

Ю.В. Яніш¹,
С.П. Залєток¹,
О.К. Вороніна²,
І.О. Сумнікова¹,
В.О. Стащенко¹,
О.О. Кленов¹,
В.В. Бенітрад¹

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ключові слова: рак передміхурової залози, клітинні лінії LNCaP і DU-145, паргілін, спермін, ζ -потенціал, поверхневий заряд клітин, апоптоз.

ВПЛИВ ПАРГІЛІНУ, СПЕРМІНУ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЙ НА АНДРОГЕНЗАЛЕЖНІ ТА АНДРОГЕННЕЗАЛЕЖНІ КЛІТИНИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

Продовжено серію досліджень, спрямованих на підсилення цитотоксичної дії сперміну по відношенню до культивованих клітин передміхурової залози людини шляхом впливу на ферменти його обміну. **Мета:** дослідити вплив паргіліну (ПАР), сперміну (Спн) та їх комбінацій на виживаність, ζ -потенціал і сумарний поверхневий заряд та цитоморфологічні властивості клітин раку передміхурової залози (РПЗ) людини в культурі. **Об'єкт і методи:** в експерименті використані диференційовані андрогензалежні клітини лінії LNCaP та слабодиференційовані андрогеннезалежні клітини лінії DU-145. Виживаність клітин визначали в тесті з трипановим синім. Вплив досліджуваних сполук як окремо, так і в комплексі, на життєздатність і проліферативну активність клітин оцінювали колориметричним методом — шляхом забарвлення живих клітин розчином кристалічного фіолетового у метанолі. Біофізичні показники визначали методом клітинного мікроелектрофорезу. Цитоморфологічні характеристики досліджували на препаратах клітин, забарвлених гематоксиліном та еозином. **Результати:** в культурі клітин лінії LNCaP IC_{50} ПАР = 2,2 мМ; IC_{50} Спн = 1,5 мМ. В культурі клітин лінії DU-145 IC_{50} ПАР = 2,35 мМ; IC_{50} Спн = 5,0 мМ. За біофізичними показниками Спн викликав інверсію знаку поверхневого електричного заряду у клітин лінії LNCaP. ПАР не справляв такої дії, заряд залишався від'ємним, демонструючи зворотну залежність від концентрації сполуки. Поєднання ПАР і Спн викликало підсилення цитотоксичної дії Спн на клітини LNCaP, але не позначалося на величині їх ζ -потенціалу і поверхневій щільності заряду, позитивний знак якого, викликаний впливом Спн, зберігався. Водночас ПАР повністю нівелював викликану Спн інверсію знаку сумарного поверхневого заряду клітин DU-145, повертаючи його до області нормальних від'ємних значень. Цитоморфологічний аналіз показав, що при поєднаній дії ПАР та Спн загинув андрогензалежних клітин LNCaP і андрогеннезалежних DU-145 відбувалася кількісно неоднаково. У клітин лінії LNCaP цитотоксичний вплив Спн, ймовірно опосередкований дією утворених з останнього токсичних альдегідів, превалював над апоптозом. На клітини DU-145 при сполученій дії ПАР та Спн більшою мірою впливав саме ПАР, конкуруючи зі Спн і викликаючи запрограмовану загибель клітин. **Висновки:** диференційовані андрогензалежні клітини лінії LNCaP при поєднаному застосуванні ПАР і Спн продемонстрували підсилення цитотоксичного впливу останнього. Низькодиференційовані андрогеннезалежні клітини лінії DU-145 виявилися стійкішими до впливу як окремо ПАР, так і ПАР в комбінації зі Спн. ПАР відмінно викликану Спн інверсію знаку сумарного поверхневого заряду клітин DU-145. Цитоморфологічні зміни, що відбувалися під впливом як ПАР окремо, так і у його комбінації зі Спн, демонструють переважно апоптотичний шлях загибелі андрогеннезалежних клітин лінії DU-145, в той час як у андрогензалежних клітин лінії LNCaP у стані апоптозу перебувала менша їх частка.

За даними наукової літератури підвищення експресії та активності ізоферментів альдегід-дегідрогенази (Aldehyde dehydrogenase, ALDH)

при різних онкологічних захворюваннях сприяє рецидивуванню пухлин. Тому інгібітори ALDH можуть бути використані як засоби консерватив-

ної терапії раку [1]. Наприклад, ALDH7A1 сприяє метастазуванню клітин раку передміхурової залози (РПЗ) у кістки [2]. І хоча за хронологією вказаних робіт складається враження, що тема застосування інгібіторів ALDH в онкології могла втратити актуальність, вона переживає певний ренесанс [3].

Незворотний інгібітор моноаміноксидази паргілін (ПАР) до недавнього часу використовувався як гіпотензивний препарат, але згодом була виявлена його властивість конкурентно інгібувати ALDH внаслідок утворення комплексу у каталітичному домені ферменту. ПАР активується у мітосомах печінки за участі цитохрому P450 і викликає окиснення ALDH, кінцевими продуктами якого є реакційно активний токсичний пропіоловий альдегід і пропаргіламін [1]. Завдяки цьому ПАР спричиняє на організм дію, аналогічну дії іншого інгібітора ALDH, дисульфіраму, внаслідок якої також утворюється отруйний альдегід, а саме оцтовий. Це дає підстави вважати ПАР перспективним засобом цитотоксичного впливу на пухлинні клітини, зокрема, клітини РПЗ людини. Нещодавні дослідження продемонстрували, що ПАР негативно впливає на проліферацію, рухливість і епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМТ) андрогеннезалежних клітин РПЗ [4]. Після обробки ПАР (3,0 мМ) значно посилювався апоптоз та зупинявся клітинний цикл. В обговоренні автори надавали перевагу здатності ПАР інгібувати лізинспецифічну деметилазу (ЛСД1). Ці дані також свідчили про перспективність вивчення впливу ПАР та його комбінації зі сперміном (Спн) на клітини РПЗ, як це показано і в наших попередніх дослідженнях з інгібіторами ферментів катаболізму Спн — аміногуанідином і хлоргексидином [5–7].

Дія ПАР в якості протипухлинної сполуки оцінювалася різними дослідниками на клітинних моделях РПЗ. Вплив на виживаність клітин лінії LNCaP-LN3 свідчив, що ПАР може бути потенційним препаратом для лікування РПЗ. Він блокував клітинний цикл у фазі G1, пригнічував проліферацію клітин і, залежно від дози, сприяв процесу апоптозу, збільшуючи швидкість загибелі клітин [3, 4].

Відомо, що ПАР є інгібітором моноаміноксидази А (МАО-А), ферменту, який каталізує перетворення біогенних амінів у відповідні альдегіди шляхом окисного дезамінування. Сучасні роботи показали неочікувану роль МАО-А в пухлиноутворенні. МАО-А бере участь у проліферації та метастазуванні різних типів злоякісних клітин, включаючи РПЗ, колоректальний рак, гепатоцелюлярну карциному та рак легені. Ці типи клітин було використано при дослідженні впливу інгібіторів МАО (в тому числі і ПАР) на регуляторні механізми, які контролюють утворення, прогресу-

вання та метастазування пухлин. Показано, що МАО-А може бути терапевтичною мішенню при лікуванні раку, зокрема РПЗ [8–11].

В клітинах РПЗ лінії LNCaP ПАР опосередковував регуляцію експресії Е-кадгерину разом із зниженням регуляції N-кадгерину та експресію віментину, запобігаючи ЕМТ, міграції та інвазії клітин. ПАР знижував експресію маркера PSA та сповільнював перехід РПЗ з андрогензалежного в андрогеннезалежний стан. Це також свідчило, що ПАР може бути перспективним при терапії локального або метастатично поширеного РПЗ [4, 12].

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі використовували культури двох клітинних ліній РПЗ людини: андрогензалежних диференційованих клітин LNCaP та андрогеннезалежних низькодиференційованих клітин DU-145. Клітини культивували в живильному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном, з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки і 1% суміші антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин (всі реагенти Biowest, Франція) у культуральних флаконах (SPL, Корея) площею 25 або 75 см². Після 24 год. культивування в CO₂-інкубаторі за стандартних умов (5% CO₂, 37°C) клітини піддавали дії досліджуваних чинників, а ще через 24 год. знімали 0,25% розчином трипсину (Biowest, Франція), відмивали і ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері, після чого визначали їх виживаність, електрокінетичний потенціал (ζ), щільність (q) сумарного поверхневого заряду (СПЗ) та його знак при рН 7,4, як викладено у [5–7]. Виживаність визначали за тестом виключення барвника 0,08% трипанового синього (ТС) живими клітинами, з подальшим підрахунком забарвлених мертвих клітин у камері Горяєва. Для дослідження кінетики проліферації клітини (по 1×10^4 /лунку) вносили у плоскодонні лунки 96-лункового планшета. Через 24 год. живильне середовище замінювали і додавали у відповідні лунки ПАР у концентраціях від 5,0 до 0,34 мМ; Спн у концентраціях від 10,0 до 0,16 мМ (обидві сполуки Sigma-Aldrich, США) та їх комбінацію (максимальна концентрація ПАР 5 мМ, Спн 10 мМ з подальшим двократним розтитруванням). Клітини інкубували з тест-сполуками 24 год. за стандартних умов, після чого живі клітини фіксували і забарвлювали 0,5% розчином кристалічного фіолетового у 70% метанолі протягом 10 хв при кімнатній температурі. Елюювали барвник 96% етанолом. Кількість живих клітин визначали за допомогою приладу Lybsystems Multiskan Plus (Фінляндія), за величиною екстинкції при $\lambda = 544$ нм. Виміри проводили у чотирьох повторях кожної концентрації сполук або їх комбінації. Обрахунки значень IC₅₀ виконували із застосуванням нелі-

нійного регресійного аналізу за допомогою програми Quest Graph™ IC₅₀ Calculator, ААТ Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Морфофункціональні зміни в клітинах під дією ПАР, Спн та їх комбінації вивчали на фіксованих препаратах клітин, вирощених окремо на покривних скельцях і забарвлених гематоксиліном та еозинном [13]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента та пакета програм STATISTICA 6 [14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив ПАР, Спн та їх комбінації на проліферативну активність, виживаність і електрокінетичні властивості клітин РПЗ людини *in vitro*. Для клітин лінії LNCaP IC₅₀ ПАР складала 2,2 мМ; IC₅₀ Спн (як і в попередніх дослідженнях [5, 6]) дорівнювала 1,5 мМ. Для клітин DU-145 IC₅₀ ПАР становила 2,4 мМ; IC₅₀ Спн (як і в попередніх дослідженнях [7]) дорівнювала 5,0 мМ.

Комбінація ПАР і Спн справляла неоднаковий вплив на клітини РПЗ: при дії на андрогензалежні клітини лінії LNCaP IC₅₀ Спн значно знизилася і дорівнювала 0,6 мМ (на 64,0% менше, ніж IC₅₀ застосованого окремо Спн); IC₅₀ ПАР дорівню-

вала 0,9 мМ (на 57,3% менше, ніж IC₅₀ застосованого окремо ПАР).

Андрогеннезалежні клітини лінії DU-145 при комбінації обох сполук продемонстрували вищу чутливість до Спн (IC₅₀ = 3,2 мМ, на 36% менше від IC₅₀ застосованого окремо Спн), в той час як IC₅₀ ПАР виявилася дуже низькою та дорівнювала 0,47 мМ (на 80% менше, ніж IC₅₀ застосованого окремо ПАР).

З даних *табл. 1* і *2* видно, що вплив ПАР на електрокінетичні характеристики клітин обох ліній носить зворотній дозозалежний характер. Від’ємний електричний заряд інтактних клітин, за фізіологічних умов (рН 7,4) зумовлений переважним представництвом на їх поверхневій мембрані та у складі глікокаліксу поліаніонів у порівнянні з полікатионами, знижувався при зростанні концентрації ПАР, зберігаючи при цьому сумарні від’ємні значення. Більш радикальна картина спостерігалася при дії аліфатичного полікатиона Спн: при концентраціях 1,0 мМ і більше він знижував від’ємний заряд клітин такою мірою, що аніонно-катионний баланс клітинної поверхні змінювався на протилежний, знак СПЗ інвертував, а сам СПЗ набував позитивних значень (див. *табл. 1, 2*).

Таблиця 1

Вплив ПАР та Спн на виживаність, величину ζ-потенціалу, знак сумарного поверхневого заряду і його щільність (*q*) на поверхні клітин РПЗ лінії LNCaP

Чинники впливу	Вживаність за тестом з ТС, %	ζ, мВ	<i>q</i> , × 10 ⁻² Кл/м ² **
Контроль	95,8 ± 1,4	13,54 ± 0,61	-9,71 ± 0,44
ПАР: 1,0 мМ	94,9 ± 2,6	13,84 ± 1,21	-9,92 ± 0,87
2,0 мМ	84,7 ± 1,9*	11,37 ± 2,10*	-8,15 ± 1,50*
3,0 мМ	48,6 ± 2,5*	7,96 ± 0,48*	-5,71 ± 0,34*
Спн: 1,0 мМ	58,6 ± 1,4*	13,66 ± 0,55	+9,79 ± 0,39*
1,5 мМ	48,5 ± 1,5*	13,06 ± 0,65	+9,36 ± 0,46*
3,0 мМ	39,5 ± 2,5*	12,52 ± 0,55	+8,98 ± 0,27*
5,0 мМ	27,0 ± 1,9*	10,01 ± 0,50*	+7,18 ± 0,36*
ПАР 0,5 мМ + Спн 1,0 мМ	42,0 ± 2,5*	13,20 ± 0,85	+9,46 ± 0,36*

Примітка: * *p* ≤ 0,05 відносно контролю, ** Кулон/м².

Таблиця 2

Вплив ПАР та Спн на виживаність, величину ζ-потенціалу, знак сумарного поверхневого заряду і його щільність (*q*) на поверхні клітин РПЗ лінії DU-145

Чинники впливу	Вживаність за тестом з ТС, %	ζ, мВ	<i>q</i> , × 10 ⁻² Кл/м ² **
Контроль	97,0 ± 2,4	9,58 ± 0,58	-6,87 ± 0,42
ПАР: 1,0 мМ	94,0 ± 3,2	8,55 ± 0,48	-6,13 ± 0,34
2,0 мМ	58,0 ± 2,2*	7,86 ± 0,43*	-5,64 ± 0,30*
3,0 мМ	53,0 ± 2,9*	6,94 ± 0,36*	-4,98 ± 0,26*
Спн: 2,0 мМ	88,0 ± 3,5*	7,82 ± 0,33*	+5,61 ± 0,24*
3,0 мМ	82,0 ± 1,8*	8,10 ± 0,43*	+5,81 ± 0,31*
5,0 мМ	49,0 ± 1,9*	9,19 ± 0,46	+6,59 ± 0,33*
ПАР 3,0 мМ + Спн 2,0 мМ	54,0 ± 3,6*	5,68 ± 0,21*	-4,10 ± 0,15*

Примітка: * *p* ≤ 0,05 відносно контролю, ** Кулон/м².

Отже, на диференційовані клітини андрогензалежної лінії LNCaP вплив Спн, як і ПАР, мав зворотну залежність від концентрації (див. *табл. 1*). В той час, у клітин андрогеннезалежної лінії DU-145 при збільшенні концентрації Спн відбувалося подальше зростання величини позитивного СПЗ клітин (див. *табл. 2*). Можна було очікувати, що поєднаний вплив обох досліджуваних сполук спричинить у сумі появу ще більших позитивних значень СПЗ клітин лінії DU-145. Але спостерігалось протилежне: їх СПЗ знову набував від'ємних значень, хоча, як і у випадку з чистим ПАР (2,0 і 3,0 мМ), був достовірно меншим, ніж СПЗ клітин інтактного контролю (див. *табл. 2*). ПАР повністю нівелював викликану Спн інверсію знаку СПЗ клітин DU-145, повернувши його до області нормальних від'ємних значень (*табл. 2*). Пояснення може полягати в тому, що в даному випадку у присутності Спн вплив ПАР на СПЗ та ζ -потенціал реалізовувався через пришвидшене транспортування поліаніонів з цитоплазми на клітинну поверхню. Можливо, спостерігалася дія одного з механізмів захисту андрогеннезалежних клітин РПЗ від цитотоксичного впливу надлишку Спн. Якщо кінцевою ланкою цитотоксичної дії Спн та ПАР є саме отруйні альдегіди, зокрема пропіоловий, цей механізм захисту спрацьовує за рахунок швидкої евакуації і токсичних сполук, і поглиненого клітиною ПАР. Цілком припусти-

мо, що наявність у клітин андрогензалежної лінії LNCaP цитоплазматичних андрогенних рецепторів класу NR3C4 заважає роботі такого захисту, чого не спостерігається у клітин андрогеннезалежної лінії DU-145, позбавлених таких рецепторів. На користь цього припущення свідчать результати цитоморфологічного аналізу клітин РПЗ, представлені нижче.

Вплив паргіліну, сперміну та їх комбінована дія на цитоморфологічні характеристики клітин РПЗ людини *in vitro*. Клітини андрогензалежної лінії LNCaP у контролі мали типову полігональну форму, були приблизно однакового розміру. В клітинах відмічали відростки, які забезпечують міжклітинні контакти. Цитоплазма слабко-базофільна, з дрібною зернистістю. Ядра великі, світлі, еухроматичні, в ядрах по 2-3 ядерця чіткої структури. Це свідчило про синтетичну, проліферативну та міграційну активність клітин (*рис. 1*).

У клітин лінії LNCaP в присутності 2,0 мМ Спн спостерігалось уповільнення росту: щільність та кількість клітин на покривному склі були менші, ніж в контролі. Були присутні як типові видовжені клітини з відростками, так і округлі (*рис. 2*). Видовжені клітини — світлі, базофільні, з великими світлими ядрами та 2-3 ядерцями в них.

Округлі клітини втрачали свою типову форму, ставали темно-базофільними, мали патологічні зміни в цитоскелеті та ядрі. У таких клітин була

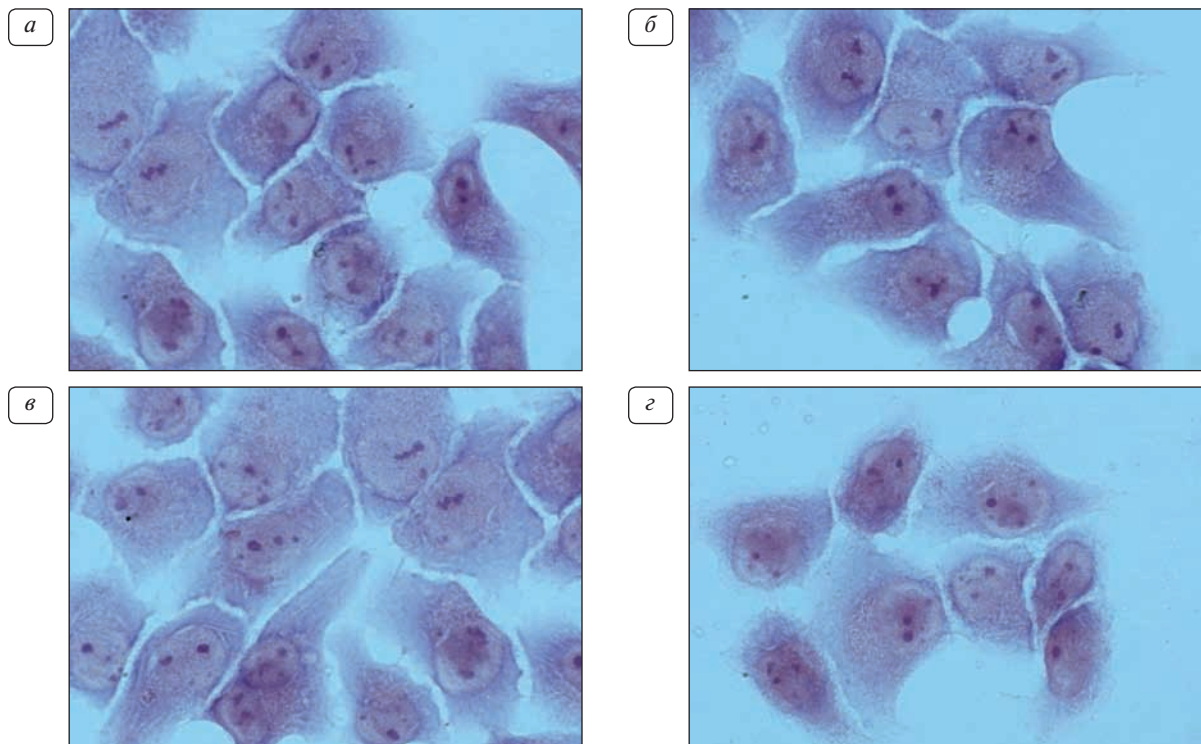


Рис. 1. Морфологія клітин лінії LNCaP у контролі. Забарвлення гематоксилином та еозином: *а* — клітини лінії LNCaP мають полігонально-відростчасту форму. Ядра клітин великі, світлі (зб. $\times 1000$); *б* — клітини полігональної, зірчастої форми (зб. $\times 1000$); *в* — в полі зору двоядерні клітини (зб. $\times 1000$); *г* — еухроматичні ядра займають майже весь об'єм цитоплазми (зб. $\times 1000$)

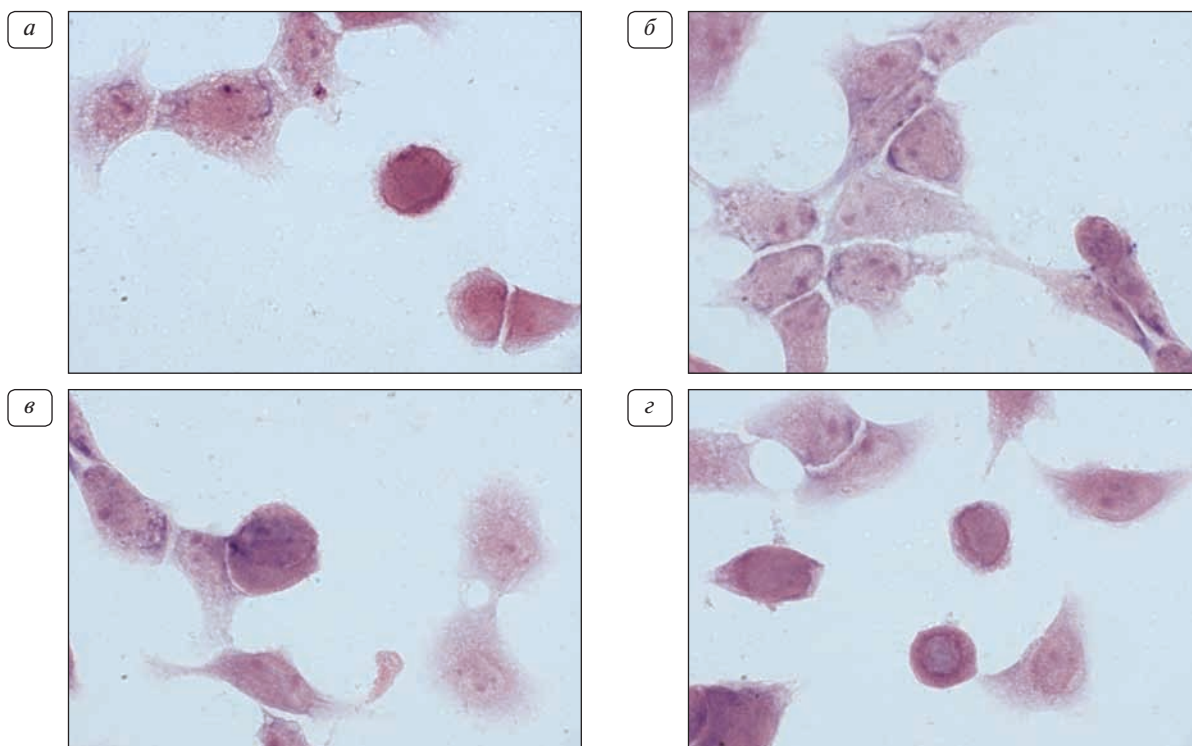


Рис. 2. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок інкубації зі Спн у концентрації 2,0 мМ. Забарвлення гематоксиліном та еозином: *а* — в полях зору присутні як типові видовжені клітини з відростками, так і округлі (зб. $\times 1000$); *б* — полігональні клітини зі світлими ядрами, помітні клітини без відростків (зб. $\times 1000$); *в* — клітини різної форми — веретеноподібні з відростками і округлі, без відростків (зб. $\times 1000$); *з* — поруч з округлими клітинами помітні клітини типової форми (зб. $\times 1000$)

втрачена міграційна, адгезивна, проліферативна активність, а натомість виявляли ознаки клітинної загибелі: втрата ядерець, зморщування ядра, інвагінації ядерної оболонки, починалося формування апоптотичних тілець (див. *рис. 2*).

Морфологічний стан клітин, інкубованих з 1,0 мМ ПАР, відповідав стану клітин у контролі: всі вони мали видовжену, веретеноподібну форму, у всіх були розвинені відростки, клітини контактували між собою, що свідчило про їх міграційний потенціал. Великі еухроматичні ядра займали майже весь об'єм цитоплазми, в ядрах знаходилися 1–3 чітких за контурами ядерця. Мітотичних фігур в клітинах помітно не було; втім, це могло також бути і наслідком утворення щільного клітинного моношару (*рис. 3*).

Зі збільшенням концентрації ПАР в культурі до 2,0 мМ серед типових клітин лінії LNCaP з'являються клітини з ознаками клітинної загибелі: темні, округлі, без відростків. Цитоплазма таких клітин різко базофільна, ядерна оболонка відсутня, хроматин та ядерця не помітні. Навіть в світлих клітинах спостерігалась вакуолізація цитоплазми, що може бути ранньою ознакою апоптозу [15]. Клітин в стані мітотичного поділу помічено не було. Отже, в клітинах лінії LNCaP під впливом 2,0 мМ ПАР спостерігалася знижена як синтетична, так і проліферативна активність; частина

клітин знаходилась на початкових етапах загибелі шляхом апоптозу (*рис. 4*).

Морфологічна картина клітинної лінії LNCaP при одночасному введенні ПАР (0,5 мМ) та Спн (1,0 мМ) відповідає такій при введенні кожної речовини окремо. Частина клітин зберігала нормальну типову будову: пірамідальну форму з відростками, з великими округлими ядрами. Частина ж клітин знаходилась на ранній стадії апоптозу, про що свідчили втрата форми, зниження адгезивних властивостей, руйнування ядерної оболонки і компактизація ядер (*рис. 5*).

Таким чином, у всіх експериментальних варіантах спостерігались приблизно однакові морфологічні зміни: частина клітин андрогензалежної лінії LNCaP переходила до ранніх стадій апоптозу (порушення форми клітини, конденсація ядер, поява апоптотичних тілець), відмінності між варіантами полягали лише в ступені прояву таких змін. Так, відмічався прямий дозозалежний ефект: зі збільшенням концентрації препаратів збільшувалась частка клітин в стані апоптозу та ступінь його розвитку. Слід зауважити, що при введенні Спн був помітний більш пригнічуючий ефект на проліферативні та міграційні властивості клітин, ніж при введенні ПАР.

Клітини андрогеннезалежної лінії DU-145 у контролі продемонстрували характерну для них

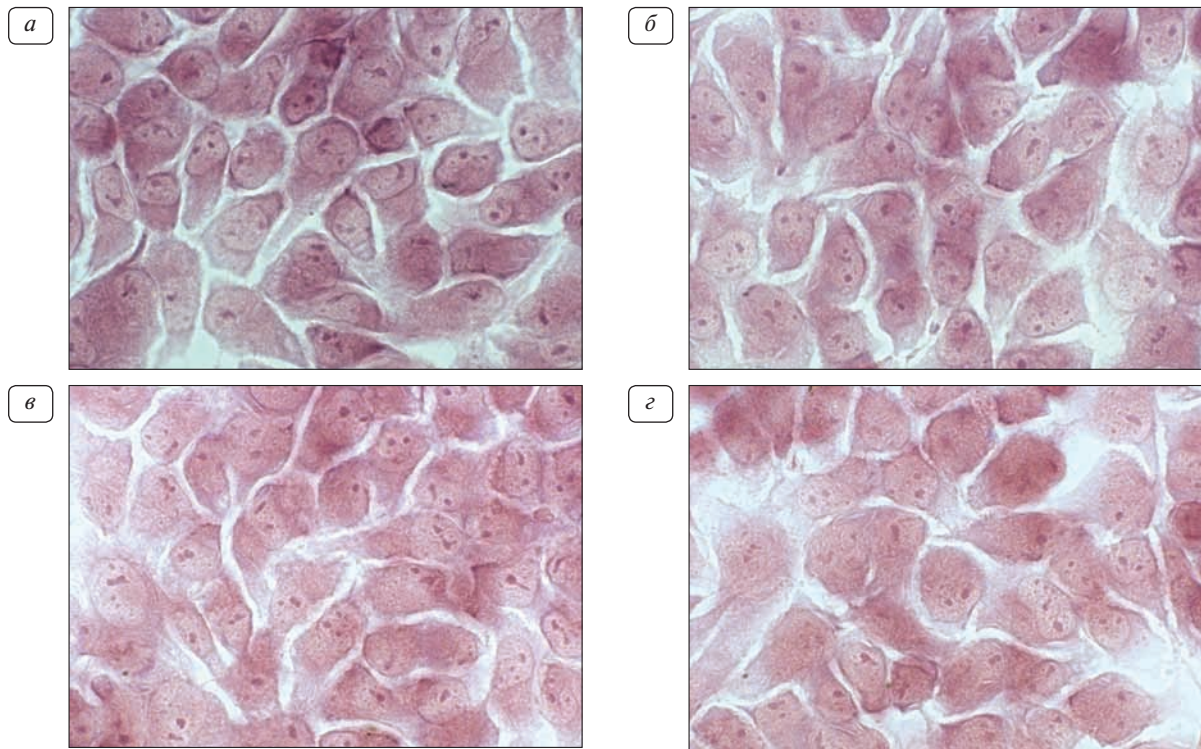


Рис. 3. Морфологія клітин лінії LNCaP, інкубованих з ПАР у концентрації 1,0 мМ. Забарвлення гематоксиліном та еозином: *а* — полігональні клітини з великим еухроматичним ядром та ядерцями в ньому (зб. $\times 1000$); *б* — великі світлі ядра, що займають весь об'єм клітини (зб. $\times 1000$); *в* — клітини різної морфології з відростками (зб. $\times 1000$); *г* — відростчасті клітини з активними світлими ядрами (зб. $\times 1000$)

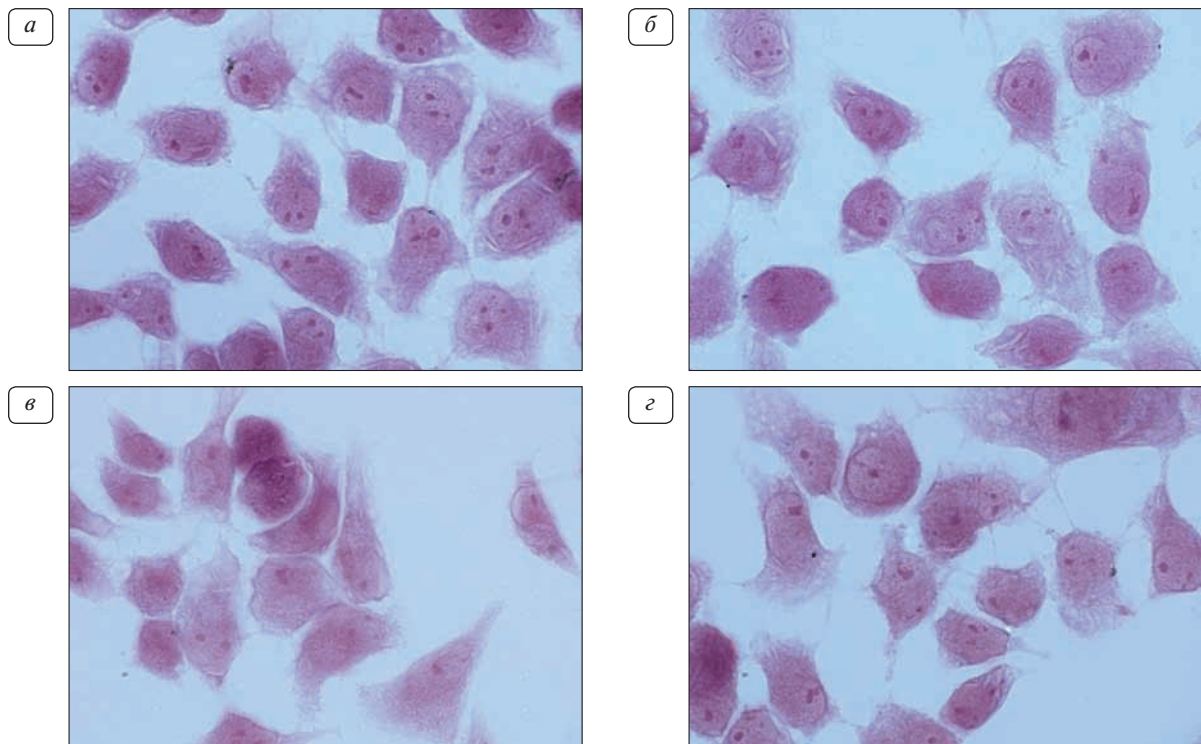


Рис. 4. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок інкубації з ПАР у концентрації 2,0 мМ. Забарвлення гематоксиліном та еозином: *а* — пірамідальні клітини, з великим ядром та чіткими ядерцями (зб. $\times 1000$); *б* — клітини з відростками та округлі клітини (зб. $\times 1000$); *в* — клітини різної морфології: пірамідальні та округлі, з помітними ядрами та з відсутністю ядра (зб. $\times 1000$); *г* — вакуолізація цитоплазми клітин з відростками (зб. $\times 1000$)

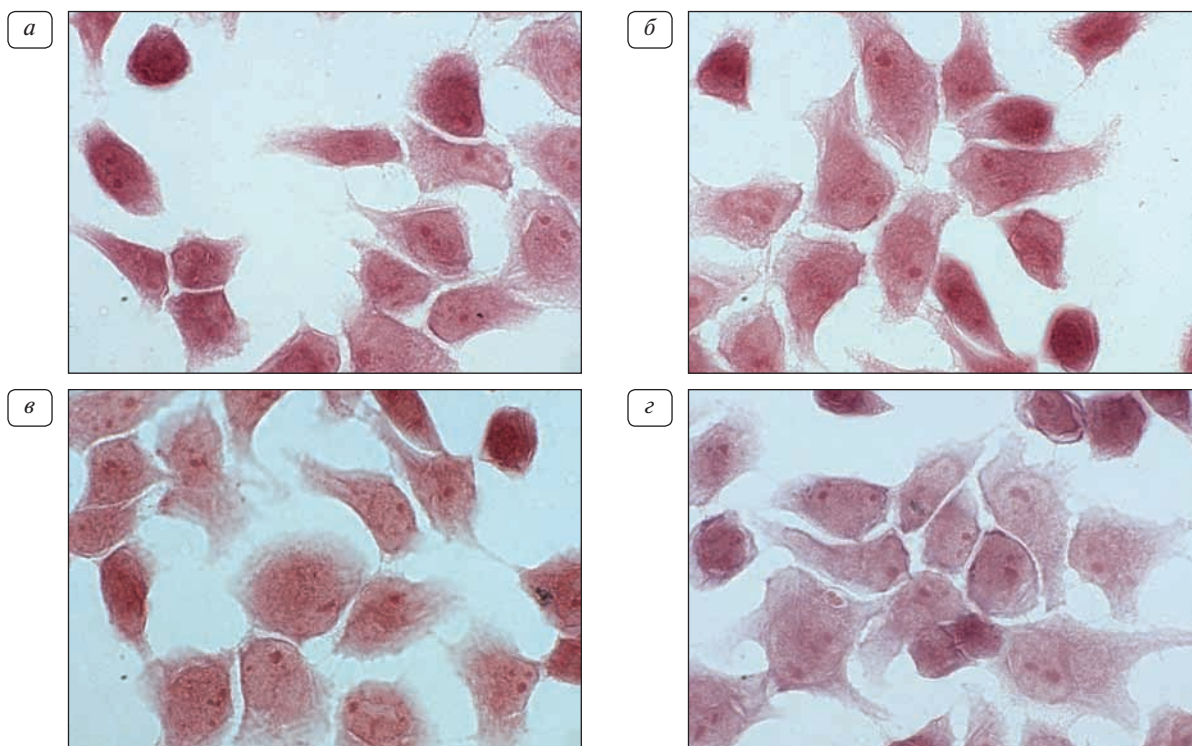


Рис. 5. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок комбінованого впливу ПАР та Спн у концентраціях 0,5 мМ і 1,0 мМ відповідно. Забарвлення гематоксилином та еозином: *а* — присутність в культурі типових та атипових форм клітин (зб. $\times 1000$); *б* — великі світлі клітини та невеликі округлі, з конденсацією ядер (зб. $\times 1000$); *в* — пірамідальні клітини з відростками (зб. $\times 1000$); *з* — клітини з відростками та без них, початкові етапи апоптозу в деяких клітинах (зб. $\times 1000$)

типову морфологію з активними еухроматичними ядрами (рис. 6). В ядрах усіх клітин спостерігалися 2–3 ядерця чіткої форми. Всі клітини мали відростки і контактували між собою; цитоскелет дозволяв клітинам активно рухатись, що могло свідчити про певну метастатичну активність. Цитоплазма клітин світла, дрібнозерниста, слабобазофільна. Клітини синтетично активні (рис. 6, б, в, з). В деяких клітинах помітні мітози, що свідчило про їх проліферативну активність (рис. 6, в).

У культурі клітин лінії DU-145 в присутності 2,0 мМ Спн частина клітин зберігала характерну форму з відростками, вони мали світлі ядра. Інша частина клітин була округлої форми без відростків та мала темні конденсовані ядра без чітких контурів, з непомітними ядерцями (рис. 7, а). В темних клітинах були помітні зміни, характерні для апоптозу — ядерна конденсація, утворення везикул на мембрані, апоптотичні тільця, фрагментація ядер (рис. 7, в, з). В клітинах, що зберігали нормальну будову, відмічалася вакуолізація цитоплазми (рис. 7, б, з); це могло свідчити про початкові етапи апоптозу. Отже, всі клітини піддавались пригнічувальній дії Спн: більшість клітин були в стані апоптозу, частина — на початкових етапах клітинної загибелі.

За морфологічним станом клітини лінії DU-145, інкубовані з 1,0 мМ ПАР, за розмірами, фор-

мою, ядрами нагадували клітини контролю: мали розвинені філоподії, дрібнозернисту базофільну цитоплазму. Ядра округлі, правильної форми, еухроматичні, в них помітні 2–3 ядерця. Клітини в мітотичному поділі відсутні. Отже, клітини синтетично активні, здатні до міграції та адгезії (рис. 8).

Морфологія клітин лінії DU-145 при одночасному введенні ПАР (0,5 мМ) та Спн (1,0 мМ) відповідала контролю, вони зберігали свою полігонально-відростчасту форму та мали еухроматичні світлі ядра (рис. 9, а). Але в полі зору зустрічалися і апоптотичні клітини: менші за розміром, округлі, з гетерохроматичними ядрами (рис. 9, б, в). Світлі полігональні клітини також мали ознаки раннього апоптозу: вакуолізація цитоплазми, різноманітна форма ядер, інвагінації ядерної оболонки, фрагментації ядер (рис. 9, а, з). Мітозів не спостерігалось, проліферація клітинної лінії була пригнічена.

Отже, частина клітин лінії DU-145 при одночасному введенні ПАР та Спн, в концентраціях 0,5 мМ та 1,0 мМ відповідно, ставала на шлях запрограмованої загибелі: переважна їх більшість перебувала на ранніх чи більш пізніх етапах апоптозу.

Таким чином, при поєднаній дії ПАР і Спн загибель андрогензалежних клітин лінії LNCaP

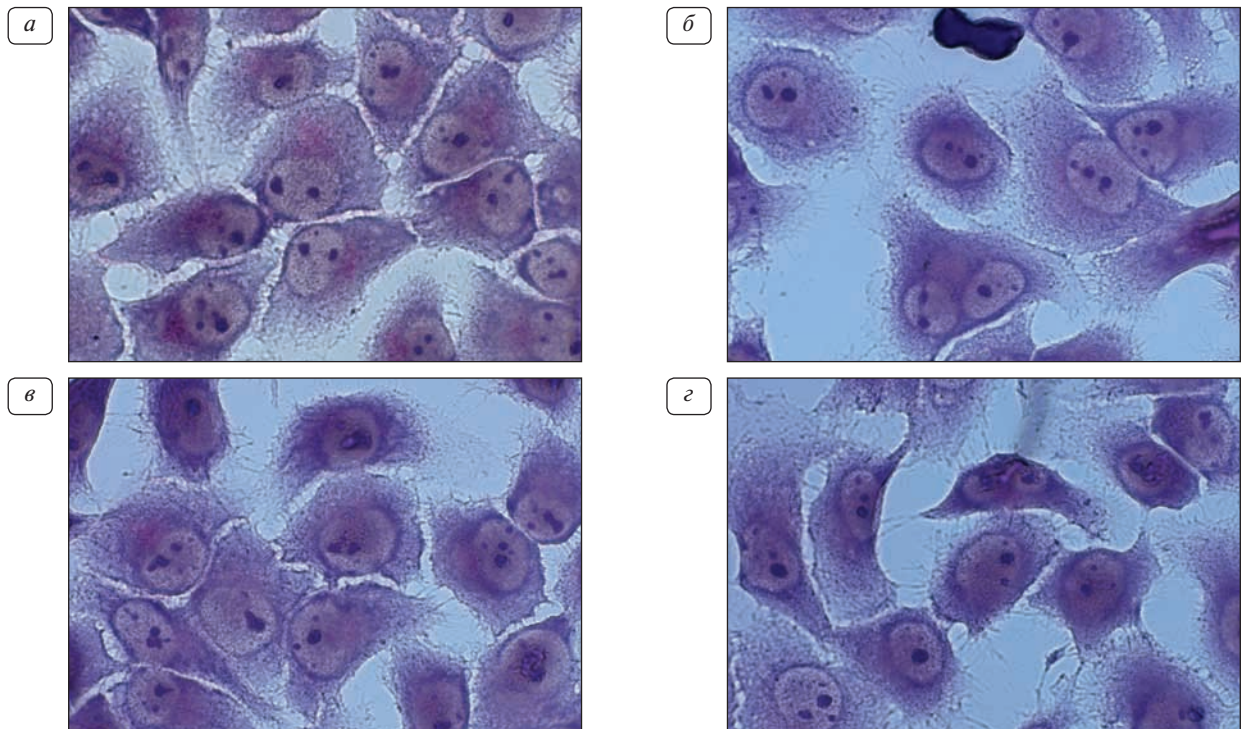


Рис. 6. Морфологія клітин лінії DU-145 у контролі. Забарвлення гематоксиліном та еозином: *а* — типова форма клітин лінії DU-145, клітини з відростками, ядра великі, світлі, з 2-3 ядерцями (зб. $\times 1000$); *б* — синтетично активні клітини (зб. $\times 1000$); *в* — великі веретеноподібні клітини, помітні клітини в мітозі (профаза) (зб. $\times 1000$); *г* — клітини в активному синтетичному стані, помітні двоядерні клітини (зб. $\times 1000$)

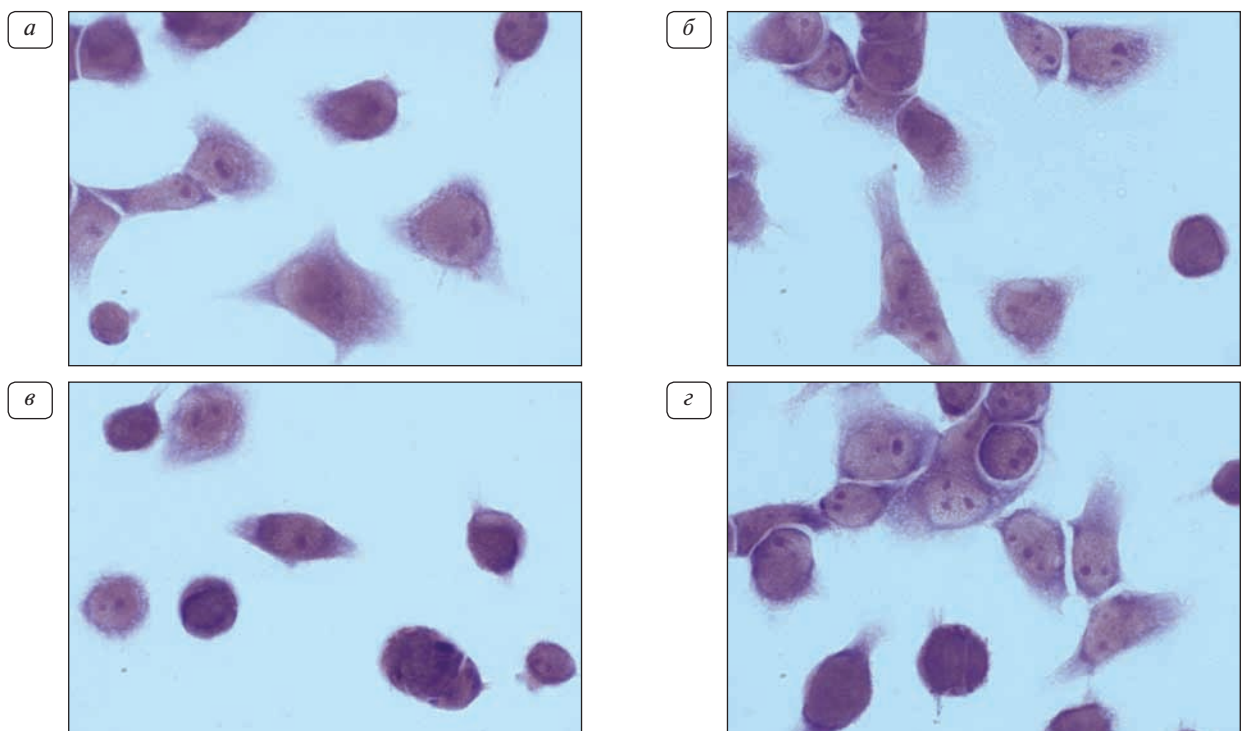


Рис. 7. Зміни морфології клітин лінії DU-145 внаслідок інкубації з Спн у концентрації 2,0 мМ. Забарвлення гематоксиліном та еозином: *а* — частина клітин лінії DU-145 зберігає типову форму клітин, частина знаходиться в апоптозі (зб. $\times 1000$); *б* — багатоядерні клітини, втрата відростків, округлі темні клітини (зб. $\times 1000$); *в* — округлі темні клітини, темна вузька цитоплазма, відсутність відростків, клітина справа внизу: з фрагментованим ядром в апоптозі (зб. $\times 1000$); *г* — вакуолізація цитоплазми, великі конденсовані ядра (зб. $\times 1000$)

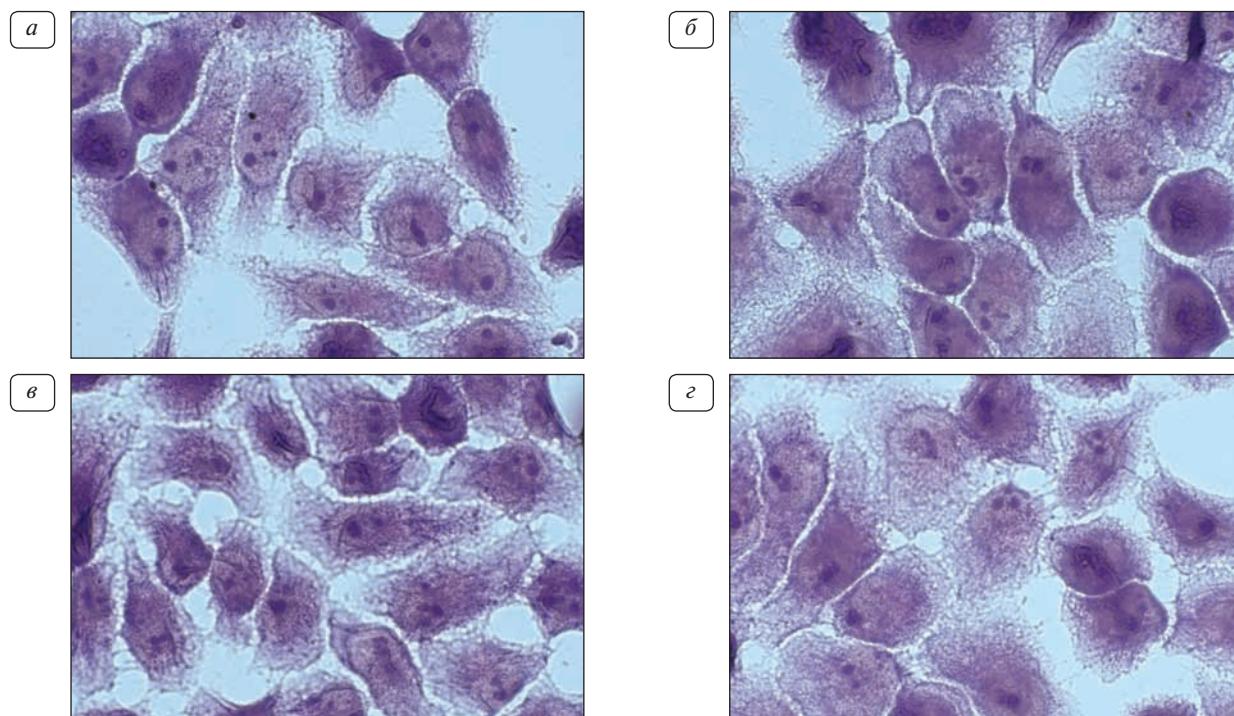


Рис. 8. Морфологія клітин лінії DU-145, інкубованих з ПАР у концентрації 1,0 мМ. Забарвлення гематоксилином та еозином: *а* — клітини, за морфологією схожі до клітин контролю (зб. $\times 1000$); *б* — клітини веретеноподібні, з відростками, з великим світлим ядром (зб. $\times 1000$); *в* — піниста цитоплазма у переважній більшості клітин (зб. $\times 1000$); *з* — великі світлі клітини (зб. $\times 1000$)

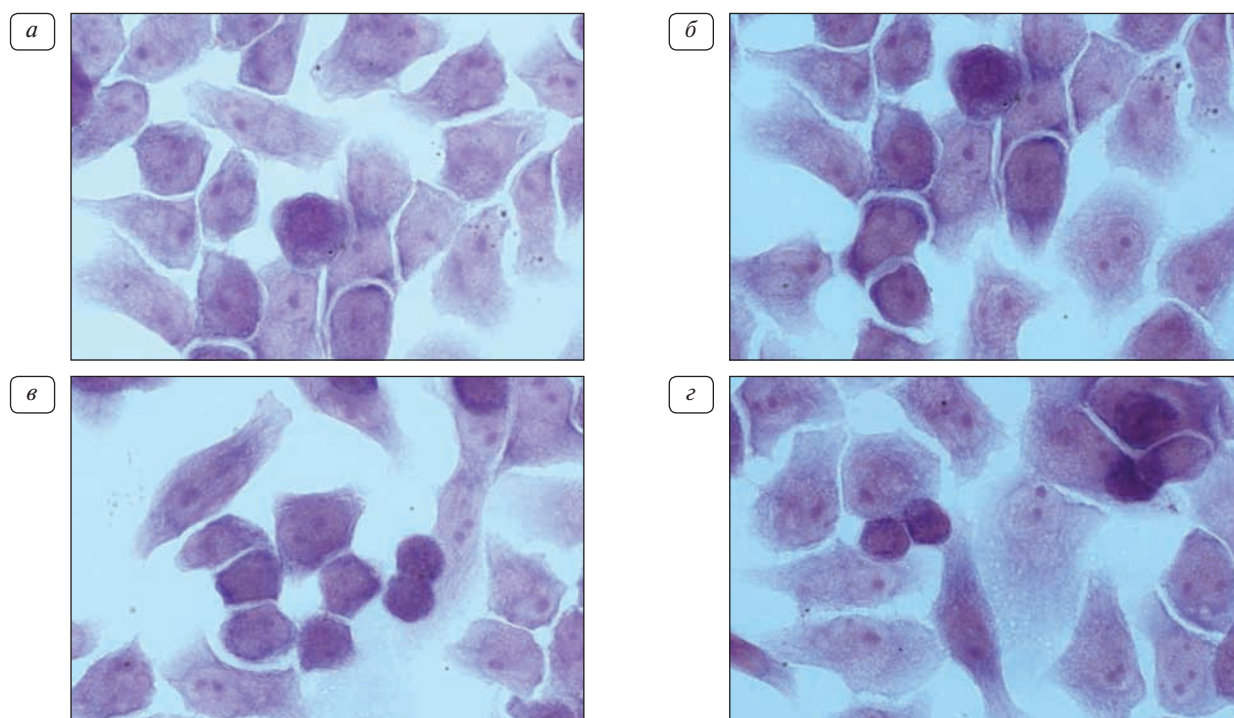


Рис. 9. Зміни морфології клітин лінії DU-145 внаслідок комбінованого впливу ПАР та Спн у концентраціях 0,5 мМ і 1,0 мМ відповідно. Забарвлення гематоксилином та еозином: *а* — клітини, за морфологією подібні до контролю. Помітні і темні круглі клітини (зб. $\times 1000$); *б* — серед нормальних клітин, веретеноподібних, з великими світлими ядрами, помітні темні округлі клітини з конденсованими ядрами (зб. $\times 1000$); *в* — різноманітні за будовою клітини, присутні в культурі як типові, так і апоптотичні клітини (зб. $\times 1000$); *з* — апоптотичні клітини, світлі клітини також з ознаками раннього апоптозу: вакуолізація цитоплазми, різноманітна форма ядер (зб. $\times 1000$)

і андрогеннезалежних DU-145 відбувалася кількісно неоднаково. У клітин лінії LNCaP цитотоксичний вплив Спн, ймовірно опосередкований дією утворених з останнього токсичних альдегідів, превалював над апоптозом. На лінію DU-145 при сполученій дії ПАР і Спн більшою мірою впливав саме ПАР, конкуруючи зі Спн і викликаючи запрограмовану загибель клітин.

ВИСНОВКИ

1. Диференційовані андрогензалежні клітини РПЗ людини *in vitro* при поєднаному застосуванні ПАР і Спн продемонстрували підсилення цитотоксичного впливу Спн.

2. Низькодиференційовані клітини РПЗ людини лінії DU-145, які не мають андрогенних рецепторів, виявилися стійкішими до впливу як окремо ПАР, так і його комбінації з Спн.

3. ПАР відміняв викликану Спн інверсію знаку СПЗ андрогеннезалежних клітин РПЗ.

4. Цитоморфологічні зміни, що відбувалися під впливом ПАР як окремо, так і у його комбінації зі Спн, свідчили про переважно апоптотичний шлях загибелі андрогеннезалежних клітин лінії DU-145, в той час як у андрогензалежних клітин лінії LNCaP у стані апоптозу перебувала менша їх частка.

Подяка за консультативну і практичну допомогу висловлюється співробітникам ІЕПОР — д.б.н., ст. досл. Наталії Лук'яновій; к.б.н., ст. наук. співробітнику Олександрі Лиховій і аспіранту Олександру Мушію.

Дослідження виконані в межах НДР за темою № 2.2.5.444 “Комбінована дія сперміну і модулаторів його катаболізму як перспективна модель лікування раку передміхурової залози”, 2022 — 2026 рр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, *et al.* Aldehyde dehydrogenase inhibitors: A comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev* 2012; **64** (3): 520–39. doi: 10.1124/pr.111.005538.
- van den Hoogen C, van der Horst G, Cheung H, *et al.* The aldehyde dehydrogenase enzyme 7A1 is functionally involved in prostate cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2011; **28** (7): 615–25. doi: 10.1007/s10585-011-9395-7.
- Wang M, Liu X, Guo J, *et al.* Inhibition of LSD1 by Pargyline inhibited process of EMT and delayed progression of prostate cancer *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **467** (2): 310–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.164.
- Zhang L, Liu X, Wang M, *et al.* Repressive effects of LSD1 inhibitor pargyline on cellular proliferation, motility and EMT process of prostate cancer *in vitro*. *Int J Clin Exp Med* 2018; **11** (9): 10173–82. www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/ IJCEM0066335
- Yanish YuV, Prylutskyi MP, Zaletok SP. The influence of spermine on the survival and electrokinetic characteristics of human prostate cancer LNCaP cell line. *Oncology* 2022; **24** (3): 163–8. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10728. (in Ukrainian)
- Yanish YuV, Prylutskyi MP, Voronina OK, Zaletok SP. The influence of spermine and aminoguanidine on the morphofunctional characteristics of human prostate cancer cell line LNCaP. *Oncology* 2023; **25** (1): 45–52. doi: 10.15407/oncology.2023.01.024. (in Ukrainian)
- Yanish YuV, Prylutskyi MP, Sumnikova IO, *et al.* The influence of spermine and chlorhexidine on the survival, electrokinetic and cytomorphological characteristics of human prostate cancer cells. *Oncology* 2023; **25** (3): 190–8. doi: 10.15407/oncology.2023.03.186. (in Ukrainian)
- Sblano S, Boccarelli A, Mesiti F, *et al.* A second life for MAO inhibitors? From CNS diseases to anticancer therapy. *Eur J Med Chem* 2024; **267**: 11618. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116180.
- Bhattacharjee A, Biswas P, Dhabal S, *et al.* Role of Monoamine oxidase A (MAO-A) in cancer progression and metastasis. *Canc Cell Microenv* 2018; **4**: 1623. doi: 10.14800/CCM.1623.
- Lee HT, Choi MR, Doh MS, *et al.* Effects of the monoamine oxidase inhibitors pargyline and tranylcypromine on cellular proliferation in human prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2013; **30** (4): 1587–92. doi: 10.3892/or.2013.2635.
- Ojha R, Chen I-C, Hsieh C-M, *et al.* Installation of Pargyline, a LSD1 inhibitor, in the HDAC Inhibitory template culminated in the identification of a tractable antiprostata cancer agent. *J Med Chem* 2021; **64** (24): 17824–45. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00966.
- Moreira-Silva F, Camilo V, Gaspar V, *et al.* Repurposing old drugs into new epigenetic inhibitors: Promising candidates for cancer treatment? *Pharmaceutics* 2020; **12** (5): 410. doi: 10.3390/pharmaceutics12050410.
- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham. UK: Scion, 2008. 571 p.
- Lakin GF. *Biometriya*. M.: Vysshaya shkola, 1990. 352 p. (in Russian)
- Lee WJ, Chien MH, Chow JM, *et al.* Nonautophagic cytoplasmic vacuolation death induction in human PC-3M prostate cancer by curcumin through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep* 2015; **27** (5): 10420. doi: 10.1038/srep10420

THE EFFECT OF PARGILINE, SPERMINE AND THEIR COMBINATIONS ON ANDROGEN-DEPENDENT AND ANDROGEN-INDEPENDENT HUMAN PROSTATE CANCER CELLS *IN VITRO*

Yu.V. Yanish¹, S.P. Zaletok¹, O.K. Voronina², I.O. Sumnikova¹, V.O. Stashenko¹, O.O. Klenov¹, V.V. Bentrad¹

¹ R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Summary. A series of studies on enhancing the cytotoxic effect of spermine on human prostate cells by affecting the enzymes of its metabolism has been continued. **Aim:** to investigate effects of pargyline, spermine and their combinations the survival, ζ -potential and surface charge and cytomorphological properties of human prostate cancer cells in culture. **Object and methods:** studies were conducted on cell cultures: differentiated androgen-dependent LNCaP cell line and low-differentiated androgen-independent DU-145 cell line. Cell survival was determined in the trypan blue assay. The effect of the investigated compounds, both individually and in combination, on the viability and proliferative activity of cells was assessed by the colorimetric method — by staining living cells with a solution of crystal violet in methanol. Biophysical parameters (ζ -potential and surface electric charge density) were determined according to the method cellular microelectrophoresis. Cytomorphological characteristics were studied on preparations of cells grown on coverslips, fixed and stained with hematoxylin and eosin (magnification 1000 $\times$). **Results:** for LNCaP cells, the IC_{50} of pargyline was 2.2 mM, and the IC_{50} of spermine was 1.5 mM. For DU-145 cells, the IC_{50} of pargyline was 2.35 mM, the IC_{50} of spermine was 5.0 mM. According to biophysical indicators, spermine caused an inversion of the sign of the electric charge in cells of the LNCaP line. Pargyline did not exert such an effect, the charge remained negative, demonstrating an inverse dependence on its concentration. The combination of pargyline and spermine increased the cytotoxic effect of spermine on LNCaP cells, but did not affect the value of their ζ -potential and surface charge density, the positive sign of which, caused by the effect

of spermine, was preserved. At the same time, pargyline completely eliminated spermine-induced inversion of the sign of the total surface charge of DU-145 cells, returning it to the normal negative values. **Conclusions:** it is shown that the differentiated androgen-dependent cells of the LNCaP line with the combined use of pargyline and spermine demonstrated an enhancement of the cytotoxic effect of spermine. At the same time, low-differentiated cells of the DU-145 line, which do not have androgen receptors, were more resistant to the effects of both pargyline and pargyline in combination with spermine. Pargyline also reversed spermine-induced inversion of the sign of the total surface charge of DU-145 cells, returning it to normal negative values. Cytomorphological changes that occurred under the influence of both pargyline alone and in its combination with spermine demonstrate mainly the apoptotic pathway of cell death in the androgen-independent DU-145 line, while in the androgen-dependent LNCaP line, a smaller proportion of cells were in a state of apoptosis.

Keywords: prostate cancer, LNCaP and DU-145 cell lines, pargyline, spermine, ζ -potential, cell surface charge, apoptosis.

Адреса для листування:

Яніш Ю.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: yanish.yuriy@gmail.com

Одержано: 02.08.2024