

О.О. Кленов,
С.П. Залєток,
Ю.В. Яніш,
І.О. Сумнікова

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

Ключові слова: поліаміни,
спермін, хлоргексидин, MDL-
72527, клітинні лінії раку
передміхурової залози людини.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.02.112>

ВПЛИВ СПЕРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З ІНГІБІТОРАМИ СПЕРМІНОКСИДАЗИ НА ПРОФІЛЬ ПОЛІАМІНІВ І ВИЖИВАНІСТЬ КЛІТИН РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

Мета: дослідити дію сперміну (Спн), інгібіторів сперміноксидази (СМО) та їх комплексний вплив на профіль поліамінів в клітинних лініях раку передміхурової залози (РПЗ) людини та співставити зміни профілю поліамінів з виживаністю пухлинних клітин. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на культурах клітин гормонозалежної (LNCaP) та гормоннезалежної (DU-145) ліній. Профіль поліамінів в пухлинних клітинах та активність СМО і поліаміноксидази (ПАО) визначали за допомогою методу вискоєфективної рідинної хроматографії. **Результати:** додавання в культуральне середовище Спн викликало суттєве накопичення цього поліаміну в клітинах, зменшення вмісту путресцину (Пут) та спермідину (Спд). Застосування інгібіторів СМО (хлоргексидину і MDL-72527) супроводжувалося зниженням рівня Спд та накопиченням ацетильованого спермідину (АцСпд). Застосування Спн призводило до падіння показника проліферації — молярного співвідношення Спд/Спн. Особливо низькі значення співвідношення Спд/Спн спостерігали при використанні сперміну разом з інгібіторами СМО. При застосуванні Спн разом з інгібіторами СМО були найнижчими і показники виживаності клітин. Це свідчить про більш ефективне гальмування росту клітин при поєднаному застосуванні цих чинників, порівняно із застосуванням їх окремо, навіть у значно вищих концентраціях. Застосування хлоргексидину окремо і спільно зі Спн призводило до зниження активності СМО та ПАО. **Висновки:** застосування Спн окремо та разом з інгібіторами СМО викликає характерні для гальмування росту зміни профілю поліамінів в пухлинних клітинах (зменшення вмісту Спд, Пут та збільшення Спн) і зниження молярного співвідношення Спд/Спн. Ці зміни супроводжуються зниженням виживаності клітин гормонозалежної (LNCaP) і гормонорезистентної (DU-145) ліній РПЗ людини. Отримані результати свідчать про перспективність подальшого вивчення сперміну та його комбінацій з інгібіторами СМО як потенційних засобів лікування РПЗ.

Поліаміни (ПА) є унікальними полікатіонними метаболітами, що контролюють різноманітні життєво важливі функції організму, включаючи клітинну проліферацію, ріст та апоптоз [1, 2]. Внутрішньоклітинний вміст ПА вищий у тканинах або клітинах з високими показниками проліферації, при регенерації тканин та в пухлинних клітинах [2–4]. Порушення метаболізму ПА визначають при різних захворюваннях, зокрема, і у онкологічних хворих [5]. В численних дослідженнях було показано, що ПА задіяні в малігнізації, метастазуванні та інвазії пухлинних клітин [6–9].

Зараз інтенсивно проводиться пошук засобів, мішенню яких є життєво важливі метаболічні процеси злоякісної клітини. Новітні дані світової літератури свідчать, що однією з таких мішеней

можуть бути ПА та ферменти їх метаболізму, які відіграють важливу роль в процесах проліферації, росту і диференціювання клітин. Пряма участь ПА у численних клітинних сигнальних шляхах [7] відкриває нові перспективи використання інгібіторів/модуляторів їх метаболізму як мішені для хіміопрофілактики та протипухлинної терапії. Дослідження останніх років демонструють перспективність вивчення в якості мішені для хімотерапії злоякісних новоутворень не тільки процес синтезу ПА, а й їх катаболізму [10]. Перспективним є також застосування інгібіторів/модуляторів метаболізму ПА у поєднанні з відомими хіміопрепаратами [11, 12].

В плані актуальності вивчення метаболізму ПА як мішені для протипухлинної терапії вельми

цікавими є дослідження, в яких показано, що поліамін-блокуюча терапія посилює протипухлинну імунну відповідь [13–15].

Великий інтерес викликає вивчення протипухлинної дії інгібіторів ферментів катаболізму ПА. Так, в низці робіт були представлені результати щодо протипухлинної дії інгібіторів сперміноксидази (СМО) [16–18]. Є також дані щодо механізмів антибластичної дії сперміну (Спн), зокрема при кастраційно-резистентному раку передміхурової залози (РПЗ) [19]. Все вищенаведене свідчить, про перспективність досліджень метаболізму ПА як мішені для протипухлинної терапії.

РПЗ є найпоширенішим злоякісним новоутворенням у чоловіків у 112 країнах (станом на 2020 р.), на нього припадає один з кожних 14 випадків раку, діагностованих у всьому світі, і 15% усіх випадків раку у чоловіків. Серед чоловіків ця хвороба посідає друге місце за смертністю після раку легені. На основі даних про демографічні зміни в світі та про збільшення тривалості життя прогнозують, що кількість випадків РПЗ у 2040 р. подвоїться. Тобто, щорічна кількість нових випадків захворювання зростає з 1,4 мільйона у 2020 р. до 2,9 мільйонів у 2040 р. [20].

З огляду на такі невтішні прогнози, пошук нових схем терапії РПЗ, зокрема дослідження ПА як мішені для лікування цього захворювання є актуальними. Варто зазначити, що на відміну від пухлин інших локалізацій, для яких характерними ознаками є висока активність ферментів синтезу ПА (орнітиндекарбоксилази (ОДК) і S-аденозилметіонін-декарбоксилази (S-АМДК), низька активність ферменту катаболізму діаміноксидази (ДАО) та високі рівні поліамінів), для РПЗ характерною є активація СМО (ферменту катаболізму ПА) і низький рівень Спн, поліаміну відповідального за процеси диференціювання клітин [21–23]. Показано, що чим більш агресивна пухлина, тим нижчий вміст Спн в злоякісних клітинах [23–26].

Було висловлено припущення, що Спн, концентрація якого в нормальній передміхуровій залозі найвища з поміж усіх органів людини [27, 28], може бути фактором, який стримує розвиток злоякісного процесу, а зниження рівня Спн у передміхуровій залозі може бути однією з причин перетворення нормальних клітин у неопластичні [29, 30].

В літературі останніх років представлені результати експериментальних досліджень чинників, що впливають на катаболізм Спн. Показано, що ряд сполук, зокрема, похідні (N-(3-{3-(диметиламіно) пропіл} аміно} пропіл)-8-хінолін-карбоксамідів (SI-4650) пригнічують активність СМО, збільшують вміст Спн в клітинній лінії раку легені, викликають зупинку клітинного циклу, індукують апоптоз та пригнічують проліферацію пухлинних клітин [17].

Водночас, мало вивчено вплив Спн та інгібіторів СМО на профіль ПА в клітинах РПЗ людини. Тому метою наших досліджень було вивчити дію Спн, інгібіторів СМО та їх комплексний вплив на профіль ПА в клітинних лініях РПЗ людини, а також зіставити характер змін ПА з виживаністю пухлинних клітин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі використані культури клітинних ліній РПЗ людини: гормонозалежного диференційованого LNCaP та гормоннезалежного низькодиференційованого DU-145. Клітини культивували у живильному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном (Biowest, США), з додаванням 10% телячої сироватки і 1% суміші антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин (Biowest, Франція) у культуральних флаконах (SPL, Корея) з корисною площею 25 або 75 см² (5 або 20 мл живильного середовища, відповідно) та інкубували у CO₂-інкубаторі (37°C, 5% CO₂). Як інгібітори СМО використовували хлоргексидин (ХГ) та більш відомий інгібітор поліаміноксидази (ПАО) і СМО — N1,N4-(біс (2,3-бутадієніл)-1,4-бутан-1,4-діамін (MDL-72527). Досліджувані речовини вносили до середовища у логарифмічний фазі росту клітин і через 24 год. інкубування визначали виживаність клітин, проліферативну активність та профіль ПА.

Вживаність визначали, забарвлюючи 0,08% клітини трипановим синім. Для визначення вмісту ПА у пухлинних клітинах використовували метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [31] з деякими нашими модифікаціями [23]. Дослідження проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США). Для аналізу зразків використовували колонку Supelco Zorbax ODS 4,6 mm I.D.×250 mm. Рівні ПА в пухлинних клітинах обраховували в пмоль на 1 млн. клітин або пмоль/мг білка. Активність СМО і ПАО визначали за методом [32]. Для визначення активності СМО в якості субстрату використовували Спн, для визначення активності ПАО — ацетильований Спн. Активність ферментів вираховували у пмоль Спн на 10⁶ клітин за годину.

Статистичну обробку отриманих результатів проведено з використанням *t*-критерію Стьюдента. Середні значення та стандартні відхилення досліджуваних величин обчислювали з використанням пакету програм STATISTICA 6 (Statsoft) [33].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Вплив Спн та інгібіторів СМО на рівні поліамінів у клітинах гормоннезалежної лінії DU-145. Результати дослідження впливу зазначених чинників на вміст ПА у клітинах гормоннезалежної лінії DU-145 та виживаність клітин відображені на *рис. 1–3*. Показано, що в присутності Спн

в культуральному середовищі суттєво змінювався вміст ПА в злоякісних клітинах: майже у 10 разів зростав рівень Спн, більш ніж у 3 рази знижувався вміст спермідину (Спд) та до нульових значень падав рівень путресцину (Пут) (рис. 1). Молярне співвідношення Спд/Спн, яке вважають показ-

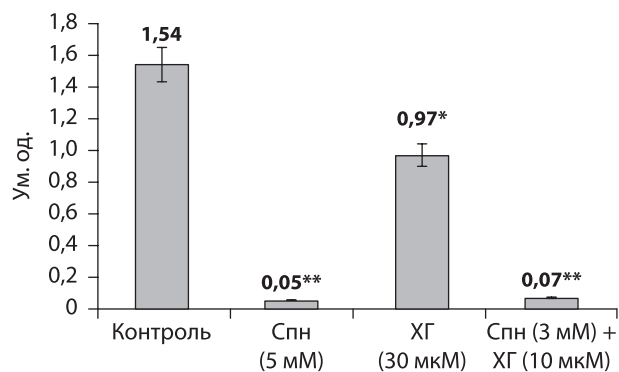


Рис. 1. Вплив сперміну (Спн), хлоргексидину (ХГ) та їх поєднана дія на вміст поліамінів у клітинах гормонезалежної лінії DU-145

* — $p \leq 0,01$; ** — $p \leq 0,001$ порівняно з контролем.

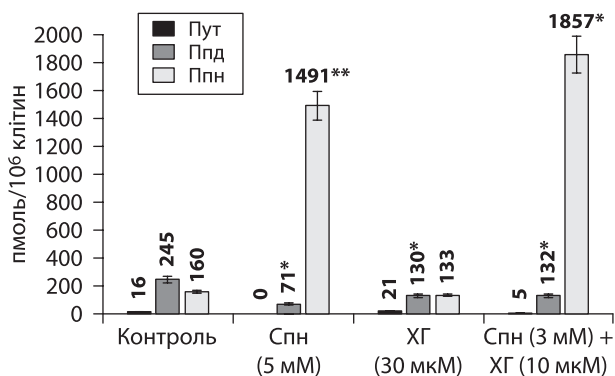


Рис. 2. Вплив сперміну (Спн), хлоргексидину (ХГ) та їх поєднана дія на молярне співвідношення Спд/Спн у клітинах лінії DU-145

* — $p \leq 0,01$ порівняно з контролем.

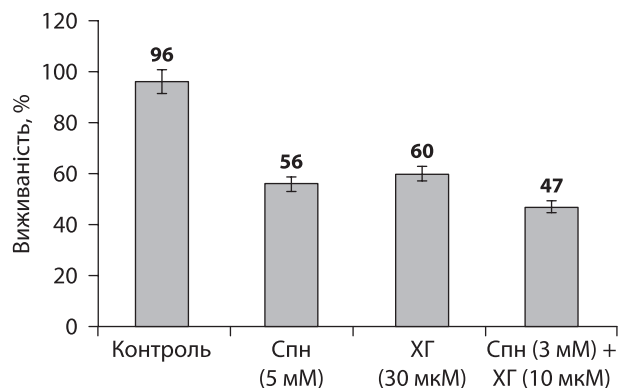


Рис. 3. Вплив сперміну (Спн), хлоргексидину (ХГ) та їх поєднана дія на виживаність клітин гормонезалежної лінії DU-145

ником проліферації, знижувалося у 30 разів порівняно з контролем (рис. 2).

Інкубація клітин з ХГ призводила до зниження в клітинах вмісту Спд, порівняно з контрольними значеннями, рівні Спн і Пут достовірно не відрізнялись від контролю, величина співвідношення Спд/Спн була у 1,6 раза нижчою за контрольні значення.

Поєднане введення Спн та ХГ в культуральне середовище призводило до ще більшого, порівняно з введенням одного Спн, зростання його рівня в клітинах. Також відмічено зменшення рівня Спд і Пут та зниження (у 22 рази) показника Спд/Спн (рис. 2), порівняно з контрольними значеннями.

Зниження величини показника молярного співвідношення Спд/Спн у клітинах DU-145 при дії сперміну, хлоргексидину окремо або в комплексі відбувалося односпрямовано зі змінами виживаності клітин (рис. 3).

Подібні результати були отримані при дослідженні впливу Спн та іншого інгібітору СМО — MDL-72527, який зазвичай використовують при вивченні протипухлинних властивостей аналогів ПА (табл. 1; рис. 4).

Як видно з табл. 1, Спн у дозі IC₅₀ (5 мМ) при введенні в культуральне середовище клітин гормонезалежної лінії DU-145 призводить до зменшення рівнів Спд (в 2,8 раза), Ацетил-Пут (в 1,7 раза), Пут (до нульових значень); збільшення рівнів Спн (в 2,1 раза) та N1-Ацетил-Спн (в 6,9 раза). Спостерігали значне зниження показника проліферації — співвідношення Спд/Спн (рис. 4).

Застосування інгібітору СМО (MDL-72527) призводило до деякого зростання рівнів Спн та Ацетил-Спд, що, ймовірно, є наслідком інгібування цим чинником активності ферментів катаболізму ПА (СМО і ПАО).

Величина показника Спд/Спн при інкубації клітин з MDL-72527, як і у випадку інкубації зі

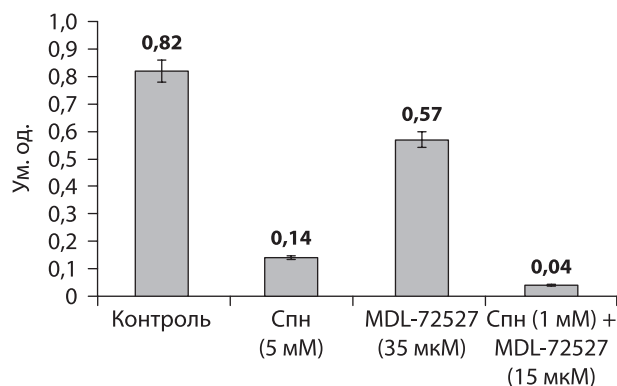


Рис. 4. Вплив сперміну (Спн), інгібітору СМО (MDL-72527) та їх поєднана дія на величину молярного співвідношення Спд/Спн у клітинах DU-145

Таблиця 1

Вплив сперміну (Спн), інгібітору СМО (MDL-72527) та їх поєднана дія на вміст поліамінів у клітинах гормоннезалежної лінії DU-145 (пмоль/10⁶ клітин)

Поліаміни	Контроль	Спн (5 мМ)	MDL-72527 (35 мкМ)	Спн (1 мМ) + MDL-72527 (15 мкМ)
Ацетил-Пут	194,0 ± 39,0	114,3 ± 22,8*	246,2 ± 48,2	201,23 ± 39,2
N ¹ -Ацетил-Спд	3324,1 ± 662,9	3278,2 ± 630,6	3672,3 ± 740,4	3519,3 ± 712,8
Пут	69,4 ± 14,9	0	40,6 ± 9,1*	0
N ¹ -Ацетил-Спн	15,4 ± 4,1	105,6 ± 20,1**	0	91,4 ± 17,3**
Спд	591,5 ± 119,4	211,9 ± 43,4*	483,1 ± 98,9	57,1 ± 10,2**
Спн	717,5 ± 144,5	1504,3 ± 305,8*	841,6 ± 160,3	1263,3 ± 253,7*

Примітка: * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$ порівняно з контролем.

Спн, знижувалася, але значно меншою мірою (див. рис. 4).

Було показано, що інкубація клітин лінії DU-145 зі Спн у дозі 5 мМ та з інгібітором СМО (MDL-72527 у дозі 35 мкМ) призводила до загибелі 50% клітин. При застосуванні Спн та інгібітору СМО у комплексі, виживаність 50% клітин спостерігали при суттєво нижчих концентраціях цих чинників (Спн 1 мМ + MDL-72527 15 мкМ), ніж при введенні їх окремо. Це вказує, що MDL-72527, як і ХГ (див. рис. 3) підсилює цитотоксичну дію Спн. Це узгоджується зі змінами вмісту ПА та показника проліферації — молярного співвідношення Спд/Спн, представлених вище (див. табл. 1, рис. 4).

Вплив Спн та інгібіторів СМО на рівні ПА у клітинах гормоннезалежної лінії LNCaP. Показано, що інкубація клітин лінії LNCaP зі Спн призводила, як і у випадку клітин гормоннезалежної лінії DU-145, до зростання внутрішньоклітинного вмісту цього ПА, зниження вмісту Спд і Пут та підвищення N¹-Ацетил-Спд. Порівняно з контрольними значеннями ХГ знижував рівні Спн, Спд та Пут, а також у 3 рази підвищував рівень N¹-Ацетил-Спд (що, ймовірно, відбувалося внаслідок пригнічення хлоргексидином активності не тільки СМО, а й ПАО). При поєднаній дії Спн та ХГ в клітинах зберігався підвищений рівень Спн; рівні Спд і Пут, відповідно у 5 та 4,5 раза були нижчими за контрольні, а рівень N¹-Ацетил-Спд у 3 рази перевищував контрольні значення.

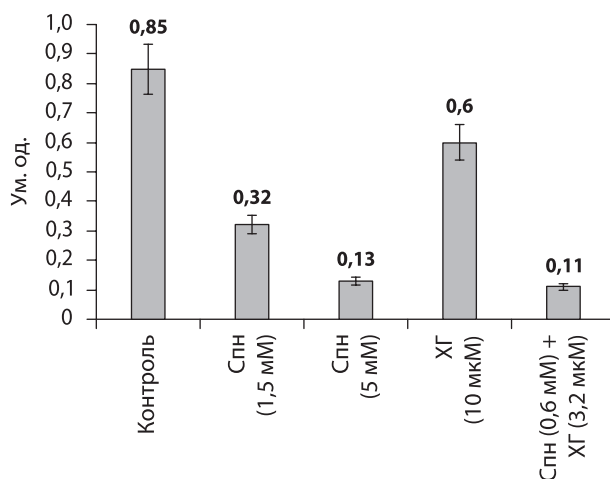


Рис. 5. Вплив сперміну (Спн), хлоргексидину (ХГ) та їх поєднана дія на величину співвідношення Спд/Спн у клітинах гормоннезалежної лінії LNCaP

Зміни рівнів Спн та Спд у клітинах під впливом застосованих чинників призводили до падіння величини молярного співвідношення Спд/Спн (рис. 5).

Зниження показника Спд/Спн свідчить про гальмування процесу проліферації та підтверджується даними щодо виживаності клітин LNCaP під впливом зазначених чинників (рис. 6).

Як видно з даних наведених в табл. 2 та на рис. 5–6, при застосуванні Спн разом з ХГ спостерігали найнижчі значення показника Спд/Спн (0,11 ум.од.) та виживаності клітин (19%). Отже,

Таблиця 2

Вплив сперміну (Спн), хлоргексидину (ХГ) та їх вплив у комплексі на вміст поліамінів у клітинах гормоннезалежної лінії LNCaP (пмоль/10⁶ клітин)

Поліаміни	Контроль	Спн (1,5 мМ)	Спн (5 мМ)	ХГ (10 мкМ)	Спн (0,6 мМ) + ХГ (3,2 мкМ)
N ¹ -Ацетил-Пут	192,9 ± 40,6	123,5 ± 25,7	130,4 ± 27,2	167,6 ± 34,9	145,1 ± 29,2
N ¹ -Ацетил-Спд	376,0 ± 77,2	409,1 ± 83,8	514,6 ± 103,1	1147,4 ± 230,5*	1000,3 ± 210,5*
Пут	68,1 ± 12,6	20,1 ± 5,2*	10,1 ± 2,3*	35,0 ± 8,2	15,4 ± 4,0*
Спд	179,5 ± 33,8	100,2 ± 19,5*	90,4 ± 10,2	60,8 ± 14,5*	35,0 ± 8,2*
Спн	210,4 ± 5,2	310,5 ± 4,2*	670,6 ± 136,1*	100,5 ± 22,3*	320,1 ± 69,2

Примітка: * — $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

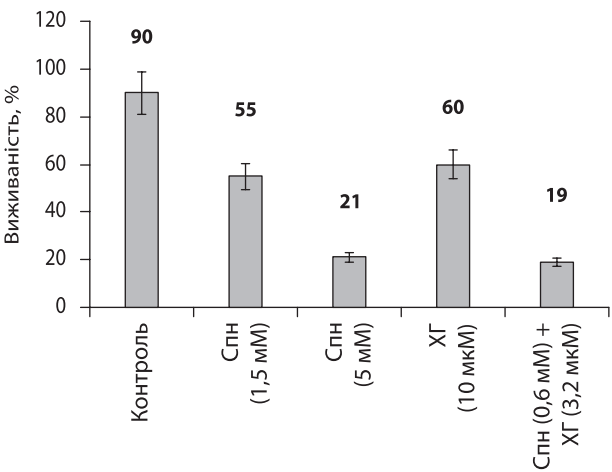


Рис. 6. Вплив сперміну (Спн), інгібітору СМО хлоргексидину (ХГ) та їх поєднана дія на виживаність клітин гормонозалежної лінії LNCaP

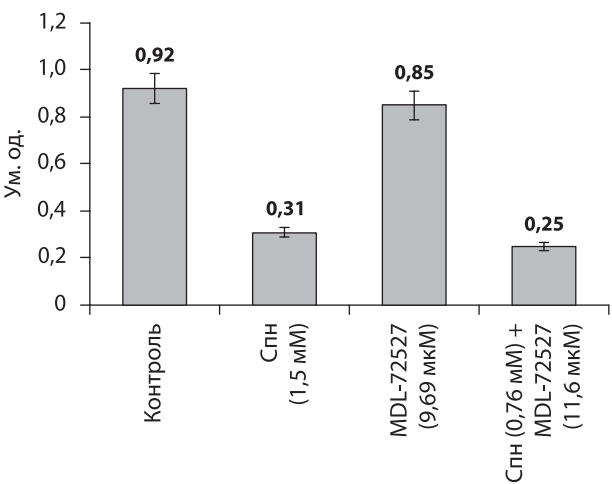


Рис. 7. Вплив сперміну (Спн) і MDL-72527 окремо та у комплексі на величину молярного співвідношення Спд/Спн у клітинах лінії LNCaP

більш ефективно гальмування росту клітин відбувалося при поєднанні цих чинників, порівняно із застосуванням їх окремо, навіть у значно вищих концентраціях.

Досліджено також вплив Спн, інгібітору СМО (MDL-72527) та їх поєднаний вплив на профіль

ПА у клітинах LNCaP (табл. 3). Як видно з наведених даних, інкубація клітин зі Спн, MDL-72527 та Спн у комплексі із MDL-72527 також призводить до суттєвих змін вмісту ПА. При внесенні в культуральне середовище MDL-72527 в клітинах лінії LNCaP, у порівнянні з контрольними клітинами, знижувалися рівні Спн та Спд, підвищувався вміст N¹-Ацетил-Спд і практично не змінювався вміст Пут. При інкубації клітин зі Спн більш ніж удвічі зростає внутрішньоклітинний вміст цього ПА, вміст N¹-Ацетил-Спд також збільшувався, а Спд і Пут — знижувався. При поєднаній дії Спн та MDL-72527 в клітинах зберігалися високі рівні Спн та N¹-Ацетил-Спд, рівень Спд не відрізнявся від контролю, а вміст Пут був у 8 разів нижчий за значення у контрольних клітинах. Зміни вмісту Спд і Спн впливають на величину молярного співвідношення Спд/Спн, значення якого було найменшим при інкубації клітин з Спн спільно з MDL-72527.

Отримані дані щодо змін профілю ПА і молярного співвідношення Спд/Спн при інкубації клітин обох ліній з Спн та інгібіторами СМО узгоджуються зі змінами виживаності цих клітин (рис. 8).

Дослідження впливу Спн, ХГ і MDL-72527 на активність СМО та ПАО у клітинах ліній LNCaP та DU-145 показало, що Спн дещо підвищує їх активність порівняно з контролем, а ХГ і MDL-72527 або їх комбінація зі Спн навіть у порівняно менших концентраціях, викликають падіння активності цих ферментів до нульових значень.

Таким чином, нами показано, що Спн та інгібітори СМО призводять до суттєвих змін вмісту ПА в клітинах ліній РПЗ людини (DU-145 та LNCaP). Виявлені зміни основних фракцій ПА (Спн, Спд, Пут) та молярного співвідношення Спд/Спн характерні для гальмування росту клітин та співпадають зі змінами виживаності клітин як гормонорезистентної (DU-145), так і гормончутливої (LNCaP) ліній РПЗ.

Варто зазначити, що зниження вмісту Пут при інкубації клітин зі Спн, яке спостерігали у клітинах обох ліній, в першу чергу, може бути наслідком інгібування екзогенним Спн ферменту

Таблиця 3

Вплив сперміну, MDL-72527 та їх поєднана дія на вміст поліамінів у клітинах гормонозалежної лінії LNCaP (пмоль/мг білка)

Поліаміни	Контроль	Спн (1,5 мМ)	MDL-72527 (9,69 мкМ)	Спн (0,76 мМ) + MDL-72527 (11,6 мкМ)
Ацетил-Пут	1330,4 ± 267,8	2230,0 ± 450,1	1080,6 ± 216,1	2230,5 ± 449,1
N ¹ -Ацетил-Спд	1220,8 ± 42,2	2180,6 ± 638,1*	1910,8 ± 83,2*	3170,6 ± 639,1*
Пут	80,4 ± 17,3	30,2 ± 12,2*	70,4 ± 15,1	10,0 ± 3,0*
N ¹ -Ацетил-Спн	240,01 ± 40,12	100,4 ± 18,5*	200,4 ± 42,2	120,2 ± 22,4*
Спд	940,2 ± 50,2	690,4 ± 80,2*	650,4 ± 30,2*	880,8 ± 79,2
Спн	1050,5 ± 112,0	2240,4 ± 70,0*	760,5 ± 60,1*	3450,9 ± 692,1*

Примітка: * — $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

синтезу ПА — ОДК. Оскільки Спн, згідно даних літератури [30] та наших результатів, здатний активувати антизид ОДК в результаті чого знижується активність ОДК і зменшується синтез її продукту — Пут. Зниження вмісту Спд в клітинах може бути обумовлене виснаженням Пут, необхідного для його синтезу, внаслідок інгібування ОДК.

Як відомо, передміхурова залоза людини є органом з найвищою концентрацією Спн, де його рівні сягають 10–20 мМ, що майже в 30 разів вище, ніж в інших органах і тканинах [27, 28]. При розвитку РПЗ вміст Спн в передміхуровій залозі поступово зменшується, корелює зі злоякісністю РПЗ [22, 23, 26]. Надзвичайно високий вміст Спн в передміхуровій залозі вказує на те, що цей ПА може відігравати функціональну роль у прогресуванні РПЗ. Повідомлялося, що присутній у водних екстрактах тканин передміхурової залози людини Спн інгібує ріст РПЗ [29]. Але механізми протипухлинної дії Спн вивчені зовсім мало і, в основному, залишаються невідомими.

Лише в літературі останніх років з'явилися поодинокі роботи, де досліджувались механізми протипухлинної дії цього ПА. Так, при вивченні впливу Спн на ріст гормонезалежних клітинних ліній РПЗ та розвиток РПЗ *in vivo* було показано, що одним з механізмів ріст-інгібуючої дії Спн може бути його вплив на сигнальні шляхи рецепторів андрогенів шляхом гальмування передачі сигналів повнорозмірного рецептора андрогена (AR-FL) та його сплайс-варіанту 7 (AR-V7) [19]. Цими ж авторами було показано, що Спн інгібує активність аргінін-метилтрансферази через пряме зв'язування з білком ферменту та знижує рівень H4R3me2a на промоторі рецептора андрогенів і, тим самим, пригнічує його транскрипційну активність.

Нами на цих же клітинних лініях РПЗ (DU-145 і LNCaP) було показано, що Спн у сублетальних концентраціях знижує синтетичну і пригнічує мітотичну активність клітин LNCaP, викликає порушення морфофункціонального стану клітин та призводить до вступу клітин в апоптоз. Було виявлено, що клітини лінії DU-145 при введенні в культуральне середовище Спн в сублетальних концентраціях, або Спн разом з інгібіторами СМО також демонструють типову апоптотичну морфологію [34, 35].

Отже, нами продемонстровано, що інкубація клітин РПЗ людини (DU-145 та LNCaP) з Спн та з Спн поєднано з інгібіторами СМО призводить до накопичення в пухлинних клітинах Спн, який відповідає за процеси диференціювання клітин та зниження вмісту Спд, відповідального за процеси проліферації, що може бути однією з причин пригнічення росту досліджуваних клітин. Зміни концентрацій ПА у клітинах під впливом засто-

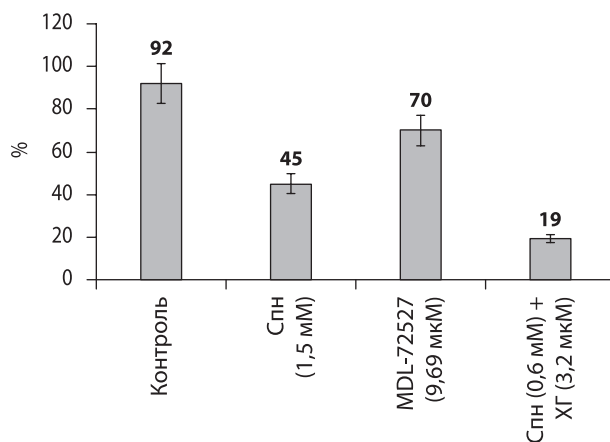


Рис. 8. Вплив сперміну (Спн) і MDL-72527 окремо та у комплексі на виживаність клітин лінії LNCaP

сованих агентів, особливо це стосується Спд і Спн, призводять до падіння величини молярного співвідношення Спд/Спн, яка свідчить про гальмування процесів проліферації в обох клітинних лініях. Ця тенденція співпадає із ступенем виживаності клітин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що додавання в культуральне середовище Спн та інгібіторів СМО суттєво змінювало в клітинах ліній РПЗ людини DU-145 та LNCaP профіль як основних фракцій ПА, так і їх ацетильованих форм.

2. Інкубація клітин DU-145 та LNCaP зі Спн окремо та у поєднанні з інгібіторами СМО викликала суттєве накопичення Спн в пухлинних клітинах та призводила до зниження рівнів Пут і Спд.

3. Додавання в культуральне середовище інгібіторів СМО (ХГ і MDL-72527) супроводжувалось зниженням вмісту Спд та накопиченням ацетильованого Спд в пухлинних клітинах.

4. Інкубація клітин зі Спн, ХГ та MDL-72527 окремо та поєднано викликала суттєві зміни активності ферментів катаболізму ПА (СМО та ПАО) в пухлинних клітинах. Спермін підвищував активність СМО та ПАО; ХГ та MDL-72527 окремо і в комбінації зі Спн призводили до падіння активності СМО та ПАО до нульових значень.

5. Інкубація клітин зі Спн, ХГ, MDL-72527 та поєднане їх застосування призводили до зниження показника проліферації клітин — молярного співвідношення Спд/Спн.

6. При застосуванні Спн разом з інгібіторами СМО спостерігали найнижчі показники співвідношення Спд/Спн та виживаності клітин, що свідчить про більш ефективне гальмування росту клітин при поєднаному застосуванні цих чинників, порівняно з застосуванням їх окремо, навіть у значно вищих концентраціях.

7. Виявлені зміни вмісту основних фракцій ПА (Спн, Спд, Пут) та молярного співвідношення Спд/Спн характерні для процесів гальмування росту і співпадають зі змінами виживаності клітин як гормонезалежної (DU-145), так і гормонозалежної (LNCaP) ліній РПЗ.

Робота виконана в рамках НДР “Комбінована дія сперміну і модуляторів його катаболізму як перспективна модель лікування раку передміхурової залози” (№ держреєстрації 2.2.5.444).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Pegg AE. Functions of polyamines in mammals. *J Biol Chem* 2016; **291** (29): 14904–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>.
- Igarashi K, Kashiwagi K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2019; **109**: 104–15. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.012>.
- Zahedi K, Barone S, Soleimani M. Polyamines and their metabolism: From the maintenance of physiological homeostasis to the mediation of disease. *Med Sci (Basel)* 2022; **10** (3): 38–56. <https://doi.org/10.3390/medsci10030038>.
- Stolarska E, Paluch-Lubawa E, Grabsztunowicz M, et al. Polyamines as universal bioregulators across kingdoms and their role in cellular longevity and death. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2023; **42** (6): 364–84. <https://doi.org/10.1080/07352689.2023.2247886>.
- Sagar NA, Tarafdar S, Agarwal S, et al. Polyamines: Functions, metabolism, and role in human disease management. *Medical Sci* 2021; **9** (2): 44. <https://doi.org/10.3390/medsci9020044>.
- Xuan M, Gu X, Li J, et al. Polyamines: their significance for maintaining health and contributing to diseases. *Cell Commun Signal* 2023; **21** (1): 348. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01373-0>.
- Li J, Meng Y, Wu X, et al. Polyamines and related signaling pathways in cancer. *Cancer Cell Int* 2020; **20** (1): 539. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01545-9>.
- Berdinskikh NK, Zaletok SP. Poliaminy i opukholevyi rost. Kiyv: Nauk. dumka, 1987. 140 p. (in Russian).
- Zaletok S. The role of polyamines in carcinogenesis and tumor growth. In: Onkolohiya. Lektsiyi. Chekhun VF (eds). K: Zdorov'ya Ukrainy, 2010: 354–70. (in Ukrainian).
- Affronti HC, Rowsam AM, Pellerite AJ, et al. Pharmacological polyamine catabolism upregulation with methionine salvage pathway inhibition as an effective prostate cancer therapy. *Nat Commun* 2020; **11** (1): 52–67. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13950-4>.
- Tummala R, Diegelman P, Hector S, et al. Combination effects of platinum drugs and N1, N11 diethylnorspermine on spermidine/spermine N1-acetyltransferase, polyamines and growth inhibition in A2780 human ovarian carcinoma cells and their oxaliplatin and cisplatin-resistant variants. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; **67** (2): 401–14. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1334-9>.
- Xie Y, Murray-Stewart T, Wang Y, et al. Self-immolative nanoparticles for simultaneous delivery of microRNA and targeting of polyamine metabolism in combination cancer therapy. *J Control Release* 2017; **246**: 110–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.017>.
- Hayes CS, Shicora AC, Keough MP, et al. Polyamine-blocking therapy reverses immunosuppression in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2014; **2** (3): P. 274–85. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0120-T>.
- Alexander ET, Minton A, Peters MC, et al. A novel polyamine blockade therapy activates an anti-tumor immune response. *Oncotarget* 2017; **8** (48): 84140–52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20493>.
- Lian J, Liang Y, Zhang H, et al. The role of polyamine metabolism in remodeling immune responses and blocking therapy within the tumor immune microenvironment. *Front Immunol* 2022; **13**: 912279. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.912279>.
- Cervelli M, Polticelli F, Fiorucci L, et al. Inhibition of acetyl polyamine and spermine oxidases by the polyamine analogue chlorhexidine. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2013; **28** (3): 463–7. <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.650691>.
- Sun L, Yang J, Qin Y, et al. Discovery and antitumor evaluation of novel inhibitors of spermine oxidase. *J Enz Inhib Med Chem* 2019; **34** (1): 1140–51. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1621863>.
- Furbish AB, Alford AS, Burger P, et al. Identification and characterization of novel small-molecule CMO inhibitors. *Med Sci* 2022; **10**: 47. <https://doi.org/10.3390/medsci10030047>.
- Li X, Li F, Ye Fi, et al. Spermine is a natural suppressor of AR signaling in castration-resistant prostate cancer. *Cell Reports* 2023; **42** (7): 112798. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112798/1>.
- James ND, Tannock I, N'Dow J, et al. The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases. *Lancet* 2024; **403** (10437): 1683–722. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00651-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00651-2).
- Goodwin AC, Jadallah S, Toubaji A, et al. Increased spermine oxidase expression in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia tissues. *Prostate* 2008; **68** (7): 766–72. <https://doi.org/10.1002/pros.20735>.
- Peng Q, Wong CY-P, Cheuk IW-y, et al. The emerging clinical role of spermine in prostate cancer. *Int J Mol Sci* 2021; **22** (9): 4382. <https://doi.org/10.3390/ijms22094382/3>.
- Zaletok SP, Klenov OO, Bentrads VV, et al. Polyamines as new potential biomarkers for differential diagnosis of prostate cancer and estimation of its aggressiveness. *Exp Oncol* 2022; **44** (2): 148–54. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17758>.
- Giskeodegård GF, Bertilsson H, Selnæs KM, et al. Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLoS One*. 2013; **8** (4): e62375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062375>.
- Basharat M, Payne GS, Morgan VA, et al. TE=32 ms vs TE=100 ms echo-time (1)H-magnetic resonance spectroscopy in prostate cancer: Tumor metabolite depiction and absolute concentrations in tumors and adjacent tissues. *J Magn Reson Imaging* 2015; **42**: 1086–93. <https://doi.org/10.1002/jmri.24875>.
- Zaletok SP, Klenov OO, Bentrads VV, et al. Polyamines as new potential biomarkers for differential diagnosis of prostate cancer and estimation of its aggressiveness. *Exp Oncol* 2022; **44** (2): 148–54. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17758>.
- Harrison GA. Spermine in human tissues. *Biochem J* 1931; **25** (6): 1885–1892. <https://doi.org/10.1042/bj0251885>.
- Harrison GA. CLIII. The approximate determination of spermine in single human organs. *Biochem J* 1933; **27** (4): 1152–6. <https://doi.org/10.1042/bj0271152>.
- Smith R, Litwin M, Lu Y, Zetter B. Identification of an endogenous inhibitor of prostate carcinoma cell growth. *Nature Med* 1995; **1**: 1040–5. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1040>.
- Koike C, Chao DT, Zetter BR. Sensitivity to polyamine — induced growth arrest correlates with antizyme induction in prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 6109–12. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/24/6109>.

31. Gerbaut L. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. Clin Chem 1991; **37**: 2117–20.
32. Halline AM., Brasitus TA. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the measurement of polyamine oxidase activity. J Chromatogr 1990; **533**: 187–94. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82201-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82201-X).
33. Lakin GF. Biometrics. M: Higher School, 1990. 352 p. (in Russian).
34. 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: <https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10728> (in Ukrainian).
35. 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: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.024> (in Ukrainian).

EFFECT OF SPERMININE AND ITS COMBINATION WITH SPERMINOXIDASE INHIBITORS ON THE PROFILE OF POLYAMINE AND SURVIVAL OF HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

O.O. Klenov, S.P. Zaletok, Yu.V. Yanish,
I.O. Sumnikova

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

Summary. Aim: to investigate the effect of spermine (Spn) and spermine oxidase inhibitors (SMO) and their effect in combination on the polyamine profile in human PCa cell lines and to compare the nature of polyamine changes with tumor cell viability. **Object and methods:** the study was performed on cell cultures of hormone-sensitive (LNCaP) and hormone-resistant (DU-145) cell lines. The profile of polyamines in tumor cells and the activities of spermine oxidase and polyamine oxidase (PAO) were determined by high-performance liquid chromatography. **Results:** the addition of Spn to the culture medium causes a significant accumulation of this polyamine in cells, a decrease in putrescine (Put) and spermidine (Spd). The use of SMO inhibitors (chlorhexidine and MDL-72527) is accompanied by a decrease in Spd levels and accumulation of acetylated spermidine (AcSpd). The use of Spn leads to a decrease in the proliferation rate — the molar ratio of spermidine/spermine (Spd/Spn). Particularly low values of the Spd/Spn ratio were observed when spermine was used in combination with SMO inhibitors. When Spn

was used in combination with SMO inhibitors, the lowest cell viability rates were also observed, indicating a more effective inhibition of cell growth with the combined use of these factors compared to their use separately, even in significantly higher concentrations. The use of chlorhexidine and chlorhexidine together with spermine led to a decrease in the activity of SMO and PAO. **Conclusions:** the use of spermine and spermine in combination with SMO inhibitors leads to changes in the polyamine profile in tumor cells characteristic of growth inhibition (decrease in Spd, Put and increase in Spn) and a decrease in the molar ratio Spd/Spn. These changes are accompanied by a decrease in the survival of cells of hormone-sensitive (LNCaP) and hormone-resistant (DU-145) human prostate cancer lines. The obtained results show the prospects for further study of spermine and its combination with SMO inhibitors as potential agents for the treatment of prostate cancer.

Keywords: polyamines, spermine, chlorhexidine, MDL-72527, human prostate cancer cell lines.

Адреса для листування:

Кленов О.О.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: klenov@ukr.net

Одержано: 24.04.2024