О.О. Кленов,
https://orcid.org/0009-0003-6630-1607
І.О. Сумнікова,
https://orcid.org/0009-0004-1382-0507
Н.П. Юрченко,
https://orcid.org/0009-0008-7515-991X
Ю.В. Яніш,
https://orcid.org/0009-0006-8485-1233

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

DOI: https://doi.org/10.15407/oncology.2026.03.157

КОМБІНОВАНИЙ ВПЛИВ СПЕРМІНУ ТА СИЛІБІНІНУ НА КЛІТИНИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВИ ПРЕВЕНТИВНОГО ПРИГНІЧЕННЯ КАТАБОЛІЗМУ СПЕРМІНУ

Дана робота завершує серію досліджень, присвячених пошуку сполук і методичних підходів, що сприяють реалізації цитотоксичної та проапоптотичної дії сперміну (Spn) на клітини раку передміхурової залози (РПЗ) in vitro. ***Мета:*** *розробка методу підсилення цитотоксичної і проапоптотичної дії Spn, інгібітора альдегіддегідрогенази (ALDH) силібініну (Sil) та їх комбінації на клітини РПЗ in vitro за рахунок превентивного пригнічення активності спермінoксидази (SMOX) хлоргексидином (Clh).* ***Об'єкт і методи:*** *об'єкт досліджень — андрогенчутливі клітини РПЗ людини лінії LNCaP та андрогенрезистентні клітини лінії DU-145. Для превентивного пригнічення катаболізму Spn використовували інгібітор SMOX хлоргексидин. Подальше культивування клітин відбувалося з Spn та інгібітором ALDH силібініном (Sil), з кожним окремо або з їх комбінацією. Концентрації Sil і Spn дорівнювали відповідним значенням IC_{50}, визначеним при застосуванні їх у монорежимі та при комбінованій дії. Ефект впливу сполук тестували за змінами виживаності клітин, їх цитоморфологічних ознак, змінами профілю основних поліамінів (ПА) та їх ацетильованих форм (N^1-АсПА), фіксували зміни молярного співвідношення спермідин/спермін (Spd/Spn).* ***Результати:*** *для клітин обох ліній визначені інгібуючі концентрації (IC_{50}): для Clh у монорежимі; після превентивного пригнічення SMOX для Sil і Spn як окремо, так і в комбінації. На тлі превентивного пригнічення SMOX клітини LNCaP не змінювали чутливості до Sil та Spn при їх комбінованому впливі у порівнянні з дією кожної з цих сполук окремо. Клітини DU-145 значно сильніше реагували на Sil в присутності Spn, хоча демонстрували суттєво вищу стійкість ніж LNCaP за стабільної чутливості до Spn. За умови превентивного пригнічення катаболізму Spn виживаність клітин ліній LNCaP та DU-145 при комбінованому впливі Sil і Spn зменшилася (на 20,6 і на 57,5% відповідно), у порівнянні з їх застосуванням без Clh. Профіль ПА в клітинах LNCaP свідчив про активацію синтезу і стимуляцію процесів інтерконверсії при дії комбінації Sil та Spn на тлі превентивного пригнічення активності SMOX, що підтверджувалося значним зростанням вмісту ацетильованої форми Spn. В клітинах DU-145 в тих же умовах відбувалося одночасне підсилення прямого синтезу і пригнічення інтерконверсії ПА.* ***Висновки:*** *за умови превентивного пригнічення катаболізму Spn його комбінація з Sil викликала у клітин LNCaP більш виражений цитотоксичний, а у клітин DU-145 — проапоптотичний ефекти. Під впливом Sil та Spn у клітинах LNCaP активувалися синтез та інтерконверсія ПА, тоді як у клітинах DU-145 активація синтезу ПА супроводжувалася пригніченням їх інтерконверсії. Розбалансування кінцевої ланки обміну ПА доводило ефективність превентивного пригнічення катаболізму Spn перед подальшим його комбінованим застосуванням з Sil.*

Ключові слова: *рак простати, лінії клітин LNCaP та DU-145, хлоргексидин, спермін, силібінін, цитоморфологія, поліаміни.*

Цитування: Кленов О.О., Сумнікова І.О., Юрченко Н.П., Яніш Ю.В. Комбінований вплив сперміну та силібініну на клітини раку передміхурової залози за умови превентивного пригнічення катаболізму сперміну. Онкологія. 2026. 28, № 3. С. 157–164. https://doi.org/10.15407/oncology.2026.03.157

© PH "Akademperiodyka" of the NAS of Ukraine, 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Рак передміхурової залози (РПЗ) є найпоширенішим злоякісним новоутворенням у чоловіків. В Україні він становить 14,5% від усіх випадків таких захворювань. Станом на 2025 р. зареєстровані 61873 хворих на РПЗ, з них вперше — 8390, смертність сягнула 2604 осіб [1]. Незважаючи на інтенсивні дослідження та відпрацювання методик діагностики і терапії, ефективність лікування таких хворих потребує подальшої оптимізації. Вміст поліамінів (ПА) в клітинах РПЗ, як і в інших пухлинних клітинах, підвищується. Проте у ряді досліджень показано, що в клітинах злоякісних новоутворень передміхурової залози (ПЗ) рівень сперміну (Spn) суттєво нижчий, ніж в клітинах прилеглої нормальної тканини або доброякісної гіперплазії ПЗ [2, 3]. Це явище стало підґрунтям для пошуку шляхів нормалізації вмісту Spn у пухлинних клітинах і подальшого вивчення впливу Spn на їх ріст. В експериментах з андрогенчутливими та андрогенрезистентними клітинами культивованих ліній РПЗ, які походять від пухлин з різною агресивністю росту, було встановлено, що застосований у монорежимі екзогенний Spn демонстрував не тільки цитотоксичні властивості, але й сприяв апоптотичній загибелі клітин [4]. Комбінована дія Spn з інгібіторами активності альдегіддегідрогнази (ALDH) призводила до посилення цих ефектів, вочевидь, за рахунок пригнічення шляхів детоксикації альдегідів, які утворювалися при окисненні Spn і самої ALDH, що отримало назву *тандемного альдегідного шоку* [5]. Дослідження вказаних явищ було продовжено за умови превентивного пригнічення катаболізму Spn інгібітором активності сперміноксидази (SMOX) хлоргексидином (Clh).

Clh являє собою антисептичний діамід, який зазвичай використовують як бактерицидний та бактеріостатичний засіб. Показано, що Clh діє як сильний конкурентний інгібітор ферментів N^1-ацетилполіаміноксидази (PAOX) і SMOX, які беруть участь у катаболізмі ПА [6]. Також продемонстрований прямий протипухлинний вплив Clh [7]. Для ряду злоякісних новоутворень виявлена кореляція між хронічним запаленням, виникненням та ростом пухлин і підвищеним рівнем SMOX [7]. Зв'язок між експресією SMOX та перебігом онкологічного захворювання зумовив спроби впливу на цей фермент з метою пригнічення пухлинного росту.

Сполуки рослинного походження привертають увагу своєю здатністю впливати на пов'язані з розвитком раку сигнальні шляхи та широким спектром біологічної дії, який включає антиоксидантну і протизапальну активність, вплив на ріст, інвазивність та апоптоз пухлинних клітин [8, 9]. Серед таких сполук важливе місце посідають флавоноїди, клас поліфенольних речовин, які широко зустрічаються у фруктах, овочах та лікарських рослинах і практично нетоксичні.

Силібінін (Sil) — природний флавонолігнан, виділений з розторопші плямистої (*Silybum marianum* L.). Він має гепатопротекторні, нейропротекторні, протиракові та імуномодулюючі властивості [10]. Завдяки своїм протизапальним, антиоксидантним та антифіброзним властивостям Sil застосовується для лікування широкого спектру патологій печінки, включно з хронічними захворюваннями, цирозом та гепатоцелюлярною карциномою [11]. Він продемонстрував інгібуючий ефект щодо різних пухлин, таких як рак молочної залози, нирок, сечового міхура, легені, товстої кишки та печінки у дослідженнях *in vitro* та *in vivo* [12].

Sil діє шляхом пригнічення проліферації пухлинних клітин, гальмування метастазування та індукції апоптозу. Він також сприяє підвищенню чутливості злоякісних клітин до цитотоксичних хіміотерапевтичних препаратів, що є одним з підходів до подолання лікарської резистентності, яка становить серйозну терапевтичну проблему [13]. Таким чином, антиоксидантні та протизапальні властивості Sil можуть протидіяти побічним ефектам хіміотерапії та покращувати реакцію пацієнтів на лікування. У випадку РПЗ Sil пригнічує інтегринний сигнальний шлях, тим самим знижуючи індуковану фібронектином рухливість та інвазивність клітин [14]. Він сприяє деградації андрогенних рецепторів через сигнальний шлях PI3K-Akt-Mdm2, пригнічуючи ріст пухлинних клітин та підвищуючи імовірність їх апоптозу [15]. Клінічні випробування з використанням високих доз Sil перед простатектомією демонстрували зниження рівнів простатоспецифічного антигену (PSA) та покращення терапевтичних результатів. Показана роль Sil в пригніченні окисного стресу. Його захисні властивості пов'язують з антиоксидантною активністю та здатністю до інактивації вільних радикалів [16]. Також відомо, що Sil може знижувати проліферацію клітин шляхом внутрішньоклітинного накопичення іонів Ca^{2+} [17].

ПА виявлено в клітинах практично всіх організмів. Позитивні заряди дозволяють їм зв'язуватися з ДНК, РНК, білками та кислими фосфоліпідами. Завдяки цим взаємодіям ПА модулюють численні клітинні функції: ріст, проліферацію, диференціацію, міграцію клітин, регуляцію генів, синтез білків та нуклеїнових кислот, а також підтримують загальний окиснювальний гомеостаз клітин [18]. При катаболізмі ПА продукуються токсичні альдегіди, зокрема 3-амінопропаналь і ненасичений альдегід акролеїн. Ізоформи ALDH каталізують окиснення альдегідів до менш токсичних карбонових кислот [19]. У випадках раку з низькою експресією ALDH ефективними є традиційні хіміо- та променева терапія. Однак висока експресія ALDH зумовлює резистентність до таких методів лікування, тому інгібування ALDH у поєднанні з

традиційними терапевтичними засобами очікувано видається перспективним [20].

Метою дослідження була розробка методу підсилення цитотоксичної і проапоптотичної дії сперміну, інгібітора ALDH силібініну та їх комбінації на клітини РПЗ *in vitro* за рахунок превентивного пригнічення активності сперміноксидази хлоргексидином.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В якості тест-об'єктів використовували культури клітин РПЗ людини — андрогенчутливі клітини лінії LNCaP та андрогенрезистентні клітини лінії DU-145, отримані з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Умови культивування клітин, методи оцінки показників їх виживаності та обчислення індексу цитотоксичності IC_{50} докладно описані в [5]. При проведенні дослідження клітини протягом першої доби культивували в присутності ½ IC_{50} інгібітора SMOX Clh, після чого живильне середовище замінювали і подальше культивування відбувалося з Spn та інгібітором ALDH рослинного походження Sil, з кожним окремо або з їх комбінацією. Концентрації Sil і Spn дорівнювали відповідним значенням IC_{50}, визначеним як для випадків застосування їх у монорежимі, так і при комбінованому впливі. Виміри проводили у чотирьох повторах. Вплив діючих сполук тестували за морфологічними змінами (забарвлення фіксованих препаратів гематоксиліном і еозином); за змінами профілю основних ПА та їх ацетильованих форм (N1-АсПА). Профіль основних ПА та їх ацетильованих форм визначали методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [21]. Також фіксували зміни молярного співвідношення Spd/Spn, яке є показником рівня проліферації, оскільки перший відповідає за проліферативну активність пухлинних клітин, а другий — за їх диференціювання. Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням програм STATISTICA 6, Microsoft Excel. Достовірними вважалися розбіжності, більші за 5% ($p \leqslant 0{,}05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для обох клітинних ліній визначені інгібуючі концентрації (IC_{50}) досліджуваних сполук і їх зміни в залежності від способу використання. Результати наведені у *табл. 1*.

Таким чином підтвердилася пролонгована дія превентивного використання Clh, після якого IC_{50} і Sil, і Spn у комбінації зменшилися у 2–4 рази у порівнянні з їх комбінованим впливом без попереднього інгібування SMOX [5].

Відмінності між двома клітинними лініями (різними за чутливістю до гормонів) полягали у тому, що на тлі превентивного пригнічення SMOX за допомогою Clh у концентрації ½ IC_{50} (у монорежимі) андрогенчутливі клітини LNCaP не змінювали свою відповідь на комбінований вплив Sil та Spn порівнянно з дією кожної сполуки окремо. Натомість андрогенрезистентні клітини DU-145 за аналогічних умов виявилися значно чутливішими до Sil в присутності Spn. Водночас їх чутливість до власне Spn залишалася такою ж стабільною, як і у клітин LNCaP. Проте стійкість до Spn клітин DU-145 була суттєво вищою. Відомо, що внутрішньоклітинні андрогенні рецептори (AR; NR3C4) регулюють експресію генів шляхом взаємодії з ДНК, як фактори транскрипції [22]. Імовірно, у нашому випадку вони захищали клітини LNCaP від негативного впливу Sil, певна частка якого витрачалася на зв'язування з цими рецепторами.

Зміни морфології клітин LNCaP і DU-145 продемонстрували відмінності їх реакції на комбіновану дію Sil та Spn за умови превентивного пригнічення катаболізму останнього. У клітин LNCaP відзначався більш виражений цитотоксичний (*рис. 1*, *2*), а у клітин DU-145 — проапоптотичний (*рис. 3*, *4*) ефекти.

Клітини лінії LNCaP в інтактному контролі мали переважно полігональну форму з розвиненими псевдоподіями, великі округлі ядра з 1–4 ядерцями, деконденсований еухроматин, і у своїй більшості перебували в інтерфазі, зберігаючи високу транскрипційну активність (див. *рис. 1*).

Клітини лінії LNCaP при культивуванні за комбінованого впливу Sil (125 мкМ) і Spn (300 мкМ) після превентивного пригнічення активності SMOX за допомогою Clh у концентрації ½ IC_{50} (5,0 мкМ), втрачали характерну форму. Спостерігали вакуолізацію цитоплазми, каріопікноз, конденсацію хроматину, хоча значна частка ядер ще зберігала по 2–5 чітко візуалізованих ядерця. В даному випадку переважно проявлялася цитотоксична дія застосованих сполук (див. *рис. 2*).

Клітини DU-145 в інтактному контролі мали притаманну цій лінії веретеноподібну, а також

Таблиця 1

Зміни інгібуючих концентрацій (IC_{50}) Clh, Sil і Spn в залежності від режиму їх застосування

Лінія клітин	IC_{50} досліджуваних сполук, мкМ			
	Clh у монорежимі	Sil після дії $^1/_2$ IC_{50} Clh	Spn після дії $^1/_2$ IC_{50} Clh	Sil + Spn після дії $^1/_2$ IC_{50} Clh
LNCaP	10	125	300	125 (Sil) + 300 (Spn)
DU-145	15	500	500	125 (Sil) + 500 (Spn)

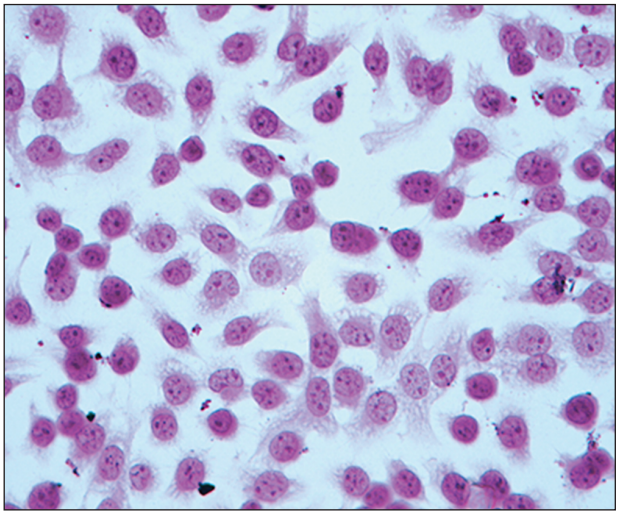


Рис. 1. Морфологія клітин лінії LNCaP, інтактний контроль. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. ×400

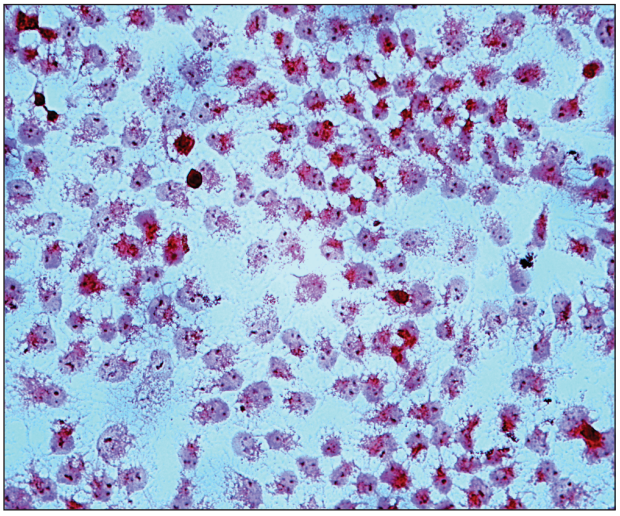


Рис. 2. Зміни морфології клітин лінії LNCaP за комбінованого впливу Sil (125 мкМ) і Spn (300 мкМ) після превентивного пригнічення катаболізму Spn за допомогою Clh у концентрації ½ IC_{50} (5,0 мкМ). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. ×400

полігональну форму. Філоподії та тонкі цитоплазматичні відростки сприяли міжклітинним контактам. Великі ядра мали по 2–3 чітко виражені ядерця (див. *рис. 3*).

В клітинах, які були культивованих за умов комбінованого впливу Sil (125 мкМ) і Spn (500 мкМ) після превентивного пригнічення активності SMOX за допомогою Clh у концентрації ½ IC_{50} (7,5 мкМ), відбувалася конденсація хроматину, вони втрачали форму і руйнувалися, демонструючи характерні ознаки апоптотичної загибелі (див. *рис. 4*).

При визначенні профілю ПА в андрогенчутливих клітинах лінії LNCaP не виявлено його суттєвих змін за умов культивування з Clh в концентрації ½IC_{50} (5,0 мкМ). Спостерігали незначне (на 6%) підвищення рівня Spn, очевидно за рахунок гальмування активності SMOX. Також зафіксовано неістотне (на 9%, $p > 0,05$) підвищення рівня спермідину (Spd). Останнє може бути обумовлене активацією спермідинсинтази (SPDSY), яка забезпечує утворення Spd з путресцину (Put), вміст якого також збільшувався (на 8,3%, $p > 0,05$) під впливом Clh. Рівень N^1-AcSpd практично перекри-

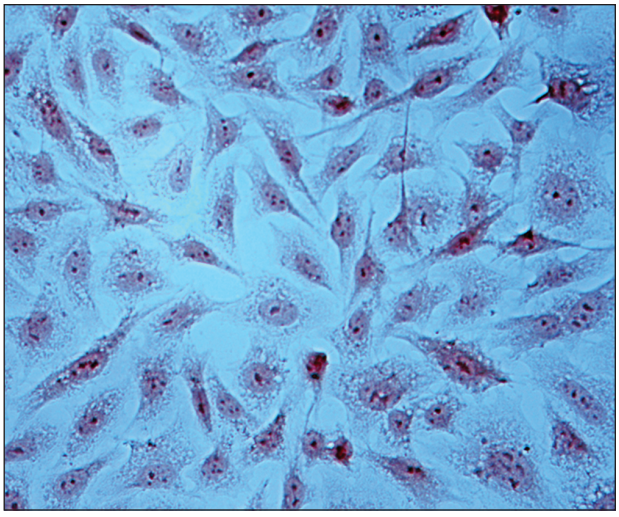


Рис. 3. Морфологія клітин лінії DU-145, інтактний контроль. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. ×400

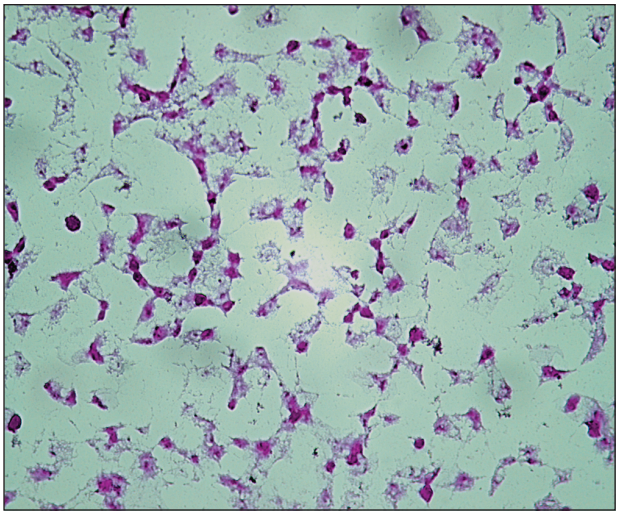


Рис. 4. Зміни морфології клітин лінії DU-145 за комбінованого впливу Sil (125 мкМ) і Spn (500 мкМ) після превентивного пригнічення катаболізму Spn за допомогою Clh в концентрації ½ IC_{50} (7,5 мкМ). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. × 400

вався з контрольними значеннями, вміст N^1-AcSpn зростав на 41,4%, можливо через те, що Clh стимулював активність Spd/Spn-ацетилтрансферази (SSAT). Молярне співвідношення Spd/Spn (показник проліферації) залишалося на рівні контрольних значень (*табл. 2*). Культивування клітин LNCaP з Sil після превентивного пригнічення SMOX викликало збільшення рівня N^1-AcSpn більш ніж в 4 рази, а Spd — на 45,5%. Рівень N^1-AcSpn зростав більш стрімко, ніж під впливом Clh у монорежимі; водночас вміст N^1-AcSpd достовірно знижувався на 20,4% (див. *табл. 2*).

З огляду на те, що Clh є інгібітором також N^1-ацетилполіаміноксидази (PAOX) та утруднює інтерконверсію ПА, такі результати підтвердили зроблене вище припущення про стимуляцію активності SSAT під впливом Clh, причому зростання кількості субстрату SSAT (Spn) за умови пригнічення SMOX було зафіксоване на недостовірному (менше 5%) рівні саме тому, що ацетилування Spn в системі Clh/Sil відбувалося швидше ніж під впливом Clh, застосованого в монорежимі. Зростання вмісту Spd наводить на думку, що вплив інгібітора ALDH (Sil) після превентивного пригнічення SMOX стимулює активність ферментів синтезу ПА загалом: у даному випадку збільшився не тільки рівень Spd, але й рівень його попередника Put (на 25%), що вказувало на активацію як SPDSY, так і ключового ферменту синтезу ПА — орнітиндекарбоксилази (ODC). Вплив Sil на тлі превентивного пригнічення SMOX за допомогою Clh викликав зростання молярного співвідношення Spd/Spn на 39%. Теоретично це свідчило про компенсаторне підвищення проліферативного потенціалу клітин і узгоджувалося зі значним зростанням пулу Spd, який сприяє їх росту.

Культивування клітин LNCaP з Spn після превентивного пригнічення SMOX за допомогою Clh в концентрації ½ IC_{50} викликало підвищення рівня Spn на 22,0%, очевидно за рахунок екзогенної сполуки та інгібування активності SMOX під впливом Clh. Рівень Put перевищував контрольні значення на 26,7%, а рівень Spd несуттєво зростав порівняно з контролем (на 7,7%) і практично дорівнював значенням при застосуванні Clh окремо. Як наслідок, показник Spd/Spn знижувався відносно контрольного значення на 11,4% (див. *табл. 2*).

При комбінованому впливі Sil та Spn на тлі превентивного пригнічення активності SMOX за допомогою Clh в концентрації ½ IC_{50} спостерігалася подальша тенденція накопичення пулу Put в клітинах LNCaP. Його рівень збільшувався майже вдвічі порівняно з контрольними показниками, що могло свідчити про підвищення активності ODC саме за рахунок впливу Sil водночас з інгібуванням PAOX під пролонгованою дією Clh. Також відмічали зростання рівня N^1-AcSpn: більш ніж вдвічі порівняно з контролем, але на 45,9% менше, ніж при дії Sil окремо; рівні Spd та Spn практично поверталися до контрольних значень. Внаслідок цього молярне співвідношення Spd/Spn також практично нормалізувалося (див. *табл. 2*).

Таким чином, в клітинах андрогенчутливої лінії LNCaP *in vitro*, після превентивного пригнічення активності SMOX за рахунок пролонгованої дії Clh, не тільки уповільнювався катаболізм Spn і відбувалося його накопичення, але й прискорювалося ацетилування наявного Spn. Проте, пригнічення активності PAOX знижувало інтенсивність процесів інтерконверсійного відновлення пулів Spd та Put. Натомість дія Sil, застосованого після попереднього впливу Clh, сприяла прямому синтезу ПА як завдяки стимулюванню утворення Put з орнітину, так і за рахунок синтезу Spd з Put — за умови активації відповідних ферментів, ODC та SPDSY. При комбінованому впливі Sil і Spn нормалізація рівня Spn, який становить головний інтерес даного дослідження, відбувалася завдяки переходу певної його частки в ацетильовану форму, зростання вмісту якої й було зафіксоване. Це свідчило про активацію інтерконверсійного відновлення пулу ПА, зокрема Spn. За змінами молярного співвідношення Spd/Spn можна при-

Таблиця 2

Вплив Clh в концентрації $^1/_2$ IC_{50} (в монорежимі), Sil, Spn та їх комбінацій після превентивного пригнічення активності SMOX на профіль ПА в андрогенчутливих клітинах LNCaP (пМ/мг білка)

ПА	Контроль	Clh (5,0 мкМ)	Clh (5,0 мкМ) + + Sil (125 мкМ)	Clh (5,0 мкМ) + + Spn (300 мкМ)	Clh (5,0 мкМ) + Sil (125 мкМ) + + Spn (300 мкМ)
Put	24,0 ± 2,5	26,0 ± 2,4	30,0 ± 1,8*	30,4 ± 3,5*	44,0 ± 4,0*
Spd	1496,8 ± 139,0	1631,6 ± 117,8	2177,8 ± 248,6*	1612,6 ± 127,8	1397,9 ± 114,9
Spn	1421,6 ± 147,5	1506,9 ± 219,7	1490, 6 ± 217,9	1733,7 ± 220,8*	1445,9 ± 115,6
N1-AcSpd	7668,4 ± 680,5	6617,9 ± 588,4	6104,4 ± 479,2*	6476,4 ± 674,8	6600,1 ± 658,4
N1-AcSpn	290,4 ± 30,6	410,6 ± 48,4*	1319,8 ± 124,7*	430,9 ± 35,4*	715,2 ± 79,3*
Spd/Spn	1,05 ± 0,06	1,08 ± 0,04	1,46 ± 0,08*	0,93 ± 0,06	0,97 ± 0,05
Виживаність клітин, %	97,0 ± 1,6	63,0 ± 2,0*	72,0 ± 2,5*	68,4 ± 1,6*	54,0 ± 2,8*

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 3

Вплив Clh в концентрації $^1/_2$ IC_{50} (в монорежимі), Sil, Spn та їх комбінацій після превентивного пригнічення активності SMOX на профіль ПА в андрогенрезистентних клітинах DU-145 (пМ/мг білка)

ПА	Контроль	Clh (7,5 мкМ)	Clh (7,5 мкМ) + + Sil (500 мкМ)	Clh (7,5 мкМ) + + Spn (500 мкМ)	Clh (7,5 мкМ) + Sil, (125мкМ) + + Spn (500 мкМ)
Put	1050,2 ± 84,0	1459,8 ± 175,2*	1014,9 ± 91,3	1779,0 ± 249,1*	2270,8 ± 227,1*
Spd	7573,4 ± 530,1	8147,8 ± 977,7	5678,4 ± 511,1*	9713,6 ± 945,3*	8734,9 ± 960,8
Spn	3689,6 ± 379,5	4097,9 ± 614,7	2722,3 ± 227,4*	8828,9 ± 790,8*	8091,0 ± 725,6*
N1-AcSpd	1854,2 ± 176,5	1947,2 ± 208,4	2973,8 ± 279,2*	1778,0 ± 174,8	2270,8 ± 226,8*
N1-AcSpn	938,8 ± 87,6	430,7 ± 46,5*	738,3 ± 84,8*	1102,0 ± 135,4	667,4 ± 72,9*
Spd/Spn	2,05 ± 0,08	1,98 ± 0,05	2,09 ± 0,08	1,10 ± 0,04*	1,08 ± 0,06*
Виживаність клітин, %	98,0 ± 1,5	79,0 ± 2,5*	68,0 ± 1,9*	62,0 ± 2,0*	45,0 ± 1,5*

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю.

пустити, що інгібітор ALDH Sil, застосований у монорежимі після превентивного пригнічення SMOX за допомогою Clh, стимулював проліферативний потенціал клітин лінії LNCaP (див. *табл. 2*).

В андрогенрезистентних клітинах лінії DU-145 визначений профіль ПА показав, що превентивне культивування з Clh в концентрації ½ IC_{50} (7,5 мкМ) викликало достовірне зростання пулу Put (на 39%, $p < 0,05$) і різке зниження пулу N^1-AcSpn (на 54,2%, $p < 0,05$) поряд з незначним підвищенням вмісту Spn (на 11,1%). Схоже, водночас була заблокована активність і PAOX, і SSAT, що призводило до компенсаторної активації ODC. Молярне співвідношення Spd/Spn неістотно знижувалося (*табл. 3*).

Культивування клітин DU-145 з Sil після превентивного пригнічення SMOX за допомогою Clh в концентрації ½ IC_{50} (7,5 мкМ) призводило до повернення до контрольних значень рівня Put і достовірного зниження вмісту Spd, Spn і N1-AcSpn (відповідно на 25,0; 26,2 та 21,4%, $p < 0,05$). В той же час рівень N^1-AcSpd зростав на 60,4%. Можливо, завдяки дії Sil відбувалося розблокування SSAT на етапі ацетилування саме Spd, і підвищений завдяки пролонгованій дії Clh пул Put був витрачений на цей процес. Молярне співвідношення Spd/Spn неістотно зростало на 5,4%.

Культивування клітин DU-145 зі Spn після превентивного впливу Clh викликало значне зростання вмісту всіх основних ПА у порівнянні з контрольними значеннями: Put на 69,4%, Spd на 28,3%, Spn — у 2,4 раза. Рівень ацетильованих форм Spd і Spn від контролю достовірно не відрізнявся. Оскільки мало місце активне захоплення клітинами екзогенного Spn, відмічали суттєве зниження молярного співвідношення Spd/Spn (на 42,3%, $p < 0,05$), яке свідчило про спад проліферативного потенціалу клітин (див. *табл. 3*).

При комбінованому впливі Sil та Spn на тлі превентивного пригнічення активності SMOX за допомогою Clh спостерігали накопичення Put в андрогенрезистентних клітинах DU-145. Збільшення його рівня у 2,2 раза порівняно з контрольними показниками може свідчити про підвищення активності ODC за рахунок впливу Sil водночас з інгібуванням PAOX під пролонгованою дією Clh, як це вже було показано для андрогенчутливих клітин LNCaP (*табл. 3*).

Рівень Spd в клітинах відповідав контрольним значенням, в той час як вміст Spn та N^1-AcSpd зростав, а рівень N^1-AcSpn зменшувався. Збільшення вмісту Spn, імовірно, зумовлене наявністю надлишкового екзогенного Spn поряд з інгібуванням SMOX, а зростання рівня N^1-AcSpd можна пояснити одночасним стимулюванням SSAT і пригніченням інтерконверсійного відновлення рівня Spd за рахунок інгібування PAOX. Зменшення вмісту N^1-AcSpn могло бути наслідком додаткового зниження активності SMOX за умов комбінованого впливу Sil та Spn на етапі ацетилування Spn. Це, в свою чергу, свідчило про специфічну вразливість кінцевої ланки синтезу/катаболізму ПА до синергічного впливу застосованих сполук (див. *табл. 3*).

Таким чином, в андрогенрезистентних клітинах РПЗ лінії DU-145 *in vitro*, після превентивного пригнічення активності SMOX за рахунок пролонгованої дії Clh, комбінований вплив Sil та Spn активував прямий синтез ПА і, водночас, уповільнювалася їх інтерконверсія.

Показники виживаності клітин РПЗ при синергічному впливі Sil і Spn після превентивного інгібування SMOX дають змогу побачити переваги даного підходу у порівнянні з застосуванням їх комбінації без Clh. Так, виживаність клітин лінії LNCaP зменшилася з 68,0 ± 2,4 [5] до 54,0 ± 2,8%, а клітин лінії DU-145 — з 72,0 ± 2,6 [5] до 45,0 ± ± 1,5% (на 20,6 та 57,5% відповідно, $p < 0,05$).

ВИСНОВКИ

1. Показана пролонгована дія Clh за умови його превентивного використання в концентрації ½ IC_{50}, що призводило до зменшення у 2–4 рази показників IC_{50} як для Sil, так і для Spn у

комбінації порівняно з їх сумісним впливом без попереднього інгібування SMOX.

2. Після превентивного інгібування SMOX з використанням Clh виживаність клітин ліній LNCaP та DU-145 при синергічному впливі Sil і Spn зменшилася, у порівнянні з застосуванням їх комбінації без Clh (відповідно на 20,6 і 57,5%).

3. Андрогенрезистентні клітини лінії DU-145, яким притаманний більш агресивний ріст, виявилися більш вразливими до комплексного впливу діючих сполук, використаних після превентивного інгібування SMOX з використанням Clh. Показник їх проліферації (молярне співвідношення Spd/Spn) знижувався вдвічі.

4. За умови превентивного пригнічення катаболізму Spn, при його комбінованому впливі з Sil, у клітин LNCaP відзначали більш виражений цитотоксичний, а у клітин DU-145 — проапоптотичний ефекти.

5. Зміни профілю ПА в андрогенчутливих клітинах лінії LNCaP під впливом комбінації Sil та Spn, за умови превентивного пригнічення катаболізму Spn, свідчили про активацію синтезу ПА, а також про активацію процесів їх інтерконверсії (відновлення рівнів Put за рахунок Spd та рівнів Spd за рахунок Spn).

6. Зміни профілю ПА в андрогенрезистентних клітинах лінії DU-145 під впливом комбінації Sil та Spn, за умови превентивного пригнічення катаболізму Spn, свідчили про активацію синтезу ПА і, водночас, пригнічення процесів їх інтерконверсії.

7. Розбалансування кінцевої ланки обміну ПА у клітинах лінії DU-145 доводило ефективність превентивного пригнічення катаболізму Spn перед подальшим його комбінованим застосуванням з Sil — для підсилення їх синергічної цитотоксичної та проапоптотичної дії, в першу чергу на низькодиференційовані, більш агресивні клітини РПЗ.

Подяка за консультативну і практичну допомогу висловлюється співробітникам ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України — к.б.н., с.н.с. О.О. Лиховій та інж. В.Г. Лупан.

Дослідження виконані в межах НДР за темою № 2.2.5.444 "Комбінована дія сперміну і модуляторів його катаболізму як перспективна модель лікування раку передміхурової залози" (2022–2026).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Fedorenko ZP, Sumkina OV, Gorokh EL, *et al.*** Cancer in Ukraine, 2024-25. Incidence, mortality, indicators of oncological service activity. Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine № 27: 61. Kyiv, 2026. http://ncru.inf.ua/publications/BULL_26/index.htm (in Ukrainian).
2. **Peng Q, Wong CY, Cheuk IW, *et al.*** The Emerging clinical role of spermine in prostate cancer. Int J Mol Sci 2021; **22** (9): 4382–402. https://doi.org/10.3390/ijms22094382.
3. **Zaletok SP, Klenov OO, Gogol SV, *et al.*** Blood and urine polyamines as new diagnostic markers of prostate cancer. Oncology 2019; **21** (3): 219–24. https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.7755. (in Ukrainian).
4. **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. https://doi.org/10.15407/oncology.2023.03.186. (in Ukrainian).
5. **Yanish YuV, Zaletok SP, Voronina OK, *et al.*** Combined action of a plant-original aldehyde dehydrogenase inhibitor and spemine on prostate cancer cells. Oncology 2025; **27** (4): 223–31. https://doi.org/10.15407/oncology.2025.04.223 (in Ukrainian).
6. **Cervelli M, Polticelli F, Fiorucci L, *et al.*** Inhibition of acetylpolyamine 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.
7. **Shin H, Kim Y, Lee Y, *et al.*** Chlorhexidine dihydrochloride shows anti-tumor effects in desmoid tumors and colorectal cancer. Anticancer Res 2024; **44** (12): 5435–43. https://doi.org/10.21873/anticanres.17369.
8. **Panche AN, Diwan AD, Chandra SR.** Flavonoids: An overview. J Nutr Sci 2016; **5**: e47. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41.
9. **Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J.** Flavonoids as anticancer agents. Nutrients 2020; **12**: 457. https://doi.org/10.3390/nu12020457.
10. **Zarenezhad E, Abdulabbas HT, Kareem AS, *et al.*** Protective role of flavonoids quercetin and silymarin in the viral-associated inflammatory bowel disease: An updated review. Arch Microbiol 2023; **205**: 252. https://doi.org/10.1007/s00203-023-03590-0.
11. **Federico A, Dallio M, Loguercio C.** Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. Molecules 2017; **22**: 191. https://doi.org/10.3390/molecules22020191.
12. **Nawaz A, Zaib S, Khan I, *et al.*** Silybum marianum: An overview of its phytochemistry and pharmacological activities with emphasis on potential anticancer properties. Anti-Cancer Agents Med Chem 2023; **23**: 1519–34 https://doi.org/10.2174/1871520623666230412111152.
13. **Iqbal MA, Chattopadhyay S, Siddiqui FA, *et al.*** Silibinin induces metabolic crisis in triple-negative breast cancer cells by modulating EGFR-MYC-TXNIP axis: Potential therapeutic implications. FEBS J 2021; **288**: 471–85. https://doi.org/10.1111/febs.15353.
14. **Deep G, Kumar R, Jain AK, *et al.*** Silibinin inhibits fibronectin induced motility, invasiveness and survival in human prostate carcinoma PC3 cells via targeting integrin signaling. Mutat Res Mol Mech Mutagen 2014; **768**: 35–46. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.05.002.
15. **Deep G, Oberlies NH, Kroll DJ, Agarwal R.** Isosilybin B causes androgen receptor degradation in human prostate carcinoma cells via PI3K-Akt-Mdm2-Mediated pathway. oncogene 2008; **27**: 3986–98. https://doi.org/10.1038/onc.2008.45.
16. **Muthumani M, Prabu SM.** Silibinin potentially protects arsenic-induced oxidative hepatic dysfunction in rats. Toxicol Mech Methods 2012; **22**: 277–88. https://doi.org/10.3109/15376516.2011.647113.
17. **Grijalba MT, Vercesi AE, Schreier S.** Ca^{2+}-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+}-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. Biochemistry 1999; **38**: 13279–87. https://doi.org/10.1021/bi9828674.

18. **Pegg AE.** Functions of polyamines in mammals. J Biol Chem 2016; **291**: 14904–12. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661.
19. **Püschel J, Dubrovska A, Gorodetska I.** The multifaceted role of aldehyde dehydrogenases in prostate cancer stem cells. Cancers (Basel) 2021; **13**: 4703. https://doi.org/10.3390/cancers13184703.
20. **Zanoni M, Bravaccini S, Fabbri F, Arienti C.** Emerging Roles of Aldehyde Dehydrogenase Isoforms in Anti-cancer Therapy Resistance. Front Med 2022; **9**: 795762 https://doi.org/10.3389/fmed.2022.795762.
21. **Klenov OO, Yanish YuV, Sumnikova IO.** The effect of aldehide dehydrogenase inhibitors and their combination with spermine on the profile of polyamines in human prostate cancer cell lines. Oncology 2025; **27** (1): 44 — 50. https://doi.org/10.15407/oncology.2024.02.112 (in Ukrainian).
22. **Kigili F, Ozen F, Catal T, Arslan BA.** Androgen Receptor (NR3C4) regulator potential of Ceratonia siliqua etxtract and it signaling pathways. Pharm Mag 2019; **15** (62): 1–4. https://doi.org/10.4103/pm.pm_588_18.

COMBINED EFFECT OF SPERMINE AND SILIBININ ON PROSTATE CANCER CELLS UNDER PREVENTIVE INHIBITION OF SPERMINE CATABOLISM

O.O. Klenov, I.O. Sumnikova, N.P. Yurchenko, Yu.V. Yanish

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

Summary. *This study concludes a series of investigations aimed at identifying compounds and methodological approaches that facilitate the cytotoxic and pro-apoptotic effects of spermine (Spn) on prostate cancer (PCa) cells in vitro.* ***Aim:*** *to develop a method for enhancing the cytotoxic and pro-apoptotic effects of Spn, the aldehyde dehydrogenase (ALDH) inhibitor silibinin (Sil), and their combination on PCa cells in vitro through the preventive inhibition of spermine oxidase (SMOX) activity using chlorhexidine (Clh).* ***Object and methods:*** *the study utilized androgen-sensitive human PCa cells (LNCaP line) and androgen-resistant cells (DU-145 line). Chlorhexidine, a SMOX inhibitor, was used to preventively inhibit Spn catabolism. Subsequent cell cultivation involved treatment with Spn and the ALDH inhibitor Sil, either individually or in combination. The concentrations of Sil and Spn corresponded to the IC_{50} values determined for both monotherapy and combination treatment. The effects of the compounds were assessed by monitoring changes in cell viability and cytomorphological characteristics, as well as alterations in the profiles of major polyamines (PAs) and their acetylated forms (N^1-AcPAs); changes in the spermidine/spermine (Spd/Spn) molar ratio were also recorded.* ***Results:*** *Inhibitory concentrations (IC_{50}) were determined for cells of both lines: for Clh in monotherapy; and for Sil and Spn –both individually and in combination — under conditions of preventive SMOX inhibition. With preventive SMOX inhibition, LNCaP cells showed no change in sensitivity to the combined action of Sil and Spn compared to the effect of each compound alone. DU-145 cells responded much more strongly to Sil in the presence of Spn, although they demonstrated significantly higher resistance than LNCaP cells while maintaining stable sensitivity to Spn. When Spn catabolism was preventively inhibited, the survival of LNCaP and DU-145 cells exposed to the combination of Sil and Spn decreased (by 20.6% and 57.5%, respectively) compared to treatment without Clh. The polyamine (PA) profile in LNCaP cells indicated activation of synthesis and stimulation of interconversion processes during combined Sil and Spn treatment with preventive SMOX inhibition, evidenced by a significant increase in the acetylated form of Spn. In DU-145 cells, the same conditions led to a simultaneous enhancement of direct synthesis and inhibition of PAs interconversion.* ***Conclusions:*** *With preventive inhibition of Spn catabolism, the combination of Spn and Sil induced a more pronounced cytotoxic effect in LNCaP cells and a pro-apoptotic effect in DU-145 cells. Under the influence of Sil and Spn, polyamine (PAs) synthesis and interconversion were activated in LNCaP cells, whereas in DU-145 cells, the activation of PAs synthesis was accompanied by the inhibition of their interconversion. The imbalance in the terminal stage of PAs metabolism demonstrated the efficacy of preemptively inhibiting Spn catabolism prior to its subsequent combined use with Sil.*

Keywords: prostate cancer, LNCaP and DU-145 cell lines, chlorhexidine, spermine, silybinin, cytomorphology, polyamines.

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: 24.08.2026
Рекомендовано до друку: 28.09.26
Підписано до друку: 02.11.2026

T.V. Zadvornyi,
https://orcid.org/0000-0003-3033-3976
P.A. Virych,
https://orcid.org/0000-0001-6201-3892
O.M. Mushii,
https://orcid.org/0000-0002-4666-9477
N.Y. Yatseniuk,
https://orcid.org/0009-0009-9941-7503
V.F. Chekhun,
https://orcid.org/0000-0003-1024-3703

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

DOI: https://doi.org/10.15407/oncology.2026.03.165

ASSESSMENT OF LABILE ZINC AND COPPER POOLS IN THE PROSTATE TUMOR MICROENVIRONMENT: A COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODOLOGICAL APPROACHES

Prostate cancer (PCa) is characterized by complex disturbances in cellular metabolism and remodeling of the tumor microenvironment, in which trace elements may play an important role. Zinc and copper are involved in the regulation of numerous enzymatic, metabolic, and signaling processes, and alterations in their intratissue homeostasis may accompany malignant transformation. Of particular interest are the labile pools of these metals, which reflect the fraction available for biochemical interactions and may serve as sensitive indicators of metabolic changes in tumor tissue. ***Aim:*** *to comparatively assess the levels of labile zinc and copper pools in the tissue of benign and malignant prostate neoplasms and to determine the methodological features of their fluorescent analysis.* ***Object and Methods:*** *the study was performed on tissue samples from 10 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and 15 patients with PCa. The fluorescent probes ZnAF-2F and Coppersensor 3 were used to determine labile forms of zinc and copper, followed by analysis using a microplate reader and digital fluorescence microscopy of FFPE sections.* ***Results:*** *according to the results obtained from unfixed PCa tissue, the level of labile zinc was 28.8% lower, whereas the copper level did not differ statistically from that in BPH samples. In the analysis of FFPE sections, the level of labile zinc in PCa tissue was 2.8-fold lower, whereas the copper level was 1.2-fold higher compared with BPH.* ***Conclusion:*** *the obtained results demonstrate a common trend toward a decrease in the labile zinc pool and preservation or elevation of copper levels during malignant transformation. Combining integral fluorometric and spatial digital analyses may provide a more comprehensive assessment of disturbances in metal homeostasis in PCa; however, the limitations of FFPE material should be taken into account.*

Keywords: *prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, zinc, copper.*

Prostate cancer (PCa) is one of the most common malignancies in men and remains an important medical and biological problem [1]. Despite significant advances in the diagnosis and treatment of this cancer, the factors determining the development of an aggressive phenotype remain unclear. Among the factors that substantially affect the functional state of tumor cells and their microenvironment, metals occupy a special place as trace elements essential for the functioning of a wide range of enzymes, transcription factors, and signaling systems. Disturbances in their intracellular and tissue homeostasis may significantly alter metabolic processes, redox status, and the proliferative and invasive activity of transformed cells [2–4].

Among the metals that are critical for the course and progression of PCa are zinc and copper, which play key roles in the regulation of apoptosis, oxidative stress, and metabolic reprogramming of malignant cells

Цитування: Zadvornyi TV, Virych PA, Mushii OM, Yatseniuk NY, Chekhun VF. Assessment of labile zinc and copper pools in the prostate tumor microenvironment: a comparative analysis of methodological approaches. Онкологія. 2026. 28, № 3. С. 165–171. https://doi.org/10.15407/oncology.2026.03.165

© PH "Akademperiodyka" of the NAS of Ukraine, 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

[5–7]. Zinc is a cofactor for more than 300 enzymes and an important component of transcription factors, superoxide dismutase, and various proteins involved in DNA repair [6]. The prostate has a unique biochemical profile that markedly distinguishes it from most other soft tissues of the human body. A hallmark of healthy prostatic epithelium is its exceptionally high zinc content, with zinc concentrations being substantially higher than those in other organs. This natural phenomenon is not merely the storage of a trace element but represents a fundamental basis of the specialized metabolic function of secretory cells, which is directed toward the excessive synthesis and accumulation of citrate [8, 9].

One of the most pathognomonic and pathophysiologically significant metabolic features of the malignant transformation of the glandular epithelium of the prostate is the loss of the cells' ability to accumulate zinc. A decrease in intracellular zinc levels may occur as early as the initial stages of carcinogenesis, before the appearance of pronounced histopathological changes, and may continue during disease progression. One of the key mechanisms underlying this phenomenon is impaired expression and function of zinc transporters of the ZIP (SLC39) and ZnT (SLC30) families, which regulate the uptake of Zn^{2+} into cells, its intracellular distribution, and its export. In particular, reduced expression of ZIP1 and other transporters capable of promoting zinc accumulation in prostatic epithelial cells is considered an important component of the molecular alterations associated with PCa development. At the same time, the biological role of zinc in malignant transformation is not limited to its involvement in citrate metabolism. Zinc is a structural and functional component of hundreds of proteins and enzymes and participates in the regulation of transcription, DNA repair, cell signaling, and apoptosis. Therefore, changes in its intracellular availability may affect numerous processes that determine tumor cell behavior [10, 11].

Another critically important trace element involved in cellular respiration, antioxidant defense, angiogenesis, and the function of enzymes responsible for extracellular matrix (ECM) remodeling is copper. Unlike zinc, the progressive depletion of which characterizes the early stages of oncogenic transformation of the glandular epithelium, the biological significance of copper in malignant neoplasms has a fundamentally opposite direction. The role of this trace element in oncogenesis is associated with its ability to act as a potent cofactor and driver of processes required for enhanced tumor growth, neoangiogenesis, and progression. Systemic and local disturbances in copper homeostasis have been described in a number of malignant neoplasms and are accompanied by its active accumulation in neoplastic tissue [2, 12]. Copper transport and intracellular availability are regulated, in particular, by the CTR1 transporter, ATP7A/ATP7B, and a number of intracellular chaperones [13].

Copper is of particular importance due to its role in ECM remodeling. Copper is required for the function of lysyl oxidases (LOX and LOXL1–4), enzymes that catalyze the oxidative cross-linking of collagen and elastin. Dysregulation of LOX-dependent matrix remodeling may alter its mechanical properties, promote the formation of a tumor-supportive microenvironment, and create conditions favorable for invasion and metastasis. Thus, changes in copper availability may be associated not only with the metabolic characteristics of tumor cells but also with remodeling of the stromal component of neoplasms [14, 15].

Given that Zn^{2+} and $Cu(I)/Cu^{2+}$ have distinct biological functions and exist in tissues as several interconnected pools, assessment of their total content does not always reflect the functionally available fraction of the metal. Of particular interest is the assessment of labile metal pools, which may directly participate in intracellular signaling and enzymatic processes. Fluorescent chemical probes are a promising tool for such investigations because they enable highly sensitive detection of metal ions while preserving information about their spatial distribution within tissues [16].

Therefore, comparative assessment of methods for the fluorescent detection of Zn^{2+} and Cu(I) in tissues of benign and malignant prostate neoplasms may be important for establishing methodological approaches to evaluating their homeostasis in PCa. The application of such approaches may potentially characterize differences between benign and malignant tissues not only in terms of metal levels but also in terms of their spatial availability, which may be relevant to understanding metabolic reprogramming, ECM remodeling, and the development of an aggressive PCa phenotype.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed on clinical material (tumor tissue) obtained from 10 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and 15 patients with PCa who underwent examination and treatment at the Center for Modern Urology (Kyiv, Ukraine) in 2023–2026 and provided informed consent for the use of their clinical data for scientific purposes. The age of patients with PCa ranged from 45 to 80 years, with a mean age of 63.0 ± 2.8 years. The mean age of patients with BPH was 66.1 ± 4.5 years. Patients were examined according to the standards for the diagnosis and treatment of patients approved by the Ministry of Health of Ukraine.

The clinical diagnosis was established based on serum prostate-specific antigen (PSA) levels, digital rectal examination, computed tomography of the pelvic organs and/or transrectal ultrasonography of the prostate and abdominal organs, bone scintigraphy, and chest radiography. In all patients, the diagnosis was verified by transrectal ultrasound-guided multifocal

prostate biopsy. Tumor stage was determined according to the International Classification of Tumors (TNM, 8th edition, 2016). Histological sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological tumor types were verified by microscopic examination according to the updated fifth edition of the WHO Classification of Urinary and Male Genital Tumours (2022) [17] and the 2014 consensus of the International Society of Urological Pathology (ISUP) [18]. Exclusion criteria were poor tissue preservation, low-quality histological material, and the administration of specific treatment at the time of diagnosis or surgical intervention. The study was approved by the Institutional Review Board and local Ethics Committee and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines.

Determination of Zinc and Copper Content in Prostate Neoplastic Tissue Using a Microplate Reader. Fluorescent probes ZnAF-2F (Sigma-Aldrich, USA) and Coppersensor 3 (Toronto Research Chemicals, Canada) were used to assess zinc and copper ions in prostate tissue, respectively. To prevent the loss of labile metal forms, the samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Frozen tissue was mechanically homogenized in a pre-cooled porcelain mortar until a homogeneous powder was obtained, with continuous cooling in liquid nitrogen. To ensure further disruption of cellular structures and extraction of labile ions, the resulting suspension was sonicated on an ice bath for 15 s.

For zinc and copper determination, 100 µL of the corresponding fluorescent probe solutions, ZnAF-2F and CS3, at concentrations of 10 µM and 2 µM, respectively, were added to 2 mg of cryopreserved tissue. The mixtures were vortexed for 30 s and incubated in the dark at 37°C for 40 min. After incubation, the suspensions were centrifuged at 13,000×g for 15 min at 4°C. The resulting supernatants were transferred to a black, flat-bottom 96-well microplate (Thermo Fisher Scientific, USA) at 100 µL per well. Working solutions of the corresponding fluorescent probes without biological material were used as blanks. Empty wells were used to determine the background fluorescence of the plate. Fluorescence intensity was measured using a Synergy HT microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) at an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 525 nm. The obtained values were used to assess the relative zinc and copper content in the studied samples. Measurements were performed in triplicate for each sample.

Determination of the Relative Levels of Labile Copper and Zinc Pools in Prostate Neoplastic Tissue Using Digital Microscopy. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples were used in the study. Tissue sections 5 µm thick were obtained using an AMR 400 microtome (Amos Scientific, Melbourne, Australia). Before fluorescent staining, the FFPE samples were deparaffinized in xylene, washed in 96% ethanol, and rehydrated in distilled water.

Fluorescent probes Coppersensor 3 and ZnAF-2F were used to assess the relative levels of labile Cu(I) and Zn^{2+} pools in prostate neoplastic tissue, respectively. Working solutions of CS3 at a concentration of 2 µM and ZnAF-2F at a concentration of 10 µM were used for staining. Incubation was performed for 30 min at 37°C. Staining was performed using the dropwise method by applying 30 µL of the corresponding fluorescent probe solution to the surface of each tissue section. To reduce nonspecific binding of the probes to the tissue, the sections were washed with PBS cooled to 4°C. The tissue was counterstained with DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, USA) for visualization of cell nuclei. Tissue autofluorescence was assessed using a negative control, in which 30 µL of PBS was applied to separate sections instead of the fluorescent probe solution.

The fluorescent signal was recorded using an Axio Scope A1 microscope (ZEISS GmbH, Germany) equipped with an HXP 120 fluorescence illuminator and a ZEISS Axiocam 820 color digital camera. Fluorescence was excited using a high-efficiency Carl Zeiss Filter Set 38 HE, featuring a blue excitation bandpass filter (BP 470/40), and the emission was recorded through a green emission bandpass filter (BP 525/50). The exposure times for imaging tissue stained with ZnAF-2F and CS3 were 500 and 1000 ms, respectively. At least 15 randomly selected fields of view were analyzed for each tissue sample. Fluorescence intensity was determined in micrographs using ImageJ v. 1.42 (https://imagej.nih.gov/ij/). The mean fluorescence intensity (MFI) in samples of benign and malignant prostate neoplasms was calculated using the following formula:

$$\mathrm{MFI} = \mathrm{Integrated\ Density}_{\mathrm{tissue}} - \left[\frac{\mathrm{Integrated\ Density}_{\mathrm{background}}}{\mathrm{Area}_{\mathrm{background}}} \times \mathrm{Area}_{\mathrm{tissue}}\right].$$

To determine the absolute fluorescence values, tissue autofluorescence was subtracted from the median values of the experimental samples.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v. 10 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Quantitative variables between two independent groups were compared using Student's *t*-test for parametric data or the Mann–Whitney U test for non-parametric data. Results were graphically presented as box-and-whisker plots, with the central line representing the median and the lower and upper boundaries of the box representing the first and third quartiles, respectively. The whiskers extending from the boxes indicate the minimum and maximum values in the studied groups, while black dots represent outliers. Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

As shown in *Fig. 1a*, the mean fluorescence intensity of the ZnAF-2F probe in unfixed BPH tissue was 11,985.0 ± 286.8 arbitrary units (a.u.), which was 28.8% higher ($p = 0.0242$) than that in PCa tissue (9,307.3 ± 718.4 a.u.). The mean fluorescence intensity of the CS3 probe was 5,490.9 ± 388.0 a.u. in PCa tissue and 5,347.3 ± 402.2 a.u. in BPH samples. No statistically significant differences in the levels of the labile copper pool were detected between the studied samples (*Fig. 1b*).

Subsequently, the levels of labile zinc and copper pools in fixed prostate tumor tissue were analyzed using fluorescence microscopy (*Fig. 2*). As shown in *Fig. 1c*, PCa tissue was characterized by a 2.8-fold lower level of labile zinc ($p < 0.0001$) compared with BPH tissue. In contrast, the level of the labile copper pool in PCa tissue was 1.2-fold higher ($p = 0.0400$) than that in BPH tissue (*Fig. 1d*).

Thus, our results clearly demonstrate that the absolute values and fold changes in the levels of labile zinc and copper pools depended substantially on the methodological approach used. In particular, considerable discrepancies were observed between the analysis of unfixed homogenized lysates using a microplate reader and spatial measurements performed on fixed histological sections (FFPE) by digital microscopy. Nevertheless, despite differences in absolute values and effect sizes, both methods demonstrated a consistent biological trend — a marked decrease in the labile zinc pool and preservation or elevation of copper levels during malignant transformation.

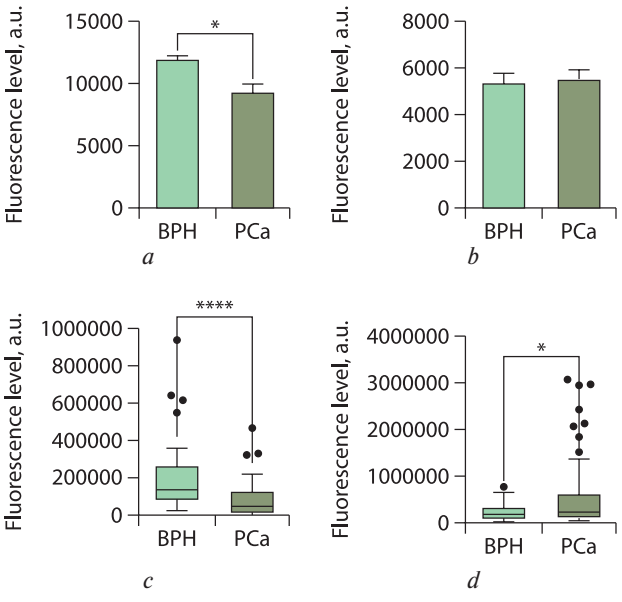


Fig. 1. Relative levels of labile zinc (*a* and *c*) and copper (*b* and *d*) pools in tissue from benign and malignant prostate neoplasms, as determined by microplate analysis (*a* and *b*) and quantitative digital microscopy (*c* and *d*)

Notes: * — statistically significant difference compared with BPH ($p < 0.05$); **** — statistically significant difference compared with BPH ($p < 0.0001$).

It should be emphasized that the labile pools of zinc and copper do not represent the absolute total content of these metals in tissue. Traditionally, the localization of zinc in archival histological material or paraffin blocks has been visualized using histochemical methods based on the formation of colored insoluble precipitates, such as the Timm sulfide-silver method [19]. Classical histochemical methods based on staining with rubeanic acid, rhodanine, and orcein are also successfully used to detect copper in tissues [20]. However, the use of fluorescent sensors opens up qualitatively new possibilities for assessing metal levels, particularly their labile pools, by providing high sensitivity and enabling their precise localization within cellular compartments and individual components of the tumor microenvironment.

A key advantage of using histological sections for the visualization and quantitative assessment of labile zinc and copper pools, compared with bulk approaches based on whole-tissue homogenized lysates, is the high spatial resolution. This analytical approach enables precise topological analysis directly within the neoplastic parenchyma.

The use of tissue sections allows detailed differentiation of the internal architecture of the neoplasm, which is not possible with integrated analysis of tissue homogenates. This method enables clear discrimination between the tumor parenchyma (malignant epithelium) and stromal components, as well as the exclusion of structural artifacts, glandular lumina, vascular spaces, and fibrotic areas from fluorescence intensity measurements. Such selection of regions of interest is particularly important because numerous heterogeneous components of prostate tissue, including structural proteins (collagen and elastin), cofactors (NAD(P)H and flavins), organelles (mitochondria and lysosomes), and erythrocytes, exhibit substantial autofluorescence. This endogenous background signal can significantly distort fluorimetric measurements if it is not spatially separated [21–23].

An additional fundamental advantage of spatial analysis using tissue sections is the possibility of parallel morphological assessment. Integration of specific fluorescent sensing of labile metal pools with conventional cytomorphological methods, such as fluorescent nuclear counterstaining with DAPI or routine hematoxylin and eosin staining, provides a unique opportunity to detect subtle local gradients of metal distribution.

At the same time, the use of sections prepared from FFPE tissue is associated with substantial limitations. In particular, fixation in 10% neutral buffered formalin cross-links free amino acid residues, including cysteine, histidine, and glutamic acid residues; however, a substantial proportion of the labile zinc pool does not form strong covalent bonds with proteins.

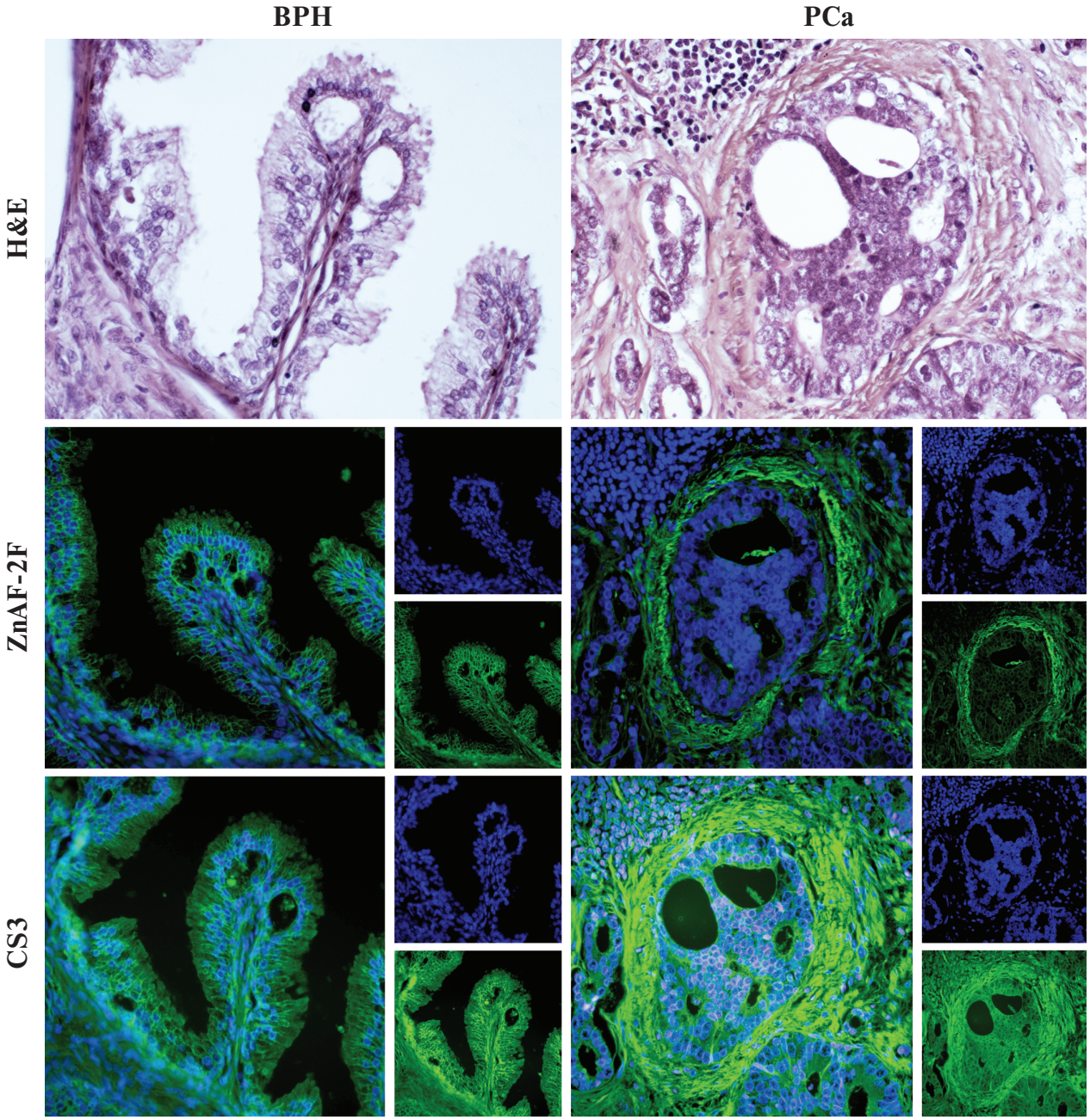


Fig. 2. Visualization of labile zinc and copper pools (green fluorescence) in benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) tissues using the fluorescent probes ZnAF-2F and CS3, respectively. Nuclei were counterstained with DAPI (blue fluorescence). Fluorescence microscopy, ×400 magnification. Representative histological sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) are shown for comparison; light microscopy, ×400

During subsequent tissue processing through increasing concentrations of alcohol and xylene, free and weakly bound metal ions may be extracted from tissue compartments. In addition, during formalin fixation and subsequent processing through alcohol and xylene, some metals may form stable, non-reactive chelates with denatured proteins [24, 25].

Thus, fluorescence analysis of FFPE material likely reflects only the residual fraction of metals that withstands the aggressive chemical processing and remains preserved in stable coordination complexes or precipitated forms. Therefore, from a methodological perspective, the optimal approach for assessing the in vivo distribution of trace elements is the use of cryostat sections prepared from frozen tissue. However, in routine clinical and laboratory practice, this approach is often substantially limited by the lack of cryogenic equipment or the inability to rapidly freeze surgical specimens *in situ*.

Standardization of preanalytical conditions is therefore particularly important, including the time to fixation or freezing, the type and duration of fixation, tissue-processing conditions, section thickness, and the parameters of fluorescence excitation and detection.

Considering the advantages and limitations of each platform, it becomes evident that the two approaches used in this study — analysis of homogenized samples of unfixed tissue and fluorescence analysis of histological sections — are complementary. Rather than competing with each other, they form a two-level analytical system that can minimize the methodological biases inherent to each approach. In our view, the rational combined use of these methods provides a more comprehensive representation of the pathophysiological alterations associated with metal homeostasis in tumor tissue.

Specifically, microplate fluorimetric analysis of tissue lysates provides an integrated assessment of the fluorescence signal across the entire volume of the analyzed sample. This platform is high-throughput, standardized, and convenient for the rapid comparison of large amounts of biological material, including large patient cohorts or series of experimental samples. It also minimizes the impact of local heterogeneity, whereby a randomly selected section may not adequately represent the overall trend within the tumor.

In contrast, digital fluorescence microscopy of tissue sections serves as a precise spatial verification tool. It preserves information on the spatial distribution of trace elements within the analyzed tissue specimen. Owing to its high spatial resolution, this approach enables dynamic changes in labile metal pools to be associated with specific cellular compartments, such as the cytoplasm and mitochondria, as well as distinct structures of the tumor microenvironment, including areas of neoangiogenesis or stromal desmoplasia.

The combination of these methods may provide a more comprehensive understanding of disturbances in metal homeostasis during malignant transformation. Integration of macro- and microanalytical approaches can overcome the methodological limitations of each technique individually, transforming quantitative measurements into a more comprehensive pathophysiological interpretation of the tumor process. From a biological perspective, the observed trend toward a decrease in the labile zinc pool and preservation or elevation of labile copper levels may reflect profound alterations in metal-dependent processes within prostate tumor tissue [5, 6, 12].

CONCLUSION

Alterations in labile zinc and copper pools may represent an important component of tumor microenvironment remodeling in PCa, while understanding the dynamics of these trace elements may provide new insights into the pathophysiological mechanisms underlying oncogenesis. At the same time, their interpretation requires consideration of methodological characteristics, the limitations of fixed tissue material, and the differences between labile and total metal pools.

Funding. This study was supported by the Research Program funded by the National Academy of Sciences of Ukraine "Development of technology for identification of stress-induced factors of initiation of bone tissue metastatic lesion" (0125U000655) and the Grants of the President of Ukraine for the Support of Research and Development of Young Scientists (Decree of the President of Ukraine No. 130/2025-рп) entitled "Molecular and biological characteristics of prostate cancer with high metastatic potential" (0126U003608). The funding source had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of this paper.

REFERENCES

1. **Ervik M, Laversanne M, Lam F, *et al.*** Global Cancer Observatory: Cancer Today (2024 estimates, version 1.0). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2026. Available from: https://gco.iarc.who.int/today.
2. **Serra M, Columbano A, Ammarah U, *et al.*** Understanding metal dynamics between cancer cells and macrophages: competition or synergism? Front Oncol 2020; **10**: 646. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00646.
3. **Shen F, Fang Y, Wu Y, *et al.*** Metal ions and nanometallic materials in antitumor immunity: Function, application, and perspective. J Nanobiotechnology 2023; **21** (1): 20. https://doi.org/10.1186/s12951-023-01771-z.
4. **Qin S, Xiang M, Tao T, *et al.*** The emerging cellular metal ions–immune axis in cancer. Trends Cell Biol, 2026. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2026.08.013.
5. **Hoang BX, Han B, Shaw DG, Nimni M.** Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer. Eur J Cancer Prev 2016; **25** (5): 457–61. https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194
6. **Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Adam V, *et al.*** Insight to physiology and pathology of zinc (II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. Curr Med Chem 2011; **18** (33): 5041–51. https://doi.org/10.2174/092986711797636126.
7. **Safi R, Nelson ER, Chitneni SK, *et al.*** Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics. Cancer Res 2014; **74** (20): 5819–31. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-3527.
8. **Li Z, Hou Y, Zhao Z, *et al.*** Deciphering the role of zinc in prostate health: From mechanism to therapeutic application. Biochem Pharmacol 2026; **245**: 117689. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2026.117689.
9. **Medrano A, Fernández-Novell JM, Ramió L, *et al.*** Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. Mol Reprod Dev 2006; **73** (3): 369–78. https://doi.org/10.1002/mrd.20414.
10. **Shahrokhi Nejad S, Golzari Z, Zangiabadian M, *et al.*** The association between zinc and prostate cancer development: A systematic review and meta-analysis. PLoS One 2024; **19** (3): e0299398. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299398.
11. **Li D, Stovall DB, Wang W, Sui G.** Advances of zinc signaling studies in prostate cancer. Int J Mol Sci 2020; **21** (2): 667. https://doi.org/10.3390/ijms21020667.
12. **Guan D, Zhao L, Shi X, *et al.*** Copper in cancer: from pathogenesis to therapy. Biomed Pharmacother 2023; **163**: 114791. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114791.
13. **Zhao Q, Qi T.** The implications and prospect of cuproptosis-related genes and copper transporters in cancer progression.

Front Oncol 2023; **13**: 1117164. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1117164.
14. **Zimnicka AM, Tang H, Guo Q, *et al.*** Upregulated copper transporters in hypoxia-induced pulmonary hypertension. PLoS One 2014; **9** (3): e90544. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090544.
15. **Tsang T, Davis CI, Brady DC.** Copper biology. Curr Biol 2021; **31** (9): R421–R427. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.054.
16. **Domaille D, Que E, Chang C.** Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. Nat Chem Biol 2008; **4**: 168–75. https://doi.org/10.1038/nchembio.69.
17. **Pires Gama A, Choy B.** WHO classification. PathologyOutlines.com website. https://www.pathologyoutlines.com/topic/prostatewho.html.
18. **Epstein JI, Egevad L, Amin MB, *et al.*** The 2014 International society of urological pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. Am J Surg Pathol 2016; **40** (2): 244–52. https://doi.org/10.1097/pas.0000000000000530.
19. **Claiborne BJ, Rea MA, Terrian DM.** Detection of zinc in isolated nerve terminals using a modified Timm's sulfide-silver method. J Neurosci Methods 1989; **30** (1): 17–22. https://doi.org/10.1016/0165-0270(89)90069-1.
20. **Bunton TE.** Comparison of three histochemical staining methods for the detection of copper in white perch (Morone americana) with abnormal hepatic copper storage. J Comp Pathol 1990; **102** (1): 25–31. https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80004-7.
21. **Georgakoudi I, Jacobson BC, Muller MG, *et al.*** NAD (P) H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. Cancer Res 2002; **62** (3): 682–7.
22. **Menter JM.** Temperature dependence of collagen fluorescence. Photochem Photobiol Sci 2006; **5** (4): 403–10. https://doi.org/10.1039/b516429j.
23. **Monici M.** Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. Biotechnol Annu Rev 2005; **11**: 227–56. https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2.
24. **Lovejoy AV, Morrell AP, Mesa D, *et al.*** Impact of histological processing on endogenous elemental contents and distributions in breast cancer tissue sections. CBMI 2026; **4** (7): 1390–404. https://doi.org/10.1021/cbmi.5c00217.
25. **Sarafanov AG, Todorov TI, Kajdacsy-Balla A, *et al.*** Analysis of iron, zinc, selenium and cadmium in paraffin-embedded prostate tissue specimens using inductively coupled plasma mass-spectrometry. J Trace Elem Med Biol 2008; **22** (4): 305–14. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2008.03.010.

ОЦІНКА ЛАБІЛЬНИХ ПУЛІВ ЦИНКУ ТА МІДІ В ПУХЛИННОМУ МІКРООТОЧЕННІ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ: ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДИЧНИХ ПІДХОДІВ

Т.В. Задворний, П.А. Вірич, О.М. Мушій, Н.Ю. Яценюк, В.Ф. Чехун

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

Резюме. *Рак передміхурової залози (РПЗ) характеризується складними порушеннями клітинного метаболізму та ремоделюванням пухлинного мікрооточення, у яких важливу роль можуть відігравати мікроелементи. Цинк і мідь беруть участь у регуляції численних ферментативних, метаболічних та сигнальних процесів, а зміна їхнього внутрішньотканинного гомеостазу може супроводжувати злоякісну трансформацію. Особливий інтерес становлять лабільні пули цих металів, які відображають доступну для біохімічних взаємодій фракцію та можуть бути чутливими індикаторами метаболічних змін у пухлинній тканині.* ***Мета:*** *провести порівняльну оцінку рівнів лабільних пулів цинку та міді у тканині доброякісних і злоякісних новоутворень передміхурової залози та визначити методичні особливості їх флуоресцентного аналізу.* ***Об'єкт і методи:*** *дослідження виконане на зразках тканини 10 хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози (ДГПЗ) та 15 хворих на РПЗ. Для визначення лабільних форм цинку та міді використано флуоресцентні зонди ZnAF-2F і Coppersensor 3 з подальшим аналізом за допомогою мікропланшетного рідера та цифрової флуоресцентної мікроскопії FFPE-зрізів.* ***Результати:*** *згідно з результатами дослідження нефіксованої тканини РПЗ рівень лабільного цинку був на 28,8% нижчим, тоді як рівень міді статистично не відрізнявся від аналогічного у зразках ДГПЗ. При дослідженні FFPE-зрізів рівень лабільного цинку у тканині РПЗ був у 2,8 раза нижчим, а міді — у 1,2 раза вищим порівняно з ДГПЗ.* ***Висновки:*** *отримані результати демонструють спільну тенденцію до зниження лабільного пулу цинку та збереження або підвищення рівня міді при малігнізації. Поєднання інтегрального флуориметричного та просторового цифрового аналізу може забезпечити комплекснішу оцінку порушень гомеостазу металів при РПЗ, однак потребує врахування обмежень FFPE-матеріалу.*

Ключові слова: рак передміхурової залози, доброякісна гіперплазія передміхурової залози, цинк, мідь.

Адреса для листування:
Задворний Т.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45,
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: tito132007@ukr.net

Одержано: 23.08.2026
Рекомендовано до друку: 25.09.2026
Підписано до друку: 02.11.2026