

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

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії  
проф. Рябухін Сергій Вікторович  
Протокол № \_\_ засідання кафедри  
від “\_\_” \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГЕННОСТІ ФОТОЧУТЛИВИХ ПЕПТИДІВ  
НА КУЛЬТУРАХ РАКОВИХ КЛІТИН**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студента освітньої програми  
«Високі технології (хемоінформатика)»  
спеціальності 102 «Хімія»

**Горбатов Катерини Павлівни**

Науковий керівник:  
директор Навчально-наукового  
інституту високих технологій,  
доктор хімічних наук

**Комаров Ігор Володимирович**

Оцінка захисту роботи:  
\_\_\_\_\_

**Київ – 2024 р.**

## АННОТАЦІЯ

**Горбаток К.П.** Дослідження імуногенності фоточутливих пептидів на культурах ракових клітин.

Кваліфікаційна робота магістра за напрямком підготовки 102 Хімія. — Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий інститут високих технологій, кафедра супрамолекулярної хімії. — Київ — 2024.

Клітинопроникні пептиди — це клас фармацевтичних препаратів, що завдяки високій біодоступності, цитотоксичності та здатності активувати імунну систему можуть бути перспективними для лікування раку. Основною перешкодою для широкого застосування цих сполук є висока загальна токсичність. У даній дипломній роботі було проаналізовано здатність двох фоточутливих пептидів, LMB002 та LMB033, діарилетен-модифікованих аналогів природного антибіотику граміцидину S, викликати імуногенну клітинну смерть, діючи у «закритій» та «відкритій» фотоформах. Було оцінено рівень вивільнення двох білкових маркерів у культурах ракових клітинних ліній HeLa, HepG2 та MDA-MB-231 *in vitro*: кальретикуліну (CALR) на зовнішню поверхню клітин за допомогою флуоресцентної конфокальної мікроскопії та HMGB1 у позаклітинний простір за використання методики Вестерн-блоту. У ході дослідження було продемонстровано, що фотоперемикання із «закритої» форми у «відкрити» сприяє виділенню імуногенних маркерів, що свідчить про потенціал фотоконтролю імуностимуляторної активності даних сполук та у перспективі можливості їхнього впровадження у якості компонент комбінаторної протиракової терапії.

**Ключові слова:** клітинопроникні пептиди, фотоконтроль, граміцидин S, імуногенна клітинна смерть, протиракова терапія

## ANNOTATION

**Horbatok K.P.** Research on immunogenicity of photosensitive peptides on cancer cell cultures.

Qualification work of master in the field of study 102 Chemistry. — Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational Scientific Institute of High Technologies, Department of Supramolecular Chemistry. — Kyiv — 2024.

Cell-penetrating peptides are a class of pharmaceutical compounds that can be applied to cancer treatment due to high bioavailability, cytotoxicity and ability to activate immune system. The main obstacle for their wide use is high systemic toxicity. In this thesis we analyzed the ability of two photosensitive peptides, LMB002 and LMB033, diarylethene-modified analogues of natural antibiotic gramicidin S, to induce immunogenic cell death through acting in “closed” and “open” photoforms. We evaluated the expression levels of two protein markers in cultures of cancer cell lines HeLa, HepG2 and MDA-MB-231 *in vitro*: calreticulin (CALR) on cellular membrane via fluorescent confocal microscopy imaging and HMGB1 in extracellular space via Western blot technique. In course of our research we demonstrated that photoswitching from “closed” form to “open” promotes the release of immunogenic markers that denotes high potential of both photocontrol of immunostimulatory activity of these compounds and perspective to implement them as components of combination anticancer therapy.

**Key words:** cell-penetrating peptides, photocontrol, gramicidin S, immunogenic cell death (ICD), anticancer therapy.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ACP	– (anticancer peptide) протираковий пептид
CALR	– (calreticulin) кальретикулін
DAE	– (diarylethene) діарилетен
DAMP	– (damage-associated molecular patterns) молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	– (Dulbecco's phosphate buffered saline) натрій-фосфатний буфер Дульбеко
FBS	– (fetus bovine serum) бичача сироватка
GS	– (gramicidin S) граміцидин S
HMGB1	– high-mobility group box 1
ICD	– (immunogenic cell death) імуногенна клітинна смерть
PBS	– (phosphate buffered saline) натрій-фосфатний буфер
TAA	– (tumor-associated antigen) антиген, асоційований з пухлиною
TME	– (tumor microenvironment) мікроклімат пухлини
АПК	– антиген-презентуючі клітини
АТФ	– аденозин трифосфат
АФК	– активні форми кисню
ГКГС	– головний комплекс гістосумісності
ДК	– дендритні клітини
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ДТТ	– дитіотреїтол
ЕПР	– ендоплазматичний ретикулум
ЛЗ	– лікарський засіб

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	10
1.1 Імуногенна клітинна смерть (ICD): визначення та індуктори.....	10
1.2 Маркери ICD .....	12
1.3 Кальретикулін (CALR).....	14
1.4 HMGB1 .....	16
1.5 Антимікробні пептиди як перспективні індуктори ICD .....	17
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	23
2.1 Інструменти та матеріали .....	23
2.2 Визначення експресії CALR на поверхні клітин .....	24
2.3 Детектування HMGB1 в супернатанті .....	26
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ .....	29
3.1. Визначення рівня експресії CALR на поверхні клітин .....	29
3.2. Визначення рівня HMGB1 в клітинному супернатанті.....	33
ВИСНОВКИ.....	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	38
4. ДОДАТКИ.....	43

## ВСТУП

Вже декілька десятиліть рак лишається другою за поширеністю причиною смерті у світі [1]. Серед чинників можна відзначити як зростання загальної тривалості життя, що збільшує ймовірність захворіти на рак, так і відсутність дієвих та безпечних методів боротьби з ним. Класична протиракова терапія — хіміотерапія, променева терапія та онкохірургія — не є достатньо ефективною через поступове звикання до препаратів, системну токсичність та виникнення запалення, що часто лише сприяє росту ракових клітин [2]. Надзвичайна резистентність та здатність до поділу ракових клітин, що робить їх непростою мішенню для звичних лікарських засобів, виникають внаслідок точкових мутацій в генах, які контролюють ключові сигнальні шляхи поділу, запрограмованої смерті та міграції, — протоонкогенах. У ході мутагенних процесів протеом ракової клітини поповнюється неоантигенами [3] — білковими послідовностями, що відрізняють мутовані клітини від здорових, та, відповідно, можуть стати мішенями для таргетної протиракової терапії. Новітні підходи до лікування раку покликані розпізнавати та точково знищувати злоякісні клітини з мінімальною шкодою для організму [4]. Отримання нанорозмірних систем, що дозволяють доставити лікарський засіб у пухлину та вивільнити його з-під захисної оболонки за участі надекспресованих ензимів на поверхні ракових клітин можуть дати другий шанс таким відомим цитотоксичним препаратам як доксорубіцин. Розшифрування геному та ідентифікація ключових онкогенних мутацій у ракових клітинах відкрили новий напрям у сфері створення лікарських засобів — розробка малих молекул, таргетованих на конкретний білок. Персоналізована терапія, що дозволяє отримати дані про молекулярні зміни в геномі окремих пацієнтів, у комбінації з генною терапією продемонструвала значну ефективність у боротьбі з раком. Проте найбільш перспективним підходом до лікування раку є залучення імунної системи організму пацієнта,

що володіє інструментами для розпізнавання і знищення «чужорідних» об'єктів, а також складними механізмами саморегуляції. Імунна система взаємодіє з мутованими клітинами впродовж усього процесу розвитку, прогресування та метастазування раку [5]. Перехресний зв'язок між імунними та раковими клітинами здатний як послаблювати, так і посилювати ріст пухлин: з одного боку злякисні клітини продовжують мутувати, продукуючи варіанти неоантигенів, що не розпізнаються імунною системою (процес відомий як імуноредагування), а також створюють мікросередовище, що пригнічує її активність; з іншого боку — імунна відповідь на трансформовані клітини може розвинути опосередковано через сигналювання від ракових клітин, що помирають, наприклад, під дією хіміотерапевтичних засобів [6]. Вивільнення молекулярних патернів, асоційованих із пошкодженням (damage-associated molecular patterns, DAMPs) у відповідь на дію лікарського засобу забезпечує перебіг імуногенної клітинної смерті (immunogenic cell death, ICD), що здатна стимулювати імунну відповідь [7]. Як виявилось, деякі відомі хіміотерапевтичні засоби, як-от антрацикліни та оксаліплатин, викликають ICD [8], проте провокують значний рівень системної токсичності та запалення. Комбінація високої специфічності, ефективності та імуногенності дозволила б отримати ідеальний протираковий препарат.

Мембранолітичні пептиди є новим перспективним класом фармацевтичних препаратів, що здатні високоточно знищувати бактерії, віруси та ракові клітини, а також впливати на імунну систему. Вбудування синтетичних фрагментів з корисними характеристиками у природні пептиди дозволяє додатково впливати на їхню біологічну активність. Зокрема, модифікація природного антимікробного пептиду граміцидину S (GS) фоточутливим фрагментом діарилетеном (DAE) дозволила отримати похідні з близькою біологічною активністю, якою можна керувати через опромінення [9].

Ефективність фотоперемикання «закритої» форми у «відкрити», що супроводжується різкою зміною цитотоксичної активності, була досліджена для двох похідних GS LMB002 та LMB033 у *in vitro* в рамках бакалаврської роботи, після чого методологію було опубліковано [10]. Оцінка імуногенного потенціалу даних молекул, що легко контролюється дією видимого світла, може відкрити нову сторінку в протираковій терапії.

**Мета** даної роботи полягала в оцінці імуногенності смерті ракових клітин, що виникає внаслідок дії DAE-модифікованих аналогів GS LMB002 та LMB033.

**Завданнями** роботи були:

1. Обрати панель маркерів для дослідження імуногенної клітинної смерті.
2. Провести валідацію та адаптацію відомих методологій під мету дослідження.
3. Визначити рівень вивільнення обраних маркерів у ході імуногенної клітинної смерті під дією «закритої» та «відкритої» фотоформ LMB002 і LMB033 та оцінити рівень імуногенності відповідно до літературних даних.

**Об'єктом дослідження** була імуногенна клітинна смерть клітин під впливом LMB002 та LMB033.

**Предметом дослідження** були ключові DAMP, що виділяються при дії фоточутливих клітинопроникних пептидів.

**Методи:**

1. Флуоресцентна конфокальна мікроскопія
2. Флуоресцентна проточна цитометрія
3. Вестерн-блот

**Новизна** роботи: вперше було досліджено імуногенність фоточутливих клітинопроникних пептидів на лініях людських клітин HepG2, HeLa, MDA-MB-231.

**Практичне значення:** проведене дослідження дозволяє оцінити імуногенність фоточутливих клітинопроникних пептидів на основі GS, що є

важливим елементом для можливого використання даних сполук в якості імуностимуляторів в ході протиракової терапії. Комбінація дії LMB002 та LMB033 з уже відомими терапевтичними методами, заснованими на додатковій активації імунної системи через, зокрема, стимуляцію дендритних клітин, є перспективним новітнім методом ефективної боротьби з раком.

**Особистий внесок:** систематизацію літературних даних, планування експериментів, експерименти із застосуванням флуоресцентної конфокальної мікроскопії, пробопідготовку зразків для Вестерн-блоту, а також узагальнення, оформлення та аналіз отриманих результатів було проведено здобувачем особисто на базі науково-виробничого підприємства «Бієнта». Експерименти із застосуванням Вестерн-блоту було проведено на базі Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ. 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 Імуногенна клітинна смерть (ICD): визначення та індуктори

Тривалий час вважалось, що успішність протиракової терапії повністю заснована на цитотоксичній дії хіміотерапевтичних ЛЗ, що ефективно реалізується у правильно підібраній схемі лікування. Вплив хіміотерапії на імунну систему організму пацієнта або не розглядався взагалі, або вважався таким, що сприяє винятково придушуванню її активності [11]. За останні двадцять п'ять років стало зрозуміло, що на шляху свого розвитку злоякісна пухлина проходить крізь три етапи: елімінування (клітини імунної системи здатні розпізнати та знищити практично усі трансформовані клітини), рівноваги (клітини імунної системи та клітини пухлини ведуть збалансовану боротьбу) та втечі (клітинам пухлини вдається уникнути розпізнавання імунною системою і вони починають неконтрольовано ділитись). Останній ключовий етап може бути пов'язаний як з придушуванням імунної системи (імуносабверсія), так і з втратою злоякісними клітинами антигенних властивостей (імуноевазія) [5]. Стан імунної системи є визначальним у розвитку та розповсюдженні раку. Як було неодноразово продемонстровано, успіху при застосуванні загальноприйнятих режимів лікування раку було досягнуто за рахунок несвідомого використання здатності імунної системи розпізнавати специфічні антигени пухлин та контролювати їхній ріст після активації класичною хіміотерапією або таргетованими лікарськими засобами [12], [13].

ЛЗ можуть активувати імунну систему через пряму активацію цитотоксичних Т-клітин, пришвидшення дозрівання дендритних клітин (ДК), інгібування мієлоїдних супресорних клітин (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), активацію В-лімфоцитів, інгібування індоламін-2,3-диоксигенази (IDO), а також через індукування імуногенної клітинної смерті [6]. До клітинних стресорів, що викликають ICD, відносять [14]:

- 1) Облігатні внутрішньоклітинні патогени (бактерії та віруси),
- 2) Терапевтичні онколітичні віруси,
- 3) Різноманітні молекули з онколітичним потенціалом,
- 4) Конвенційні хімотерапевтичні засоби:
  - a) антрацикліни (доксорубіцин, мітоксантрон),
  - b) ЛЗ, що пошкоджують структуру ДНК (циклофосфамід, оксаліплатин),
  - c) Інгібітори полі-А-рибозаполімерази (PARP),
  - d) Мітотичні отрути (доцетаксель, патупілон),
  - e) Протеасомальні інгібітори (бортезоміб, карфілзоміб),
- 5) Епігенетичні модифікатори, такі як інгібітори ДНК-метилтрансферази, гістондеацетилази, бромодомену,
- 6) Таргетовані протиракові ЛЗ (кризотиніб, цетуксімаб, динацикліб, ібрутиніб),
- 7) Інші хімічні сполуки (антибіотик блеоміцин, компонент традиційної китайської медицини шиконін та активний компонент червоного перцю капсаїцин),
- 8) Різні види фізичного впливу:
  - a) Іонізуюче випромінювання,
  - b) Екстракорпоральна фотохімотерапія,
  - c) Фотодинамічна терапія із застосуванням гіперіцину (PDT),
  - d) Фотоімунотерапія з використанням інфрачервоного випромінювання в ближньому діапазоні (near-infrared, NIR),
  - e) Високий гідростатичний тиск,
  - f) Цитотоксичний тепловий шок,
  - g) Стимуляція електричними нанопульсами,
  - h) Електрогіпертермія.

За визначенням Номенклатурного комітету по клітинній смерті (Nomenclature Committee on Cell Death) [14] імуногенна клітинна смерть — це форма регульованої клітинної смерті (regulated cell death, RCD), що має здатність активувати адаптивну імунну відповідь в імунокомпетентному

сингенному організмі. Це визначення об'єднує компоненти клітини та цілого організму та підкреслює ключову характеристику — імуногенний потенціал клітин, що може виникнути лише в організмах, що володіють певними характеристиками.

Імуногенний потенціал регульованої клітинної смерті залежить від двох параметрів, жоден з яких не є апіорі притаманним для клітин, що помирають: антигенність та ад'ювантність. Антигенність можна визначити як здатність клітин утворювати та презентувати антигени, що можуть бути розпізнавані клітинами імунної системи, а саме найвними Т-лімфоцитами. Основним джерелом антигенів у ракових клітинах є антигени, асоційовані з пухлинами, (tumor-associated antigens, TAAs) — невеликі пептиди, що утворюються після транскрипції онкогенів, трансляції протеїнів та їхньої протеосомної деградації [15]. Оскільки ракові клітини розвинули багато шляхів уникнення ефективної презентації антигенів клітинам імунної системи, додаткова активація необхідна для виникнення імунної відповіді, що забезпечується такою характеристикою як ад'ювантністю. У контексті ICD ад'ювантність реалізується через особливі молекули, що або експонуються на поверхні клітини, що помирає, або вивільняються в позаклітинний простір, де вони можуть вільно взаємодіяти з рецепторами на поверхні АПК та сприяти їхньому рекрутингу та дозріванню. Такі молекули отримали назву молекулярних патернів, асоційованих із пошкодженням (damage-associated molecular patterns, DAMP) та є *маркерами ICD*.

## 1.2 Маркери ICD

До маркерів ICD відносять різноманітні DAMP та цитокіни, що сприяють виникненню адаптивної імунної відповіді у доклінічних моделях. Перелік цих імуностимуляторних молекул включає аденозинтрифосфат (АТФ), нуклеїнові кислоти, ДНК-зв'язувальний протеїн негістонової природи high mobility group box 1 (HMGB1), анексин А1 (ANXA1), цитокіни інтерферон І типу, C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), C-X-C motif

chemokine ligand 1 (CXCL1) та CXCL10, білки-шаперони ендоплазматичного ретикулуму кальретикулін (CALR), протеїндисульфідізомераза A3 (PDIA3), протеїни теплового шоку Hsp70, HSP90, F-актин, активні форми кисню (АФК), кардіоліпін та мітохондріальний транскрипційний фактор А (TFAM).

Основні функції DAMP та цитокінів можна об'єднати у п'ять груп:

1. Рекрутинг АПК та їхніх попередників до місця масової клітинної смерті (АТФ),
2. Просторове спрямування взаємодії між АПК та клітинами, що помирають (ANXA1),
3. Полегшення фагоцитозу вмираючих або вже мертвих клітин (CALR, PDIA3, протеїни теплового шоку),
4. Сприяння дозріванню АПК та їхній здатності крос-презентувати антигени Т-лімфоцитам (АТФ, HMGB1, інтерферон I типу),
5. Сприяння рекрутингу Т-лімфоцитів (CCL2, CXCL1, CXCL10).

Незважаючи на багатофакторність імуностимуляторного впливу DAMP на клітини імунної системи, кінцевий ефект протиракової терапії індукторами ICD залежить від низки супутніх факторів: рівня експресії DAMP, типу рецептора, з яким відбувається взаємодія, наявності loss-of-function поліморфізмів у генах, що кодують DAMP-зв'язувальні рецептори, рівня експресії антагоністів DAMP, можливості імуноклітинної інфільтрації місця загибелі ракових клітин, типу та стадії раку і стану імунної системи пацієнта. Окрім того, тривала імуностимуляція неминуче призводить до імунного виснаження та втрати неоантигенів у ході процесу імуноредагування, що сприяють онкогенним процесам [16]. Таким чином, стратегія активації сигнальних шляхів DAMP разом із застосуванням цитостатичної терапії або терапії, що попереджує імунне виснаження, як-от терапії інгібіторами чекпойнту виглядає більш обнадійливо, ніж застосування імуностимуляторних ЛЗ самих по собі. Тим не менш, ідентифікація DAMP як маркерів ICD є першим кроком для визначення потенціалу того чи іншого кандидата на імуностимуляторний ЛЗ. Три

ключові DAMP — аденозин трифосфат (АТФ), кальретикулін (CALR) та HMGB1 — включають до панелі первинної оцінки клітинної смерті як ICD *in vitro*. У даній роботі ми зосередились на вивченні двох маркерів — CALR та HMGB1.

### 1.3 Кальретикулін (CALR)

Кальретикулін (calreticulin, CALR) — це мультифункціональний протеїн, локалізований в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР), де відіграє ключову роль у згортванні білків, підтримуванні кальцієвого гомеостазу, а також у функціонуванні комплексу навантажування пептидів (peptide-loading complex, PLC), що забезпечує експозицію антигенів на молекулах головного комплексу гістосумісності (ГКГС) I класу для розпізнавання клітинами імунної системи [17], [18]. Соматичні мутації так званого I та II типів у гені *CALR* придушують відповідь клітин на накопичення розгорнутих білкових послідовностей та окисний стрес і таким чином сприяють онкогенезу через генерування АФК та, відповідно, генетичну нестабільність [19]. Окрім того, втрата CALR функції згортання, асемблювання та експозиції ТАAs на ГКГС I класу сприяє уникненню раковими клітинами імунної відповіді.

Коли клітина входить в так званий стан інтегрованої відповіді на стрес (integrated stress response, ISR) — тривалий стан реакції клітини на специфічні чинники у внутрішньо- та зовнішньоклітинному середовищі, що призводить до порушення ендоплазматичного гомеостазу — CALR виходить з люмену ЕПР і передислоковується на зовнішню частину клітинної мембрани. Експонований на поверхні клітини, екто-кальретикулін надсилає АПК, ДК та їхнім попередникам, профагоцитарний сигнал, таким чином ініціюючи поглинання клітин, які помирають. Імуностимуляторний ефект досягається за рахунок розпізнавання кальретикуліну рецептором CD91 на поверхні ДК та подальшого праймінгу Т-клітин-хелперів 17. Врівноважування профагоцитарної функції кальретикуліну відбувається за участі протеїну CD47. Підвищення регуляції CD47 на поверхні ракових

клітин є одним з механізмів уникнення розпізнавання та поглинання АПК [20].

Молекулярний механізм транслокації CALR на поверхню клітини реалізується завдяки складній взаємодії між різними внутрішньоклітинними модулями, включаючи каспазу-8 та протеїни Bcl-2, комплекс PP1/GADD34 та інгібіторне фосфорилування евкаріотичного фактора трансляції eIF2 $\alpha$  кіназою PERK та протеїни SNARE. Відповідно, loss-of-function мутація будь-якого компоненту перелічених комплексів унеможливорює перенесення кальретикуліну на зовнішню частину клітинної мембрани.

CALR є визначальним фактором імуногенності клітинної смерті *in vitro* та *in vivo*. При застосуванні фотодинамічної терапії на клітинній лінії аденокарциноми T24 та колоректальної карциноми CT26 рівень кальретикуліну зростає більш, ніж удвічі [21]. В іншому дослідженні при обробці ракових клітин антрациклінами (мітоксантрон, ідарубіцин, доксорубіцин) *in vitro*, вакцинації мишей отриманими мертвими клітинами та введенні живих ракових клітин в організм тих самих тварин через деякий час, було помічено, що організм більше, ніж 80% мишей, ефективно знищив ракові клітини, так що пухлин не було детектовано протягом 4 місяців спостережень. При більш детальному дослідженні протеїнів, що були експресовані на поверхні клітин, було виявлено підвищений рівень CALR [22].

Вважаючи на важливі ролі як ендо-, так і екто-CALR в процесах розпізнавання та знищення чужорідних об'єктів клітинами імунної системи, підвищений рівень експресії CALR раковими клітинами вважається позитивним прогностичним маркером, хоча для деяких когорт пацієнтів з різними типами раку та застосованими протоколами лікування загальна виживаність знижувалась. Ймовірно, причина полягає у функціонуванні ендо-CALR у якості ключового компонента у підтримуванні кальцієвого гомеостазу в ЕПР ракових клітин, що і сприяє пухлиногенезу [19], що ще раз підкреслює двоякість впливу DAMP на перебіг раку.

## 1.4 HMGB1

High mobility group box 1 (HMGB1) — це ядерний фактор негістонної природи, функція якого полягає у забезпеченні згортання ДНК навколо гістонів у нуклеосомах та регуляції експресії деяких генів [23].

У позаклітинному просторі HMGB1 виступає в якості аларміна [24] — ендогенної молекули, що бере участь в міжклітинному сигналюванні. HMGB1 вивільняється у позаклітинний простір або внаслідок порушення цілісності ядерної мембрани та пасивної дифузії у ході некрозу, або внаслідок гіперацетилювання, що супроводжується транслокацією протеїну в цитоплазму, де відбувається упаковка в секреторні лізосоми, що зливаються з клітинною мембраною після отримання вторинного сигналу, зокрема в моноцитарних клітинах та макрофагах після активації ліпополісахардом (LPS) — компонентом бактеріальних мембран, що провокує імунну відповідь [25]. P300/CBP-асоційований фактор (P300/CBP-associated factor, PCAF), CREB-зв'язувальний білок (CREB-binding protein, CBP) та гістонацетилтрансфераза p300 відіграють важливу роль в ацетилюванні HMGB1. Активація Янус-кінази 1 (JAK1) або STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) інтерфероном I типу також здатні індукувати ацетилювання HMGB1 та транслокацію протеїну з ядра у цитоплазму [26].

Після вивільнення у позаклітинний простір HMGB1 може запускати сигнальний каскад через зв'язування з рецептором RAGE (receptor of advanced glycation endproducts) або з Toll-подібним рецептором 4 (TLR4) [26]. Ефект від вивільнення HMGB1 в кінцевому рахунку залежить від його рівня експресії, окисного стану, посттрансляційних модифікацій, зв'язування з іншими молекулами (ДНК, гістони) та рецептора, через який відбувається сигналювання [27], [28], [29]. Зокрема, зв'язування з TLR4 запускає сигнальний каскад, що викликає запалення. Сигналювання через RAGE активує ядерний фактор κB (NF-κB), таким чином сприяючи продукуванню цитокінів. Сигналювання як через RAGE, так і через TLR, може сприяти ангиогенезу (утворенню кровоносних судин) в пухлинах та метастазуванню

[16], [30] або покращувати дозрівання, активацію, рекрутинг та інфільтрацію різних типів АПК, а також крос-активувати інші типи клітин імунної системи.

Комплексний аналіз великого масиву накопичених даних [31] показав, що рівень експресії HMGB1 в здорових та пухлинних тканинах відрізняється. Окрім того, рівень експресії протеїну тісно пов'язаний із стадією та прогнозом для різних типів пухлин, що дає можливість припустити, що HMGB1 може відігравати різні ролі в онкогенних процесах залежно від характеристик пухлини. Ракові клітини мають підвищений рівень експресії HMGB1, ймовірно завдяки тому, що протеїн у тому числі сприяє автофагії [32] — перетравлення клітиною власних органел за допомогою ферментів, що містяться у лізосомах у відповідь на стрес. Таким чином ТАА не експонуються на поверхні клітин і не можуть бути розпізнані АПК, що дозволяє клітинам уникати імунного знищення. З іншого боку, було продемонстровано, що низка ЛЗ, затверджених Food and Drug Administration (FDA) [33], та новітніх хіміотерапевтичних засобів [34] викликають секрецію HMGB1 в позаклітинний простір, що сприяє виникненню протипухлинного імунітету. Незважаючи на дуальність дії HMGB1, HMGB1 є важливим прогностичним маркером в процесах онкогенезу, що має бути взятий до уваги в процесі розробки ЛЗ з імуностимуляторними властивостями.

### **1.5 Антимікробні пептиди як перспективні індуктори ICD**

Мембранолітичні протиракові пептиди (membranolytic anticancer peptides, ACPs) — це новий перспективний клас сполук, що володіють терапевтичним потенціалом для лікування раку. АСР здатні знищувати ракові клітини в ході неферментативного мембранолізу, що ускладнює розвиток клітинної резистентності, яка однією з основних проблем при розробці протиракових препаратів [35]. Прикладом АСР є антимікробні пептиди (antimicrobial peptides, AMPs). Найпершим ізольованим AMP був природній циклічний пептид граміцидин S (gramicidin S, GS), що

секретується бактерією *Bacillus brevis* та є ефективним проти Грам-позитивних бактерій.

АСР — це зазвичай амфіфільні пептиди довжиною не більше 10-30 амінокислотних залишків. Селективність АСР до знищення саме ракових клітин залежить як від характеристик самого пептиду (послідовність амінокислот, гідрофобність, сумарний заряд, третинна структура), так і від характеристик мембран ракових клітин (електростатичний потенціал, відносний вміст полісахаридів з різними характеристиками у складі мембрани, зокрема залишків сілової кислоти, холестеролу та фосфатидилсерину).

Зважаючи на високу активність, біодоступність та відомий механізм дії, АСР можуть бути ефективними протираковими ЛЗ. Найбільшою перешкодою до прямого застосування є висока системна токсичність, що пов'язана з недостатнім рівнем селективності відносно ракових клітин більшості активних АСР. Відповідно, раціональний дизайн та розробка специфічних протоколів введення таких пептидів для одночасного мінімізації побічних ефектів та максимізації ефективної дії є перспективною, проте ресурсо- та часозатратною стратегією отримання кандидатів на лікарський засіб.

Особливий інтерес до пошуку та розробки нових синтетично-модифікованих АСР з'явився після того, як стало зрозумілим, що АСР можуть сприяти розвитку імунної відповіді організму на трансформовані ракові клітини, викликаючи імуногенну клітинну смерть. За рахунок утворення пор в зовнішньо- та внутрішньоклітинних мембранах (мітохондріальна та ядерна мембрани), сприяння виникненню інтегрованої відповіді на стрес в ЕПР АСР сприяють експонуванню та/або секреції вищезгаданих DAMP, що здатні впливати на активацію або блокувати супресію імунних клітин, що можуть знаходитись в мікросередовищі пухлини (tumor microenvironment, TME) [36].

Зокрема LTX-315, синтетична похідна природнього пептиду лактоферицину В (lactoferricin В), сприяла вивільненню АТФ, цитохрому С та HMGB1 з щурячих трансформованих мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* і попереджувала розвиток пухлини після введення протягом тринадцяти тижнів *in vivo* [34]. На даний момент антираковий ефект сполуки пояснюється збільшенням інфільтрації Т-лімфоцитів через TME, що було продемонстровано у клінічних дослідженнях I/II фази проти раку грудей і раку голови та шиї [37].

Іншим прикладом є RT53 — похідна від клітинопроникного пептиду пенетратину, що стимулює експонування CALR, вихід в позаклітинний простір HMGB1 та АТФ *in vitro*, а при внутрішньопухлинному введенні *in vivo* призводить до некрозу пухлини та зростання інфільтрації клітин імунної системи [38].

Хемокіностатин-1 (CKS1) — 24-мерний пептид, отриманий з хемокіну CXCL1. Початково вважалось, що він володіє антиангіогенними властивостями, проте у ході детальних досліджень було виявлено, що CKS1 є селективним онколітичним пептидом, що викликає ICD: підвищений рівень АТФ та HMGB1 після інкубації клітин зі сполукою був детектований *in vitro*, а також значний некроз пухлин та їхнє суттєве зменшення були задокументовані в ході *in vivo* експериментів [39].

Хоча про онколітичну активність граміцидину S було відомо давно [40], пептид не знайшов свого застосування в клінічній практиці через високу токсичність. Інкорпорування синтетичного фоточутливого фрагменту DAE та серія амінокислотних замін дали початок класу фоточутливих АСР з протираковою та антимікробною активностями — люмобіотикам (lumobiotics, LMB). Дослідження *in vitro* на різних ракових клітинних лініях [41] та *in vivo* на алогографній мишачій моделі раку легеней [42] показали високу цитотоксичну активність сполуки LMB002, яку можливо контролювати опромінюванням. «Відкрита» форма є близькою до GS конформаційно, що відображається на значеннях IC<sub>50</sub> у тому самому

мікромольному діапазоні при обробці сполуками еваріотичних клітинних ліній. Окрім того, різниця у значеннях  $LD_{50}$  показали, що введення «закритої» форми, її фотоперемикання *in situ* у «відкриту» значно знижує токсичність сполуки. Значне інгібування hERG та різних ізоформ цитохромів CYP450, а також накопичення сполук у плазмі крові у концентраціях, що можуть спричиняти гемолітичну активність, підкреслюють основну проблему використання ACPs у типових протоколах лікування раку — високий рівень загальної токсичності, що змушує шукати альтернативні підходи до застосування сполук.

Додаткові дослідження на хімічно-індукованій моделі гепатоцелюлярної карциноми в щурах *in vivo* продемонстрували значне підвищення виживаності тварин після введення тієї ж сполуки та фотоперемикання з менш активної «закритої» форми у більш активну «відкриту» (Рис. 1.1, 1.2).

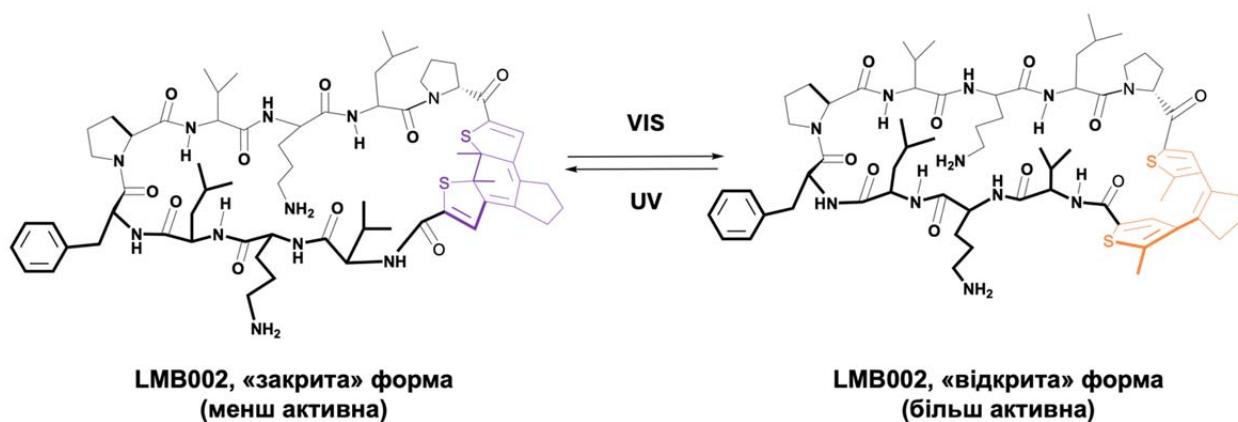


Рис. 1.1 Фотоперемикання між двома формами LMB002

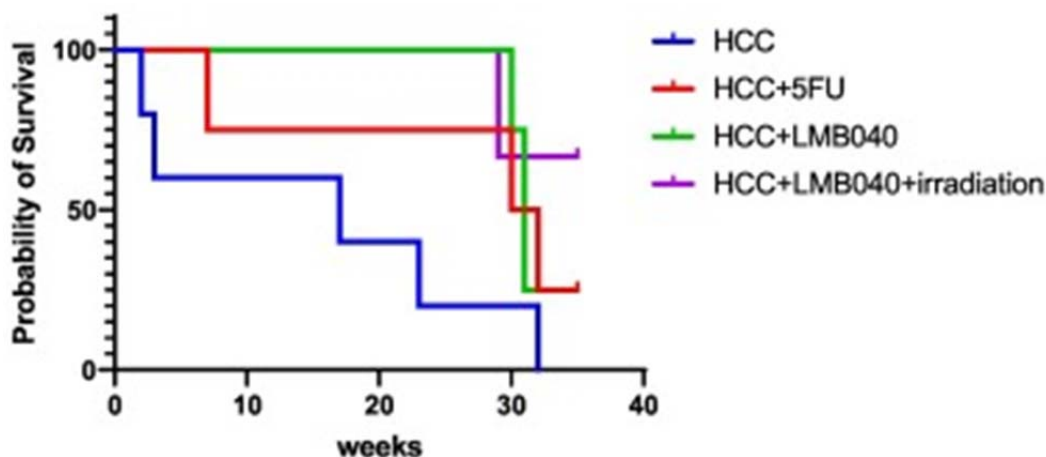


Рис. 1.2 Крива виживаності Каплана-Меєра для щурів з гепатоцелюлярною карциномою (hepatocellular carcinoma, HCC), яких не лікували (синя крива), вводили відомий протираковий ЛЗ 5-фторурацил (5-FU) (червона крива), «закриту» форму LMB040 (зелена крива), «закриту» форму LMB040 з подальшим опроміненням (фіолетова крива). Витяг з [43].

Окрім того, декілька тварин з групи, яким вводили «закриту» форму LMB040 та опромінювали лазером, таким чином перемикаючи у «відкриту» форму, мали підвищений рівень Т-лімфоцитів у тимусі та селезінці, що свідчить про імунну активацію, ймовірно, в ході ICD.

DAE-модифіковані аналоги GS володіють високим терапевтичним потенціалом протиракових ЛЗ, оскільки є ефективними онколітичними агентами з фотокерованою активністю, що здатні індукувати імунну відповідь без спричинення системної токсичності. Для досягнення максимальної ефективності з мінімальними ризиками варто вдаватися до альтернативних стратегій активації імунної системи — внутрішньопухлинної вакцинації або протиракової вакцинації з використанням дендритних клітин (ДК). Внутрішньопухлинна вакцинація (intratumoral vaccination) включає введення імуностимуляторних таргетованих ЛЗ безпосередньо в пухлину, мікроклімат якої часто пригнічує активність тих АПК або Т-лімфоцитів, що можуть там перебувати. Відповідно, активація імунних клітин у безпосередній близькості до пухлини має сприяти її ефективному знищенню [44]. У свою чергу головною метою використання вакцинації ДК є

стимуляція цитотоксичних Т-лімфоцитів, специфічних до антигенів пухлини, що можуть розпізнавати та знищувати її [45]. Принцип полягає у виділенні ракових і дендритних клітин з організму пацієнта, обробки ракових клітин онколітичними речовинами *ex vivo*, розпізнавання отриманих антигенів дендритними клітинами та введення отриманої суспензії ДК назад в організм. У випадку застосування речовин, що викликають ICD, що супроводжується виділенням DAMP, відбувається додаткова активація ДК, що сприяє виникненню релевантної імунної відповіді в організмі. Такі терапевтичні пептидні вакцини вважаються одним з найбільш обнадійливих підходів до лікування раку. Застосування різноманітних комбінаторних підходів (фотоперемикання, таргетовані ЛЗ, інгібітори чекпойнту, CAR Т-лімфоцити і т.д.) [46] разом з вакцинацією активованих ДК організму пацієнта є кандидатом на успішний персоналізований протокол лікування раку. Проте першим кроком є оцінка пептидів *in vitro* та *in vivo* (Рис. 1.3) на рівень індукції ICD та активації імунної системи організму.

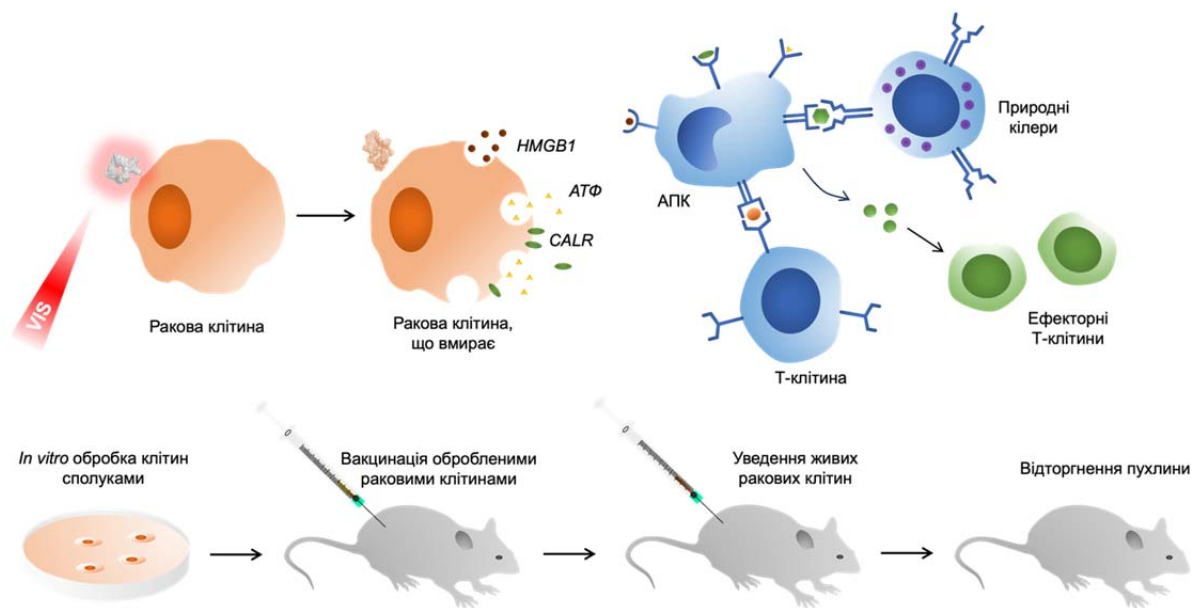


Рис. 1.3 Експериментальна схема оцінки імуногенності клітинної смерті, що викликається DAE-модифікованими аналогами GS, *in vitro* та *in vivo*

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Інструменти та матеріали

Для дослідження було обрано три людські ракові лінії клітин: раку шийки матки HeLa (ATCC, #CCL-2), гепатоцелюлярної карциноми HepG2 (ATCC, #HB-8065) та раку грудей MDA-MB-231 (DSMZ, #ACC-732).

У ході дослідження експресії CALR на поверхні клітин було використано флуоресцентний барвник Hoechst 33342 (Invitrogen™, #H3570) для мічення ядер клітин та рекомбінантне антитіло до CALR, мічене флуорофором Alexa Fluor® 647 [EPR3924] (#ab196159, Abcam). Клітини були розкапані у 96-лункові плати для флуоресцентної мікроскопії (PerkinElmer, #6055302). Для відмивання плат був використаний вошер для плат BioTek ELx405. Мікроскопічні зображення було отримано за допомогою автоматизованої системи високоефективного клітинного скринінгу INCell Analyzer 6500HS (GE Healthcare), вбудованого об'єктиву з 20-кратним збільшенням з NA = 0,45 та лазерів зі збудженням на 405 та 645 нм. 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 10.

Для детектування HMGB1 у супернатанті культури клітин були розкапані у 96-лункові плати (Corning, #353377). Було використано моноклональне антитіло до HMGB1 (ThermoFisher, #GT348), вторинне антитіло Goat anti-Mouse IgG2 Secondary Antibody, HRP (ThermoFisher, #A-10685) та моноклональне антитіло до  $\beta$ -актину (ThermoFisher, #AM4302) для внутрішнього контролю. Для стандарту молекулярної маси білків було використано реагент PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher, #26616). Для проявлення та фіксування використовували проявник та фіксаж РЕНМЕД-В-Ф.

## **2.2 Визначення експресії CALR на поверхні клітин**

Для визначення рівня експресії кальретикуліну на поверхні клітин методом флуоресцентної мікроскопії клітини було посаджено у 96-лункові плати у 200 мкл середовища DMEM complete (10% FBS, 1% глутаміну та 1% P/S) на лунку. Густина посадки була 20000 клітин на лунку для ліній HeLa та MDA-MB-231 та 30000 клітин на лунку для HepG2, що було визначено попередньо (*Додатки А, Б та В*). За добу середовище повністю відбирали та додавали 100 мкл свіжого. Серійні розведення тестових сполук були приготовані у середовищі відповідно до карти плати (*Рис. 2.1*) у проміжній платі та були перенесені у відповідні лунки в об'ємі 100 мкл. Дані концентрації були вибрані з урахуванням раніше визначених значень  $IC_{50}$  для усіх сполук і знаходяться в діапазоні з цитотоксичною активністю у 0-100% для «відкритої» форми LMB002, LMB033 та GS і 0-40% для «закритої» форми обох сполук залежно від клітинної лінії.

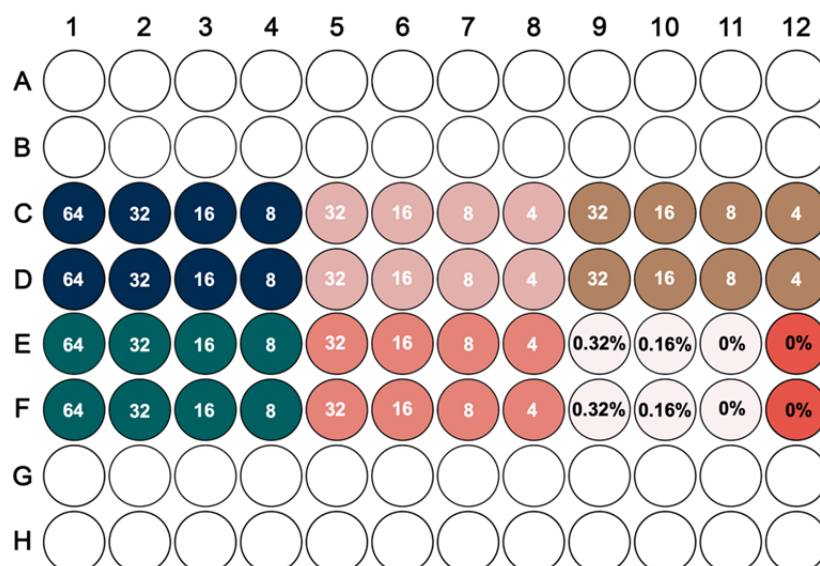


Рис. 2.1: Карта плати для експерименту з визначення експресії кальретикуліну: LMB002, «закрита» форма (синій), LMB002, «відкрита» форма (світло-рожевий), LMB033, «закрита» форма (зелений), LMB033, «відкрита» форма (кораловий), грамїцидин S (коричневий), негативний контроль – необроблені клітини (бежевий), позитивний контроль – необроблені клітини, пермеабілізовані 0,1% Triton X-100 (червоний). Концентрації сполук у мкМ вказані текстом на лунці. У лунках негативного та позитивного контролів % відображає вміст ДМСО.

Клітини лишали інкубуватися з речовинами в інкубаторі (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) протягом 24 годин. Після цього проводили фіксацію клітин: до кожної лунки додавали 50 мкл 20% розчину параформальдегіду (фінальна концентрація – 4%) та інкубували при кімнатній температурі 15 хвилин. Потім формальдегід відмивали тричі PBS з використанням вошера для плат BioTek ELx405. Для позитивного контролю (необроблені клітини, у яких CALR знаходиться в ЕПР) проводили пермеабілізацію клітинної мембрани: повністю відбирали PBS з відповідних лунок, додавали 0,1% розчин Triton X-100 в PBS та інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після чого лунки відмивали тричі PBS. Для блокування неспецифічних взаємодій клітини додавали 100 мкл блокувального буферу (1% BSA, 22,5 мг/мл гліцину, 0,1% Tween 20 в PBS) на лунку та інкубували протягом 30 хвилин.

Після цього буфер повністю відбирали та проводили фарбування: до кожної лунки додавали 100 мкл розчину (1/1000 розведення антитіла до CALR та 1/4000 розведення Hoechst 33342) та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Після цього лунки відмивали тричі PBS, лишаючи 100 мкл PBS в кінці. Плату заклеювали алюмінієвою плівкою та поміщали в камеру конфокального мікроскопа для отримання зображень.

### **2.3 Детектування HMGB1 в супернатанті**

Для детектування HMGB1 в супернатанті методом Вестерн-блоту 20000 клітин HepG2 на лунку було посаджено у 96-лункові плати у 200 мкл середовища DMEM complete (10% FBS, 1% глутаміну та 1% P/S). За добу середовище повністю відбирали та додавали 50 мкл свіжого. Серійні розведення тестових сполук були приготовані у середовищі відповідно до карти плати (Рис. 2.2) у проміжній платі та були перенесені у відповідні лунки в об'ємі 50 мкл. Клітини лишали інкубуватися з речовинами в інкубаторі (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) протягом 24 годин. Після цього 45 мкл супернатанту відбирали у епендорфи на 200 мкл та додавали 15 мкл SDS Sample Buffer 4X (250 мМ Tris HCl pH 6,8, 277 мМ натрій додецилсульфату (sodium dodecylsulfate, SDS), 40% гліцерину, 0,2 ДТТ, 3 мМ бромфенолового синього). Отримані зразки нагрівали до температури 85°C протягом 5 хвилин, аби забезпечити денатурацію білків. У свою чергу середовище з лунок з позитивним контролем повністю відбирали та додавали 50 мкл лізис-буферу (250 мМ Tris HCl pH 6,8, 2% SDS, 6М сечовини, 100 мМ ДТТ, 0,75 мМ бромфенолового синього) для пермеабілізації клітинної та ядерної мембран. Отриманий розчин переносили в епендорфи, які нагрівали при температурі 100°C протягом 10 хвилин. Усі зразки охолоджували та заморожували на -70°C.

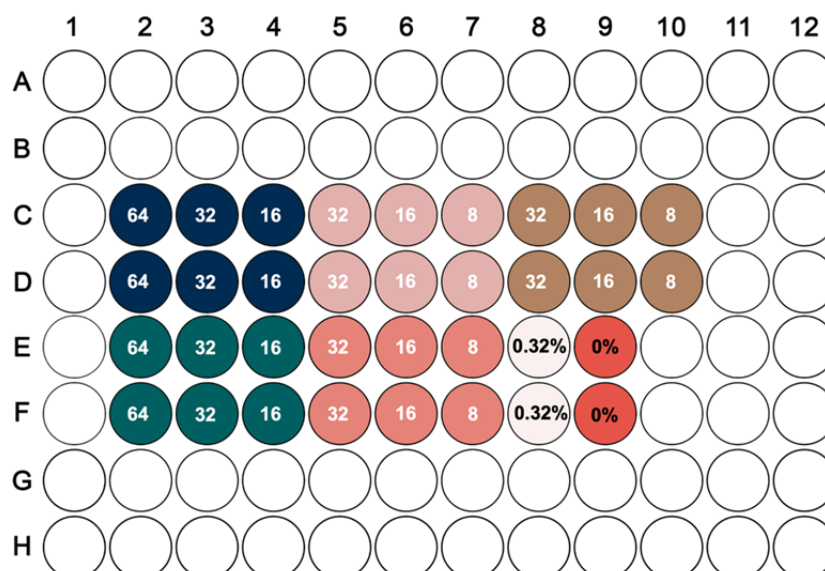


Рис. 2.2: Карта плати для експерименту з визначення вмісту HMGB1 в супернатанті: LMB002, «закрита» форма (синій), LMB002, «відкрита» форма (світло-рожевий), LMB033, «закрита» форма (зелений), LMB033, «відкрита» форма (кораловий), грамїцидин S (коричневий), негативний контроль – необроблені клітини (бежевий), позитивний контроль – необроблені клітини, пермеабілізовані 0,1% Triton X-100 (червоний). Концентрації сполук у мкМ вказані текстом на лунці. У лунках негативного та позитивного контролів % відображає вміст ДМСО.

У день проведення аналізу зразки розморожували, завантажували в об'ємі 20 мкл в попередньо підготовлені касети з гелем та розділили методом електрофорезу на 12% поліакриламідному гелі (12% розчину акриламід-бісакриламід у співвідношенні 29:1, 375 мМ Tris рН 8,8, 0,001% 6,6 мМ персульфату амонію, 0,3% SDS, 0,025% N,N,N',N'-тетраметилендіаміну (TEMED)) на 150 В протягом 50-70 хвилин. Після електрофорезу гель разом з фільтрувальним папером та нітроцелюлозною мембраною замочували у буфері TOWBIN (192 мМ гліцину, 25 мМ Tris, 10% метанолу) протягом 5 хв, а тоді здійснювали перенос на нітроцелюлозну мембрану на 60 В протягом 3 годин. Отриману мембрану проявляли за допомогою 0,1% Amido Black, після чого промивали дистиллятом декілька разів. Наступним кроком проводили блокування: для цього мембрану замочували у 10 мл буферу TBST (10 мМ

Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) з 1% альбуміну та 1% сухого молока протягом 1 години. Потім наносились первинні антитіла до HMGB1, попередньо розведені 1:500 у блокувальному буфері, та інкубувалися протягом 2 годин при постійному перемішуванні при кімнатній температурі. Для зразків для внутрішнього контролю проводили аналогічну процедуру з моноклональними антитілами до  $\beta$ -актину у розведенні 1:1000. Після завершення інкубації мембрану промивали TBST тричі з перемішуванням по 10 хвилин. Вторинні антитіла Goat anti-Mouse IgG2 Secondary Antibody, HRP у розведенні 1:200 у TBST наносились на 1 годину при кімнатній температурі. Після цього мембрану промивали TBST п'ять разів по 5 хвилин та переходили до детекції. Було попередньо приготовано два водні розчини для методу покращеної хемілюмінісценції (enhanced chemiluminescence, ECI): розчин 1 (2,5 mM люмінолу, 396 мкМ п-кумаринової кислоти, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5) та розчин 2 (0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5). Спочатку здійснювалась інкубація в розчині 1 протягом 5 хв, після чого аналогічно інкубували в розчині 2 протягом 5 хв. Після цього проводили проявку у проявнику РЕНМЕД-В-Ф протягом 5 хв, промивали водою 1 хвилину та фіксували за допомогою фіксажу РЕНМЕД-В-Ф протягом 10 хвилин. Потім мембрану інтенсивно промивали водою, висушували та сканували.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Визначення рівня експресії CALR на поверхні клітин

У ході дослідження експресії CALR на поверхні клітин як маркера імуногенної клітинної смерті було отримано серії мікроскопічних зображень для кожної клітинної лінії. На *рис. 3.1A, 3.2A та 3.3A* представлено деякі з них для HeLa, HepG2 та MDA-MB-231 відповідно.

Обробка отриманих даних за допомогою вбудованого ПЗ InCarta дозволила здійснити сегментацію окремих клітин, а також кількісний аналіз CALR на їхній поверхні. Для обрахунку було обрано площу регіонів скупчення CALR — усереднену на усі клітини в лунці площу областей навколо ядра клітини, інтенсивність флуоресценції яких вища від фоновій вдвічі ( $> 500$  RFU). Для деяких концентрацій дані не було отримано та проаналізовано через змивання клітин з дна лунки внаслідок їхнього

відкріплення у відповідь на дію сполук. Дані було представлено у вигляді гістограм, зображених на *рис. 3.1Б, 3.2Б та 3.3Б*, що демонструють кратне збільшення площі скупчень CALR відносно негативного контролю (0,5% ДМСО).

Для клітинної лінії HeLa значне ( $\geq 2$  відносно негативного контролю) збільшення експресії CALR було отримане лише для GS в концентрації 32 мкМ (*Рис. 3.1Б*). Обидві форми LMB002 та LMB033 показали близькі до контролю значення. У свою чергу фотоперемикання із «закритої» форми у «відкриту» форму майже не змінило кількість екто-CALR на поверхні клітинної мембрани при порівнянні однакових концентрацій (*Табл. 3.1*). «Відкрита» форма LMB033 в концентрації 16 мкМ майже вдвічі збільшила CALR, проте жодне з одержаних значень не є статистично значимим відносно контролю (*Додаток Г*). Виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок, що DAE-модифіковані аналоги GS в обраному діапазоні концентрацій не сприяють експресії CALR на поверхні клітин лінії HeLa.

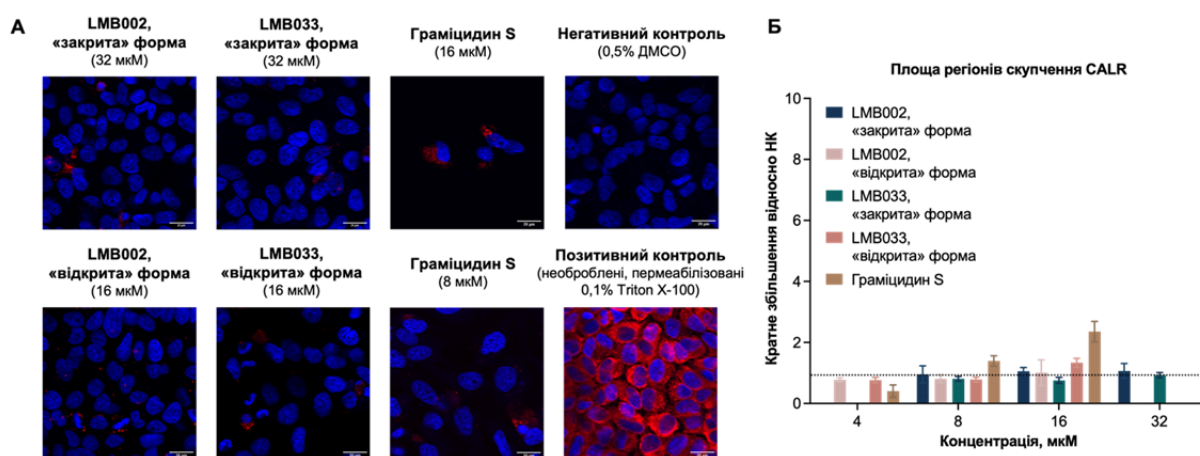


Рис. 3.1: А) Вибрані мікроскопічні зображення клітинної лінії HeLa після інкубації з речовинами протягом 24 годин та фарбування Hoechst 33342 (синій) та флуоресцентно-міченими антитілами, специфічними до CALR (червоний). Масштаб — 20 мкм. Б) Гістограма, що відображає кратне збільшення площі регіонів скупчення CALR відносно негативного контролю (0,5% ДМСО, пунктирна лінія) після інкубації зі сполуками. Дані візуалізовано як SEM  $\pm$  SD (n=2).

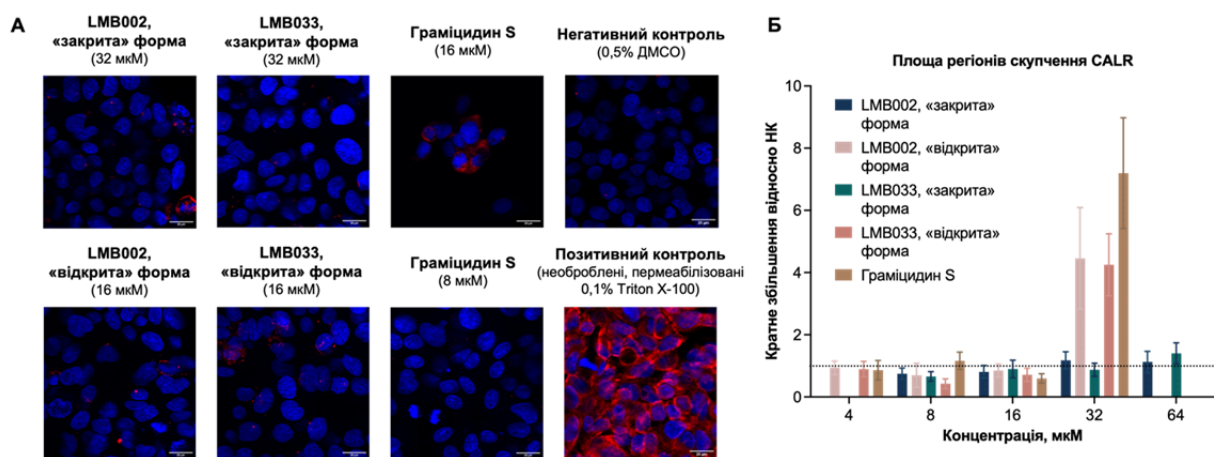


Рис. 3.2: А) Вибрані мікроскопічні зображення клітинної лінії HepG2 після інкубації з речовинами протягом 24 годин та фарбування Hoechst 33342 (синій) та флуоресцентно-міченими антитілами, специфічними до CALR (червоний). Масштаб — 20 мкм. Б) Гістограма, що відображає кратне збільшення площі регіонів скупчення CALR відносно негативного контролю (0,5% ДМСО, пунктирна лінія) після інкубації зі сполуками. Дані візуалізовано як SEM ± SD (n=2).

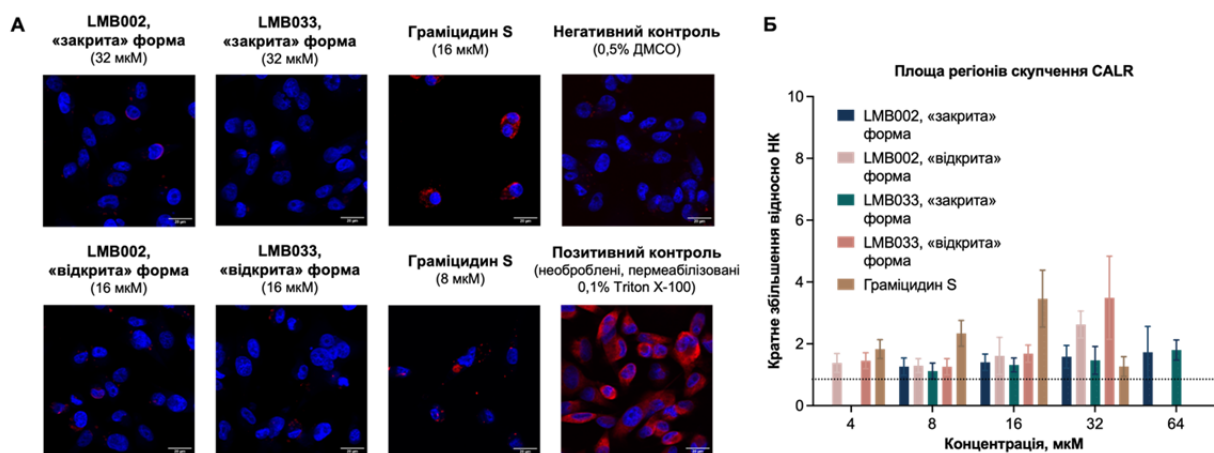


Рис. 3.3: А) Вибрані мікроскопічні зображення клітинної лінії MDA-MB-231 після інкубації з речовинами протягом 24 годин та фарбування Hoechst 33342 (синій) та флуоресцентно-міченими антитілами, специфічними до CALR (червоний). Масштаб — 20 мкм. Б) Гістограма, що відображає кратне збільшення площі регіонів скупчення CALR відносно негативного контролю (0,5% ДМСО, пунктирна лінія) після інкубації зі сполуками. Дані візуалізовано як SEM ± SD (n=2).

Табл. 3.1. Відношення рівнів експресії CALR на клітинній мембрані лінії HeLa після обробки «закритою» та «відкритою» формами LMB002 та LMB033 в однакових концентраціях

<i>Концентрація, мкМ</i>	<b>LMB002</b>	<b>LMB033</b>
8	0,85	0,97
16	0,95	1,76

Для клітин гепатоцелюлярної карциноми HepG2 різке збільшення CALR спостерігається для «відкритої» форми LMB002 та LMB033 і GS у концентрації 32 мкМ (Рис. 3.2Б). При відносній оцінці впливу «відкритої» та «закритої» форм сполук в однакових концентраціях видно, що при 32 мкМ фотоперемикання збільшує кількість CALR на поверхні клітинної мембрани у 3,78 та 4,86 для LMB002 та LMB033 відповідно, що свідчить про високий вплив фотоконтролю в сприянні вивільнення цього DAMP (Табл. 3.2). Додаткова статистична обробка даних продемонструвала їхню статистичну значимість (Додаток Г).

Табл. 3.2. Відношення рівнів експресії CALR на клітинній мембрані лінії HepG2 після обробки «закритою» та «відкритою» формами LMB002 та LMB033 в однакових концентраціях

<i>Концентрація, мкМ</i>	<b>LMB002</b>	<b>LMB033</b>
8	0,93	0,64
16	1,06	0,79
32	3,78	4,86

В експерименті з клітинною лінією MDA-MB-231 невелике збільшення рівня експресії CALR відносно негативного контролю помітно на усіх протестованих концентраціях сполук (Рис. 3.3Б). Однак значне ( $\geq 2$ ) зростання CALR відбулось при обробці 32 мкМ «відкритої» форми LMB002 та LMB033, а також 8 та 16 мкМ GS (Додаток Д). Порівнюючи «відкрити» та

«закритою» форми обох LMB (Табл. 3.3), можна відслідкувати збільшення екто-CALR більше, ніж вдвічі, при фотоперемиканні 32 мкМ «закритої» форми у «відкритою» LMB033.

Табл. 3.3. Відношення рівнів експресії CALR на клітинній мембрані лінії MDA-MB-231 після обробки «закритою» та «відкритою» формами LMB002 та LMB033 в однакових концентраціях

Концентрація, мкМ	LMB002	LMB033
8	1,02	1,12
16	1,15	1,28
32	1,66	2,38

Зростання рівня експресії CALR більше, ніж вдвічі, відносно контролю було достатньо для імуностимуляторної дії фотодинамічної терапії [21]. Відповідно, отримані дані про активність «закритої» та «відкритої» форм LMB002 і LMB033, а також GS на клітинних ліній HepG2 та MDA-MB-231, свідчать про те, що викликану клітинну смерть можна вважати імуногенною *in vitro* за рівнем експресії CALR. У випадку лінії HeLa зростання рівня CALR на клітинній мембрані під дією сполук не було значимим.

### 3.2. Визначення рівня HMGB1 в клітинному супернатанті

У ході експерименти з детекції HMGB1 в клітинному супернатанті отримані зразки були розподілені на чотири окремі плати по вісім зразків, яким відповідали внутрішні контролю навантажування зразків з антитілами, специфічними до  $\beta$ -актину. Усі концентрації сполук були протестовані у двох повторях на окремих платах. Для «закритої» та «відкритої» форми LMB002 було отримано два гелі (Рис. 3.4, 3.5).

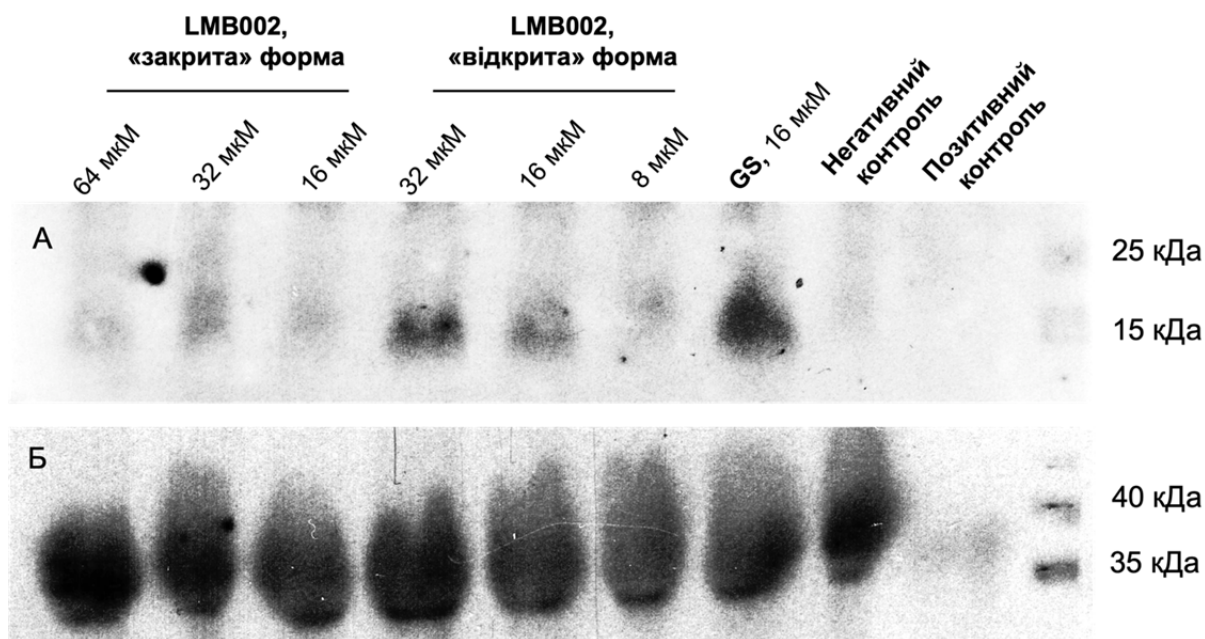


Рис. 3.4: Вестерн-блот зразків, що були отримані з супернатанту клітинної лінії Nerg2 після інкубації з експериментальними сполуками 24 години. А) Гель зі специфічними до HMGB1 антитілами; Б) Гель з антитілами до  $\beta$ -актину. Справа вказані молекулярні маси сигналів від контролів.

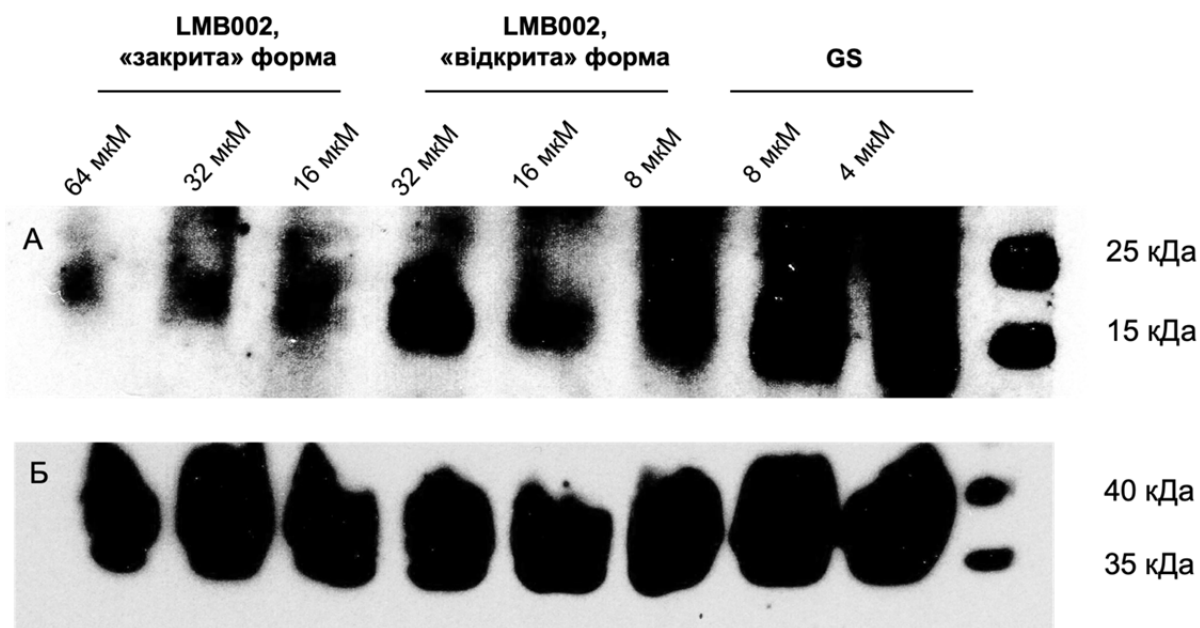


Рис. 3.5: Вестерн-блот зразків, що були отримані з супернатанту клітинної лінії Nerg2 після інкубації з експериментальними сполуками 24 години. А) Гель зі специфічними до HMGB1 антитілами; Б) Гель з антитілами до  $\beta$ -актину. Справа вказані молекулярні маси сигналів від контролів.

На гелі, зображеному на *рис. 3.4* можемо бачити сигнали від експериментальних зразків та контролю з антитілами до  $\beta$ -актину, тоді як на *рис. 3.5* спостерігаємо перенасичення сигналу. Відповідно, до уваги було взято лише гелі на *рис. 3.4*. Сигнал від HMGB1 спостерігається в регіоні між 15 та 25 кДа. Вихід протеїну у супернатант відбувається при інкубації клітин з 32 та 16 мкМ «відкритої» форми LMB002, а також 16 мкМ GS, що ще раз підкреслює подібність дії цих двох сполук. «Закрита» форма LMB002 не викликала вихід HMGB1, так само, як і негативний контроль.

Аналогічно було отримано два гелі для зразків після інкубації клітин із «закритою» та «відкритою» формою LMB033 (*Рис. 3.6, 3.7*). Хороший сигнал спостерігається для обох гелів, проте у випадку гелю на *рис. 3.7* контроль рівномірності навантажування білків не пройшов. Відповідно, до уваги було взято дані з гелю на *рис. 3.6*.

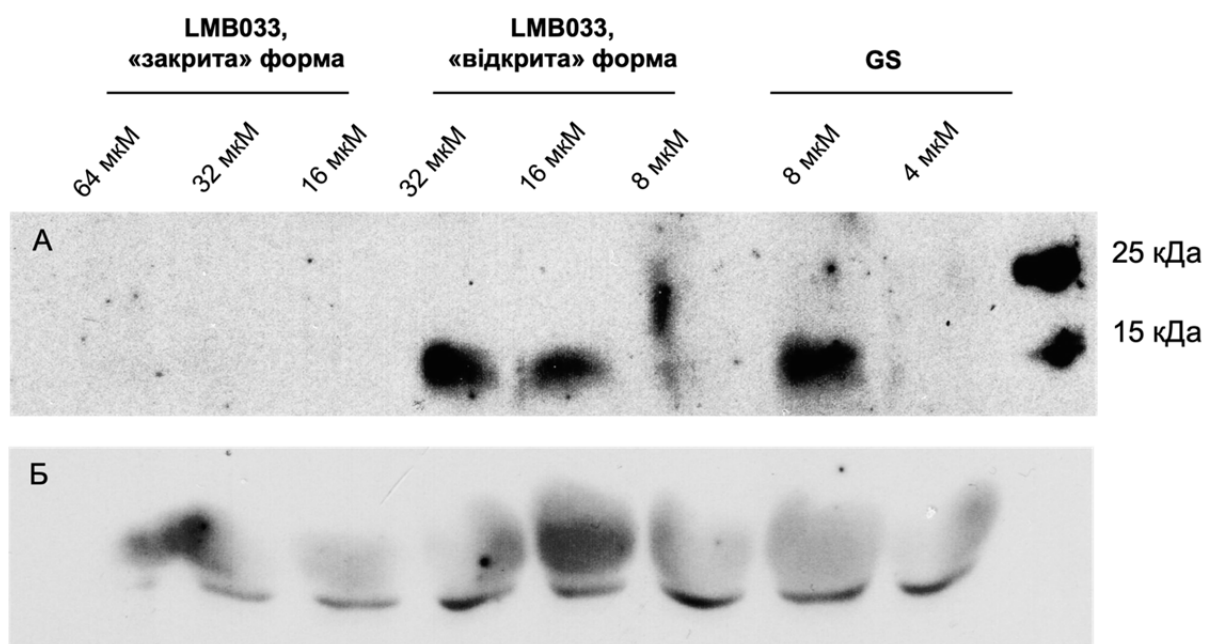


Рис. 3.6: Вестерн-блот зразків, що були отримані з супернатанту клітинної лінії НерG2 після інкубації з експериментальними сполуками 24 години.

А) Гелі зі специфічними до HMGB1 антитілами; Б) Гелі з антитілами до  $\beta$ -актину. Справа вказані молекулярні маси сигналів від контролів.

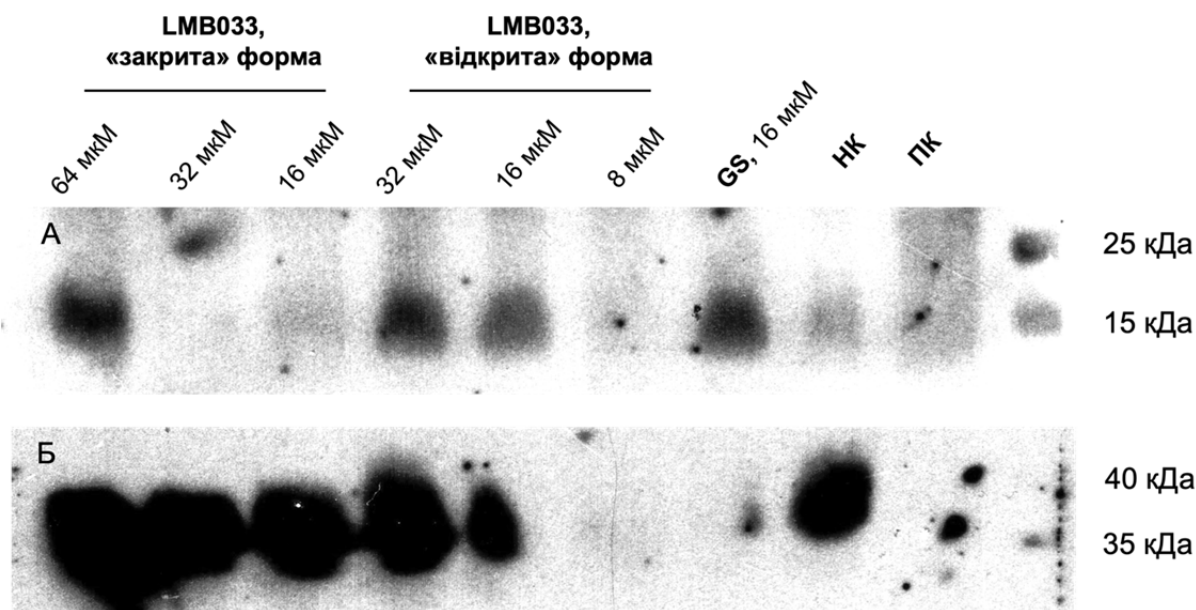


Рис. 3.7: Вестерн-блот зразків, що були отримані з супернатанту клітинної лінії НерG2 після інкубації з експериментальними сполуками 24 години. А) Гель зі специфічними до HMGB1 антитілами; Б) Гель з антитілами до  $\beta$ -актину. Справа вказані молекулярні маси сигналів від контролів.

Аналізуючи отримані зразки, можна помітити, що HMGB1 виходив з ядра клітин у позаклітинний простір при обробці культури 32 та 16 мкМ «відкритої» форми LMB033, а також 8 мкМ GS. «Закрита» форма LMB033 та нижчі концентрації «відкритої» форми та GS не сприяли появі білка у супернатанті.

Беручи до уваги дані, отримані для обох фотоформ LMB002 та LMB033, можемо зробити висновок, що експресія HMGB1 в позаклітинний простір відбувається лише під дією «відкритої» форми пептиду в концентраціях 16 та 32 мкМ. «Закрита» форма пептидів не провокує експресії HMGB1 у відповідних та вищих концентраціях.

## ВИСНОВКИ

1. Вперше було продемонстровано, що природній антимікробний пептид граміцидин S разом з фоточутливими DAE-модифікованими аналогами LMB002 та LMB033 є індукторами імуногенної клітинної смерті *in vitro*.
2. Було показано, що фотоперемикання LMB002 та LMB033 із «закритої» форми у «відкрити» сприяє підвищенню рівня секреції маркерів імуногенної клітинної смерті кальретикуліну та HMGB1. Імуногенна активність «відкритої» форми обох сполук близька до активності батьківської молекули граміцидину S у відповідних концентраціях.
3. Дія фоточутливих пептидів LMB002 та LMB033 і GS на ракові клітинні лінії різного походження та природи не є однаковою, що свідчить про певний рівень специфічності активності сполук.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, *WORLD CANCER REPORT: cancer research for cancer development*. Place of publication not identified: IARC, 2020.
- [2] I. F. Tannock, ‘Conventional cancer therapy: promise broken or promise delayed?’, *The Lancet*, vol. 351, pp. SII9–SII16, May 1998, doi: 10.1016/S0140-6736(98)90327-0.
- [3] T. N. Schumacher and R. D. Schreiber, ‘Neoantigens in cancer immunotherapy’, *Science*, vol. 348, no. 6230, pp. 69–74, Apr. 2015, doi: 10.1126/science.aaa4971.
- [4] D. T. Debela *et al.*, ‘New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives’, *SAGE Open Medicine*, vol. 9, p. 205031212110343, Jan. 2021, doi: 10.1177/20503121211034366.

- [5] D. S. Vinay *et al.*, ‘Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies’, *Seminars in Cancer Biology*, vol. 35, pp. S185–S198, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
- [6] L. Galluzzi, L. Senovilla, L. Zitvogel, and G. Kroemer, ‘The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs’, *Nat Rev Drug Discov*, vol. 11, no. 3, pp. 215–233, Mar. 2012, doi: 10.1038/nrd3626.
- [7] O. Kepp *et al.*, ‘Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death’, *OncoImmunology*, vol. 3, no. 9, p. e955691, Sep. 2014, doi: 10.4161/21624011.2014.955691.
- [8] I. Martins *et al.*, ‘Chemotherapy induces ATP release from tumor cells’, *Cell Cycle*, vol. 8, no. 22, pp. 3723–3728, Nov. 2009, doi: 10.4161/cc.8.22.10026.
- [9] O. Babii *et al.*, ‘Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy’, *Angew Chem Int Ed*, vol. 55, no. 18, pp. 5493–5496, Apr. 2016, doi: 10.1002/anie.201600506.
- [10] K. Horbatok *et al.*, ‘In Vitro and In Vivo Evaluation of Photocontrolled Biologically Active Compounds - Potential Drug Candidates for Cancer Photopharmacology’, *JoVE*, no. 199, p. 64902, Sep. 2023, doi: 10.3791/64902.
- [11] L. Zitvogel, O. Kepp, and G. Kroemer, ‘Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens’, *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 8, no. 3, pp. 151–160, Mar. 2011, doi: 10.1038/nrclinonc.2010.223.
- [12] N. Casares *et al.*, ‘Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death’, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, no. 12, pp. 1691–1701, Dec. 2005, doi: 10.1084/jem.20050915.
- [13] D. R. Green, T. Ferguson, L. Zitvogel, and G. Kroemer, ‘Immunogenic and tolerogenic cell death’, *Nat Rev Immunol*, vol. 9, no. 5, pp. 353–363, May 2009, doi: 10.1038/nri2545.
- [14] L. Galluzzi *et al.*, ‘Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death’, *J Immunother Cancer*, vol. 8, no. 1, p. e000337, Mar. 2020, doi: 10.1136/jitc-2019-000337.

- [15] P. G. Coulie, B. J. Van Den Eynde, P. Van Der Bruggen, and T. Boon, ‘Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy’, *Nat Rev Cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 135–146, Feb. 2014, doi: 10.1038/nrc3670.
- [16] C. Hernandez, P. Huebener, and R. F. Schwabe, ‘Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword’, *Oncogene*, vol. 35, no. 46, pp. 5931–5941, Nov. 2016, doi: 10.1038/onc.2016.104.
- [17] M. Michalak, E. F. Corbett, N. Mesaeli, K. Nakamura, and M. Opas, ‘Calreticulin: one protein, one gene, many functions.’, *Biochem J*, vol. 344, no. Pt 2, pp. 281–292, Dec. 1999.
- [18] M. Raghavan, S. J. Wijeyesakere, L. R. Peters, and N. Del Cid, ‘Calreticulin in the immune system: ins and outs’, *Trends in Immunology*, vol. 34, no. 1, pp. 13–21, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.it.2012.08.002.
- [19] J. Fucikova, R. Spisek, G. Kroemer, and L. Galluzzi, ‘Calreticulin and cancer’, *Cell Res*, vol. 31, no. 1, pp. 5–16, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41422-020-0383-9.
- [20] M. P. Chao *et al.*, ‘Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47’, *Sci. Transl. Med.*, vol. 2, no. 63, Dec. 2010, doi: 10.1126/scitranslmed.3001375.
- [21] A. D. Garg *et al.*, ‘A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death: CRT, ATP, and immunogenic cancer cell death’, *The EMBO Journal*, vol. 31, no. 5, pp. 1062–1079, Mar. 2012, doi: 10.1038/emboj.2011.497.
- [22] M. Obeid *et al.*, ‘Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death’, *Nat Med*, vol. 13, no. 1, pp. 54–61, Jan. 2007, doi: 10.1038/nm1523.
- [23] P. Mandke and K. M. Vasquez, ‘Interactions of high mobility group box protein 1 (HMGB1) with nucleic acids: Implications in DNA repair and immune responses’, *DNA Repair*, vol. 83, p. 102701, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102701.

- [24] M. E. Bianchi, ‘DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger’, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2007, doi: 10.1189/jlb.0306164.
- [25] Z.-B. Huang *et al.*, ‘HMGB1 release by human liver L02 and HepG2 cells induced by lipopolysaccharide’, *Molecular Medicine Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 103–112, Jul. 2013, doi: 10.3892/mmr.2013.1482.
- [26] S. Yuan, Z. Liu, Z. Xu, J. Liu, and J. Zhang, ‘High mobility group box 1 (HMGB1): a pivotal regulator of hematopoietic malignancies’, *J Hematol Oncol*, vol. 13, no. 1, p. 91, Dec. 2020, doi: 10.1186/s13045-020-00920-3.
- [27] E. Venereau *et al.*, ‘Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release’, *J Exp Med*, vol. 209, no. 9, pp. 1519–1528, Aug. 2012, doi: 10.1084/jem.20120189.
- [28] S. A. Richard *et al.*, ‘Post-translational modifications of high mobility group box 1 and cancer’, *Am J Transl Res*, vol. 9, no. 12, pp. 5181–5196, 2017.
- [29] U. Andersson, H. Yang, and H. Harris, ‘Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases’, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 22, no. 3, pp. 263–277, Mar. 2018, doi: 10.1080/14728222.2018.1439924.
- [30] R. L. Chavez-Dominguez *et al.*, ‘Role of HMGB1 in Cisplatin-Persistent Lung Adenocarcinoma Cell Lines’, *Front. Oncol.*, vol. 11, p. 750677, Dec. 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.750677.
- [31] H. Guan *et al.*, ‘The Comprehensive Role of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein in Different Tumors: A Pan-Cancer Analysis’, *JIR*, vol. Volume 16, pp. 617–637, Feb. 2023, doi: 10.2147/JIR.S386898.
- [32] D. Tang *et al.*, ‘Endogenous HMGB1 regulates autophagy’, *Journal of Cell Biology*, vol. 190, no. 5, pp. 881–892, Sep. 2010, doi: 10.1083/jcb.200911078.
- [33] X. D. (Eric) Dong *et al.*, ‘High Mobility Group Box I (HMGB1) Release From Tumor Cells After Treatment: Implications for Development of Targeted Chemoimmunotherapy’, *Journal of Immunotherapy*, vol. 30, no. 6, pp. 596–606, Sep. 2007, doi: 10.1097/CJI.0b013e31804efc76.

- [34] J. Nestvold *et al.*, ‘Oncolytic peptide LTX-315 induces an immune-mediated abscopal effect in a rat sarcoma model’, *OncoImmunology*, vol. 6, no. 8, p. e1338236, Aug. 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1338236.
- [35] G. Gabernet, A. T. Müller, J. A. Hiss, and G. Schneider, ‘Membranolytic anticancer peptides’, *Med. Chem. Commun.*, vol. 7, no. 12, pp. 2232–2245, 2016, doi: 10.1039/C6MD00376A.
- [36] H. Locy, S. De Mey, W. De Mey, M. De Ridder, K. Thielemans, and S. K. Maenhout, ‘Immunomodulation of the Tumor Microenvironment: Turn Foe Into Friend’, *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2909, Dec. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02909.
- [37] ‘LTX-315 in Patients With Transdermally Accessible Tumours as Monotherapy or Combination With Ipilimumab or Pembrolizumab | ClinicalTrials.gov’. Accessed: Apr. 28, 2024. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01986426>
- [38] E. Pasquereau-Kotula, J. Habault, G. Kroemer, and J.-L. Poyet, ‘The anticancer peptide RT53 induces immunogenic cell death’, *PLoS ONE*, vol. 13, no. 8, p. e0201220, Aug. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0201220.
- [39] N. Furukawa *et al.*, ‘Chemokine-derived oncolytic peptide induces immunogenic cancer cell death and significantly suppresses tumor growth’, *Cell Death Discov.*, vol. 10, no. 1, p. 161, Apr. 2024, doi: 10.1038/s41420-024-01932-5.
- [40] K. Okamoto, Y. Tomita, H. Yonezawa, T. Hirohata, R. Ogura, and N. Izumiya, ‘Inhibitory Effect of Gramicidin S on the Growth of Murine Tumor Cells in vitro and in vivo’, *Oncology*, vol. 41, no. 1, pp. 43–48, 1984, doi: 10.1159/000225789.
- [41] O. Babii *et al.*, ‘Structure–Activity Relationships of Photoswitchable Diarylethene-Based  $\beta$ -Hairpin Peptides as Membranolytic Antimicrobial and Anticancer Agents’, *J. Med. Chem.*, vol. 61, no. 23, pp. 10793–10813, Dec. 2018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01428.

- [42] O. Babii *et al.*, ‘Peptide drugs for photopharmacology: how much of a safety advantage can be gained by photocontrol?’, *Future Drug Discovery*, vol. 2, no. 1, p. FDD28, Jan. 2020, doi: 10.4155/fdd-2019-0033.
- [43] I. V. Komarov *et al.*, ‘Towards in vivo photomediated delivery of anticancer peptides: Insights from pharmacokinetic and -dynamic data’, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 233, p. 112479, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112479.
- [44] A. Marabelle, H. Kohrt, C. Caux, and R. Levy, ‘Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy’, *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 7, pp. 1747–1756, Apr. 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2116.
- [45] S. Anguille, E. L. Smits, E. Lion, V. F. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman, ‘Clinical use of dendritic cells for cancer therapy’, *The Lancet Oncology*, vol. 15, no. 7, pp. e257–e267, Jun. 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70585-0.
- [46] P. A. Ott, F. S. Hodi, H. L. Kaufman, J. M. Wigginton, and J. D. Wolchok, ‘Combination immunotherapy: a road map’, *J. immunotherapy cancer*, vol. 5, no. 1, p. 16, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40425-017-0218-5.

#### 4. ДОДАТКИ

##### **Додаток А. Визначення оптимальної густини посадки клітинної лінії HeLa**

Для визначення оптимальної густини посадки на 96-лункову плату було обрано п'ять значень кількості клітин на лунку: 2500, 5000, 10000, 20000 та 30000 клітин на лунку. Для моделювання додавання речовин було використано 0,1% ДМСО. У ході дослідження було використано чотири флуоресцентні барвники: Hoechst 33342 (InVitrogen™, #H3570) для мічення ядер клітин, EthD-1 (InVitrogen™, #E1169) для зафарбовування мертвих клітин та кальцеїн-АМ (InVitrogen™, #C1430) для зафарбовування метаболічно-активних клітин.

Обрану кількість клітин садили у лунку у 200 мкл середовища DMEM complete (10% FBS, 1% глутаміну та 1% P/S). За 24 години середовище відбирали, додавали 100 мкл свіжого середовища та 100 мкл 0,2% розчину DMSO у середовищі та інкубували ніч. Наступного дня проводили фарбування клітин: до кожної лунки додавали 50 мкл розчину барвників (2,5 мкМ кальцеїну-AM, 25 мкМ Hoechst 33342, 15 мкМ EthD-1, 10% FBS) у PBS, інкубували протягом 20 хвилин при 37°C та отримували зображення (Рис. 4.1).

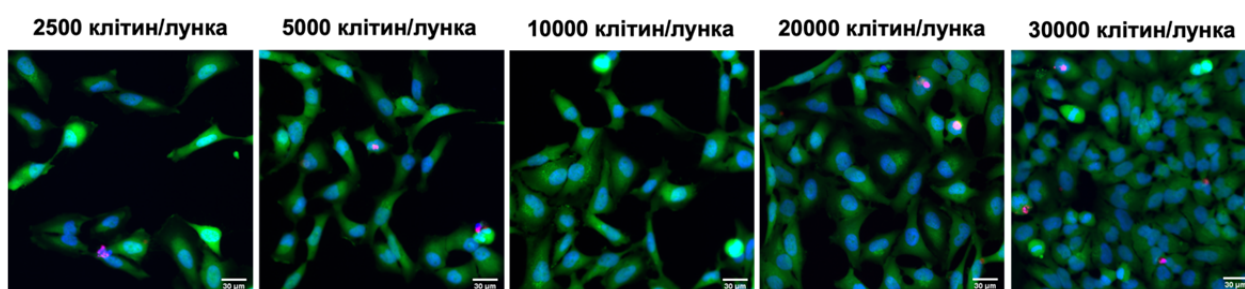


Рис. 4.1. Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HeLa. Клітини були пофарбовані барвниками кальцеїном-AM (зелений), EthD-1 (червоний), Hoechst33342 (синій). Масштаб — 30 мкм.

При густині посадки 20000 клітин/лунка була отримана конфлюентність 70-80%, що є необхідним для постановки експериментів з тестовими сполуками.

#### **Додаток Б. Визначення оптимальної густини посадки клітинної лінії НерG2**

Для визначення оптимальної густини посадки на 96-лункову плату було обрано три значення кількості клітин на лунку: 20000, 30000 та 40000 клітин на лунку. Для моделювання додавання речовин було використано 0,1% ДМСО. У ході дослідження було використано чотири флуоресцентні барвники: Hoechst 33342 (Invitrogen™, #H3570) для мічення ядер клітин, PI (Invitrogen™, #P1304MP) для зафарбовування мертвих клітин та кальцеїн-

AM (Invitrogen™, #C1430) для зафарбовування метаболічно-активних клітин.

Обрану кількість клітин садили у лунку у 200 мкл середовища DMEM complete (10% FBS, 1% глутаміну та 1% P/S). За 24 години середовище відбирали, додавали 100 мкл свіжого середовища та 100 мкл 0,2% розчину DMSO у середовищі та інкубували ніч. Наступного дня проводили фарбування клітин: до кожної лунки додавали 50 мкл розчину барвників (2,5 мкМ кальцеїну-AM, 25 мкМ Hoechst 33342, 15 мкМ EthD-1, 10% FBS) у PBS, інкубували протягом 20 хвилин при 37°C та отримували зображення (Рис. 4.2).

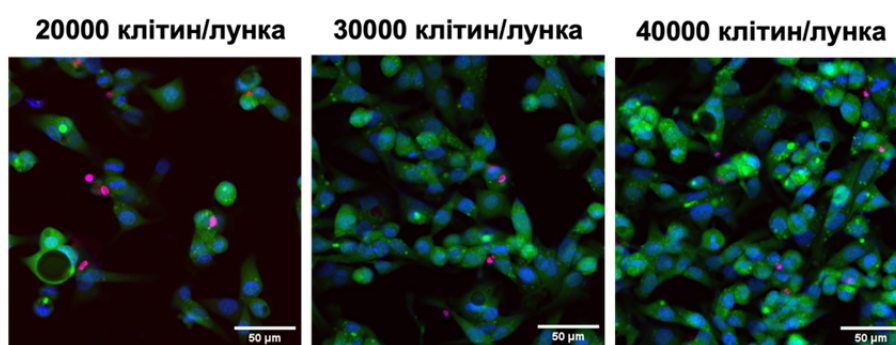


Рис. 4.2. Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин HepG2. Клітини були пофарбовані барвниками кальцеїном-AM (зелений), PI (червоний), Hoechst33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

При густині посадки 30000 клітин/лунка була отримана конфлюентність 70-80%, що є необхідним для постановки експериментів з тестовими сполуками.

#### **Додаток В. Визначення оптимальної густини посадки клітинної лінії MDA-MB-231**

Для визначення оптимальної густини посадки на 96-лункову плату було обрано три значення кількості клітин на лунку: 10000, 15000 та 20000 клітин на лунку. Для моделювання додавання речовин було використано 0,1% ДМСО. У ході дослідження було використано чотири флуоресцентні

барвники: Hoechst 33342 (Invitrogen™, #H3570) для мічення ядер клітин, PI (Invitrogen™, #P1304MP) для зафарбовування мертвих клітин та кальцеїн-АМ (Invitrogen™, #C1430) для зафарбовування метаболічно-активних клітин.

Обрану кількість клітин садили у лунку у 200 мкл середовища DMEM complete (10% FBS, 1% глутаміну та 1% P/S). За 24 години середовище відбирали, додавали 100 мкл свіжого середовища та 100 мкл 0,2% розчину DMSO у середовищі та інкубували 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 отримували зображення (Рис. 4.3).

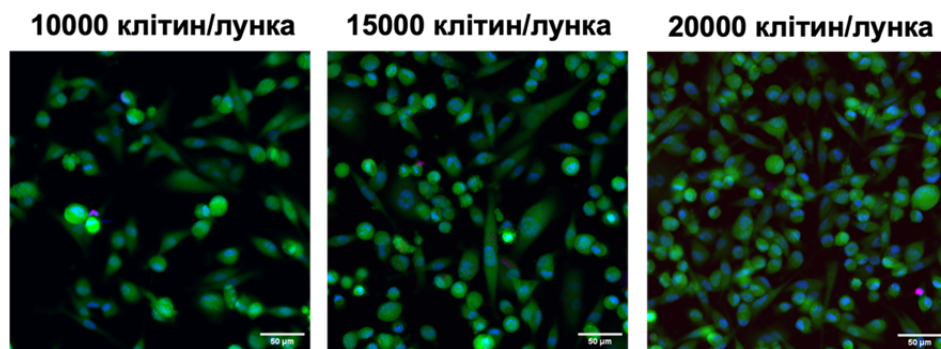


Рис. 4.3. Зображення, отримані за допомогою флуоресцентного конфокального мікроскопа, для клітин MDA-MB-231. Клітини були пофарбовані барвниками кальцеїном-АМ (зелений), PI (червоний), Hoechst33342 (синій). Масштаб — 50 мкм.

При густині посадки 20000 клітин/лунка була отримана конфлюентність 70-80%, що є необхідним для постановки експериментів з тестовими сполуками.

#### **Додаток Г. Статистична обробка даних експресії CALR на поверхні клітин лінії HeLa**

У ході статистичного аналізу було розраховано три параметри: середнє арифметичне значення площі регіонів скупчення CALR, середнє квадратичне

відхилення середнього арифметичного та р-значення (Табл. 4.1). Статистично значимими вважаються дані з  $p \leq 0,05$ .

Табл. 4.1 Статистичні значення, отримані для клітин HeLa, в ході експерименту з оцінки експресії CALR

	LMB002, «закрита»			LMB002, «відкрита»			GS		
	форма			форма					
<i>Конц., мкМ</i>	8	16	32	4	8	16	4	8	16
Середнє	12,85	14,23	14,36	10,41	10,87	13,57	5,43	18,77	31,74
СКВСА	3,56	0,98	3,01	0,11	1,43	5,51	2,69	1,47	3,36
р-значення	0,85	0,58	0,75	0,18	0,20	0,98	0,10	0,06	0,05
	LMB033, «закрита»			LMB033, «відкрита»			0,5% ДМСО		
	форма			форма			(НК)		
<i>Конц., мкМ</i>	8	16	32	4	8	16	-		
Середнє	10,92	10,21	12,50	10,31	10,55	17,97	13,46		
СКВСА	0,12	0,96	0,01	0,73	0,48	0,98	1,27		
р-значення	0,21	0,11	0,47	0,12	0,16	0,07	-		

### Додаток Г. Статистична обробка даних експресії CALR на поверхні клітин лінії HepG2

У ході статистичного аналізу було розраховано три параметри: середнє арифметичне значення площі регіонів скупчення CALR, середнє квадратичне

відхилення середнього арифметичного та р-значення (Табл. 4.2). Статистично значимими вважаються дані з  $p \leq 0,05$ .

Табл. 4.2 Статистичні значення, отримані для клітин HerG2, в ході експерименту з оцінки експресії CALR

	LMB002, «закрита»				LMB002, «відкрита»				GS			
	форма				форма							
<i>Конц., мкМ</i>	8	16	32	64	4	8	16	32	4	8	16	32
Середнє	4,56	4,92	7,19	6,86	5,70	4,23	5,18	27,1	5,24	7,08	3,63	43,8
СКВСА	0,24	0,49	0,12	1,33	-*	2,12	0,51	7,70	1,47	0,33	0,38	3,64
р-значення	0,36	0,44	0,47	0,63	-	0,42	0,52	0,15	0,62	0,50	0,23	0,02
	LMB033, «закрита»				LMB033, «відкрита»				0,5% ДМСО (НК)			
	форма				форма							
<i>Конц., мкМ</i>	8	16	32	64	4	8	16	32	-			
Середнє	4,0	5,47	5,33	8,55	5,46	2,59	4,33	25,9	6,09			
СКВСА	0,23	1,17	0,32	0,50	0,82	0,73	0,82	0,62	1,42			
р-значення	0,28	0,68	0,58	0,22	0,65	0,13	0,30	0,01	-			

\*точка була проаналізована в одному повторі (n=1).

#### Додаток Д. Статистична обробка даних експресії CALR на поверхні клітин лінії MDA-MB-231

У ході статистичного аналізу було розраховано три параметри: середнє арифметичне значення площі регіонів скупчення CALR, середнє квадратичне

відхилення середнього арифметичного та р-значення (Табл. 4.3). Статистично значимими вважаються дані з  $p \leq 0,05$ .

Табл. 4.3 Статистичні значення, отримані для клітин MDA-MB-231, в ході експерименту з оцінки експресії CALR

	<b>LMB002, «закрита»</b>				<b>LMB002, «відкрита»</b>				<b>GS</b>			
	<b>форма</b>				<b>форма</b>							
<i>Конц., мкМ</i>	8	16	32	64	4	8	16	32	4	8	16	32
Середнє	9,66	10,7	12,1	13,2	10,6	9,90	12,3	20,1	14,0	17,9	24,5	9,69
СКВСА	1,43	0,98	1,96	5,90	1,54	0,56	4,11	0,08	0,13	1,20	5,49	1,84
р- значення	0,28	0,12	0,13	0,41	0,18	0,20	0,34	0,04	0,09	0,01	0,11	0,34
	<b>LMB033, «закрита»</b>				<b>LMB033, «відкрита»</b>				<b>0,5% ДМСО (НК)</b>			
	<b>форма</b>				<b>форма</b>							
<i>Конц., мкМ</i>	8	16	32	64	4	8	16	32	-			
Середнє	8,57	10,1	11,2	13,8	11,1	9,62	12,9	26,7	7,65			
СКВСА	1,36	0,43	2,89	0,98	0,68	1,22	0,28	9,27	1,27			
р- значення	0,55	0,20	0,30	0,04	0,11	0,25	0,10	0,21	-			