu działania określonego związku, a także pozwala na wyodrębnienie grup (ang. *cluster*) związków o podobnym efekcie [32,37].

PODSUMOWANIE

W procesie opracowywania leków istnieje duże zapotrzebowanie na wykorzystanie metod o dużej przepustowości w poszukiwaniu potencjalnych związków terapeutycznych oraz obniżenie kosztów całego procesu. Nieprawidłowe wytypowanie związków prowadzi do zużycia ogromnych nakładów finansowych, straty czasu i ogromu pracy. Głównym celem skringingów wysokoprzepustowych jest przetestowanie bibliotek chemicznych często składających się z setek tysięcy kandydatów na leki w wielu modelach chorobowych i szlakach molekularnych. HTS odgrywa ogromną rolę na wczesnym etapie poszukiwania i opracowywania substancji terapeutycznych. Zapewnia ilościową i jakościową charakterystykę związków chemicznych oraz wsparcie analityczne w badaniach przedklinicznych. Dzięki przeskalowaniu i miniaturyzacji procesu pozwala na przetestowanie milionów związków chemicznych obniżając też koszty całego procesu wprowadzenia leku na rynek przez dokładną selekcję badanych bibliotek. Automatyzacja i robotyzacja procesu w badaniach wysokoprzepustowych zwiększa powtarzalność i przyspiesza pracę. Należy jednak pamiętać o rzetelnej ocenie parametrów jakościowych skringingu, stosowaniu odpowiednich kryteriów analitycznych, kontroli jakości na każdym etapie procesu, właściwie dobranej analizie danych i wizualizacji. Etapy te są kluczowe do prawidłowej selekcji badanych związków chemicznych, odrzuceniu wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. HTS jest metodą selekcyjną na wczesnym etapie badań, dlatego niezmiernie ważne jest dobranie odpowiedniej procedury i zasad, by w jak najlepszym stopniu pomijać wszelkie błędy i eliminować nieprawidłowe wyniki.

PIŚMIENNICTWO

1. Berdigaliyev N, Aljofan M (2020) An overview of drug discovery and development. *Future Med Chem* 12(10):939–47
2. Shultana S, Maraz KM, Ahmed A, Sultana T, Khan RA (2021) Drug design, discovery and development and their safety or efficacy on human body. *GSC Adv Res Rev* 17(2):113–22
3. Berg EL (2021). The future of phenotypic drug discovery. *Cell Chem Biol* 28(3):424–30
4. Zeng W, Guo L, Xu S, Chen J, Zhou J (2020) High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. *Trends Biotechnol* 38(8):888–906
5. Gangadharan NT, Venkatachalam AB, Sugathan S (2017) High-Throughput and In Silico Screening in Drug Discovery. W: *Bioresources*

- and Bioprocess in Biotechnology. Springer Nature Singapore Pte Ltd, str. 1–443
6. Kumar R. Drug Discovery (Lead Identification and High Throughput Screening) (2021) *Res J Pharmacol Pharmacodyn* 13(2):46–50
 7. Macarron R, Banks MN, Bojanic D, Burns DJ, Cirovic DA, Garyantes T, Green DVS, Hertzberg RP, Janzen WP, Paslay JW, Schopfer U, Sittampalam GS (2011) Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov* 10(3):188–95
 8. Faisal Bokhari F, Albukhari A (2021) Design and Implementation of High Throughput Screening Assays for Drug Discoveries. W: High-Throughput Screening for Drug Discovery. IntechOpen, str. 128
 9. Zhang Z, Guan N, Li T, Mais DE, Wang M (2012) Quality control of cell-based high-throughput drug screening. *Acta Pharm Sin B* 2(5):429–38
 10. Szymański P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E (2012) Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery-Toxicological Screening Tests. *Int J Mol Sci* 13(1):427–52
 11. Blay V, Tolani B, Ho SP, Arkin MR (2020) High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discov Today*. 25(10):1807–21.
 12. Hajare AA, Salunkhe SS, Mali SS, Gorde SS, Nadaf SJ, Pishawikar SA (2014) Review on: High-Throughput Screening Is An Approach To Drug Discovery. *Am J PharmTech Res* 4(1):113–29
 13. Dahlin JL, Walters MA (2014) The essential roles of chemistry in high-throughput screening triage. *Futur Med Chem* 6(11):1265–90
 14. Hughes JP, Rees SS, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 162(6):1239–49
 15. Chen B (2022) Drug Discovery and Development Process. *Int Res J Biochem Bioinforma* 12(3):1–2
 16. Olmedo DA, Durant-Archibold AA, López-Pérez JL, Medina-Franco JL (2023) Design and Diversity Analysis of Chemical Libraries in Drug Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 26:1–14
 17. Khan T (2024) An Overview of High Throughput Screening. *The Scientist*.
 18. Gong Z, Hu G, Li Q, Liu Z, Wang F, Zhang X, Xiong J, Li P, Xu Y, Ma R, Chen S, Li J (2017) Compound Libraries: Recent Advances and Their Applications in Drug Discovery. *Curr Drug Discov Technol* 14(4):216–28
 19. Paricharak S, Méndez-Lucio O, Ravindranath AC, Bender A, Ijzerman AP, van Westen GJP (2018) Data-driven approaches used for compound library design, hit triage and bioactivity modeling in high-throughput screening. *Brief Bioinform* 19(2):277–85
 20. Matson SL, Chatterjee M, Stock DA, Leet JE, Dumas EA, Ferrante CD, Monahan WE, Cook LS, Watson J, Cloutier NJ, Ferrante MA, Houston JG, Banks MN (2009) Best practices in compound management for preserving compound integrity and accurately providing samples for assays. *J Biomol Screen* 14(5):476–84
 21. Janzen WP, Popa-Burke IG (2009) Review: Advances in improving the quality and flexibility of compound management. *J Biomol Screen* 14(5):444–51
 22. ABOUT EU-OPENSREEN (ERIC) <https://www.eu-openscreen.eu/about/quick-facts.html>
 23. EU-OPENSREEN COMPOUND COLLECTION <https://www.eu-openscreen.eu/services/compound-collection.html>
 24. EU-OPENSREEN DIVERSITY COMPOUND LIBRARY <https://www.eu-openscreen.eu/services/compound-collection/european-chemical-biology-library-eubl-diversity-library.html>
 25. Murray D, Wigglesworth M (2016) HTS Methods: Assay Design and Optimisation. W: Bittker JA, Ross NT (red) High Throughput Screening Methods: Evolution and Refinement. Murray, D. The Royal Society of Chemistry
 26. Lee HJ, Lee YG, Kang J, Yang SH, Kim JH, Ghisaidoobe ABT, Kang HJ, Lee SR, Lim MH, Chung SJ (2019) Monitoring metal-amyloid- β complexation by a FRET-based probe: Design, detection, and inhibitor screening. *Chem Sci* 10:1000–7
 27. Chappe Y, Michel P, Joushomme A, Barbeau S, Pierredon S, Baron L, Garenne A, de Gannes FP, Hurtier A, Mayer S, Lagroye I, Quignard JF, Ducret T, Compan V, Franchet C, Percherancier Y (2021) High-throughput screening of TRPV1 ligands in the light of the Bioluminescence Resonance Energy Transfer technique. *Mol Pharmacol* 100(3):237–57
 28. Martis EA, Radhakrishnan R, Badve RR (2011) High-Throughput Screening: The Hits and Leads of Drug Discovery - An Overview. *J Appl Pharm Sci* 01(01):2–10
 29. Hall MD, Yasgar A, Peryea T, Braisted JC, Jadhav A, Simeonov A, Coussens NP (2016) Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. *Methods Appl Fluoresc* 4(2):1–41
 30. Bosse R, Illy C, Chelsky D (2002) Principles of AlphaScreen, Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay. Application note, Perkin Elmer
 31. Su L, Bryan N, Battista S, Freitas J, Garabedian A, D'Alessio F, Romano M, Falanga F, Fusco A, Kos L, Chambers J, Fernandez-Lima F, Chappagain PP, Vasile S, Smith L, Leng F (2020) Identification of HMGA2 inhibitors by AlphaScreen-based ultra-high-throughput screening assays. *Sci Rep* 10:18850(1):1–14
 32. Lin S, Schorpp K, Rothenaigner I, Hadian K. (2020) Image-based high-content screening in drug discovery. *Drug Discov Today* 25(8):1348–61
 33. Wei F, Wang S, Gou X (2021) A review for cell-based screening methods in drug discovery. *Biophys Reports* 7(6):504–16
 34. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2016) Cell Viability Assays. W: Assay Guidance Manual. str. 1–25
 35. Rothenaigner I, Hadian K (2021) Brief Guide: Experimental Strategies for High-Quality Hit Selection from Small-Molecule Screening Campaigns. *SLAS Discov* 26(7):851–4
 36. Auld DS, Coassin PA, Coussens NP, Hensley P, Klumpp-Thomas C, Michael S, Sittampalam GS, Trask OJ, Wagner BK, Weidner JR, Wildey MJ, Dahlin JL (2020) Microplate Selection and Recommended Practices in High-throughput Screening and Quantitative Biology. W: Assay Guidance Manual. str. 1–50
 37. Dorval T, Chanrion B, Cattin ME, Stephan JP (2018) Filling the drug discovery gap: is high-content screening the missing link? *Curr Opin Pharmacol* 42:40–5
 38. Bray MA, Singh S, Han H, Davis CT, Borgeson B, Hartland C, Kost-Alimova M, Gustafsdottir SM, Gibson CC, Carpenter AE (2016) Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat Protoc* 11(9):1757–74
 39. Chai SC, Goktug AN, Chen T (2015) Assay Validation in High Throughput Screening - from Concept to Application. W: Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine. InTech
 40. Silva TC, Eppink M, Ottens M (2022) Automation and miniaturization: enabling tools for fast, high-throughput process development in integrated continuous biomanufacturing. *J Chem Technol Biotechnol* 97(9):2365–75
 41. Jones E, Michael S, Sittampalam GS (2004) Basics of Assay Equipment and Instrumentation for High Throughput Screening. W: Assay Guidance Manual. str. 1–26
 42. Knight S, Plant H, McWilliams L, Murray D, Dixon-Steele R, Varghese A, Harper P, Ramme A, McArdle P, Engberg S, Bennett N, Blackett C, Wigglesworth M (2017) Enabling 1536-Well High-Throughput Cell-Based Screening through the Application of Novel Centrifugal Plate Washing. *SLAS Discov* 22(6):732–42
 43. Mpindi JP, Swapnil P, Dmitrii B, Jani S, Saeed K, Wernerberg K, Aittokallio T, Östling P, Kallioniemi O (2015) Impact of normalization methods on high-throughput screening data with high hit rates and drug testing with dose-response data. *Bioinformatics* 31(23):3815–21
 44. Selekmán JA, Qiu J, Tran K, Stevens J, Rosso V, Simmons E, Xiao Y, Janey J (2017) High-throughput automation in chemical process development. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 8:525–47
 45. Zhai Y, Chen K, Zhong Y, Zhou B, Ainscow E, Wu YT, Zhou Y (2016) An Automatic Quality Control Pipeline for High-Throughput Screening Hit Identification. *J Biomol Screen* 21(8):832–41

46. Hentz NG, Knaide TR (2014) Effect of Liquid-Handling Accuracy on Assay Performance. *J Lab Autom* 19(2):153–62
47. Li M, Chou J, King KW, Jing J, Wei D, Yang L (2015) ICECAP: An Integrated, General-Purpose, Automation-Assisted IC50/EC50 Assay Platform. *J Lab Autom* 20(1):32–45
48. Shou WZ, Gerritz SW, Harden D, Lawrence RM, Chase P, Chin J, Surti N, Lippy JS, Weller HN, Nielsen J, Weerakoon D (2021) Rapid Compound Integrity Assessment for High-Throughput Screening Hit Triaging. *SLAS Discov* 26(2):242–7
49. He L, Kuleskiy E, Saarela J, Turunen L, Wennerberg K, Aittokallio T, Tang J (2018) Methods for high-throughput drug combination screening and synergy scoring. *W: Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. str: 351–98
50. David L, Walsh J, Sturm N, Feierberg I, Nissink JWM, Chen H, Bajorath J, Engkvist O (2019) Identification of Compounds That Interfere with High-Throughput Screening Assay Technologies. *ChemMedChem* 14(20):1795–802
51. Goodwin S, Shahtahmassebi G, Hanley QS (2020) Statistical models for identifying frequent hitters in high throughput screening. *Sci Rep* 10:17200(1):1–13
52. Kämpf C, Specht M, Scholz A, Puppel SH, Doose G, Reiche K, Schor J, Hackermüller J (2019) Uap: Reproducible and robust HTS data analysis. *BMC Bioinformatics* 664(1):1–9
53. Paul D, Sanap G, Shenoy S, Kalyane D, Kalia K, Tekade RK (2021) Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug Discov Today* 26(1) str: 80–93

The role and application of high-throughput screening in the search for chemical compounds of therapeutic activity

Natalia Karczewska¹, Monika Pyc¹✉, Krzysztof Żukowski¹, Joanna Kosman^{1,2}, Dorota Kwiatek¹, Jacek Ł. Kolanowski¹

¹Centre for Chemical Biology, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań

²Department of Bioanalytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań

✉Corresponding author: mpyc@ibch.poznan.pl

Keywords: high-throughput screening studies, screening, drug discovery, compound libraries, automation

ABSTRACT

With the development of medicine and the aging population, the demand for more effective therapies is escalating. A tool that facilitates the discovery and introduction of new therapeutic drugs is High-Throughput Screening (HTS). These tests, consisting of a wide set of various assays, allow testing hundreds of thousands of compounds in a short period of time. The aim is to accurately identify active compounds that could become potential therapeutic candidates in the pharmaceutical industry. HTS is the first step in the quest for potential drugs, therefore it is one of the crucial tests that determine whether a particular drug candidate will be discovered. In this review, different stages of high-throughput screening studies will be described, as well as methods utilized in these studies. The necessary steps in the optimization of these tests, selection of equipment, automation and key quality control parameters for reliably performed screening will also be presented.

WYSOKOPRZEPUSTOWE BADANIA PRZESIEWOWE

