

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Рябухін Сергій Вікторович

Протокол № \_\_ засідання кафедри

від “\_\_” \_\_\_\_\_ 2022 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ПЕПТИДНИХ  
ЛЮМОБІОТИКІВ, АНАЛОГІВ ГРАМІЦИДИНУ С, НА КУЛЬТУРИ  
ЛЮДСЬКИХ РАКОВИХ КЛІТИН**

Випускна кваліфікаційна робота  
бакалавра студента спеціальності  
102 «Хімія»

освітньої програми

«Хімія (високі технології)»

**Горбатов Катерини Павлівни**

Науковий керівник:

директор Інституту високих технологій,

доктор хімічних наук

**Комаров Ігор Володимирович**

Оцінка захисту роботи:

---

**Київ – 2022 р.**

## АНОТАЦІЯ

**Горбатов К.П.** Дослідження цитотоксичності пептидних люмобіотиків, аналогів грамїцидину С, на культурі людських ракових клітин.

Кваліфікаційна робота бакалавра за напрямком підготовки 102 Хімія. — Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Інститут високих технологій, кафедра супрамолекулярної хімії. — Київ — 2022.

**Ключові слова:** люмобіотики, клітинопроникні пептиди, грамїцидин С, цитотоксичність, конфокальна мікроскопія, високопродуктивний клітинний скрінінг.

Люмобіотики — це сполуки різної хімічної природи, що здатні до фото-«перемикання» між двома формами завдяки наявності у їхній структурі фотоперемикача — фоточутливого фрагменту, що ізомеризується під дією світла. У даній дипломній роботі було проведено дослідження зміни цитотоксичної дії у часі «закритої» та «відкритої» форм двох представників класу пептидних люмобіотиків, діарилетен-модифікованих аналогів природного антибіотику грамїцидину С, LMB002 та LMB033 на культуру людських ракових клітин HeLa. Було застосовано методики фарбування клітин флуоресцентними барвниками, отримання зображень за допомогою флуоресцентної конфокальної мікроскопії та автоматизованої обробки отриманих даних. У ході дослідження було продемонстровано, що «відкриті» форми обох люмобіотиків володіють на порядки вищою цитотоксичністю, ніж відповідні «закриті» форми, що свідчить про фотоконтрольовану біологічну активність сполук.

## ANNOTATION

**Horbatok K.P.** Cytotoxicity research of peptidic lumobiotics, analogues of gramicidin S, on human cancer cell culture.

Qualification work of bachelor in the field of study 102 Chemistry. — Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of High Technologies, Department of Supramolecular Chemistry. — Kyiv — 2022.

**Key words:** lumobiotics, cell-penetrating peptides, gramicidin S, cytotoxicity, confocal fluorescent microscopy, high-throughput cell screening.

Lumobiotics are compounds of different chemical nature that are able to photo-“switch” between two forms due to built-in photo-switch – photosensitive fragment that isomerizes upon light irradiation. In this thesis we conducted time-dependent cytotoxicity research on “closed” and “opened” forms of two representatives of peptidic lumobiotics, diarylethene-modified analogues of natural antibiotic gramicidin S, LMB002 and LMB033 on human cancer cell culture HeLa. We used methods of fluorescent staining, fluorescent confocal imaging and automatized analysis of obtained data. In our research we showed that “opened” forms of both lumobiotics demonstrate much higher cytotoxicity than correspondent “closed” forms which is evidence of photo-controllable biological activity of studied compounds.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДАЕ	– діарилетен
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
РНК	– рибонуклеїнова кислота
СТС	– ставроспорин
СКВСА	– середнє квадратичне відхилення середнього арифметичного
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	– (fetus bovine serum) бичача сироватка
PBS	– (phosphate buffered saline) натрій-фосфатний буфер
IC <sub>50</sub>	– концентрація напівмаксимальної дії
EthD-1	– (ethidium homodimer-1) етидій гомодимер-1
PI	– (propidium iodide) пропідій йодид

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	<b>6</b>
<b>1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Клітинопроникні пептиди: відкриття та дослідження</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Фотоконтрольовані клітинопроникні пептидоміметики</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Фотоконтрольовані мембраноактивні пептидоміметики на основі граміцидину С</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 Флуоресцентна конфокальна мікроскопія як ефективний метод дослідження <i>in vitro</i></b> .....	<b>16</b>
<b>2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Інструменти і матеріали</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Визначення оптимальних умов для експерименту</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 Визначення цитотоксичності люмобіотиків LMB033 та LMB002</b> .....	<b>20</b>
<b>3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Визначення оптимальних умов для експерименту</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2. Визначення цитотоксичності люмобіотика LMB033</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Визначення цитотоксичності люмобіотика LMB002</b> .....	<b>29</b>
<b>4. ВИСНОВКИ</b> .....	<b>34</b>
<b>5. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>35</b>
<b>ДОДАТКИ</b> .....	<b>37</b>

## ВСТУП

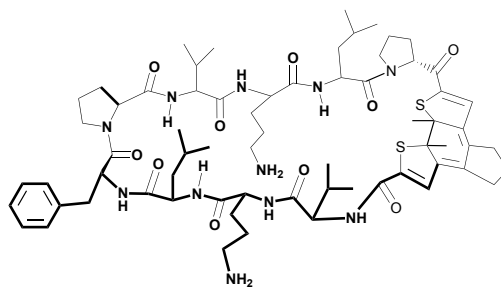
Люмобіотики — це сполуки різної хімічної природи, що здатні до фото-«перемикання» між двома формами завдяки наявності у їхній структурі фотоперемикача — фоточутливого фрагменту, що ізомеризується під дією світла. Одним із перспективних напрямків фармакологічних досліджень є вбудовування фотоперемикача у структуру молекул природного походження, зокрема пептидів, що дозволяє отримати фоточутливі аналоги природних пептидів — люмобіотики пептидної природи (пептидоміметики).

Пептиди є унікальним класом лікарських засобів, що складаються з ланцюжка амінокислот та мають молекулярну масу від 500 до 5000 Дальтон. З часів першого медичного використання пептиду природного походження інсуліну у 1922 році, яке повністю змінило підхід до лікування діабету I типу, більше 80 пептидів були схвалені для застосування у лікувальних цілях та вийшли на світовий ринок<sup>[1]</sup>. Станом на 2021 рік 150 потенційних лікарських препаратів пептидної природи знаходилися у клінічній розробці і ще близько 400-600 проходили доклінічні дослідження<sup>[1]</sup>. Враховуючи удосконалення методів пептидного синтезу та значні інвестиції в галузь, вчені прогнозують лише зростання темпів розробки та дослідження нових пептидів для використання у медичній практиці. Що робить пептиди перспективним напрямом в області *drug discovery*?

З точки зору фармакодинаміки пептиди виступають у якості гормонів, факторів росту, нейротрансмітерів, лігандів йонних каналів та анти-інфекційних агентів, що специфічно зв'язуються з рецепторами на поверхні клітин, запускаючи внутрішньоклітинні біохімічні процеси. Якими перевагами вони володіють порівняно з біологічними препаратами (протеїни, антитіла, клітини та тканини) та малими молекулами? У порівнянні з біопрепаратами пептиди практично не викликають імунної реакції. У порівнянні з малими молекулами зв'язування пептидів з рецепторами характеризується вищою афінністю та специфічністю, а також здатністю

інгібувати значні за площею поверхневі взаємодії, зокрема білок-білкові, що для малих молекул унеможлиблює невеликий розмір. Недоліками пептидів відносно біологічних препаратів та малих молекул є менша стабільність та коротший період напіврозпаду *in vivo*<sup>[2]</sup>. Однак саме високоафінність та специфічність взаємодії з мішенями роблять пептиди перспективними об'єктами для використання у клінічній практиці для лікування серцево-судинних хвороб, онкології, остеопорозу, діабету та захворювань шлунково-кишкового тракту.

Незважаючи на успішне застосування пептидів для зв'язування з рецепторами на поверхні клітин та інгібування білок-білкових взаємодій, велика кількість фармакологічно-перспективних мішеней знаходиться всередині клітин, тоді як проникна здатність навіть невеликих пептидних молекул значно обмежена. Вченими були відкриті так звані клітинопроникні пептиди, що можуть проходити через клітинну мембрану і проникати усередину клітин. Клітинопроникні пептиди є перспективними фармакологічними агентами для транспортування молекулярних вантажів крізь клітинну оболонку, зокрема інших пептидів, протеїнів, наночастинок, ДНК, РНК та малих молекул, що володіють необхідною біологічною активністю. Включення синтетичних фрагментів, зокрема хімічно модифікованих амінокислот, синтетичних угруповань, що легко гідролізуються при певних фізіологічних умовах та фотоізомеризаційних угруповань дає можливість отримати пептидні молекули з контрольованою біологічною активністю, що змінюється, наприклад, під впливом світла або ферментів. Прикладом таких пептидоміметиків є фоточутливі сполуки на основі природного антибіотику граміцидину С LMB002 та LMB033 (структура на даний момент не розголошується через те, що ця сполука проходить доклінічні дослідження в компанії «Lumobiotics»).



LMB002

**Мета** роботи полягала у дослідженні цитотоксичності двох фотоізомеризаційних («відкритої» та «закритої») форм люмобіотиків-пептидоміметиків на основі грамїцидину С LMB002 та LMB033, що володіють фотоконтрольованою біоактивністю, при різних концентраціях та інкубації з клітинами протягом 10 хвилин, 60 хвилин, 24 годин та 72 годин, визначення значень  $IC_{50}$  та їхнє порівняння для «відкритої» та «закритої» форм сполук.

**Завданнями** роботи були:

- Визначити оптимальні умови проведення експерименту на 2D-культурі ракових клітин HeLa;
- Провести відносну оцінку цитотоксичності «відкритої» та «закритої» форм люмобіотиків LMB002 та LMB033 при чотирьох часах інкубації з клітинами;
- Порівняти цитотоксичність двох люмобіотиків LMB002 та LMB033.

**Об'єктом** дослідження були два представники класу пептидних люмобіотиків LMB002 та LMB033.

**Предметом** дослідження була цитотоксичність LMB002 та LMB033 на 2D-культуру ракових клітин HeLa.

**Методи:** 2D-культивування ракових клітин; фарбування клітин та їхніх компонентів із використанням флуоресцентних барвників; флуоресцентна конфокальна мікроскопія.

**Особистий внесок** здобувача: систематизацію літературних даних, увесь обсяг експериментальної роботи, узагальнення, оформлення та аналіз отриманих результатів було проведено здобувачем особисто. Синтез та хроматографічне очищення сполук було проведено на базі Технологічного

інституту Карлсруе. Постановка завдання дослідження та обговорення результатів проводились разом з науковим керівником д.х.н. Комаровим І.В.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Клітинопроникні пептиди: відкриття та дослідження

Клітинопроникні пептиди (cell-penetrating peptides, CPPs) — це клас пептидів різного складу та будови довжиною 5-30 амінокислотних залишків, що мають здатність проникати крізь клітинну мембрану. Перше спостереження білкової проникності було зафіксоване у 1988 році вченими Аланом Франкелем та Карлом Пабо. У своїй роботі<sup>[3]</sup> вони показали, що білок трансактивації транскрипції (Tat) вірусу імунодефіциту людини типу 1 здатний проникати у клітини та переміщуватися у ядро. Це відкриття дало поштовх іншим дослідженням у цій галузі, і вже у 1994 році був відкритий перший домен трансдукції протеїнів (Protein Transduction Domain, PTD)<sup>[4]</sup>: пептид з 16 амінокислот був отриманий з гомеодомену *Drosophila Antennapedia* та отримав назву Penetratin.

Протягом більше тридцяти років з моменту відкриття було виявлено десятки нових клітинопроникних пептидів. Клітинопроникні пептиди природного походження є похідними мотивів протеїнів, завдяки яким вони проникають всередину клітин у ході біохімічних циклів та сигналінгу. Найбільшими джерелами клітинопроникних пептидів є гепарин-зв'язувальні білки (Vectocell), ДНК- або РНК-зв'язувальні протеїни (Tat, Rev, c-Fos, c-Jun), гомеопротеїни (Penetratin, Fushi-tarazu, PDX-1), сигнальні пептиди (Ig(v), K-FGF), антимікробні пептиди (Pyrrhocoricin, L-2, Melittin, Crotamine) та вірусні пептиди (PreS2-TLM, VT5)<sup>[5]</sup>. Клітинопроникні пептиди синтетичного походження отримують завдяки аналізу комбінаторних баз даних протеїнів.

Незважаючи на те, що певні групи клітинопроникних пептидів мають високу спорідненість послідовностей та спільні особливості будови, у загальному клітинопроникні пептиди не є гомологічними. Величезна структурна різноманітність пояснюється різними шляхами проникнення крізь мембрану та особливостями будови мембрани різних клітинних ліній. Відповідно до того, що рівень гідрофобності та полярності клітинопроникних

пептидів дуже різняться, виділяють три основні класи пептидів: катіонні, амфіфільні та гідрофобні пептиди<sup>[5]</sup>. До катіонних клітинопроникних пептидів відносять пептиди з ланцюжком позитивно заряджених залишків амінокислот лізину (Lys, K) та аргініну (Arg, R), який забезпечує проникнення крізь мембрану клітин. Натомість амфіфільні пептиди теж можуть мати позитивний сумарний заряд, однак мають амфіфільну вторинну структуру. Характерною вторинною структурою амфіфільних пептидів є  $\alpha$ -спіраль. До гідрофобних клітинопроникних пептидів належать пептиди, що в основному складаються з гідрофобних амінокислотних залишків: аланіну (Ala, A), валіну (Val, V), лейцину (Leu, L), ізолейцину (Ile, I), метіоніну (Met, M), фенілаланіну (Phe, F), тирозину (Tyr, Y) та триптофану (Trp, W). Особливою групою гідрофобних пептидів є «скріплені» (stapled) пептиди, у яких синтетичний фрагмент вводиться у структуру через реакцію взаємодії з функціональними групами амінокислотних бічних ланцюгів, утворюючи біциклічну структуру.

Для клітинопроникних пептидів характерні три механізми проникнення крізь мембрану: пасивна дифузія, пряма транслокація та ендоцитоз<sup>[6]</sup>. Пасивна дифузія зазвичай можлива для малих неполярних молекул. Пряма транслокація є АТФ-незалежним механізмом проникнення та проходить у два етапи: зв'язування з мембраною або мембрано-асоційованими компонентами (наприклад, сульфоцукри глікокаліксу) та пряма вставка у мембрану або локальне руйнування мембрани. Ендоцитоз характеризується трьома етапами: зв'язування з компонентами мембрани (фосфоліпідами, рецепторами, протеогліканами), ендосомальне поглинання та ендосомальне вивільнення у цитозоль клітини. Домінування одного механізму над іншим у випадку проникнення конкретного пептиду у клітину визначається електростатичним зарядом молекули, її концентрацією на поверхні клітини та будовою клітинної мембрани. Зокрема, для клітинопроникних пептидів катіонної природи Tat, Penetratin та поліаргініну характерне проникнення шляхом прямої транслокації при високих концентраціях та шляхом ендоцитозу при нижчих концентраціях. Однак, через вплив низки факторів на домінування того чи

іншого механізму некоректно говорити про існування чітко визначеної кореляції між структурою клітинопроникного пептиду та механізмом його транспорту всередину клітини. Проте вченими були розроблені три стратегії покращення проникності пептидів: циклізація молекулярного скелету, бокове «скріплення» скелету та уведення груп, що забезпечують систематичну зміну фізикохімічних властивостей.

Однією з причин високої зацікавленості науковців клітинопроникними пептидами є їхня здатність транспортувати різноманітний молекулярний вантаж крізь клітинну мембрану. Це можуть бути біологічно активні речовини з обмеженою біодоступністю, мішені для яких знаходиться всередині клітини — нуклеїнові кислоти, протеїни, малі синтетичні молекули. Тому це відкриває величезні можливості для використання клітинопроникних пептидів у якості внутрішньоклітинних переносників лікарських засобів.

## 1.2 Фотоконтрольовані клітинопроникні пептидоміметики

Одним із досягнень у галузі покращення внутрішньоклітинної проникності пептидів завдяки систематичній зміні їхніх фізикохімічних властивостей було відкриття фотоконтрольованих клітинопроникних пептидів — молекул, які змінюють свою структуру під впливом світла. Один з перших фотоконтрольованих клітинопроникних пептидів був описаний Престелем і Мюллером у 2016 році<sup>[7]</sup>. У своїй роботі вони втілили ідею нейтралізації ланцюжку полікатионного олігоаргініну негативнозарядженим олігоглутаматом. Олігоаргінін та олігоглутамат були з'єднані через азобензенову групу, що ізомеризується під дією світла (рис. 1.1).

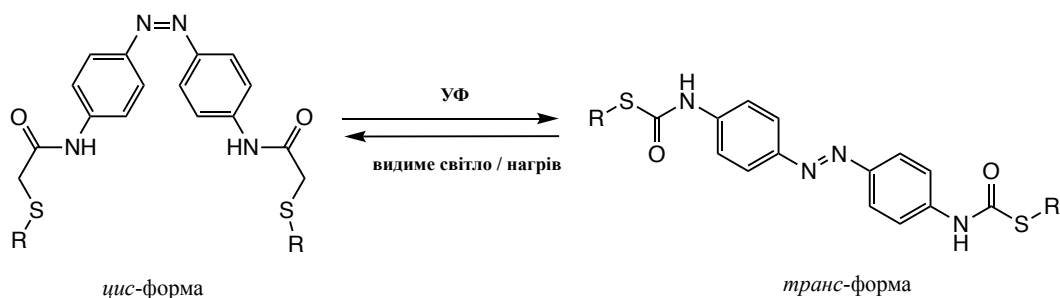


Рис. 1.1: Фотоізомеризація азобензенового фрагменту

*Цис*-конфігурація унеможлиблює проникнення молекули усередину клітини через паралельне розташування заряджених ланцюжків амінокислотних залишків. Фотоізомеризація у *транс*-конфігурацію руйнує утворену структуру, дозволяючи позитивно-зарядженому кінцю молекули — олігоаргініну — проникати крізь мембрану. Група Кім *et al.*<sup>[8]</sup> використала макроциклічну основу для синтезу «скріпленого» клітинопроникного пептиду, фоторегулятором у якому виступала азобензенова група. Отриманий Ab-LK пептид продемонстрував високу клітинну проникність у *цис*-конфігурації ( $\alpha$ -спіраль) на відміну від *транс*-конфігурації (дестабілізована  $\alpha$ -спіраль), перемикання між якими здійснювалось за допомогою ультрафіолетового випромінювання. Недоліком азобензен-пептидів є низька термічна стабільність активної *цис*-конфігурації та висока швидкість *in vivo* деградації азобензенової групи<sup>[9]</sup>. Окрім того, необхідною умовою використання фотоконтрольованих сполук у клінічній практиці є фотоізомеризація під дією червоних або краще коротких інфрачервоних променів, що глибоко проникають у тканини живих організмів та не є токсичними на відміну від ультрафіолетового випромінювання.

Іншим типом фоторегуляторних сполук є сполуки, що містять діарилетенові (ДАЕ) фрагменти. Діарилетен є хімічно інертним *in vivo* та термічно стабільним в обох конфігураціях, що робить можливим його використання для розробки лікарських засобів. Окрім цього, ДАЕ-модифіковані сполуки можуть ізомеризуватися під впливом червоного світла (*рис. 1.2*).

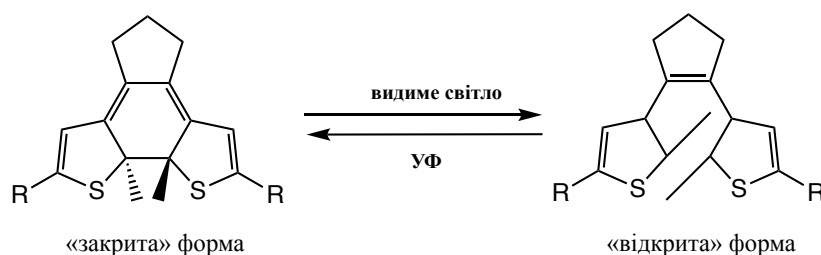


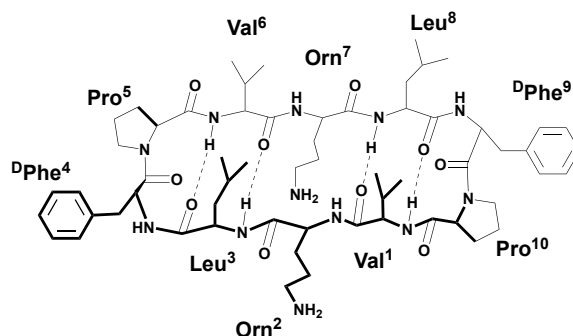
Рис. 1.2: Фотоперемикання між «закритою» та «відкритою» формами діарилетену (ДАЕ)

Тому Шобер *et al.*<sup>[10]</sup> вивчали ДАЕ-модифіковані клітиннопроникні пептиди у якості вірогідних переносників лікарських засобів усередину еукаріотичних клітин. Вони синтезували низку амфифільних та катіонних клітинопоникних пептидів циклічної структури, у якій два коротких лінійних поліпептидних ланцюжки були з'єднані ДАЕ-фрагментом з одного боку та β-вигином D-Xxx-L-Pro (D-Xxx — α-D-амінокислота). Через короткий інертний лінкер до залишку D-амінокислоти був приєднаний молекулярний вантаж — флуоресцентний фрагмент. Фотоізомеризація ДАЕ-фрагменту із «закритої» у «відкритої» форму за допомогою червоного світла приводила до зміни розташування бокових ланцюгів амінокислот, що підвищило проникність пептиду крізь клітинну мембрану. За допомогою флуоресцентної мікроскопії вдалося встановити, що внутрішньоклітинна інтенсивність флуоресценції зростала до 6,5 разів після здійснення ДАЕ-фотоізомеризації, що є свідченням кращої проникності «відкритої» форми крізь клітинну мембрану. Проведене дослідження продемонструвало, що клітинопоникні пептиди з фотоізомеризаційним ДАЕ-фрагментом є привабливими кандидатами для подальшої розробки фоторегуляторних систем доставки ліків за рахунок активації нетоксичним червоним випромінюванням та можливості контролю їхньої проникності всередину клітин.

### **1.3 Фотоконтрольовані мембраноактивні пептидоміметики на основі грамїцидину С**

Декапептид грамїцидин С, похідна природної речовини грамїцидину, яка секретується *Bacillus brevis*, є відомим цитотоксичним агентом, що ефективний у відношенні як до прокаріотичних<sup>[11]</sup>, так і до еукаріотичних клітин. Він має амфифільну циклічну структуру із загальним позитивним зарядом, що дозволяє легко зв'язуватися з ліпідами, експонованими на поверхні клітинної мембрани, що призводить до її руйнування та клітинної смерті<sup>[12]</sup>. Мембранолітичні властивості грамїцидину С роблять його привабливим хіміотерапевтичним агентом для лікування раку, проте

величезним недоліком його застосування є висока система токсичність *in vivo*, що спричинена низькою селективністю трансформованих ракових клітин на фоні здорових клітин<sup>[13]</sup>.



Граміцидин С

Використовуючи ДАЕ-фрагмент та граміцидин С за молекулярну основу, був синтезований новий клас фотоконтрольованих клітинопроникних пептидів<sup>[14]</sup>. Перехід ДАЕ із «закритої» у «відкриту» форму при опроміненні червоним світлом, що змінює конформацію усього пептиду (*рис. 1.3*), дає змогу контролювати його клітинну проникність та, відповідно, цитотоксичність<sup>[15]</sup>. Проведені дослідження *in vitro* на трансформованих гепатоцитах та епітеліальних клітинах продемонстрували значну різницю між значеннями  $IC_{50}$  для «відкритої» та «закритої» форм, що свідчить про факт існування біологічної активності, яку можливо контролювати за допомогою фото-«перемикання» між двома формами. Таким чином основна проблема звичних хіміотерапевтичних препаратів — неселективна токсичність — усувається: активація ДАЕ-клітинопроникних пептидів світлом безпосередньо у місці розташування пухлини дозволяє знищувати ракові клітини таргетно, не завдаючи шкоди здоровим клітинам організму.

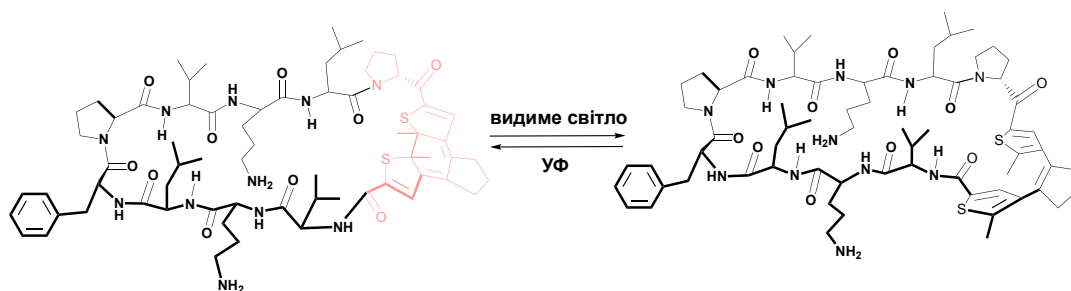


Рис. 1.3: Фотоперемикання між двома формами LMB002 — ДАЕ-модифікованого пептидоміметичу на основі граміцидину С

#### 1.4 Флуоресцентна конфокальна мікроскопія як ефективний метод дослідження *in vitro*

Ефективним методом досліджень *in vitro* у сучасній біології та фармакології є флуоресцентна мікроскопія<sup>[16]</sup>. Флуоресцентне мічення протеїнів або інших біомолекул за допомогою флуоресцентних зв'язаних фрагментів або барвників дозволяє отримати детальну візуалізацію клітин та їхніх органел, що дозволяє відстежити хід майже будь-якого біохімічного процесу завдяки легкому одержанню його якісних та кількісних параметрів.

Принцип флуоресцентної мікроскопії полягає у збудженні флуорофорів, що зв'язані з молекулами або клітинними органелами, світлом з певною довжиною хвилі та подальшому детектуванні світла, що випромінюється внаслідок перебігання процесу флуоресценції. На відміну від традиційної широкопольної флуоресцентної мікроскопії, конфокальна мікроскопія дозволяє вловлювати тільки ті промені випроміненого світла, що сходяться в обраній фокальній площині, відкидаючи усі промені, що знаходяться поза фокусом. Це досягається завдяки використанню спеціального отвору — пінхолу (*рис. 1.4*), що виступає у якості фільтру променів світла поза фокальною площиною. Цей принцип знайшов широке застосування, зокрема, у дослідженнях *in vitro*, адже дозволяє отримувати чіткі зображення шарів біологічних об'єктів, що вивчаються (клітин, тканин або навіть цілих органів) без фонового флуоресцентного випромінювання, яке значно ускладнює інтерпретацію зображень та кількісний аналіз зібраних даних. У разі дослідження 2D-об'єктів (культур клітин, що моделюють тканини, наприклад) зручно отримувати світлини без зовнішнього шумового випромінювання.

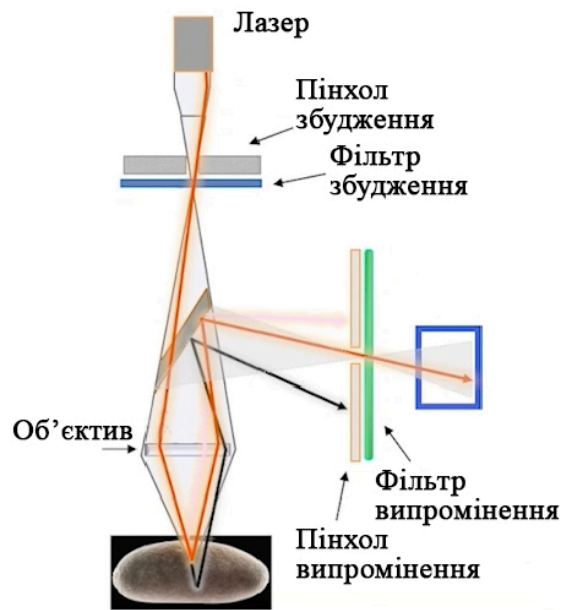


Рис. 1.4: Будова конфокального мікроскопа  
(адаптовано з *Oxford Instruments*)

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Інструменти і матеріали

Для дослідження була обрана трансформована лінія епітеліальних клітин людини HeLa (ATCC, #CCL-2).

У ході дослідження було використано чотири флуоресцентні барвники: Hoechst 33342 (Invitrogen™, #H3570), EthD-1 (Invitrogen™, #E1169), PI (Invitrogen™, #P1304MP) та кальцеїн-АМ (Invitrogen™, #C1430). Hoechst33342 є відомим клітинопроникним барвником, що флуоресцює у блакитній ділянці видимого спектру ( $\lambda = 461$  нм) при зв'язуванні з дволанцюговою молекулою ДНК, тому використовується для забарвлення ядер клітин. EthD-1 та PI використовуються у якості індикатору життєздатності клітин. Вони не здатні проникати усередину клітин, тому можуть випромінювати червоне світло ( $\lambda = 617$  нм) тільки при некротичному руйнуванні клітинних мембран. Кальцеїн-АМ є клітинопроникним барвником, що під дією внутрішньоклітинного фермента естерази гідролізує з утворенням кальцеїну, що флуоресцює у зеленій ділянці видимого спектру ( $\lambda = 515$  нм). Оскільки фермент естераза активний лише у живих клітинах, кальцеїн-АМ використовується як індикатор живих клітин. ДМСО був придбаний у Sigma Aldrich. Ставроспорин був придбаний у Cayman Chemical.

Для дослідження були використані 96-лункові плати для флуоресцентної мікроскопії (PerkinElmer, #6055302).

Фотографії були отримані за допомогою автоматизованої системи високоефективного клітинного скрінінгу INCell Analyzer 6500HS (GE Healthcare) та вбудованого об'єктиву з 20-кратним збільшенням з NA = 0,45. На одну лунку плати було одержано 16 світлин, обраних випадковим чином. Аналіз зображень був здійснений у INCarta Software 1.13. Отримані дані були проаналізовані у GraphPad Prism 8.

## 2.2 Визначення оптимальних умов для експерименту

Для визначення оптимальної густини посадки на 96-лункову плату було обрано п'ять значень кількості клітин на лунку по шість повторів кожен: 2500, 5000, 10000, 20000 та 30000 клітин на лунку. За негативний контроль (живі клітини) було взято лунки з вмістом 0,1% ДМСО; за позитивний контроль (мертві клітини) було взято лунки з кінцевою концентрацією алкалоїду ставроспорину 1 мкМ. Час інкубації перед додаванням зазначених реагентів становив 24, 48 та 72 години (рис. 2.1).

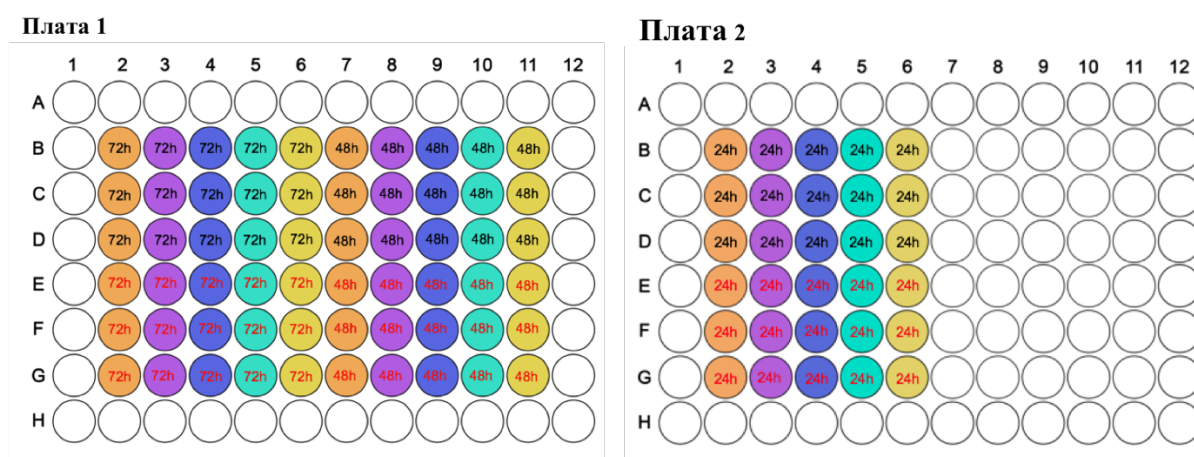


Рис. 2.1: Схема 96-лункових плат для визначення оптимальних умов експерименту на токсичність: 2500 клітин/лунка (оранжевий); 5000 клітин/лунка (фіолетовий); 10000 клітин/лунка (синій); 20000 клітин/лунка (зелений); 30000 клітин/лунка (жовтий). 24h, 48h, 72h ілюструють час інкубації; чорним позначено лунки з негативним контролем (0,1% ДМСО), червоним позначено лунки з позитивним контролем (1 мкМ ставроспорину).

Обрану кількість клітин садили у лунку у 200 мкл середовища DMEM. За 24 години повністю змінювали середовище та садили наступну порцію клітин у пусті лунки. Через наступні 24 години змінювали середовище у клітин, посаджених 24 і 48 годин тому, та садили наступну порцію клітин у пусті лунки. За 24 години середовище відбирали, додавали 100 мкл свіжого середовища та 100 мкл 0,2% розчину DMSO у середовищі (позитивний контроль) та 100 мкл 2 мкМ розчину ставроспорину у середовищі (негативний

контроль) відповідно та лишали на ніч. Наступного дня проводили фарбування клітин: до кожної лунки додавали 50 мкл розчину барвників (2,5 мкМ кальцеїну-АМ, 25 мкМ Hoechst 33342, 15 мкМ EthD-1, 10% FBS) у PBS, інкубували протягом 20 хвилин при 37°C та знімали зображення.

Для експериментів на визначення цитотоксичності люмобіотиків було обрано густину посадки 20000 клітин на лунку та час для адгезії 24 години (Додаток А).

### 2.3 Визначення цитотоксичності люмобіотиків LMB033 та LMB002

Для визначення значень  $IC_{50}$  люмобіотиків LMB033 та LMB002 було обрано десять концентрацій для «закритої» та «відкритої» форм і взято чотири повтори на кожну концентрацію. Для порівняння був також використаний граміцидин С у восьми концентраціях та як негативний контроль були взяті лунки з 0,6% ДМСО (рис. 2.2). Час інкубації з речовинами становив 10 хвилин, 60 хвилин, 24 години і 72 години.

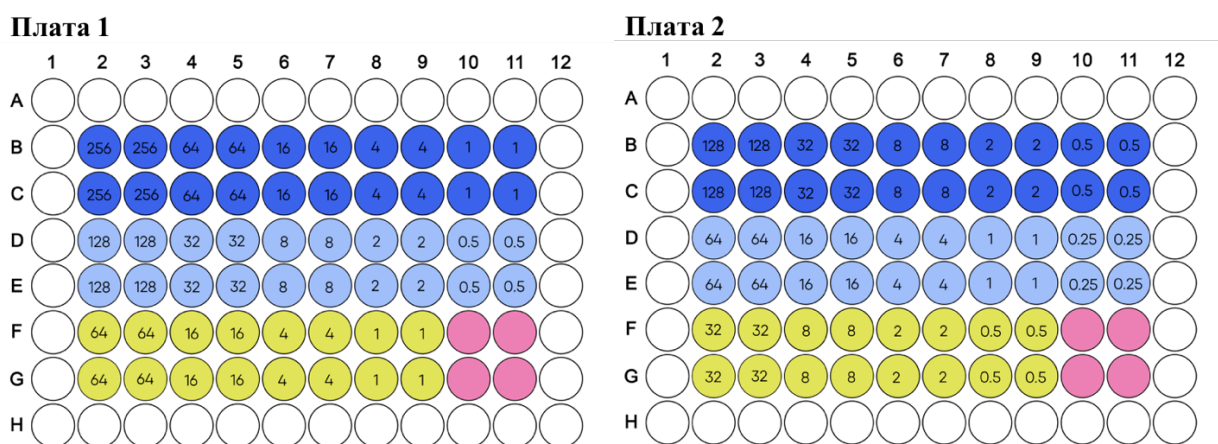


Рис. 2.2: Схеми 96-лункових плат для оцінки токсичності люмобіотиків LMB033 і LMB002: LMB033 / LMB002, закрита форма (синій); LMB033 / LMB002, відкрита форма (блакитний); граміцидин С (жовтий); контроль (0,6% ДМСО) (рожевий).

Були приготовані стоки речовин у ДМСО: для LMB033 та LMB002 40 мМ, для граміцидину С — 20 мМ. Для отримання «відкритих» форм

люмобіотиків LMB033 та LMB002 стоки у віалах були опромінені лазером з довжиною хвилі 660 нм та потужністю 0,4 Вт до візуальної зміни кольору з фіолетового на коричневий.

20000 клітин, суспендовані у 200 мкл середовища DMEM, поміщали у лунки 96-лункової плати для флуоресцентної мікроскопії. Через 24 години середовище повністю відбирали та додавали 100 мкл свіжого середовища. Речовини розводили у DMEM до необхідної концентрації, вносили у лунки у 100 мкл та інкубували при 37°C протягом 10 хвилин, 60 хвилин, 24 годин та 72 годин. Після інкубації проводили фарбування клітин: до кожної лунки додавали 50 мкл розчину барвників (25 мкМ Hoechst 33342, 5 мкМ EthD-1 або PI, 10% FBS) у PBS, інкубували протягом 20 хвилин при 37°C та знімали зображення.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Визначення оптимальних умов для експерименту

У ході експерименту було отримано та проаналізовано три серії зображень, що відповідають трьом часовим точкам після додавання контролів — 24, 48 і 72 години. На *рис. 3.1, 3.2 та 3.3* представлено по одному репрезентативному зображенню на кожну точку густини посадки клітин у негативному контролі (0,1% ДМСО) та позитивному контролі (1 мкМ СТС).

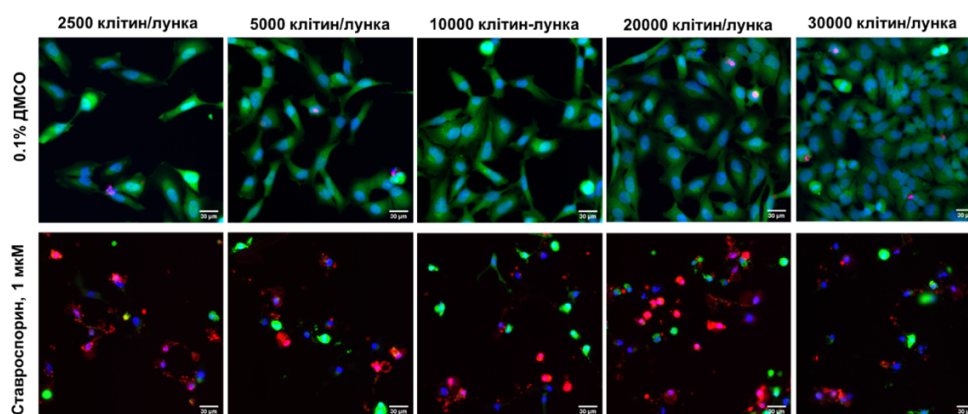


Рис. 3.1. Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa (24 години після посадки). Клітини були пофарбовані барвниками кальцеїном-АМ (зелений), EthD-1 (червоний), Hoechst33342 (синій). Масштаб — 30 мкм.

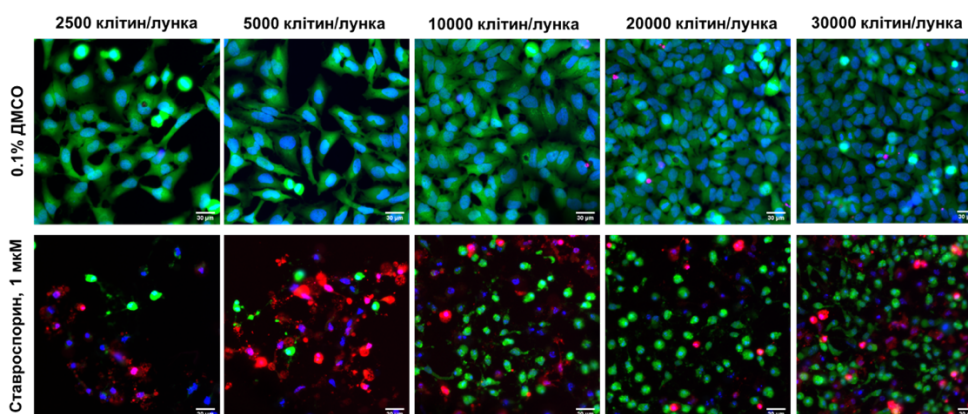


Рис. 3.2. Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa (48 години після посадки). Клітини були пофарбовані барвниками кальцеїном-АМ (зелений), EthD-1 (червоний), Hoechst33342 (синій). Масштаб — 30 мкм.

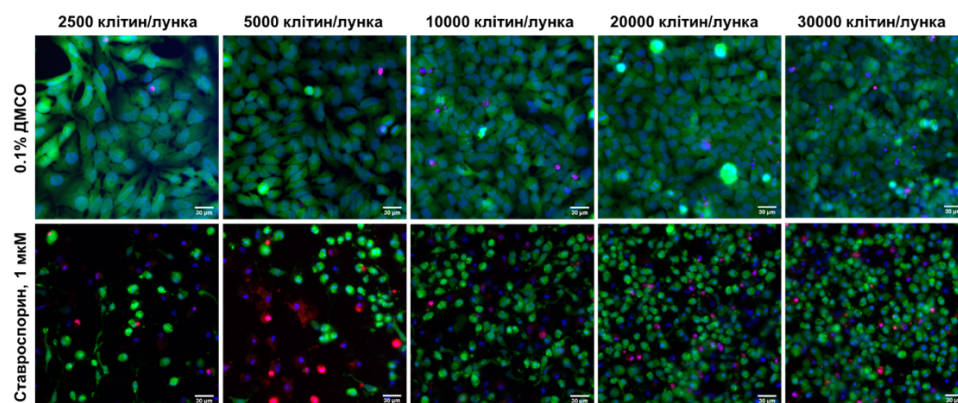


Рис. 3.3. Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa (72 години після посадки). Клітини були пофарбовані барвниками кальцеїном-АМ (зелений), EthD-1 (червоний), Hoechst33342 (синій). Масштаб — 30 мкм.

При некрозі барвник EthD-1 має змогу проникнути усередину клітини та зв'язатися з ДНК у її ядрі. Відповідно як контрольний параметр була обрана кількість EthD-1 позитивних клітин у відсотковому відношенні до усіх клітин у лунці. EthD-1 позитивні клітини були детектовані за допомогою класифікації ядер по інтенсивності у червоному каналі: ядра з інтенсивністю близькою до фоновій вважалися EthD-1 негативними, ядра з вищою інтенсивністю вважалися EthD-1 позитивними. Після процедури класифікації були побудовані гістограми для порівняння позитивного та негативного контролю для трьох часових точок (рис. 3.4). Для отриманих даних також був проведений статистичний аналіз (Додаток А).

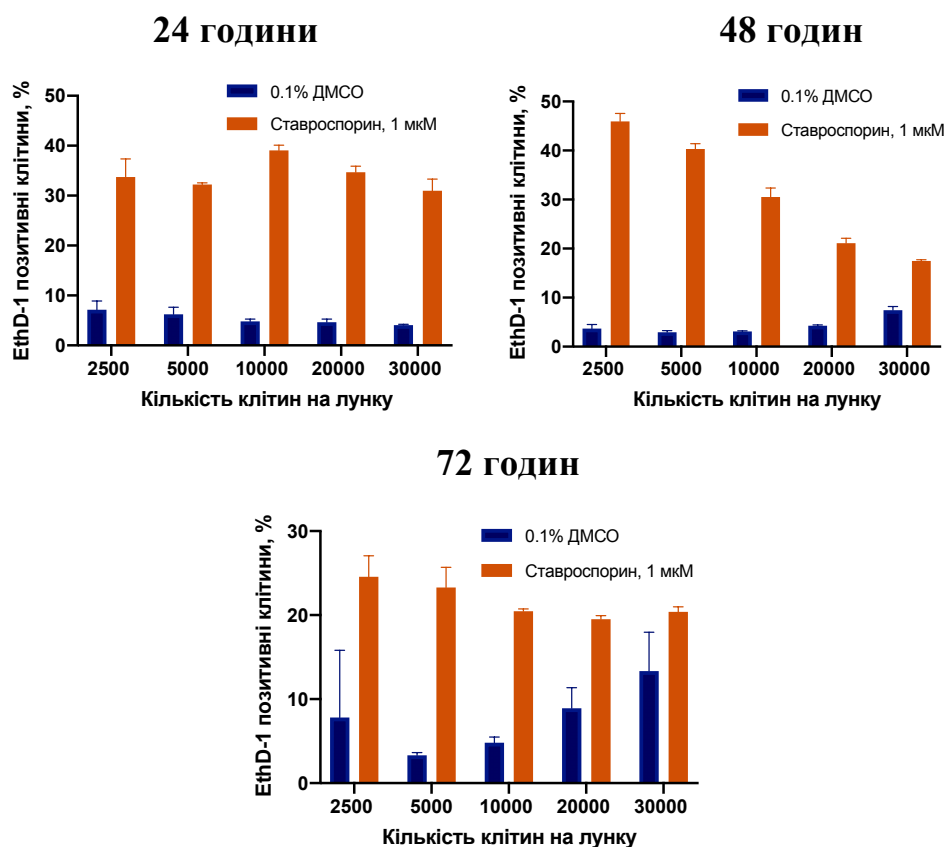


Рис. 3.4: Порівняння негативного (0,1% ДМСО) та позитивного (1 мкМ СТС) контролів на кількість EthD-1 позитивних клітин для 24, 48 та 72 годин інкубації.

Найкращі статистичні параметри були отримані для 5000, 10000 та 20000 клітин на лунку. Враховуючи обрані часові точки інкубації з речовинами (10 хвилин, 60 хвилин, 24 години і 72 години) та візуальну оцінку зображень було обрано густину посадки 20000 клітин на лунку, що досягають конфлюентності 70-80% за 24 години інкубації, що є бажаним для аналізу.

### 3.2. Визначення цитотоксичності люмобіотика LMB033

У ході експерименту було отримано та проаналізовано чотири серії зображень, що відповідають чотирьом часам інкубації з речовинами — 10 хвилин, 60 хвилин, 24 години і 72 години. На *рис. 3.5, 3.6, 3.7 та 3.8* представлено по одному репрезентативному зображенню на кожну концентраційну точку.

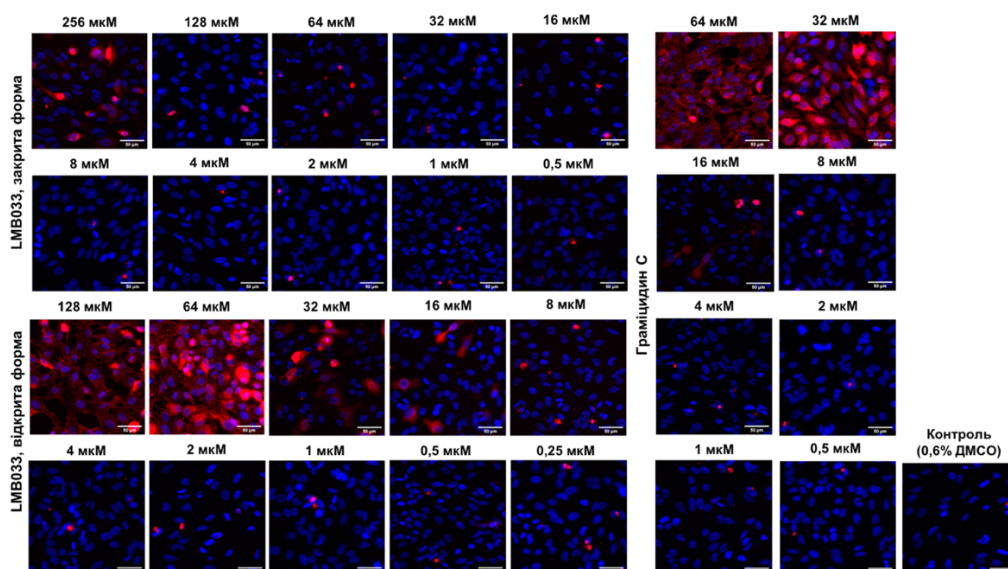


Рис. 3.5: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 10 хвилин. Клітини були пофарбовані EthD-1 (червоний) та Hoechst 33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

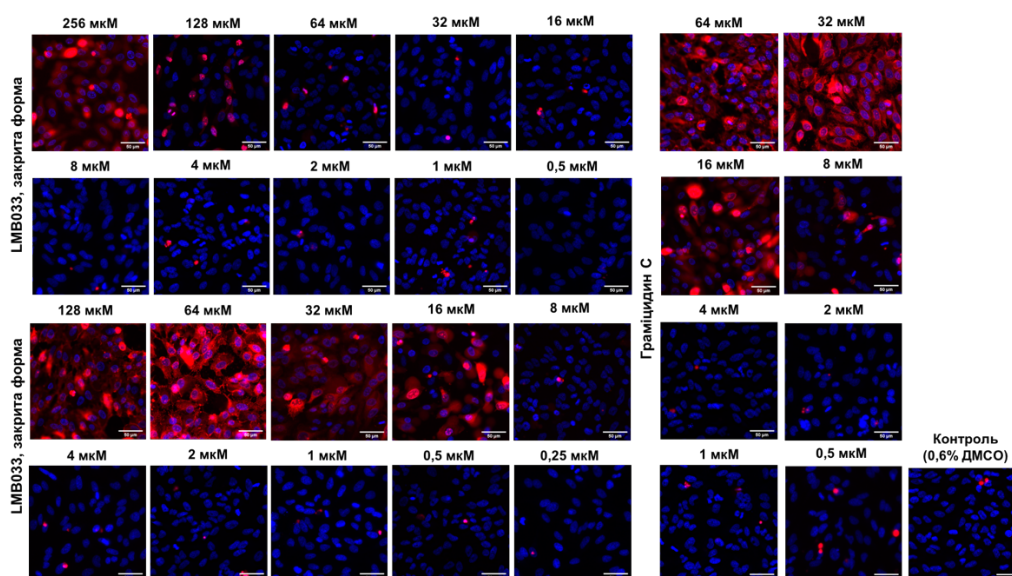


Рис. 3.6: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 60 хвилин. Клітини були пофарбовані EthD-1 (червоний) та Hoechst 33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

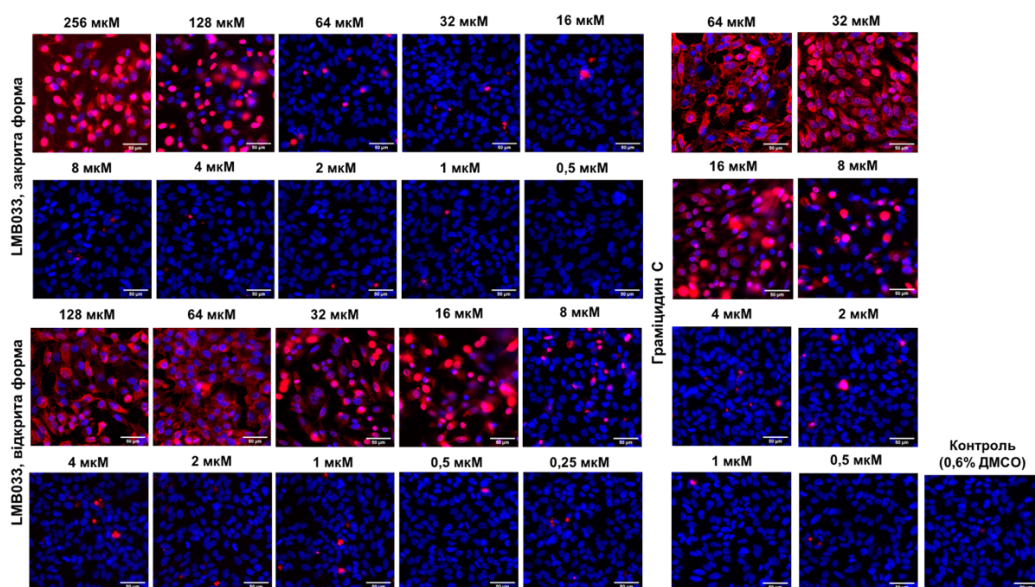


Рис. 3.7: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 24 годин. Клітини були пофарбовані EthD-1 (червоний) та Hoechst 33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

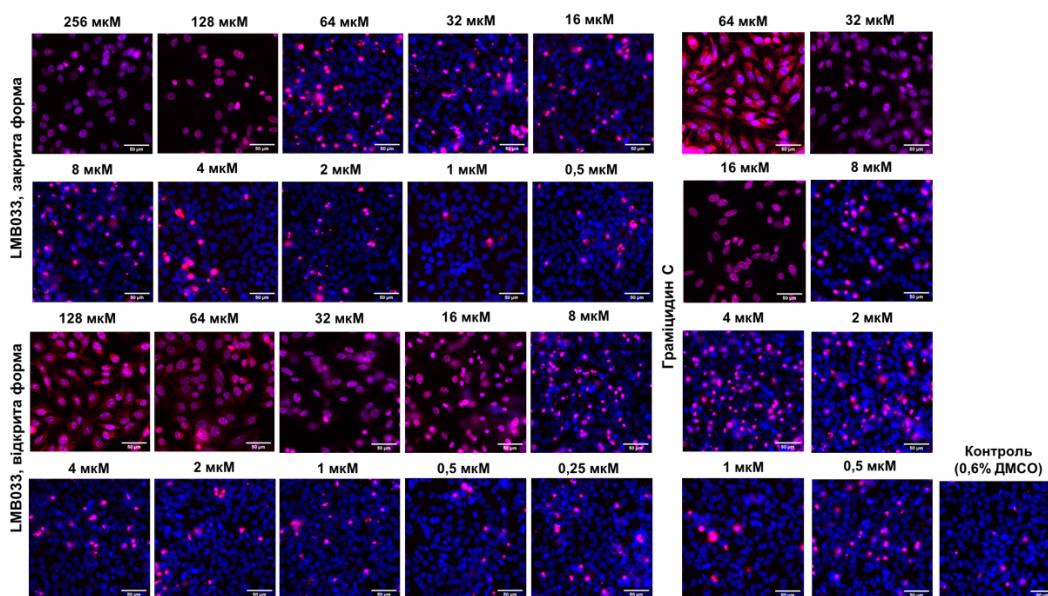


Рис. 3.8: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 72 годин. Клітини були пофарбовані PI (червоний) та Hoechst 33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

Обробка отриманих даних полягала у розподілі клітин відповідно до інтенсивності цитоплазми (при інкубації протягом 10 хвилин, 60 хвилин та 24

годин сигнал накопичувався у цитоплазмі) або ядер (при інкубації протягом 72 годин сигнал накопичувався у ядрі) у червоному каналі на два класи: EthD-1/PI негативні (сигнал у червоному каналі близький до фонового) та EthD-1/PI позитивні (сигнал у червоному каналі вище фонового). Після розподілу на класи було побудовано чотири набори S-подібних кривих у координатах «концентрація» – «кількість EthD-1/PI позитивних клітин, %» (рис. 3.9). Для побудови була використана процедура нормалізації по осі 0y та метод найменших квадратів. За допомогою інструменту апроксимації були отримані значення  $IC_{50}$  — концентрації напівмаксимальної дії досліджуваних речовин. Для наочності отримані значення  $IC_{50}$  були оформлені у гістограму (рис. 3.10) та таблицю (табл. 3.1) і статистично оброблені (Додаток Б).

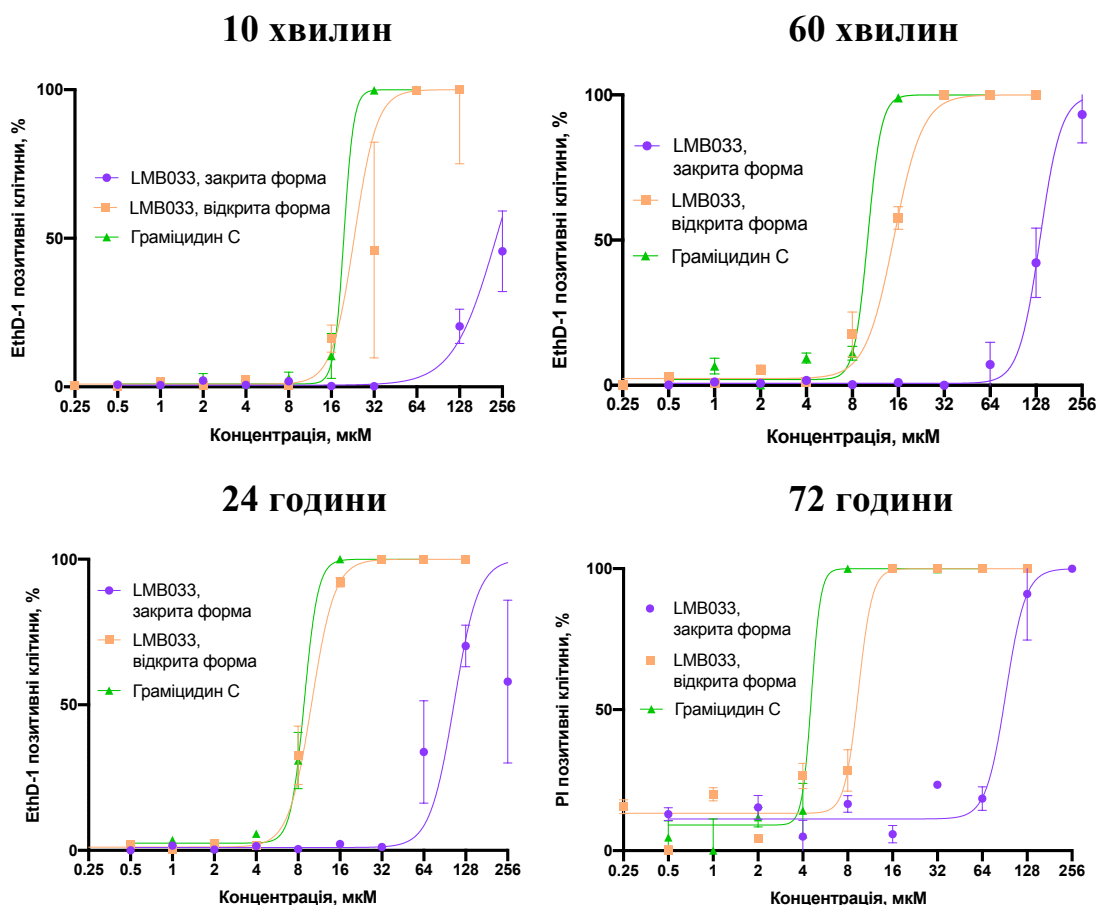


Рис. 3.9: S-подібна залежність між концентрацією речовин та кількість EthD-1/PI позитивних клітин, %, для інкубації з речовинами протягом 10 хвилин, 60 хвилин, 24 годин та 72 годин.

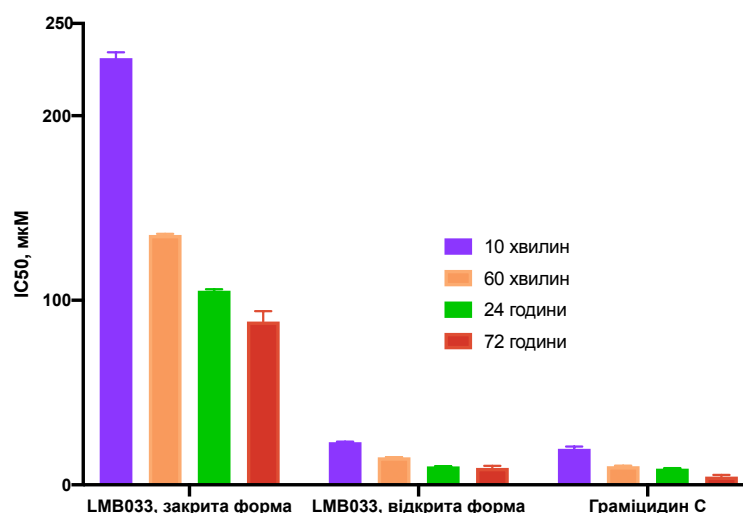


Рис. 3.10: Порівняння значень  $IC_{50}$  для «закритої» та «відкритої» форм LMB033 і граміцидину С при інкубації протягом 10 хвилин, 60 хвилин, 24 годин та 72 годин.

	LMB033, закрыта форма				LMB033, відкрита форма				Граміцидин С			
	10 хв	60 хв	24 год	72 год	10 хв	60 хв	24 год	72 год	10 хв	60 хв	24 год	72 год
Середнє	231	135	105	88	23	15	10	9	20	10	9	4,5
СКВСА	3	0,67	0,9	6	0,2	0,18	0,06	1,2	1,2	0,36	0,28	0,9

Табл. 3.1: Отримані значення  $IC_{50}$  у мкМ для «закритої» та «відкритої» форм LMB033 та граміцидину С.

Можемо побачити, що зі зростанням часу інкубації зі сполуками, значення  $IC_{50}$  падає, що свідчить про підвищення їхньої токсичності. Значення  $IC_{50}$  для «закритої» форми LMB033 суттєво вище відповідних значень для «відкритої» форми та граміцидину С, що свідчить про значну різницю між механізмами дій, що також було підтверджено за допомогою методів статистичної обробки даних (Додаток Б). Для визначення токсичності «закритої» форми LMB033 відносно «відкритої» були обраховані співвідношення значень  $IC_{50}$  для чотирьох часів інкубації (табл. 3.2).

Співвідношення значень $IC_{50}$ між «закритою» та «відкритою» формами LMB033			
10 хв	60 хв	24 год	72 год
10	9	9,5	9,8

Табл. 3.2: Значення терапевтичного вікна (різниці між значеннями  $IC_{50}$ ) для двох форм LMB033 для чотирьох часових точок інкубації з люмобіотиком

Співвідношення значень  $IC_{50}$  між «закритою» та «відкритою» формами LMB033 практично не змінюється протягом різних часів інкубації і знаходиться в інтервалі 9,5-10.

### 3.1 Визначення цитотоксичності люмобіотика LMB002

У ході експерименту було отримано та проаналізовано чотири серії зображень, що відповідають чотирьом часам інкубації з речовинами — 10 хвилин, 60 хвилин, 24 години і 72 години. На *рис. 3.11, 3.12, 3.13 та 3.14* представлено по одному репрезентативному зображенню на кожну концентраційну точку.

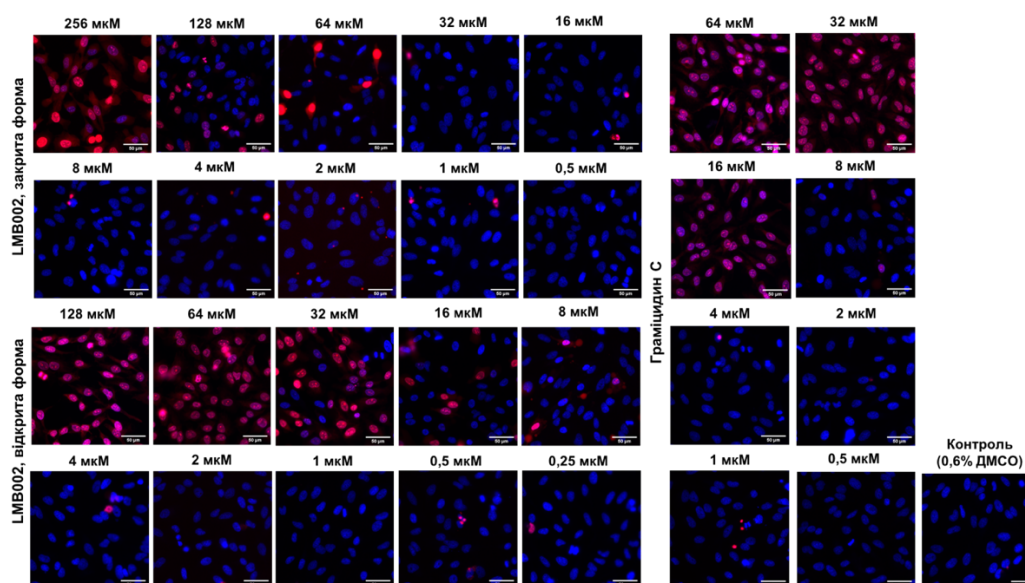


Рис. 3.11: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 10 хвилин. Клітини були пофарбовані **PI (червоний)** та **Hoechst 33342 (синій)**. Масштаб — 50 мкм.

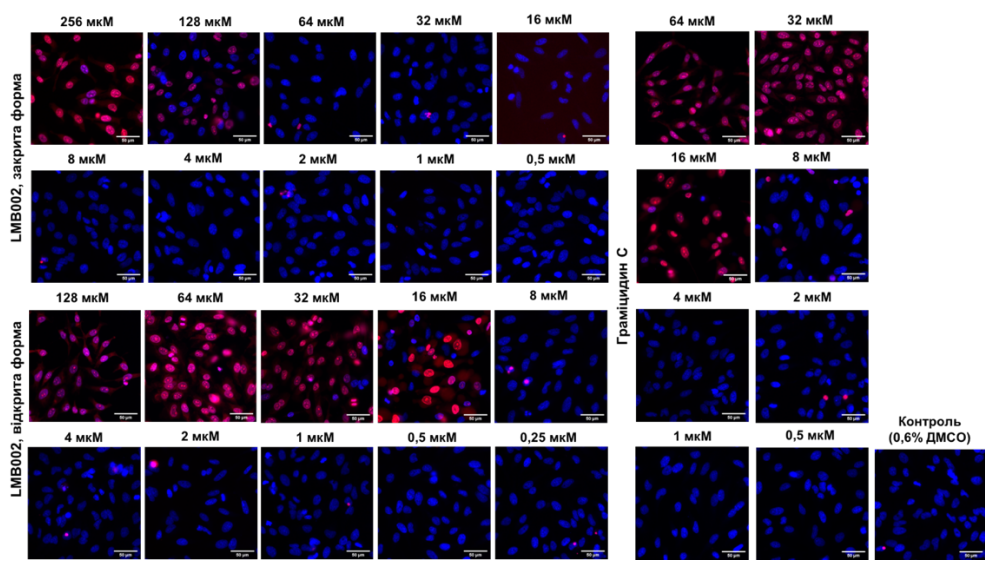


Рис. 3.12: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 60 хвилин. Клітини були пофарбовані **PI (червоний)** та **Hoechst 33342 (синій)**. Масштаб — 50 мкм.

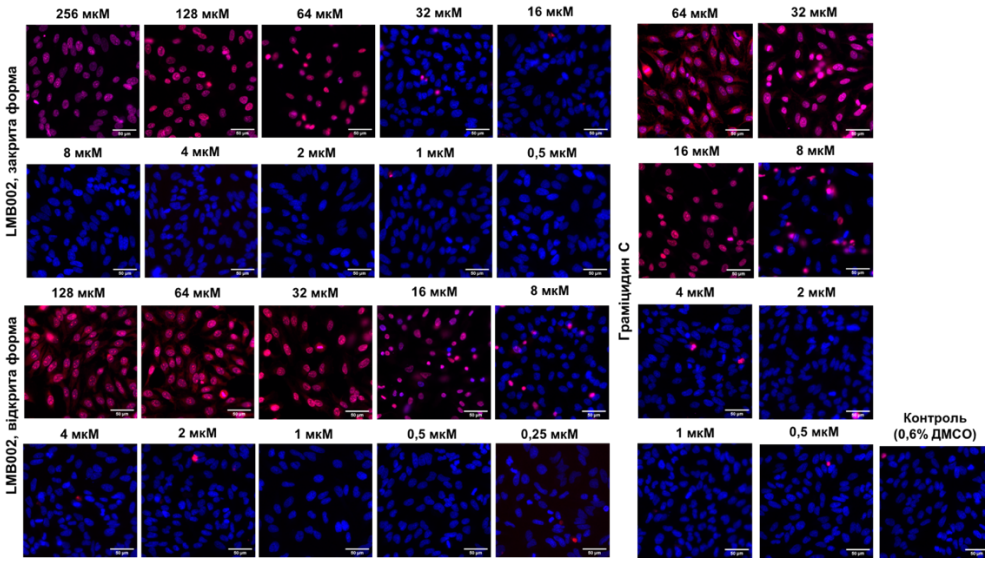


Рис. 3.13: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 24 годин. Клітини були пофарбовані **PI (червоний)** та **Hoechst 33342 (синій)**. Масштаб — 50 мкм.

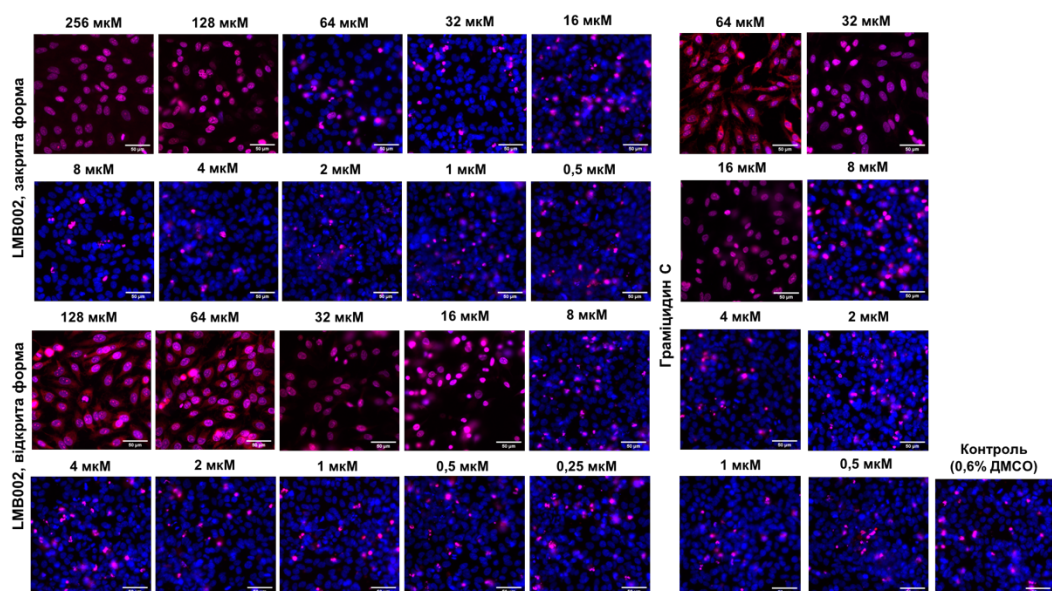


Рис. 3.14: Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa при інкубації з речовинами протягом 72 годин. Клітини були пофарбовані PI (червоний) та Hoechst 33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

Обробка отриманих даних полягала у розподілі клітин відповідно до інтенсивності ядер (сигнал накопичувався у ядрі) у червоному каналі на два класи: PI негативні (сигнал у червоному каналі близький до фонового) та PI позитивні (сигнал у червоному каналі вище фонового). Після розподілу на класи було побудовано чотири набори S-подібних кривих у координатах «концентрація» – «кількість PI позитивних клітин, %» (рис. 3.15). Для побудови була використана процедура нормалізації по осі 0y та метод найменших квадратів. За допомогою інструменту апроксимації були отримані значення  $IC_{50}$  — концентрації напівмаксимальної дії досліджуваних речовин. Для наочності отримані значення  $IC_{50}$  були оформлені у гістограму (рис. 3.16) та таблицю (табл. 3.3) і статистично оброблені (Додаток В).

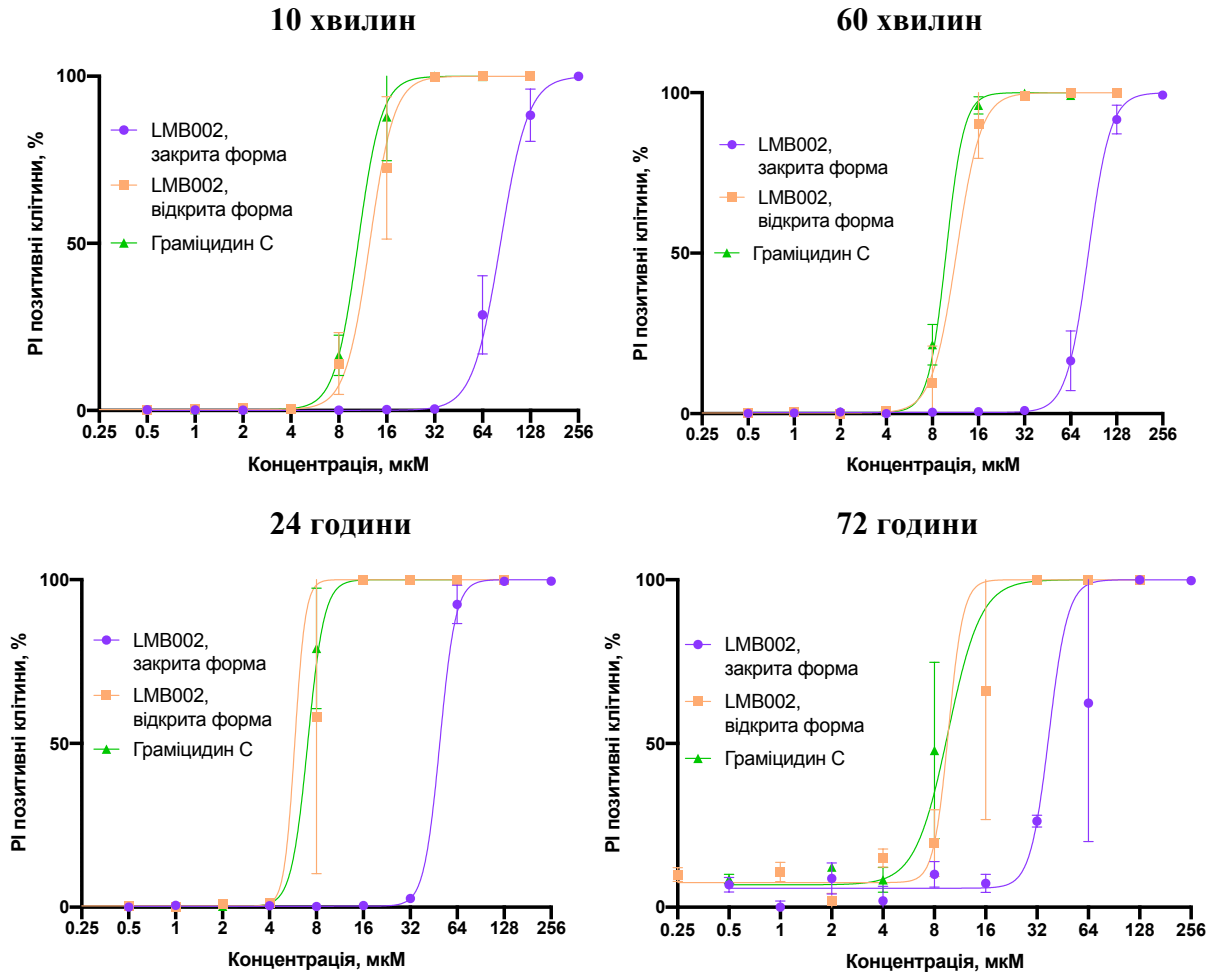


Рис. 3.15: S-подібна залежність між концентрацією речовин та кількість PI позитивних клітин, %, для інкубації з речовинами протягом 10 хвилин, 60 хвилин, 24 годин та 72 годин.

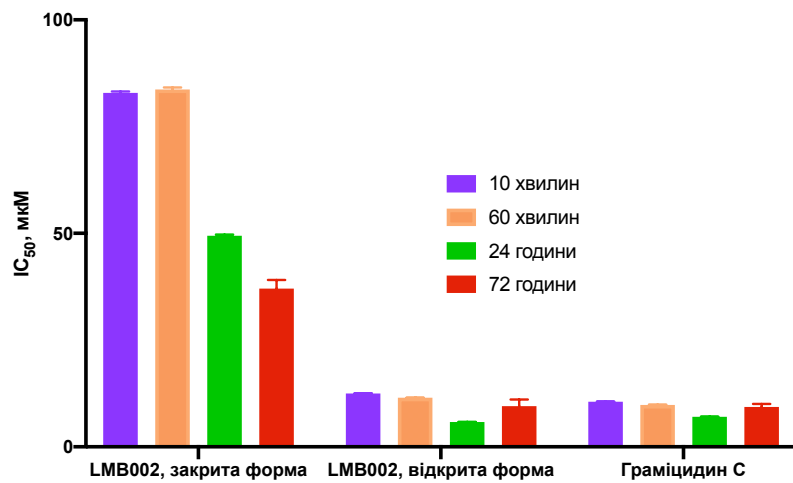


Рис. 3.16: Порівняння значень IC<sub>50</sub> для «закритої» та «відкритої» форм LMB002 і граміцидину С при інкубації протягом 10 хвилин, 60 хвилин, 24 годин та 72 годин.

	LMB002, закрита				LMB002, відкрита				Граміцидин С			
	форма		форма		форма		форма		форма		форма	
	10	60	24	72	10	60	24	72	10	60	24	72
	хв	хв	год	год	хв	хв	год	год	хв	хв	год	год
Середнє	83	84	49	37	12,5	11,5	6	9,5	11	10	7	9
СКВСА	0,3	0,5	0,3	2	0,05	0,03	0,06	1,6	0,05	0,08	0,03	0,7

Табл. 3.3: Отримані значення  $IC_{50}$  у мкМ для «закритої» та «відкритої» форм LMB002 та граміцидину С.

Можемо побачити, що зі зростанням часу інкубації зі сполуками, значення  $IC_{50}$  падає, що свідчить про підвищення їхньої токсичності. Значення  $IC_{50}$  для «закритої» форми LMB002 суттєво вище відповідних значень для «відкритої» форми та граміцидину С, що свідчить про значну різницю між механізмами дій, що також було підтверджено за допомогою методів статистичної обробки даних (Додаток В). Для визначення токсичності «закритої» форми LMB002 відносно «відкритої» були обраховані співвідношення значень  $IC_{50}$  для чотирьох часів інкубації (табл. 3.2).

Співвідношення значень $IC_{50}$ між «закритою» та «відкритою» формами LMB002			
10 хв	60 хв	24 год	72 год
6,6	7,3	8,2	3,9

Табл. 3.4: Значення терапевтичного вікна (різниці між значеннями  $IC_{50}$ ) для двох форм LMB002 для чотирьох часових точок інкубації з люмобіотиком.

Співвідношення значень  $IC_{50}$  між «закритою» та «відкритою» формами LMB033 зростає при збільшенні часу інкубації від 10 хвилин до 24 годин, проте знижується вдвічі при переході від 24 до 72 годин інкубації.

#### 4. ВИСНОВКИ

1. У ході даного дослідження було продемонстровано, що конфокальна флуорисцентна мікроскопія є потужним аналітичним методом для дослідження цитотоксичності люмобіотиків, який раніше не використовувався для даного класу сполук.
2. Було показано, що люмобіотики LMB033 та LMB002 володіють цитотоксичною активністю до людських ракових клітин, що зростає зі збільшенням часу інкубації зі сполуками.
3. «Закрита» форма даного класу сполук набагато менш токсична у порівнянні із «відкритою» формою, що за значеннями  $IC_{50}$  близька до «батьківської» молекули — грамїцидину С. Співвідношення між  $IC_{50}$  «закритої» та «відкритої» форм LMB033 практично не змінювалися з часом інкубації і лежать в інтервалі 9,5-10. Співвідношення між  $IC_{50}$  «закритої» та «відкритої» форм LMB002 зменшувалися зі зростанням часу інкубації і лежать в інтервалі 3,9-8,2.
4. У порівнянні з контрольною сполукою грамїцидином С «відкриті» форми LMB002 та LMB033 мають близькі до неї значення  $IC_{50}$ , тоді як для «закритих» форм обох сполук було отримані на порядки вищі значення  $IC_{50}$ . У випадку LMB002 різниця між значеннями  $IC_{50}$  його «закритої» форми та грамїцидину С була меншою, аніж відповідна різниця для «закритої» форми LMB033. Це свідчить про вищу токсичність LMB002.

## 5. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. M. Muttenthaler, G.F. King, D.J. Adams, P.F. Alewood. Trends in peptide drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery* 20, 309–325 (2021).
2. L. Wang, N. Wang, W. Zhang *et al.* Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 7, 48 (2022).
3. A.D. Frankel, C.O. Pabo. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55 (6), 1189–1193 (1988).
4. D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (14), 10444-10450 (1994).
5. F. Milletti. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today*, 17 (15–16), 850-860 (2012).
6. L. Peraro, J. Kritzer. Getting in: emerging methods and design principles for cell-penetrant peptides. *Angewandte Chemie, International Edition* (2018).
7. A. Prestel, H. M. Möller. Spatio-temporal control of cellular uptake achieved by photoswitchable cell-penetrating peptides. *Chemical Communications*, 52, 701-704 (2016).
8. G. C. Kim, J. H. Ahn, J. H. Oh, S. Nam, S. Hyun, J. Yu, Y. Lee. Photoswitching of Cell Penetration of Amphipathic Peptides by Control of  $\alpha$ -Helical Conformation. *Biomacromolecules*, 19 (7), 2863-2869 (2018).
9. R. Mart, R. Allemann. Azobenzene photocontrol of peptides and proteins. *Chemical Communications*, 52, 12262-12277 (2016).
10. T. Schober, I. Wehl, S. Afonin, O. Babii, A. Iampolska, U. Schepers, I.V. Komarov, A. S. Ulrich. Controlling the Uptake of Diarylethene-Based Cell-Penetrating Peptides into Cells Using Light. *ChemPhotoChem*, 3, 384 (2019).
11. M. Berditsch, S. Afonin, J. Reuster *et al.* Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci. *Scientific Reports*, 9, 17938 (2019).

12. E. J. Prenner, R. N.A.H Lewis, R. N. McElhaney The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1462 (1-2), 201-221 (1999).
13. K. Okamoto, Y. Tomita, H. Yonezawa, T. Hirohata, R. Ogura, N. Izumiya Inhibitory effect of gramicidin S on the growth of murine tumor cells in vitro and in vivo. *Oncology*, 41(1), 43-49 (1984).
14. O. Babii, S. Afonin, M. Berditsch, S. Reißer, P.K. Mykhailiuk, V.S. Kubyshkin, T. Steinbrecher, A.S. Ulrich, I.V. Komarov Controlling Biological Activity with Light: Diarylethene-Containing Cyclic Peptidomimetics. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(13), 3392–3395 (2014).
15. O. Babii, S. Afonin, L.V. Garmanchuk, V.V. Nikulina, T.V. Nikolaienko, O.V. Storozhuk, D.V. Shelest, O.I. Dasyukevich, L.I. Ostapchenko, V. Iurchenko, S. Zozulya, A.S. Ulrich, I.V. Komarov Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(18), 5493–5496 (2016).
16. A. Diaspro, F. Beltrame, M. Fato, P. Ramoino. Characterizing biostructures and cellular events in 2D/3D [using wide-field and confocal optical sectioning microscopy]. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 15(1), 92–100 (1996).

## ДОДАТКИ

### Додаток А. Статистична обробка даних, отриманих у ході визначення оптимальних умов для експерименту на токсичність.

У ході статистичного аналізу було отримано чотири показники: середнє арифметичне, стандартне відхилення середнього арифметичного, співвідношення сигнал/фон і Z-прайм (табл. 1, 2, 3). Співвідношення сигнал/фон було отримане в результаті ділення середнього значення позитивного контролю (1 мкМ СТС) на середнє значення негативного контролю (0,1% ДМСО) та ілюструє відносну різницю між ними. Показник Z-прайм дозволяє додатково оцінити наскільки контролю відрізняються один від одного та розраховується за формулою:

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_{PK} + 3\sigma_{NK}}{|\mu_{PK} - \mu_{NK}|}$$

де  $\sigma_{PK}$  і  $\sigma_{NK}$  — стандартні відхилення середніх арифметичних позитивного і негативного контролів відповідно,

$\mu_{PK}$  і  $\mu_{NK}$  — середні арифметичні позитивного і негативного контролів.

Значення Z від 0,5 до 1 відповідають якісно поставленому експерименту, тоді як значення  $Z < 0$  демонструють незначну різницю між контролями — їх неможливо розрізнити.

	2500		5000		10000		20000		30000	
	кл./лунка		кл./лунка		кл./лунка		кл./лунка		кл./лунка	
	0,1% ДМСО	1 мкМ СТС	0,1% ДМСО	1 мкМ СТС	0,1% ДМСО	1 мкМ СТС	0,1% ДМСО	1 мкМ СТС	0,1% ДМСО	1 мкМ СТС
Середнє	7,2	33,8	6,2	32,3	4,8	39	4,6	34,7	4,1	31
Стандартне відхилення	1,7	3,6	1,4	0,3	0,5	1,1	0,6	1,2	0,2	2,3
Сигнал/фон	4,7		5,2		8,1		7,5		7,6	
Z-прайм	0,4		0,8		0,9		0,8		0,7	

Табл. А.1: Статистичні параметри для 24-годинної інкубації з контрольними речовинами.

	<b>2500</b>		<b>5000</b>		<b>10000</b>		<b>20000</b>		<b>30000</b>	
	<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>	
	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>
Середнє	3,8	45,9	3	40,3	3,1	30,5	4,3	21,1	7,4	17,5
Стандартне відхилення	0,9	1,6	0,3	1,1	0,2	1,9	0,2	1,9	0,8	0,3
Сигнал/фон	12,5		13,7		9,9		4,9		2,4	
Z-прайм	0,8		0,9		0,8		0,8		0,7	

Табл. А.2: Статистичні параметри для 48-годинної інкубації з контрольними речовинами.

	<b>2500</b>		<b>5000</b>		<b>10000</b>		<b>20000</b>		<b>30000</b>	
	<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>		<b>кл./лунка</b>	
	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>	<i>0,1%</i> <i>ДМСО</i>	<i>1 мкМ</i> <i>СТС</i>
Середнє	7,8	24,6	3,3	23,3	4,8	20,5	8,9	19,5	13,3	20,4
Стандартне відхилення	8	2,5	0,3	2,4	0,7	0,3	2,5	0,4	4,6	0,6
Сигнал/фон	3,2		7		4,3		2,2		1,5	
Z-прайм	-0,9		0,6		0,8		0,2		-1,2	

Табл. А.3: Статистичні параметри для 72-годинної інкубації з контрольними речовинами.

Найкращі параметри спостерігаються для 5000, 10000 та 20000 клітин на лунку.

**Додаток Б. Статистична обробка даних, отриманих у ході експерименту з визначення токсичності люмобіотику LMB033.**

У ході статистичного аналізу було розраховано три параметри: середнє арифметичне значення, середнє квадратичне відхилення середнього арифметичного та р-значення.

	LMB033, закрита форма				LMB033, відкрита форма				Граміцидин С			
	10 хв	60 хв	24 год	72 год	10 хв	60 хв	24 год	72 год	10 хв	60 хв	24 год	72 год
Середнє	231	135	105	88	23	15	10	9	20	10	9	4.5
СКВСА	3	0,67	0,9	6	0,2	0,18	0,06	1,2	1,2	0,36	0,28	0,9
р-значення <sup>1</sup>	<0,0001				<0,0001				0,0030			
р-значення (10 хв) <sup>2</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	<b>0,0901<sup>B</sup></b>	<0,0001 <sup>a</sup>	<b>0,0901<sup>B</sup></b>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<b>0,0901<sup>B</sup></b>
р-значення (24 год) <sup>3</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	0,0398 <sup>B</sup>	0,0398 <sup>B</sup>	0,0398 <sup>B</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	0,0398 <sup>B</sup>
р-значення <sup>4</sup>	<b>0,0679</b>				<b>0,4674</b>				0,0175			
р-значення (72 год) <sup>5</sup>	0,001 <sup>a</sup>	0,0008 <sup>b</sup>	0,0008 <sup>b</sup>	0,001 <sup>a</sup>	0,001 <sup>a</sup>	<b>0,0577<sup>B</sup></b>	<b>0,0577<sup>B</sup></b>	<b>0,0577<sup>B</sup></b>	0,0008 <sup>b</sup>	0,0008 <sup>b</sup>	0,0008 <sup>b</sup>	<b>0,0577<sup>B</sup></b>

Табл. Б.1: Статистичні параметри експерименту з визначення IC<sub>50</sub> LMB033.

<sup>1</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> для кожної сполуки для інкубації протягом 10 хвилин та 24 годин; <sup>2</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук між собою для часової точки 10 хвилин; <sup>3</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук між собою для часової точки 24 години; <sup>4</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> для кожної сполуки для інкубації протягом 24 та 72 годин; <sup>5</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук між собою для часової точки 72 години; <sup>a</sup>порівняння значень IC<sub>50</sub> «закритої» та «відкритої» форм LMB033 між собою; <sup>b</sup>порівняння значень IC<sub>50</sub> «закритої» форми LMB033 та граміцидину С; <sup>B</sup>порівняння значень IC<sub>50</sub> «відкритої» форми LMB033 та граміцидину С.

Р-значення — статистичний параметр, що дозволяє перевірити «нульову» гіпотезу. Він виражає ймовірність отримати аналогічний результат випадковим чином. У нашому випадку нульовою гіпотезою була відсутність різниці у механізмі дії між пептидом природнього походження граміцидином

С та двома формами його ДАЕ-модифікованого аналогу LMB033, а також відсутність різниці між «закритою» та «відкритою» формою LMB033 при кожному часі інкубації. Інтервал статистично значимих значень був обраний  $p \leq 0,05$ . Із сукупності отриманих р-значень за межі інтервалу статистично значимих значень виходять лише значення для порівняння «відкритої» форми LMB033 та граміцидину С між собою при інкубації протягом 10 хвилин та 72 годин, а також для порівняння значень  $IC_{50}$  для «відкритої» та «закритої» форм LMB033 при інкубації протягом 24 та 72 годин (відмічені у табл. 1 жирним). Це свідчить про високу ймовірність подібності механізму дії «відкритої» форми LMB033 та граміцидину С, а також про те, що при переході від 24 до 72 годин інкубації  $IC_{50}$  для обох форм LMB033 не зазнає суттєвих змін. Усі інші отриманні р-значення заперечують «нульову» гіпотезу: обидві форми LMB033 та граміцидин С мають відмінний механізм дії.

**Додаток В. Статистична обробка даних, отриманих у ході експерименту з визначення токсичності люмобіотику LMB002.**

У ході статистичного аналізу було розраховано три параметри: середнє арифметичне значення, середнє квадратичне відхилення середнього арифметичного та р-значення.

	LMB002, закрита форма				LMB002, відкрита форма				Граміцидин С			
	10 хв	60 хв	24 год	72 год	10 хв	60 хв	24 год	72 год	10 хв	60 хв	24 год	72 год
Середнє	83	84	49	37	12,5	11,5	6	9,5	11	10	7	9
СКВСА	0,3	0,5	0,3	2	0,05	0,03	0,06	1,6	0,05	0,08	0,03	0,7
р-значення <sup>1</sup>	<0,0001				<0,0001				<0,0001			
р-значення (10 хв) <sup>2</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	0,0002 <sup>B</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	0,0002 <sup>B</sup>	0,0002 <sup>B</sup>
р-значення (24 год) <sup>3</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>a</sup>	0,0007 <sup>B</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>b</sup>	0,0007 <sup>B</sup>	0,0007 <sup>B</sup>
р-значення <sup>4</sup>	<b>0,0096</b>				<b>0,0725</b>				<b>0,1012</b>			
р-значення (72 год) <sup>5</sup>	0,0017 <sup>a</sup>	0,0009 <sup>b</sup>	0,0009 <sup>b</sup>	0,0017 <sup>a</sup>	0,0017 <sup>a</sup>	<b>0,7907<sup>B</sup></b>	0,0017 <sup>a</sup>	<b>0,7907<sup>B</sup></b>	0,0009 <sup>b</sup>	0,0009 <sup>b</sup>	<b>0,7907<sup>B</sup></b>	<b>0,7907<sup>B</sup></b>

Табл. В.1: Статистичні параметри експерименту з визначення IC<sub>50</sub> LMB002.

<sup>1</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> для кожної сполуки для інкубації протягом 10 хвилин та 24 годин; <sup>2</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук між собою для часової точки 10 хвилин; <sup>3</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук між собою для часової точки 24 години; <sup>4</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> для кожної сполуки для інкубації протягом 24 та 72 годин; <sup>5</sup>порівняння отриманих значень IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук між собою для часової точки 72 години; <sup>a</sup>порівняння значень IC<sub>50</sub> «закритої» та «відкритої» форм LMB002 між собою; <sup>b</sup>порівняння значень IC<sub>50</sub> «закритої» форми LMB002 та граміцидину С; <sup>B</sup>порівняння значень IC<sub>50</sub> «відкритої» форми LMB002 та граміцидину С.

Р-значення — статистичний параметр, що дозволяє перевірити «нульову» гіпотезу. Він виражає ймовірність отримати аналогічний результат випадковим чином. У нашому випадку нульовою гіпотезою була відсутність

різниці у механізмі дії між пептидом природнього походження граміцидином С та двома формами його ДАЕ-модифікованого аналогу LMB002, а також відсутність різниці між «закритою» та «відкритою» формою LMB002 при кожній часовій точці. Інтервал статистично значимих значень був обраний  $p \leq 0,05$ . Із сукупності отриманих р-значень за межі інтервалу статистично значимих значень виходять лише значення для порівняння «відкритої» форми LMB002 та граміцидину С між собою при інкубації протягом 72 годин, а також для порівняння значень  $IC_{50}$  для «відкритої» та «закритої» форм LMB002 і граміцидину С при інкубації протягом 24 та 72 годин (відмічені у табл. 1 жирним). Це свідчить про високу ймовірність подібності механізму дії «відкритої» форми LMB002 та граміцидину С, а також про те, що при переході від 24 до 72 годин інкубації  $IC_{50}$  для обох форм LMB033 не зазнає суттєвих змін. Усі інші отриманні р-значення заперечують «нульову» гіпотезу: обидві форми LMB033 та граміцидин С мають відмінний механізм дії.