

Ю.В. Яніш¹,
М.П. Прилуцький¹,
І.О. Сумнікова¹,
О.О. Кленов¹,
В.О. Стащенко¹,
В.В. Бенітрад¹,
О.К. Вороніна²,
С.П. Залєток¹

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

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ключові слова: спермін, хлор-гексидин, LNCaP, DU-145, ξ -потенціал, поверхневий заряд, цитоморфологічні характеристики, апоптоз.

ВПЛИВ СПЕРМІНУ ТА ХЛОР-ГЕКСИДИНУ НА ВИЖИВАНІСТЬ, ЕЛЕКТРОКІНЕТИЧНІ ТА ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

Мета: дослідити вплив сперміну та інгібітора сперміноксиди хлор-гексидину, застосованих окремо або у комбінації, на життєздатність, електрокінетичні та структурно-функціональні характеристики клітин раку передміхурової залози людини *in vitro*. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на культурах клітин: диференційованих андрогензалежної лінії LNCaP та низькодиференційованих андрогеннезалежної лінії DU-145. Вивживаність визначали методом виключення живими клітинами вітального барвника трипанового синього. Електрокінетичні параметри клітин (ξ -потенціал і щільність сумарного поверхневого заряду) визначали згідно рівнянь Смолуховського і Квінке—Гельмгольца. Морфологічні зміни оцінювали методом світлооптичної мікроскопії фіксованих препаратів клітин, забарвлених гематоксиліном та еозином. **Результати:** підтверджено факт, що спермін у концентрації 1,5 мМ проявляє інгібуючий ефект на ріст диференційованих клітин лінії LNCaP, який полягає у зниженні їх виживаності до $48,5 \pm 1,5\%$ у порівнянні з інтактним контролем, а при застосуванні цього чинника у концентрації, що перевищує 5,0 мМ — у їх загибелі. Показано, що низькодиференційовані клітини лінії DU-145 виявилися значно стійкішими: їх виживаність знижувалася до $56,0 \pm 1,9\%$ лише під дією сперміну у концентрації 5,0 мМ; концентрація 10,0 мМ викликала повну загибель клітин обох ліній. Тенденція зберігалася і у разі застосування хлоргексидину: під його впливом у концентрації 15,0 мкМ виживаність клітин гормонозалежної лінії LNCaP становила $33,0 \pm 1,5\%$, а гормоннезалежної DU-145 — $79,0 \pm 2,5\%$. Комбіноване застосування сперміну і хлоргексидину (0,6 мМ і 3,2 мкМ відповідно) викликало потужний цитотоксичний ефект у клітин лінії LNCaP (виживаність $19,0 \pm 1,2\%$), водночас як клітини лінії DU-145 зберігали доволі високий її показник ($76,0 \pm 2,1\%$) навіть при значно вищому вмісті сперміну (3,0 мМ) і хлоргексидину (5,0 мкМ) в культуральному середовищі. Встановлено, що під впливом хлоргексидину клітини обох досліджуваних ліній демонструють інверсію знаку поверхневого електричного заряду. Виявлені певні кількісні відмінності у електрокінетичних показниках клітин гормонозалежної і гормоннезалежної ліній. Клітини лінії DU-145 під впливом сперміну, або сперміну і хлоргексидину, демонстрували типову апоптотичну морфологію. **Висновки:** спермін у концентраціях 1,5–10,0 мМ та хлоргексидин у концентраціях 10,0–30,0 мкМ, застосовані окремо, справляють цитотоксичну дію на клітини раку передміхурової залози людини ліній LNCaP і DU-145. Цитотоксичні властивості сперміну, хлоргексидину або їх комбінації сильніше виражені при дії на клітини гормонозалежної лінії LNCaP, ніж гормоннезалежної лінії DU-145. Комбіноване їх застосування демонструє значно вищий цитотоксичний ефект на клітини лінії LNCaP, чого не спостерігається для клітинної лінії DU-145. Хлоргексидин, як і спермін, викликає інверсію поверхневого заряду клітин, змінюючи його знак на позитивний. Виявлені відмінності у характері змін виживаності і електрокінетичних параметрів клітин ліній LNCaP та DU-145 можуть пояснюватися наявністю або відсутністю рецепторів зв'язування андрогенів на їх поверхневих мембранах. Клітини лінії DU-145 під впливом сперміну, або одночасно сперміну і хлоргексидину, переходять до стану апоптозу, як і клітини лінії LNCaP при дії на них сперміну.

Рак передміхурової залози (РПЗ) посідає чільне місце серед онкологічних захворювань чоловіків віком 55–74 роки в усьому світі, займаючи друге місце в Україні серед онкопатологій чоловіків після раку легені. За даними Національного канцер-реєстру України кількість первинних хворих на РПЗ у 2020 р. перевищувала 6,0 тис. осіб, що становило 39,0 хворих на 100 тис. чоловічого населення (світовий показник — 23,8/100 тис.). Смертність сягала 18,6/100 тис. (світовий показник 10,8/100 тис.). У 2021 р. захворюваність на РПЗ в Україні становила уже 44,6 на 100 тис. чоловічого населення, а летальність — 17,6 на 100 тис. [1]. Інтенсивне поширення РПЗ свідчить, що боротьба з цим захворюванням є актуальною медико-соціальною проблемою. До пріоритетних напрямків в онкоурології належать як пошуки біомаркерів, які можна використовувати при діагностиці і прогнозуванні перебігу хвороби, так і дослідження різних механізмів впливу на проліферативну і метаболічну активність злоякісних клітин. Для нормальної передміхурової залози людини характерні високі рівні поліамінів, зокрема сперміну (Спн). Проте показано, що у злоякісно трансформованій тканині простати спостерігається зниження його рівня [2]. Оскільки саме Спн відповідає за процеси диференціювання клітин, логічним було дослідити вплив самого Спн та інгібіторів ферментів його катаболізму на морфофункціональний стан клітин РПЗ у культурі та на деякі їх біофізичні показники. Комбінована дія Спн і модуляторів його катаболізму розглядається останнім часом як перспективна модель лікування РПЗ [3–5]. Тому **метою роботи** було дослідити вплив Спн, інгібітора сперміноксидази хлоргексидину (ХГ) та їх комбінації на виживаність, електрокінетичні і цитоморфологічні характеристики клітин РПЗ людини *in vitro*.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на культурах клітинних ліній РПЗ: гормонозалежної диференційованої LNCaP та гормонезалежної низькодиференційованої 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), вирощували 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). За 24 год клітини піддавали дії досліджуваних чинників, а ще через 24 год визначали їх виживаність, електрокінетичний потенціал (ζ), щільність сумарного поверхневого заряду — СПЗ (q) і його знак та аналізували морфофункціональні зміни. Концентрація застосованого у різних варіантах

Спн (AppliChem, Німеччина) становила 0,6; 1,5; 3,0; 5,0 і 10,0 мМ, а ХГ (Sigma-Aldrich, США) — 3,2; 5,0; 10,0; 15,0 і 30,0 мкМ.

Клітини знімали з поверхні полістиролових флаконів за допомогою трипсину (Biowest, Франція; 0,25 %, 37°C; 1,5–3 хв), виживаність визначали за тестом виключення суспендованими у PBS клітинами трипанового синього (ТС; Merck, Німеччина) у концентрації 0,08%. Електрокінетичні параметри обчислювали згідно рівнянь Смолуховського і Квінке-Гельмгольца, адаптованих до біологічних об'єктів за фізіологічних значень фізико-хімічних параметрів [6].

Морфологічні зміни оцінювали методом світлооптичної мікроскопії фіксованих препаратів клітин, вирощених у чашках Петрі на покривних скельцях у CO₂-інкубаторі, з подальшим забарвленням гематоксиліном та еозином.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням *t*-критерію Стюдента та пакету програм STATISTICA 6 [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх дослідженнях було показано, що IC₅₀ Спн для клітин лінії LNCaP дорівнювала 1,5 мМ [6]. Тому надалі ця концентрація використовувалася як початкова. Підтвердилася не тільки дозозалежна цитотоксичність Спн і зміна значень СПЗ клітин лінії LNCaP під його впливом з від'ємних на позитивні, але і в цілому показано аналогічний характер дії ХГ. На перший погляд це цілком зрозуміло: обидві сполуки мають катіонні властивості, тому їх надлишкова сорбція на клітинній поверхні має призводити до нейтралізації відповідного надлишку поліаніонів, що зазвичай і обумовлюють від'ємний СПЗ клітин за нормальних фізіологічних умов. ζ -потенціал визначається як різниця потенціалів між сорбційним та дифузним шарами протийонів, що оточують дисперсну частинку (живу або мертву клітину зокрема) у дисперсійному середовищі (буферному розчині для клітинного мікроелектрофорезу у нашому випадку). Потенціал, як такий, є величиною скалярною, але електричний заряд, що обумовлює його виникнення, вже є величиною векторною і має знак + або —. Треба завжди мати на увазі, що одні й ті самі значення ζ -потенціалу можуть бути обумовлені як нормальним негативним, так і зміненим під дією зовнішніх чинників на позитивний СПЗ клітини. В експерименті це визначає напрямок руху досліджуваної клітини в електричному полі. Тому є сенс завжди розглядати ці взаємопов'язані показники у комплексі. Відомий факт, що ζ -потенціал мертвих клітин перевищує такий живих клітин; ζ -потенціал живої клітини зазвичай не більше 50 мВ. Це пояснюється поступовим витіканням вмісту мертвої клітини назовні, що й обумовлює зростання її електричного заряду і ζ -потенціалу.

Дані *табл. 1* демонструють зворотну залежність між виживаністю клітин лінії LNCaP і концентрацією як Спн, так і ХГ. Чим більшою була концентрація ХГ, тим меншою виживаність клітин, але й тим більшим був їх позитивний поверхневий заряд і ζ -потенціал. Сам факт зміни заряду з від'ємного на позитивний є логічним з огляду на сказане вище, проте у випадку зі Спн ми спостерігаємо цікаву відмінність. Зворотна залежність виживаності і концентрації поліаміну зберігається, але зменшення відносної частки живих клітин у зразках супроводжується також достовірним зниженням як значень їх середнього ζ -потенціалу, так і щільності СПЗ, що його обумовлює. Це може бути пояснено експресією від'ємно заряджених молекул на поверхні клітин лінії LNCaP саме під впливом Спн.

Звертає на себе увагу потужний цитотоксичний ефект комбінації Спн та ХГ, застосованих у невеликих концентраціях. Паралельно відмічається зниження обох електрокінетичних параметрів у порівнянні з дією відносно високої (1,5 мМ) концентрації Спн, та їх достовірне зростання у порівнянні з дією 10 мкМ ХГ (*табл. 1*). Різностямовану дію можна пояснити конкуренцією даних сполук за сайти зв'язування на мембрані клітин LNCaP.

На відміну від клітин лінії LNCaP, клітини лінії DU-145 демонструють більш одноманітну реак-

цію на вплив Спн та ХГ за тестованими ознаками (*табл. 2*).

Зростання цитотоксичності обох чинників, застосованих окремо, прямо пропорційно залежить від їх вмісту в експериментальних зразках; паралельно спостерігається зростання ζ -потенціалу і поверхневої щільності заряду. Проте, поєднана дія обох сполук у менших концентраціях повертає ці параметри до значень, притаманних впливу 3,0 мМ Спн (приблизно) та 15,0 мкМ ХГ (співпадіння), помітно нівелюючи цитотоксичний ефект. Це може бути пояснено, зокрема, різним йонним аранжуванням клітинної мембрани, пов'язаним зі зниженою чутливістю низькодиференційованих клітин лінії DU-145 до андрогенів.

При підрахунку живих і мертвих клітин лінії DU-145, підданих впливу Спн (5,0 мМ), було виявлено, що суспендовані у PBS клітини, не профарбовані ТС, переважно мали більший діаметр, ніж профарбовані (мертві) клітини: 30–36 мкм порівняно з 15–18 мкм. Профарбовані клітини у полі зору світлооптичного мікроскопа розташовувалися поодинокі. Водночас не були профарбовані клітини, що мали розділитися, і поодинокі клітини, які, вочевидь, щойно розділилися. Не виключено, що клітини лінії DU-145 на різних фазах клітинного циклу мають неоднакову чутливість до дії Спн.

Таблиця 1

Вплив Спн та ХГ на виживаність, величину ζ -потенціалу, знак СПЗ і його щільність (q) на поверхні клітин РПЗ людини лінії LNCaP *in vitro*

Чинники впливу	Вживаність, %	ζ , мВ	$q, \times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	95,8 ± 1,4	13,54 ± 0,61	– 9,71 ± 0,44
Спн 1,5 мМ	48,5 ± 1,5*	13,06 ± 0,65	+ 9,36 ± 0,46*
Спн 5,0 мМ	27,0 ± 1,9*	10,01 ± 0,50*	+ 7,18 ± 0,36*
ХГ 10,0 мкМ	60,0 ± 2,0*	8,36 ± 0,66*	+ 5,99 ± 0,47*
ХГ 15,0 мкМ	33,0 ± 1,5*	10,62 ± 0,38*	+ 7,61 ± 0,27*
Спн 0,6 мМ + ХГ 3,2 мкМ	19,0 ± 1,2*	10,45 ± 0,29*	+ 7,49 ± 0,21*

Примітка: * — $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 2

Вплив Спн та ХГ на виживаність, величину ζ -потенціалу, знак СПЗ і його щільність (q) на поверхні клітин РПЗ людини лінії DU-145 *in vitro*

Чинники впливу	Вживаність, %	ζ , мВ	$q, \times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	97,0 ± 2,1	9,29 ± 0,46	– 6,66 ± 0,33
Спн 3,0 мМ	82,0 ± 1,8*	8,10 ± 0,43*	+ 5,81 ± 0,31*
Спн 5,0 мМ	56,0 ± 1,9*	9,19 ± 0,46	+ 6,59 ± 0,33*
Спн 10,0 мМ	0*	13,97 ± 0,85*	+ 10,02 ± 0,61*
ХГ 15,0 мкМ	79,0 ± 2,5*	8,82 ± 0,36	+ 6,32 ± 0,26*
ХГ 30,0 мкМ	65,0 ± 1,1*	12,80 ± 0,53*	+ 9,18 ± 0,38*
Спн 3,0 мМ + ХГ 5,0 мкМ	76,0 ± 2,1*	9,40 ± 0,44	+ 6,74 ± 0,32*

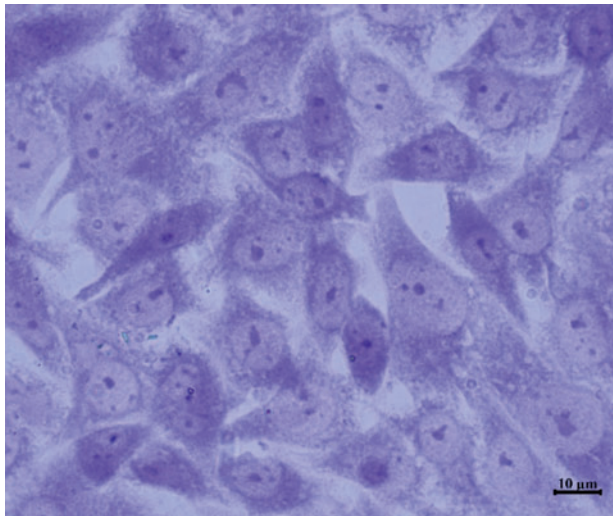
Примітка: * — $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Вплив Спн на морфологічні характеристики клітин раку простати людини лінії LNCaP висвітлено у нашій попередній публікації [8].

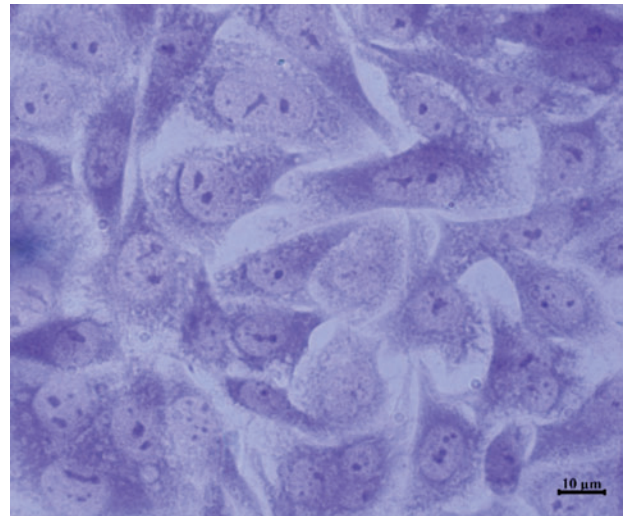
Морфологічна характеристика клітин лінії DU-145. Клітини лінії DU-145 інтактного контролю мали типову будову і утворювали щільний моношар. Вони мали полігональну, інколи пірамідальну, форму з добре розвиненими відростками, з перинуклеарним потовщенням. Базофільна дрібнозерниста цитоплазма займала невеликий об'єм. Усі клітини були одноядерні, багатоядерних відмічено не було. Ядра в клітинах великі, округлі, світлі, з 2–3 чітко сформованими ядерцями. Ядерна оболонка чітка, округла, без інвагінацій чи пошкоджень. Мітозів не спостерігалось, клітини знаходились в активно синтетичному стані (рис. 1).

Морфологічна характеристика клітин лінії DU-145, інкубованих зі Спн (5,0 мМ). Додавання у культуральне середовище 5,0 мМ Спн індувало апоптоз. Клітини втрачали відростки, ставали округлими, виникали мембранні пухирці та апоптотичні тільця. Плазматична мембрана часто втрачала свої контури, були помітні везикули, що відшнуровувалися від неї. Ядра та ядерні структури не відрізнялись. Відмічався інгібуючий вплив на ріст пухлинних клітин (рис. 2).

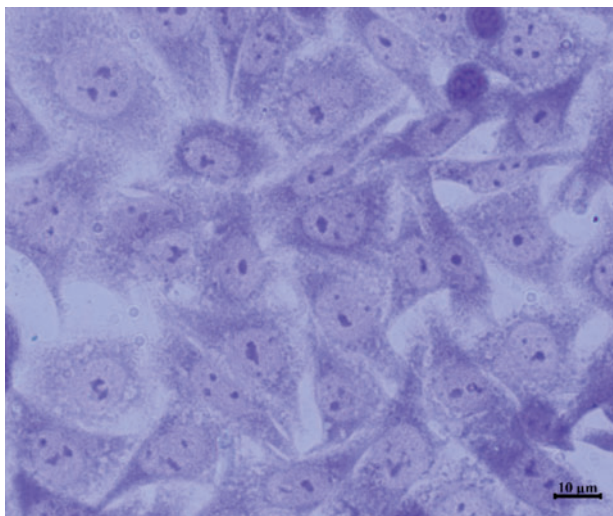
Морфологічна характеристика клітин лінії DU-145, інкубованих з ХГ (30,0 мкМ). У більшості клітин, що культивувалися у присутності 30,0 мкМ ХГ, виявили морфологію, аналогічну клітинам інтактного контролю (рис. 3). Пірамідальної форми клітини мали стандартні розміри і типові еухроматичні ядра, світлу дрібнозернисту цитоплазму.



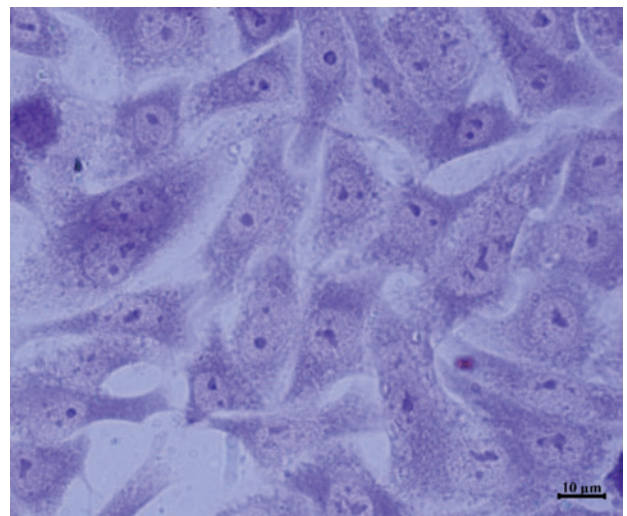
1.1. Щільно розташовані клітини полігонально-відростчастої форми, з великими світлими ядрами (зб. $\times 1000$).



1.2. Одноядерні клітини, світлі ядра з 2–3 ядерцями (зб. $\times 1000$).

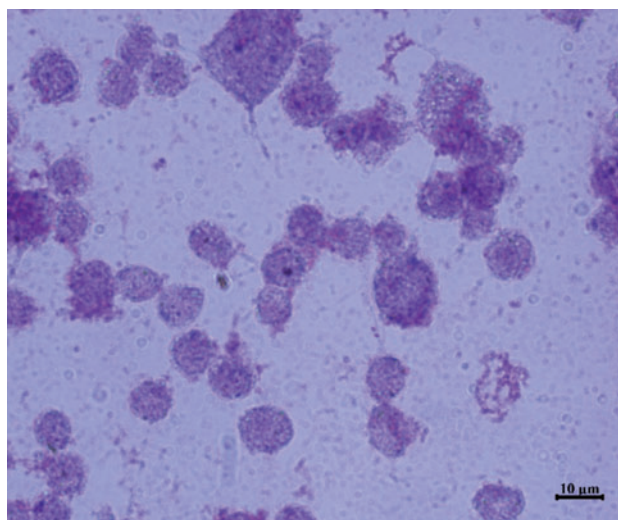


1.3. Великі веретеноподібні клітини зі світлою цитоплазмою (зб. $\times 1000$).

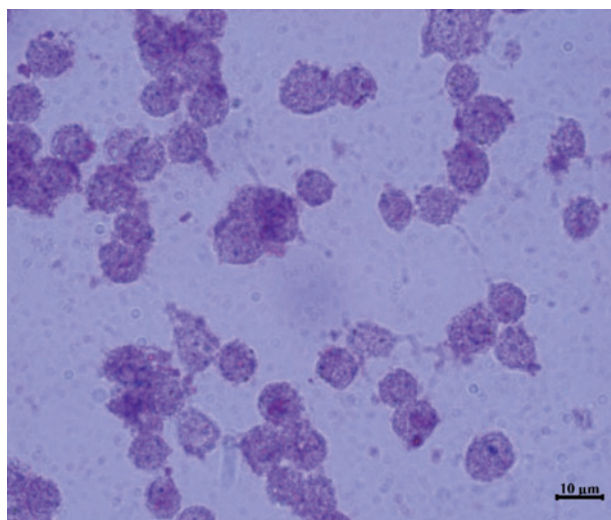


1.4. Клітини в інтерфазі, в активно синтетичному стані (зб. $\times 1000$).

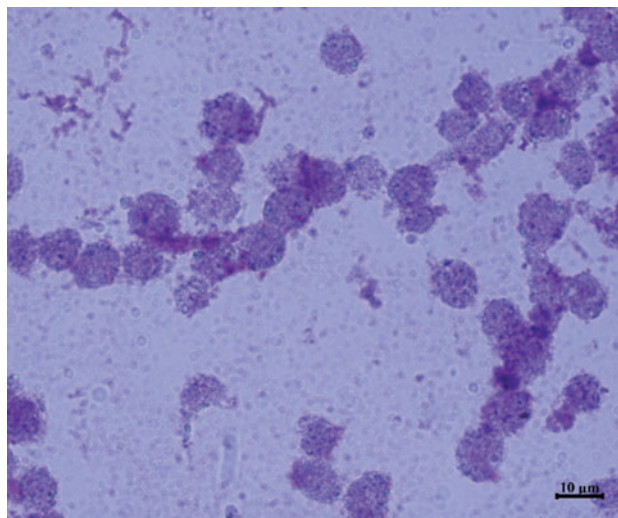
Рис. 1. Морфологія клітин лінії DU-145 у контролі. Забарвлення гематоксиліном та еозином



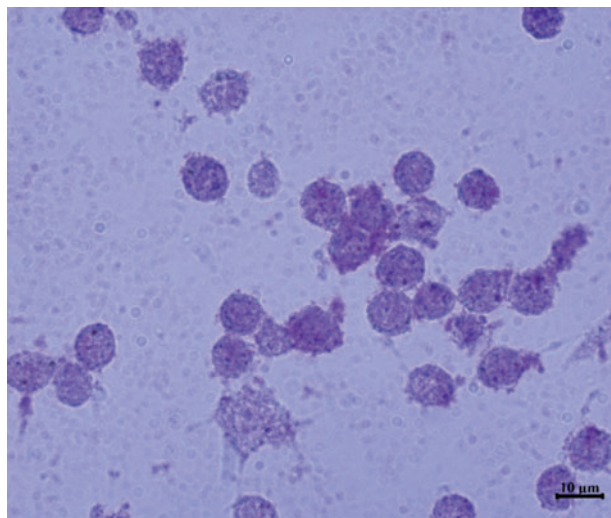
2.1. Круглі темні клітини з конденсованим хроматином (зб. $\times 1000$).



2.2. Оболонка деяких клітин зруйнована, помітні апоптотичні везикули (зб. $\times 1000$).



2.3. Клітини в стані апоптозу. Помітні зруйновані клітини (зб. $\times 1000$).



2.4. Клітини без відростків, зі зруйнованою мембраною (зб. $\times 1000$).

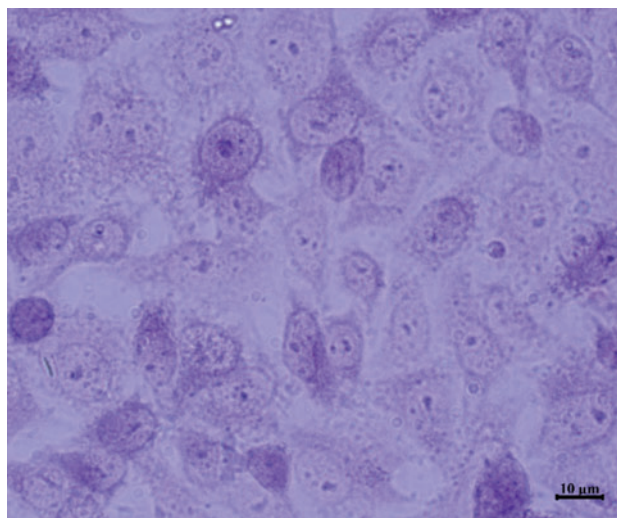
Рис. 2. Зміни морфології клітин лінії DU-145 при їх інкубації зі сперміном у концентрації 5,0 мМ. Забарвлення гематоксиліном та еозином

Всі клітини знаходились в інтерфазі, в активно-синтетичному стані, проте зустрічалися і темні круглі клітини з конденсованими ядрами (рис. 3.4). Подібність морфології клітин, які піддалися впливу ХГ, до морфології інтактного контролю можна пояснити тим, що під дією антисептика відбулася певна селекція: чутливі клітини загинули і відокремилися від субстрату; водночас клітини стійкої до ХГ субпопуляції швидко відновили моношар нормальної щільності.

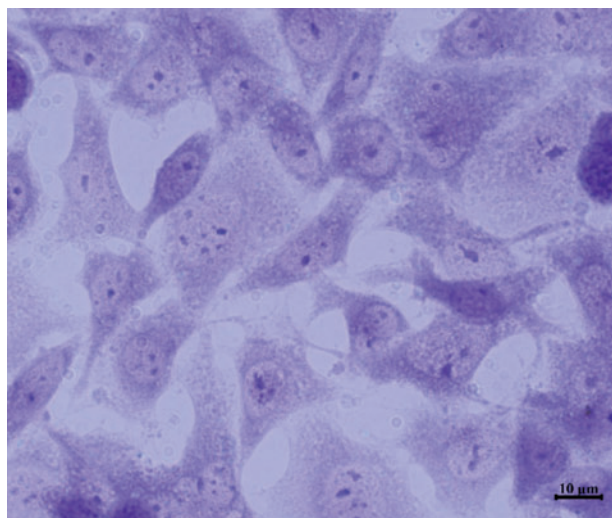
Морфологічна характеристика клітин лінії DU-145 при поєднаній дії Спн та ХГ (3,0 мМ та 10,0 мкМ відповідно). Під впливом комбінації Спн та ХГ у зазначених концентраціях клітини втрачали типову форму, ставали округлими без відростків, їх мембрана мала нечіткі контури. Зустрічалися клітини

як з неушкодженою, так і зі зруйнованою мембраною. В клітинах відмічалися апоптотичні тільця. Хроматин конденсований, темний, розташований біля ядерної оболонки. У деяких клітинах помітна ядерна фрагментація. Мітозів не спостерігалось. В клітинах відмічався апоптоз (рис. 4).

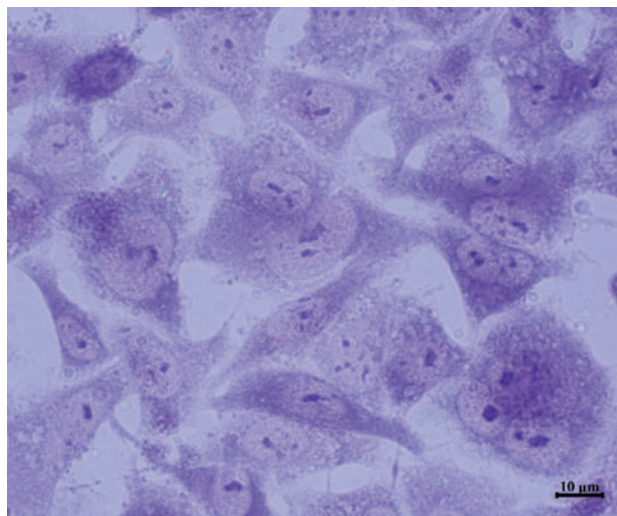
Таким чином, клітини РПЗ гормононезалежної лінії DU-145 при введенні в культуральне середовище Спн (5,0 мМ), або Спн (3,0 мМ) і ХГ (10,0 мкМ) одночасно, показали типову апоптотичну морфологію: клітини округлилися та відокремилися одна від одної і від субстрату (див. рис. 2 та рис. 4). Водночас дія одного лише ХГ (30,0 мкМ) у переважній більшості не вплинула на морфологію клітин, які практично не відрізнялися від клітин інтактного контролю (див. рис. 3.1, 3.2., 3.3).



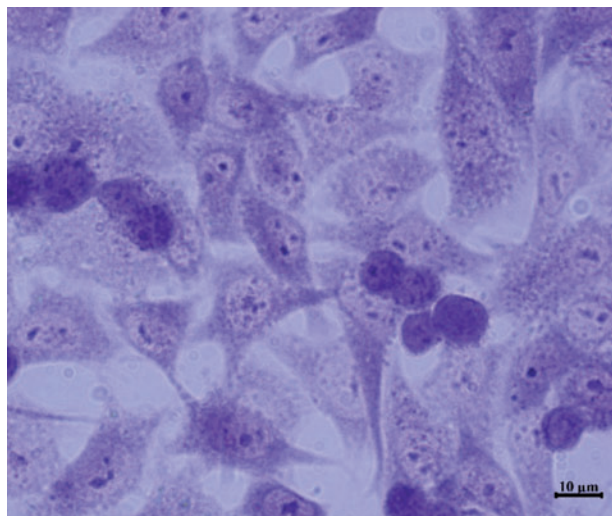
3.1. Клітини, за морфологією подібні до контролю (зб. $\times 1000$).



3.2. Більшість клітин веретеноподібні, з великими світлими ядрами (зб. $\times 1000$).



3.3. Типові клітини лінії DU145, з відростками, світлі округлі ядра. Клітини в інтерфазі (зб. $\times 1000$).



3.4. Спостерігаються клітини в апоптозі. Морфологічна картина може свідчити про порушення живлення та дихання в умовах щільного клітинного моношару (зб. $\times 1000$).

Рис. 3. Зміни морфології клітин лінії DU-145 при їх інкубації з хлоргексидином (30,0 мкМ). Забарвлення гематоксилином та еозином

ВИСНОВКИ

1. Спермін у концентраціях 1,5–10,0 мМ та хлоргексидин у концентраціях 10,0–30,0 мкМ, застосовані окремо, проявляють цитотоксичну дію на клітини раку передміхурової залози лінії LNCaP і лінії DU-145 в культурі. Комбіноване їх застосування значно підсилює цитотоксичний ефект на клітини андрогензалежної лінії LNCaP.

2. Цитотоксичні властивості як сперміну, так і хлоргексидину, достовірно сильніше виражені за дії на гормонозалежну лінію клітин LNCaP, ніж на гормононезалежну DU-145.

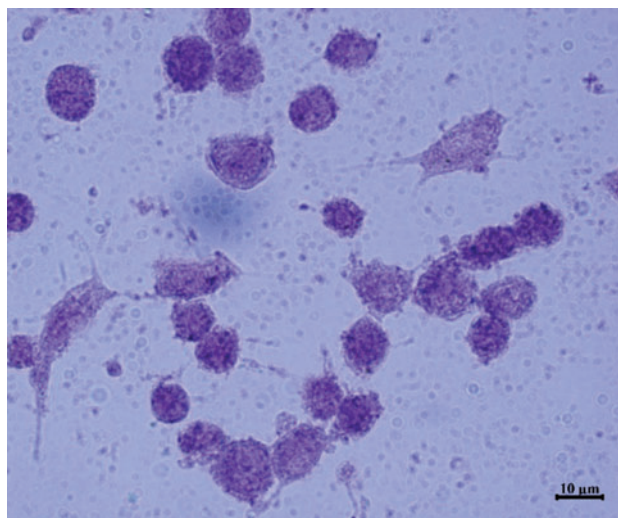
3. Хлоргексидин, як і спермін, викликає інверсію поверхневого заряду клітин РПЗ людини

in vitro, змінюючи його знак з від'ємного на позитивний.

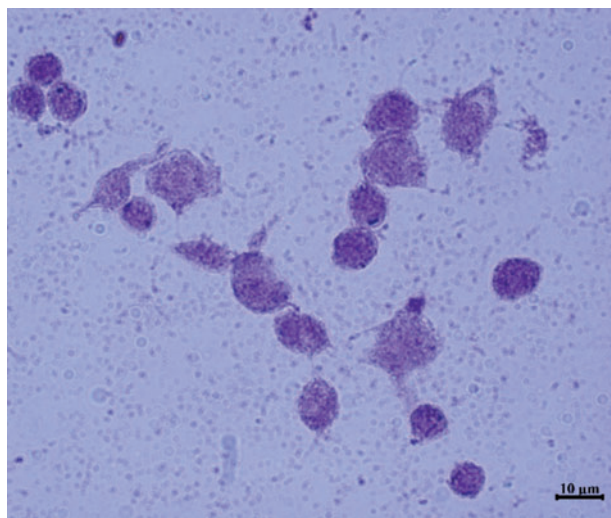
4. Спермін та хлоргексидин імовірно конкурують за сайти зв'язування на поверхні клітин лінії LNCaP; про що свідчать відмінності впливу на поверхневий заряд клітин даних сполук, застосованих як окремо, так і разом.

5. Виявлені відмінності у характері змін виживаності і електрокінетичних параметрів клітин ліній LNCaP та DU-145 можуть пояснюватися наявністю або відсутністю рецепторів зв'язування андрогенів на їх поверхневій мембрані.

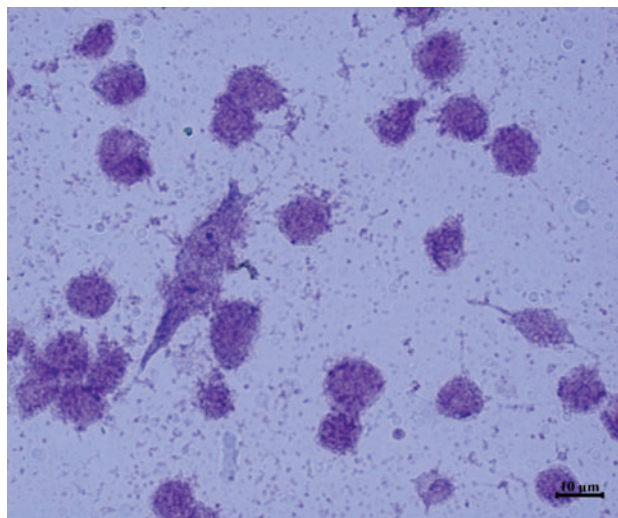
6. Не виключено, що спермін не справляє цитотоксичної дії на клітини лінії DU-145, які перебувають у певних фазах клітинного циклу.



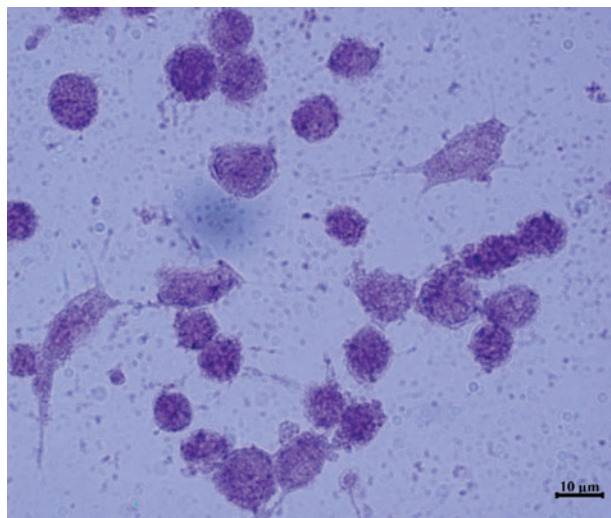
4.1. Округлі клітини з ядерною фрагментацією (зб. $\times 1000$).



4.2. Конденсований хроматин в круглих клітинах (зб. $\times 1000$).



4.3. Зруйновані клітини (зб. $\times 1000$).



4.4. Апоптотичні тільця (зб. $\times 1000$).

Рис. 4. Зміни морфології клітин лінії DU-145 після комбінованої дії сперміну (3,0 мМ) та хлоргексидину (10,0 мкМ). Забарвлення гематоксиліном та еозином

7. Клітини лінії DU-145 при введенні в культуральне середовище сперміну, або сперміну і хлоргексидину разом, демонстрували типову апоптотичну морфологію: вони округлялися та відокремлювалися одна від одної і від субстрату, були відмічені конденсація хроматину, розмиті контури поверхневої мембрани, ядерна фрагментація і наявність апоптотичних тілець.

Робота виконана в рамках НДР “Експресія фактора транскрипції NF- κ B і ферментів обміну поліамінів, рівні поліамінів та активність РНК-аз в пухлинах передміхурової залози як потенційні критерії прогнозу перебігу захворювання” (№ держреєстрації 0118U005467).

Подяка: висловлюємо щиру вдячність канд. біол. наук, ст. наук. співр. Лиховій О.О. та аспі-

ранту Віричу П.А. за консультативну і практичну допомогу під час досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedorenko Z, Sumkina O, Goroh Ye, et al. Cancer in Ukraine, 2021–2022. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service. Bull Natl Cancer Reg Ukr; Kyiv, 2023; (24): 148 p. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/index.htm (in Ukrainian).
2. Zaletok SP, Klenov OO, Bentrud VV, et al. Polyamines in prostate cancer: the relationship with the aggressiveness of tumors and the risk of disease progression. Oncology 2023; 25 (2): 128–38. doi: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.02.128> (in Ukrainian).
3. 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. doi: [10.1016/j.celrep.2023.112798](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112798).

4. Casero Jr RA, Murray ST, Pegg AE. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**: 681–95. doi: 10.1038/s41568-018-0050-3.
5. 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**: 4382. doi: 10.3390/ijms22094382.
6. 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).
7. Lakin GF. *Biometrics*. M: Higher School, 1990. 352 p. (in Russian).
8. Yanish YuV, Prylutskyi MP, Voronina OK, Zaletok SP. The influence of spermine and aminoguanidine on the morpho-functional 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).

THE INFLUENCE OF SPERMINE AND CHLORHEXIDINE ON THE SURVIVAL, ELECTROKINETIC AND CYTOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

Yu. V. Yanish¹, M. P. Prylutskyi¹, I. O. Sumnikova¹, O. O. Klenov¹, V. O. Stashenko¹, V. V. Bentrad¹, O. K. Voronina², S. P. Zaletok¹

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

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to study the effects of spermine and the spermine oxidase inhibitor chlorhexidine, applied alone or in combination, on the viability, electrokinetic and structural-functional characteristics of human prostate cancer cells in vitro. **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 by the method of exclusion of the vital dye trypan blue by living cells. The electrokinetic parameters of the cells (ζ -potential and total surface charge density) were determined according to the Smoluchovsky and Quincke-Helmholtz equations. Morphological changes were assessed by light microscopy of fixed preparations of cells stained with hematoxylin and eosin. **Results:** spermine at a concentration of 1.5 mM exhibits inhibitory effect on the growth of differentiated prostate cancer cells of the LNCaP line, which consists in reducing their survival to $48.5 \pm 1.5\%$ compared to intact control, and when this factor is used in a concentration exceeding 5.0 mM — in their death. It was shown that poorly differentiated cells of the DU-145 line were resistant to its influence: their survival decreased to $56.0 \pm 1.9\%$ only under the influence of spermine at a concentration of 5.0 mM; a concentration of 10.0 mM caused complete cell death of both lines. The trend persisted in the case of chlorhexidine: under its influence at a concentration of 15.0 μM , the survival of cells of the hormone-dependent LNCaP line was $33.0 \pm 1.5\%$, and the hormone-independent DU-145 cell line was $79.0 \pm 2.5\%$. The combined use of spermine and chlorhexidine (0.6 mM and 3.2 μM , respectively)

caused a strong cytotoxic effect in cells of the LNCaP line (survival $19.0 \pm 1.2\%$), while cells of the DU-145 line maintained a fairly high rate ($76.0 \pm 2.1\%$) even with a significantly higher content of spermine (3.0 mM) and chlorhexidine (5.0 μM) in the culture medium. It was established that under the influence of chlorhexidine, the cells of both studied lines show an inversion of the sign of the surface electric charge. Certain quantitative differences in the electrokinetic indicators of cells of hormone-dependent and hormone-independent lines were revealed. Cells of the DU-145 line under the influence of spermine, or simultaneously spermine and chlorhexidine, showed a typical apoptotic morphology. **Conclusions:** spermine in concentrations of 1.5–10.0 mM and chlorhexidine in concentrations of 10.0–30.0 μM , applied separately, have a cytotoxic effect on human prostate cancer cells of LNCaP and DU-145 lines. Cytotoxic properties of spermine, chlorhexidine or their combination are more pronounced when acting on the hormone-dependent LNCaP line cells than on the hormone-independent DU-145 line. Their combined use demonstrates a significantly higher cytotoxic effect on cells of the LNCaP line, which is not observed in the DU-145 cell line. Chlorhexidine, like spermine, causes an inversion of the surface charge in the cell lines, changing its sign to positive. The revealed differences like changes in survival and electrokinetic parameters of LNCaP and DU-145 cells can be explained by the presence or absence of androgen binding receptors on their surface membrane. Cells of the DU-145 line under the influence of spermine, or at the same time spermine and chlorhexidine, go to the state of apoptosis, as well as cells of the LNCaP line when they are exposed to spermine.

Keywords: spermine, chlorhexidine, LNCaP, DU-145, ζ -potential, surface charge, cytomorphological characteristics, apoptosis.

Адреса для листування:

Яніш Ю.В.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: yanish.yuriy@gmail.com

Одержано: 23.10.2023