

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ___ засідання кафедри

від “___” _____ 20__ р.

**СПЕРМІН ТА СИЛБІНІН ЯК ЧИННИКИ ВПЛИВУ НА КЛІТИННІ ЛІНІЇ
РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Сташенко Вікторії Олегівни

Науковий керівник від кафедри
д-р. біол. наук, ст. наук. співроб.
Дворщенко К.О.

Робота виконана у відділі функціональної геноміки та прогресії раку Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України під керівництвом канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Кленова Олега Олександровича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	– активні форми кисню;
РПЗ	– рак передміхурової залози;
СПЗ	– сумарний поверхневий заряд;
AcPut	– N ¹ -acetylputrescine (N ¹ -ацетилпутресцин);
AcSpd	– N ¹ -acetylspermidine (N ¹ -ацетилспермідин);
AcSpn	– N ¹ -acetylspermine (N ¹ -ацетилспермін);
AdoMetDC	– S-adenosylmethionine decarboxylase (S-аденозилметіоніндекарбоксилаза);
ALDH	– aldehyde dehydrogenase (альдегіддегідрогеназа);
AMD1	– adenosylmethionine decarboxylase 1 (аденозилметіоніндекарбоксилаза 1);
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифіковане середовище Ігла);
IC ₅₀	– half maximal inhibitory concentration (концентрація напівмаксимального інгібування);
ODC	– ornithine decarboxylase (орнітиндекарбоксилаза);
РАОХ	– polyamine oxidase (поліаміноксидаза);
PBS	– phosphate-buffered saline (фосфатно-сольовий буферний розчин);
Put	– putrescine (путресцин);
Sil	– silibinin (силібінін);
SMOX	– spermine oxidase (сперміноксидаза);
Spd	– spermidine (спермідин);
Spd/Spn	– spermidine/spermine ratio (співвідношення спермідин/спермін);
Spn	– spermine (спермін);
SSAT1	– spermidine/spermine N ¹ -acetyltransferase 1 (спермідин/спермін-N ¹ -ацетилтрансфераза 1).

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Метаболізм поліамінів та система детоксикації альдегідів як мішені терапії раку передміхурової залози	6
1.1. Поліаміни як регулятори проліферації та апоптозу пухлинних клітин.....	6
1.2. Катаболізм поліамінів як чинник оксидативного стресу.....	9
1.3. Біологічна роль альдегіддегідрогеназ у нормальних та пухлинних клітинах.....	13
1.4. Модуляція активності ферментів катаболізму поліамінів як стратегія антибластичної терапії	17
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	21
2.1. Матеріали та реактиви.....	21
2.2. Обладнання.....	21
2.3. Морфологічна характеристика клітинної лінії LNCaP інтактного контролю	22
2.4. Морфологічна характеристика клітинної лінії DU-145 інтактного контролю.....	23
2.5. Культивування клітинних ліній LNCaP та DU-145.....	24
2.6. Оцінка інгібуючої дії сперміну, силібініну та їх комбінації у різних концентраціях на виживаність клітинних ліній.....	24
2.7. Оцінка окремого та комбінованого впливу сперміну та силібініну на виживаність клітинних ліній LNCaP та DU-145.....	26
2.8. Визначення електрокінетичних властивостей клітин ліній LNCaP та DU-145 методом клітинного мікроелектрофорезу.....	27
2.9. Визначення вмісту поліамінів у клітинах LNCaP та DU-145 методом високоефективної рідинної хроматографії.....	28
2.10. Статистична обробка отриманих результатів.....	30

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	31
3.1. Вживаність клітин андрогенчутливої лінії LNCaP за дії сперміну та силібініну.....	31
3.2. Вживаність клітин андрогенрезистентної лінії DU-145 за дії сперміну та силібініну.....	38
3.3. Електрокінетичні характеристики клітин ліній LNCaP та DU-145 за дії сперміну та силібініну.....	44
3.4. Вміст поліамінів у клітинах ліній LNCaP та DU-145 за дії сперміну та силібініну.....	48
ВИСНОВКИ.....	56
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	57

ВСТУП

За актуальними даними, рак передміхурової залози (РПЗ) залишається домінуючою онкопатологією серед чоловіків старшої вікової групи. Згідно зі статистичними даними Американського онкологічного товариства, динаміка захворюваності демонструє стійку тенденцію до зростання: якщо у 2025 році у США було зафіксовано 313 780 нових випадків, то вже у 2026 році цей показник сягнув 333 830, що складає 31 % всіх діагностованих новоутворень у чоловіків [1]. Згідно з прогнозами, до 2040 року глобальна кількість нових діагнозів РПЗ може досягти 2,4 мільйона щорічно [2].

Головним викликом сучасної терапії РПЗ залишається подолання прогресуючої резистентності метастатичного раку простати до андрогенної деприваційної терапії [3]. Характерною ознакою кастраційно-резистентної форми захворювання у переважній частині пацієнтів є наявність рентгенологічно підтверджених метастазів у кісткову тканину [4]. Такий перебіг хвороби значно погіршує прогноз: показник п'ятирічної виживаності залишається критично низьким – на рівні 30 % [4]. Це зумовлює нагальну необхідність розробки новітніх терапевтичних стратегій, зокрема тих, що базуються на таргетуванні метаболізму поліамінів.

Численні дослідження доводять, що при злоякісній трансформації клітин спостерігається зміна співвідношення основних фракцій поліамінів: рівень сперміну виражено знижується, тоді як рівень спермідину підвищується [5]. Виявлені метаболічні порушення дозволяють висунути гіпотезу про потенційну роль сперміну у механізмах прогресування РПЗ [6]. Результати попередніх експериментів підтверджують цитотоксичні властивості сперміну щодо пухлинних клітин передміхурової залози, які можна значно потенціювати шляхом цілеспрямованої модуляції метаболічних ферментів поліамінів [7, 8].

Важливу роль у цих процесах відіграють альдегіддегідрогенази – ферменти, що забезпечують детоксикацію реактивних альдегідів, які

утворюються під час катаболізму поліамінів [9]. Згідно з даними сучасної наукової літератури, підвищена активність альдегіддегідрогеназ асоціюється з метастатичним потенціалом пухлин, набуттям фенотипу, подібного до ракових стовбурових клітин та розвитком резистентності до терапії [9]. Надекспресія різних ізоформ альдегіддегідрогеназ описана для широкого спектра злоякісних новоутворень, включаючи рак підшлункової та грудної залози, гліому, меланому та рак яєчників [10]. Таким чином, комбіноване застосування сперміну та інгібіторів альдегіддегідрогеназ може розглядатися як перспективна стратегія підвищення чутливості пухлинних клітин до терапії та посилення їх цитотоксичного ушкодження.

Тому метою дослідження було оцінити вплив сперміну та інгібітора альдегіддегідрогенази на функціональний стан клітин раку передміхурової залози залежно від їх андрогенної чутливості.

Для досягнення мети даної роботи були поставлені наступні завдання:

1. Порівняти виживаність, рівень проліферації клітин ліній DU-145 та LNCaP за умов окремого та комбінованого застосування сперміну і силібініну.
2. Виміряти величину ζ -потенціалу, знак сумарного поверхневого заряду і його щільність на поверхні клітин DU-145 та LNCaP за дії сперміну і силібініну.
3. Проаналізувати профіль поліамінів у клітинах ліній DU-145 та LNCaP за дії сперміну і силібініну.

РОЗДІЛ 1

МЕТАБОЛІЗМ ПОЛІАМІНІВ ТА СИСТЕМА ДЕТОКСИКАЦІЇ АЛЬДЕГІДІВ ЯК МІШЕНІ ТЕРАПІЇ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

1.1. Поліаміни як регулятори проліферації та апоптозу пухлинних клітин

Відомо, що поліаміни є низькомолекулярними аліфатичними полікатионними сполуками [11]. Наявність у їхній структурі низки позитивних зарядів наближає їхні властивості до катіонів Ca^{2+} та Mg^{2+} , завдяки чому поліаміни зв'язуються з негативно зарядженими сполуками – ДНК, РНК, АТФ, різними білками та фосфоліпідами. Відповідно, завдяки здатності взаємодіяти з макромолекулами, поліаміни виступають універсальними регуляторами клітинного гомеостазу [12, 13]. Ці сполуки координують фундаментальні біологічні процеси, включаючи реплікацію ДНК, транскрипцію, трансляцію, диференціювання клітини. Окрім того, поліаміни характеризуються плейотропною біохімічною природою, що дає можливість інтегруватися у регуляцію різноманітних життєво важливих функцій в організмі людини, включаючи клітинний цикл, ембріональний розвиток, апоптоз, ангіогенез, активацію Т- та В-лімфоцитів, антиоксидантну дію, роботу іонних каналів [14].

Фундаментальна роль поліамінів у проліферації клітин реалізується насамперед через посттрансляційну модифікацію фактора ініціації трансляції eIF5A – гіпузинування. Онкогенний транскрипційний коактиватор Yes-асоційований білок (YAP) та транскрипційний коактиватор з PDZ-зв'язуючим мотивом (TAZ або WWTR1), що відіграють вирішальну роль у контролі розміру органів, тканинному гомеостазі та онкогенезі, безпосередньо активують транскрипцію (ornithine decarboxylase 1, *ODCI*) для посилення синтезу поліамінів. Відповідно, підвищений рівень поліамінів

сприяє гіпузинуванню eIF5A для підтримки ефективної трансляції гістон-лізин-специфічної деметилази LSD1 [15]. Х. Лі та ін. встановили, що у печінці мишей з індукованою надекспресією онкогену *YAP* значно підвищувалися рівні ключових метаболітів біосинтезу поліамінів – аргініну, орнітину, путресцину, спермідину та сперміну через пряму активацію транскрипції гену *ODC1* та регуляції генів *AZIN1/2*, *SRM*, *SMOX*, а також зростав рівень гіпузинованого eIF5A. Також було встановлено, що рівні eIF5A та LSD1 залежали від рівня спермідину, а LSD1 у свою чергу необхідний для клітинної проліферації та росту пухлин, індукованих *YAP/TAZ* [15].

Дослідження Р. Ляо та ін. демонструють високу експресію мРНК аденозилметіоніндекарбоксилази 1 (adenosylmethionine decarboxylase 1, *AMD1*) у клітинах базальноклітинного раку грудної залози. Фермент S-аденозилметіоніндекарбоксилаза (S-adenosylmethionine decarboxylase, AdoMetDC) каталізує декарбоксилювання S-аденозилметіоніну, який слугує донором амінопропільної групи, котра у свою чергу переноситься на путресцин для синтезу спермідину та сперміну. Екзогенна експресія *AMD1* спричинила значне збільшення рівня спермідину, тоді як нокдаун експресії *AMD1* – його різке зниження. Накопичений спермідин, у свою чергу, слугує субстратом для гіпузинування eIF5A. Відповідно, підвищений рівень гіпузинованого eIF5A специфічно сприяв трансляції мРНК *TCF4*, який стимулює проліферацію клітин базальноклітинного раку грудної залози. Окрім того, високий рівень експресії *AMD1* у пацієнток корелював з високим ступенем злоякісності пухлини, метастазуванням у лімфовузли та гіршим прогнозом виживання [16].

Результати більш ранніх досліджень підтверджують, що AdoMetDC, стабільність якого регулюється комплексом mTORC1, відіграє важливу роль у рості клітин раку передміхурової залози. У генетично модифікованій мишачій моделі раку передміхурової залози *Pten^{pc-/-}* інгібування mTORC1 еверолімусом призводило до різкого зниження рівня AdoMetDC через

скорочення періоду його напіврозпаду та як наслідок – швидшої деградації ферменту протеасомами. У свою чергу без стабілізації AdoMetDC клітина втрачає здатність до синтезу декарбоксільованого S-аденозилметіоніну, необхідного для синтезу спермідину та сперміну, що призводить до зупинки поділу пухлинної клітини. Аналіз біоптатів пацієнтів з раком передміхурової залози доводить кореляцію між рівнем AdoMetDC та проліферацією пухлинних клітин: у пацієнтів, які проходили терапію еверолімусом спостерігалось зниження рівня AdoMetDC, що корелювало зі зниженням індексу Ki67 – показником проліферації [17].

Поліаміни виконують дуалістичну роль у виживанні клітини: як ми вже з'ясували, вони можуть сприяти клітинному поділу, проліферації та диференціації клітин, але й водночас регулювати чутливість клітини до запрограмованої загибелі. Наприклад, поліаміни є критичними регуляторами фероптозу: вони впливають на окисно-відновний гомеостаз через глутатіонову систему та антиоксидантний захист [18].

Відомо, що фероптоз це залізо-залежна форма запрограмованої загибелі клітини, зумовлена перекисним окисненням ліпідів, накопиченням реактивних форм кисню та руйнуванням мембран. Було встановлено, що поліаміни посилюють RSL3-індукований фероптоз, а саме перекисне окиснення ліпідів у клітинах легеневої карциноми лінії A549 та клітинах фібросаркоми лінії HT1080. Активація ферментів катаболізму поліамінів сперміноксидази (spermine oxidase, SMOX) та поліаміноксидази (polyamine oxidase, PAOX) спричиняє утворення пероксиду водню, який вступає у реакцію з двовалентним залізом (реакція Фентона) з подальшим утворенням високореактивного гідроксильного радикалу, котрий ініціює перекисне окиснення ліпідів. Також було продемонстровано, що перевантаження клітини залізом активувало сигнальний шлях WNT/MYC, який посилює експресію *ODC*, підвищує синтез поліамінів та продукцію пероксиду водню, що у свою чергу індукує фероптоз [19].

Більш ранні дослідження демонструють, що поліаміни у надлишковій

кількості індукують апоптоз шляхом модуляції кальцієвого сигналіngu у клітинах раку передміхурової залози лінії LNCaP. Екзогенний спермін у високій концентрації (40 мМ) стимулював масивний вхід іонів кальцію у цитозоль через неселективні канали плазматичної мембрани. Надмірне накопичення кальцію у матриксі мітохондрій у свою чергу призводило до деполяризації мітохондрій та активації внутрішнього шляху апоптозу, що підтвердилося зниженням експресії антиапоптичного білка Bcl-2 та підвищенням рівня проапоптичного білка Bax. Таким чином було показано, що поліаміни можуть регулювати баланс між виживанням та запрограмованою загибеллю клітини через вплив на іонний гомеостаз [20].

Отже, поліаміни виступають універсальними регуляторами клітинного гомеостазу, забезпечуючи як проліферацію клітини, так і її чутливість до загибелі. Така функціональна дуалістичність може слугувати потенційною мішенню для розробки протипухлинних терапевтичних стратегій.

1.2. Катаболізм поліамінів як чинник оксидативного стресу

Метаболічний шлях поліамінів є високорегульованим процесом, що дозволяє підтримувати їх внутрішньоклітинні концентрації у тому діапазоні, який відповідає типу клітини та є оптимальним для клітинної функції. Відповідно, високорегульовані ферменти, що лімітують швидкість реакцій перетворення, сприяють точному контролю як біосинтезу, так і катаболізму поліамінів.

Біосинтез поліамінів забезпечується координованою дією орнітиндекарбоксилази (ornithine decarboxylase, ODC) та S-аденозилметіоніндекарбоксилази для утворення спермідину та сперміну. Путресцин, що є продуктом реакції декарбоксилювання орнітину, використовується як субстрат для конститутивної спермідинсинтази, яка додає амінопропілну групу, донором якої слугує декарбоксильований S-

аденозилметіонін під дією AdoMetDC. Спермінсинтаза виконує аналогічну функцію, перетворюючи спермідин на спермін шляхом додавання іншої амінопропільної групи. Ключовими ферментами катаболізму поліамінів є N^1 -ацетилполіаміноксидаза (polyamine oxidase, PAOX), спермідин/спермін N^1 -ацетилтрансфераза (spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase 1, SSAT1) та сперміноксидаза (spermine oxidase, SMOX) [21].

PAOX – це FAD-залежна аміноксидаза, що каталізує окиснення ацетильованих поліамінів. Афініть ферменту до субстратів знижується у такому порядку: N^1 -ацетилспермін > N^1 -ацетилспермідин > N^1, N^{12} -діацетилспермін \gg спермін. У більшості нормальних тканин експресія PAOX є конститутивною, а функціональна активність ферменту залежить від доступності ацетильованого субстрату, що продукується SSAT1. Дослідження продемонстрували значну варіабельність PAOX у клітинах пухлини грудної залози, що свідчить про специфічний та складніший, порівняно з нормальними тканинами, механізм регуляції ферменту при патології [22].

SSAT1 – високоіндуцибельний цитозольний фермент, який здійснює ацетилювання спермідину та сперміну за допомогою ацетил-КоА. Перевага належить субстратам структури $RNH(CH_2)_3NH_2$. Ацетилювання сполук лише з двома метиленовими групами ($RNH(CH_2)_2NH_2$) проходить неефективно, тоді як сполуки з чотирма метиленовими групами ($RNH(CH_2)_4NH_2$) не виступають субстратами для SSAT1 взагалі. Експресія гена *SAT1* є чутливою до зміни концентрації поліамінів: надлишок екзогенного сперміну викликає стрімку індукцію SSAT1. Це, у свою чергу, ініціює каскад катаболічних реакцій за участі PAOX та SMOX, що супроводжується утворенням цитотоксичних ацетальдегідів та активних форм кисню (АФК) [22].

Дослідження доводять зв'язок між SSAT1 та p53-опосередкованим фероптозом у відповідь на оксидативний стрес. На різних лініях пухлинних клітин, оброблених препаратами, що провокують пошкодження ДНК, було продемонстровано зростання експресії *SAT1*, опосередковане активацією

білка-супресора пухлин p53. Це, у свою чергу, стимулювало індукцію арахідонат-15-ліпоксигенази, яка відповідає за загибель клітин, спричинену оксидативним стресом. Комплексна дія цих факторів призводила до неконтрольованого перекисного окиснення ліпідів, що є біохімічною основою фероптозу [23].

SMOX – FAD-залежна високоіндуцибельна оксидаза, яка проявляє високу субстратну специфічність до сперміну. SMOX каталізує пряме окиснення сперміну до спермідину з утворенням пероксиду водню та 3-амінопропанолу, який є прекурсором високотоксичного акролеїну. Саме SMOX-залежна генерація АФК є основним механізмом пошкодження ДНК та індукції апоптозу при порушенні метаболізму поліамінів. Це пояснюється тим, що SMOX існує у цитоплазматичній та ядерній формах, що у свою чергу забезпечує безпосередній доступ пероксиду водню до критичних біомолекул та значно підвищує ризик генетичних ушкоджень порівняно з пероксисомальним пероксидом водню, який швидко детоксикується каталазою [24].

Роль SMOX як ініціатора окисного стресу була детально досліджена у патогенезі *Helicobacter pylori*-індукованого гастриту, ушкодженні ДНК та сигнальних змінах, що призводять до канцерогенезу. Було встановлено, що *H. pylori* індукувала експресію та активність SMOX у епітеліальних та імунних клітинах шлунку, що призводило до інтенсивного окиснення сперміну з утворенням пероксиду водню. Дослідження демонструють суттєво знижені рівні спермідину та пероксиду водню у клітинах шлунку SMOX-дефіцитних мишей після зараження *H. pylori* порівняно з мишами без генетичних втручань. Окрім того, у SMOX-дефіцитних мишей були зниженими рівень маркерів запалення та кількість нейтрофілів, що свідчить про критичну роль SMOX у генерації оксидативних молекул при інфекції [25].

Також SMOX сприяла активації сигнального шляху β -катеніну, що призводило до неконтрольованої проліферації клітин та набуття

властивостей, притаманних раковим стовбуровим клітинам. Делеція *SMOX* знижувала рівень спермідину в тканинах шлунка, зменшувала інфільтрацію імунних клітин та запобігала пошкодженню ДНК. Таким чином, цілеспрямоване пригнічення експресії *SMOX* можна розглядати як потенційну стратегію хіміопрофілактики раку шлунка [25].

У процесі катаболізму поліамінів синтезується широкий ряд різноманітних за хімічною структурою аміноальдегідів, зокрема N, N' - біс (3-оксопропіл)-1,4-бутандіамін, 3-[(4-амінобутил)аміно]пропаналь, 4-[(3-амінопропіл)аміно]бутаналь, 3-амінопропаналь та 4-амінобутаналь. Механізм токсичної дії аміноальдегідів може здійснюватися кількома шляхами, основним з яких є порушення цілісності лізосом. Такі сполуки, як 3-амінопропаналь, завдяки наявності аміногрупи проявляють виражену лізосомотропність, що дозволяє їм легко дифундувати крізь мембрани у кисле середовище лізосом, де вони протонуються та накопичуються. Критичне підвищення концентрації аміноальдегідів усередині органел спричиняє дестабілізацію їхніх мембран, що завершується пермеабілізацією та розривом лізосом із подальшим вивільненням у цитозоль гідролітичних ферментів, зокрема катепсинів, які безпосередньо ініціюють процеси некрозу або апоптозу [26, 27].

Оскільки аміноальдегіди є високореактивними електрофільними сполуками, їм властива хімічна токсичність відносно біологічних молекул. Наприклад, 3-амінопропаналь шляхом відщеплення аміаку може перетворюватися на акролеїн. Відомо, що акролеїн є не лише забруднювачем навколишнього середовища, але й фактором, асоційованим з патогенезом запальних процесів та нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, Паркінсона та церебральна ішемія [28]. Завдяки наявності α,β -ненасичених карбонільних груп акролеїн виступає сильною електрофільною молекулою, що атакує нуклеофільні центри білків та ковалентно реагує із залишками цистеїну, гістидину, лізину та аргініну, формуючи аддукти Міхаеля. Цей процес, відомий як карбонілювання білків,

призводить до незворотної втрати функціональної активності життєво важливих ферментів, руйнування елементів цитоскелета та інактивації факторів транскрипції [29].

Таким чином катаболізм поліамінів є не лише механізмом регуляції їх внутрішньоклітинної концентрації, але й потужним джерелом оксидативного стресу. Накопичення таких токсичних метаболітів, як аміноальдегіди, пероксид водню та акролеїн, у ході розщеплення поліамінів порушує редокс-гомеостаз клітини, спричиняє дисфункцію лізосом та мітохондрій, також активує шляхи програмованої клітинної загибелі.

1.3. Біологічна роль альдегіддегідрогенази у нормальних та пухлинних клітинах

З огляду на доведену цитотоксичність побічних продуктів катаболізму поліамінів можна зробити висновок, що виживаність клітини залежить від ефективності систем їх детоксикації. Ключову роль у цьому процесі відіграють ферменти родини альдегіддегідрогеназ (aldehyde dehydrogenase, ALDH), які нейтралізують надлишок реактивних карбонільних сполук.

Альдегіддегідрогенази (EC 1.2.1.3) – це сімейство НАДФ-залежних ферментів з молекулярною масою приблизно 50–60 кДа, що окиснюють широкий спектр аліфатичних та ароматичних, ендогенних та екзогенних альдегідів з утворенням відповідних карбонових кислот. У організмі людини існує 19 ізоформ ALDH, які різняться за своєю субклітинною локалізацією, розподілом у тканинах та субстратною специфічністю, водночас сприяючи широкому спектру пов'язаної біологічної активності у прокаріотів, еукаріотів та архей [30].

На сьогодні більшість встановлених альдегіддегідрогеназ згруповані у дві надродини споріднених НАДФ-залежних ферментів у базі даних консервативних доменів, а саме: ферменти, подібні до

гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (c149616 та c149643) та ALDH-подібні ферменти (c111961). Ферменти першої надродини складаються з субодиниць або доменів з 350 ± 20 амінокислот і переважно беруть участь у відновленні активованих органічних кислот до відповідних альдегідів або здійснюють оборотні реакції перетворення між альдегідами та активованими кислотами. Натомість ферменти другої надродини складаються з субодиниць або доменів з 500 ± 50 амінокислот та спеціалізуються здебільшого на незворотному окисненні різних альдегідів до відповідних кислот, або відновленні активованих кислот до альдегідів. Більшість альдегіддегідрогеназ зберігають висококонсервативну структуру, що складається з трьох ключових доменів: N-кінцевого домену, відповідального за зв'язування кофактора НАДФ, каталітичного домену та невеликого C-кінцевого домену, який бере участь у олігомеризації [31].

Основна відмінність між надродиною ферментів, подібних до гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази та надродиною ALDH-подібних ферментів полягає у розмірі N-кінцевого домену, який у надродини ALDH є набагато більшим. На межі розділу всіх трьох доменів знаходиться лійкоподібна порожнина з отвором, що веде до каталітичної кишені, всередині якої знаходиться важливий каталітичний тіоловий залишок цистеїну. Цей залишок формує ковалентний тіогеміацетальний зв'язок з альдегідом, а подальше відновлення НАДФ веде до утворення тіоестеру. У необоротних реакціях цей тіоестер гідролізується до кислоти, а у оборотних реакціях перетворюється на високоенергетичні сполуки [30, 31].

Важливість альдегіддегідрогенази у підтримці клітинної функції підтверджується поширеністю її ізоформ: найвищий рівень експресії мРНК та білків ALDH виявлено у печінці, нирках, серці, мозку та тканинах з високим вмістом мітохондрій. Як було вказано раніше, ALDH притаманна поширена субклітинна локалізація, пов'язана з субстратною специфічністю фермента. На основі аналізу гомології амінокислотних послідовностей ALDH було класифіковано у 11 родин та 4 підродини, які різняться між собою

функцією, локалізацією та субстратною специфічністю [32].

Класичною функцією альдегіддегідрогенази у організмі людини є участь у метаболічному перетворенні етанолу, що полягає у окисненні ацетальдегіду до оцтової кислоти. Відомо, що окиснення етанолу, індуковане ферментативною активністю цитохрому P450 2E1, супроводжується утворенням таких побічних продуктів реакції як супероксидний аніон-радикал та пероксид водню. Відповідно, зловживання алкоголем посилює поглинання заліза печінкою, що призводить до генерації більш реактивних АФК, гідроксильного радикалу у процесі реакції Фентона та, відповідно, сприяє розвитку оксидативного стресу. Ізоформи ALDH2 та ALDH1A1 відповідають за детоксикацію 4-гідроксиноненалу до 4-гідроксинон-2-єнової кислоти [33].

Біологічна роль альдегіддегідрогеназ не обмежується знешкодженням токсинів, оскільки вони демонструють щонайменше три каталітичні активності. У першу чергу ці ферменти беруть участь у біосинтезі важливих біомолекул, що утворюються у процесі метаболізму альдегідів. До них належать бетаїн, фолат, γ -аміномасляна кислота та ретиноева кислота. Також ALDH є важливими для синтезу НАДФН у процесі відновлення кофактора НАДФ, який слугує критичним регулятором клітинного гомеостазу та донором електронів [34]. Вторинна роль таких представників родини як ALDH1A1, ALDH2, ALDH3A1 та ALDH4A1, реалізується у виявленні ними естеразної активності відносно *p*-нітрофенілових естерів. Третя каталітична функція, унікальна для ізоформи ALDH2, полягає у розщепленні нітрогліцерину до 1,2-гліцерилдинітриту та нітриту, що у свою чергу збільшує рівень цГМФ та сприяє релаксації гладеньких м'язів [35].

Впродовж останнього десятиліття зібрано достатню кількість даних про те, що висока активність ALDH є селективним маркером для стовбурових та прогеніторних клітин. Дослідження демонструють великий відсоток лінійно-комітованих гемопоетичних клітин-попередників у субпопуляції ALDH^{br}, виділеної з пуповинної крові людини, кісткового мозку та периферичної

крові. Було встановлено пряму кореляцію між клітинами $ALDH^{br}$ та здатністю пуповинної крові утворювати колонії. У кістковому мозку $ALDH^{br}$ проявляють проангіогенну активність та сприяють регенерації тканин у моделях ішемії та ураження міокарду. У передміхуровій залозі, печінці, шкірі, грудній та підшлунковій залозах субпопуляція $ALDH^{br}$ збагачена тканино-специфічними стовбуровими або прогеніторними клітинами, які демонструють вищу здатність до приживлення та виживання в умовах оксидативного стресу [36].

Відомо, що генам *ALDH* властива висока експресія у пухлинних клітинах: кожна ізоформа проявляє унікальний рівень експресії при різних типах раку. Особливу увагу привертає ізоформа $ALDH1$, гіперекспресія якої спостерігається при раку грудної залози, легень, шлунка, шийки матки, передміхурової залози, нирки, а також при меланомі та колоректальному раку. Було встановлено, що $ALDH1$ підтримує проліферацію та характеристики ракових стовбурових клітин через метаболізм ретиноєвої кислоти. У свою чергу ретиноєва кислота активує сигнальний шлях фосфоінозитид-3-кінази та знижує активність протеїнкінази С, що стимулює проліферацію ракових стовбурових клітин та перешкоджає їх апоптозу. Крім того, ретиноєва кислота може забезпечувати виживання клітини через формування гетеродимерів з рецептором естрогену альфа (estrogen receptor alpha, $ER\alpha$) та рецепторами, активованими проліфераторами пероксисом бета/дельта (peroxisome proliferator-activated receptors beta/delta, $PPAR\beta$, $PPAR\delta$) [37].

Дослідження Є. Городецької та ін. демонструють підвищені міграційні властивості клітин раку передміхурової залози з високою активністю $ALDH$ та підвищену активацію сигнального шляху β -катеніну/WNT. Експериментальні дані свідчать про різну роль ізоформ $ALDH1A1$ та $ALDH1A3$ у регуляції прогресування раку передміхурової залози. Було встановлено позитивну кореляцію $ALDH1A1$ з виживанням пухлинних клітин при циркуляції, екстравазації та утворенні метастазів, тоді як

ALDH1A3 виявляла інгібуючий вплив на ці процеси. Молекулярні механізми таких процесів полягали у взаємодії ALDH з андрогенними рецепторами (androgen receptor, AR) та ретиноїдним рецепторами (retinoic acid receptor, RAR). ALDH1A1 через активацію RAR-залежних транскрипційних програм модулювала поло-подібну кіназу 3, яка контролювала виживання, диференціювання та резистентність пухлинних клітин [38].

Таким чином альдегіддегідрогенази є одними з ключових ферментів клітинного захисту, які в нормальних клітинах забезпечують детоксикацію альдегідів, підтримують редокс-гомеостаз та процеси диференціювання через метаболізм ретиноєвої кислоти. При онкологічних захворюваннях висока активність цих ферментів набуває патологічного значення: ALDH сприяють виживанню пухлинних клітин в умовах оксидативного стресу.

1.4. Модуляція активності ферментів катаболізму поліамінів як стратегія антибластичної терапії

На сьогодні перспективним напрямом сучасної молекулярної онкології є розробка стратегій, спрямованих на використання метаболічних особливостей пухлинних клітин для їх самознищення. У цьому контексті модуляція активності ферментів катаболізму поліамінів розглядається як унікальна терапевтична мішень, оскільки пухлинні клітини залежать від підтримання підвищеного рівня поліамінів для проліферації, виживання та метаболічної адаптації [39].

За фізіологічних умов SSAT1 присутня у низьких концентраціях у клітинах, однак експресія ферменту може підвищуватися у відповідь на різноманітні стимули, включно з факторами росту, гормонами та токсичними агентами. Дослідження А. Максим'юка встановили десятикратне підвищення рівнів мРНК *SAT1* у клітинних лініях раку передміхурової залози (LNCaP), раку грудної залози (T-47D) та раку легень (A549) [40]. Відповідно, автори

розробили неінвазивний діагностичний тест, заснований на каталітичній активності SSAT1 з використанням амантадину – антивірусного препарату, затвердженого Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів та медикаментів США (Food and Drug Administration, FDA). Амантадин слугує субстратом для SSAT1, яка здійснює його ацетилювання до ацетиламантадину, котрий потім екскретується з сечею. У пацієнтів з різними видами раку був встановлений значно підвищений рівень ацетиламантадину у сечі порівняно з контрольними здоровими групами, також спостерігалася кореляція рівня ацетиламантадину зі стадією та тяжкістю захворювання у деяких випадках [41].

У сучасних дослідженнях метаболізму поліамінів дедалі більше уваги приділяється фармакологічній модуляції SSAT1 як потенційному протипухлинному механізму. Дослідження демонструють індукцію експресії *SAT1* нестероїдним протизапальним препаратом індометацином у клітинах недрібноклітинного раку легень, що супроводжувалася суттєвим зниженням їх виживаності. Активація SSAT1 провокувала зниження внутрішньоклітинного рівня поліамінів, однак їх можливість повторно залучатися у метаболічні шляхи відновлювалася за рахунок поліаміноксидази. Тому автори дослідили можливість посилення протипухлинного ефекту шляхом поєднання індометацину з інгібітором поліаміноксидази – метоктраміном. Комбінація індометацину та метоктраміну продемонструвала синергетичний цитотоксичний ефект на виживаність клітин недрібноклітинного раку легень [42].

Застосування синтетичних аналогів поліамінів слугує однією зі стратегій антибластичної терапії. PG-11047 (N^1, N^{12} -бісетил- α -дегідроспермін) – це версія другого покоління симетрично заміщених аналогів поліамінів, які конкурують з природними поліамінами за проникнення у клітину, активують катаболізм поліамінів шляхом індукції SSAT1 та стимулюють окиснення сперміну до спермідину SMOX. Результати дослідження I клінічної фази демонструють стабілізацію захворювання у 30 % пацієнтів з прогресуючими

солідними пухлинами. Попередні дослідження на комбінаціях з іншими протипухлинними препаратами свідчать про можливий синергетичний ефект, що стимулює досліджувати можливості PG-11047 у подальших фазах клінічних випробувань [43].

На сьогодні розглядається можливість застосування екзогенної поліаміноксидази як протипухлинного агенту через генерацію токсичних продуктів окиснення поліамінів. Використання каталітично активної поліаміноксидази, очищеної з пагонів кукурудзи у комбінації з екзогенним сперміном знижувало виживаність мультирезистентної лінії клітин аденокарциноми товстої кишки зі збільшенням концентрації сперміну та тривалості його інкубації. Дослідники довели, що цитотоксичний ефект реалізувався за рахунок пероксиду водню, який утворювався у процесі окиснення: додавання каталази повністю скасовувало зниження виживаності клітин, натомість введення альдегіддегідрогенази не впливало на ефект. Окрім того, комбінація поліаміноксидази та сперміну значно знижувала потенціал мітохондріальних мембран у клітинах та провокувала появу ознак апоптозу [44].

Застосування інгібіторів ферментів катаболізму поліамінів розглядається як ще один дієвий підхід до розробки нових методів антибластичної терапії. У літературі описано низку інгібіторів SMOX, серед яких найбільш дієвими є MDL-72527 та аналоги олігамінів. Однак попри протипухлинний ефект, їх клінічне застосування обмежене через низьку ефективність та виражені побічні ефекти [45]. Результати фармакофорного моделювання та молекулярного докінгу продемонстрували SI-4650 як найбільш активного інгібітора SMOX на сьогодні. Обробка клітин недрібноклітинного раку легень лінії A549 інгібітором SI-4650 призводила до зниження загального рівня поліамінів: підвищувалася концентрація сперміну як субстрату SMOX та знижувалася концентрація спермідину як продукту окиснення. Також спостерігалось зниження проліферації, міграції пухлинних клітин та затримка клітинного циклу у переході S/G2, що супроводжувалася

підвищенням експресії регуляторних білків p21 та цикліну B1 [46].

З огляду на участь альдегіддегідрогеназ у підтриманні виживання пухлинних клітин та формуванні терапевтичної резистентності, фармакологічне таргетування ALDH є одним з перспективних варіантів протипухлинної терапії. На сьогодні відомі інгібітори ALDH можуть пригнічувати активність кількох ізоформ одночасно або бути спрямованими на одну ізоформу, що дозволяє потенційно зменшити токсичність для нормальних тканин. До мульти-ізоформних інгібіторів ALDH належать DEAB (діетиламінобензальдегід), DIMATE (S-метил-4-диметиламіно-4-метилпент-2-інтіоат), цитраль, сполуки серії Aldi та диклонін [47]. DEAB є одним з перших та найбільш поширених інгібіторів, який слугує оборотним субстратом для ALDH1A1, ALDH3A1 та необоротним для ALDH1A2, ALDH2. DEAB продемонстрував здатність пригнічувати ріст клітин раку яєчників *in vitro* та зменшувати поширення легневих метастазів у мишачих моделях раку грудної залози, однак його ефективність суттєво залежить від рівня експресії *ALDH* у клітині [48].

Серед мішеней ізоформ-специфічних інгібіторів ALDH найбільш дослідженими є ALDH1A, ALDH2 та ALDH3A1. Сполука CM037, що є похідним аналога на основі індоліндіону і конкурентного інгібітору ALDH1A1 (Cpd3), продемонструвала високу інгібуючу активність та сенсibiliзацію резистентних до паклітакселу клітин раку яєчників [48]. Оптимізований інгібітор на основі теофіліну NCT-501 виявляв потужний протипухлинний ефект: під його дією ріст ксенотрансплантатів плоскоклітинної карциноми голови та шиї зменшувався на 78 % [49]. Похідні на основі хіноліну NCT-505 та NCT-506 проявляли високу інгібуючу активність із показником IC_{50} на рівні всього 7 нМ, а також ефективно пригнічували утворення 3D-сфероїдних культур у клітинах раку яєчників лінії OV-90 [50]. На сьогодні більшість селективних інгібіторів ALDH перебуває на доклінічному етапі досліджень, а їх обмежена біодоступність є серйозною перешкодою для впровадження у терапію.

Таким чином, модуляція ферментів катаболізму поліамінів є перспективним підходом у протипухлинній терапії. Реалізація механізму знищення пухлинної клітини, який полягає у накопиченні токсичних продуктів та розвитку оксидативного стресу може суттєво підвищити ефективність лікування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

У роботі були використані наступні реактиви: середовище для культивування клітин DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) з високим вмістом глюкози і L-глутаміну (Biowest, Франція); фетальна теляча сироватка, 10 % (Biowest, Франція); суміш пеніциліну та стрептоміцину, 1 % (Biowest, Франція); трипсин, 0,25 % (Biowest, Франція); PBS, рН 7.4 (фосфатно-сольовий буферний розчин); К/Na-фосфатний буферний розчин, рН 7.4; кристалічний фіолетовий, 1 % (Merck, Німеччина); трипановий синій, 0,08 % (Merck, Німеччина); спермін (AppliChem, Німеччина); силібінін (Thermo Scientific, Китай).

2.2. Обладнання

У роботі було використане наступне обладнання: культуральні флакони (SPL, Корея); CO₂-інкубатор MCP-170 (Ybo Technologies, Китай); мікропланшеточний спектрофотометр Multiscan Plus (Termolab Systems, Фінляндія); центрифуга SIGMA-1 (Sigma Laborzentrifugen, Німеччина); хроматограф Agilent 1200 (Agilent, США); світлооптичний мікроскоп CX23 з окуляр-мікрометром (Olympus, Японія); секундомір; пристрій оригінальної конструкції Шляховенка В. О.

2.3. Морфологічна характеристика клітинної лінії LNCaP інтактного контролю

Експериментальною моделлю у роботі слугувала диференційована клітинна лінія раку передміхурової залози LNCaP, котра характеризується чутливістю до андрогенів. Історія відкриття цієї лінії бере свій початок з 1977 року, коли її вперше було виділено з метастатичного вогнища аденокарциноми лімфатичних вузлів 50-річного чоловіка. Клітинам LNCaP притаманне епітеліальне походження, вони демонструють адгезивний або частково адгезивний тип росту в умовах культивування. Важливою біологічною особливістю даної лінії є експресія андрогенових рецепторів та простат-специфічного антигену. Цим обумовлена їх здатність реагувати на гормональну стимуляцію естрогенами та андрогенами, що відіграють ключову роль у клітинному рості та диференціюванні [51].

Морфологічно культура LNCaP не формує суцільного моношару: клітини ростуть переважно у вигляді компактних колоній з чіткими межами, котрі поступово розширюються та можуть об'єднуватися. У центральній частині таких скупчень в основному спостерігаються клітини правильної полігональної форми з добре розвиненими відростками. У периферичній частині клітини вишиковуються у ряди, набуваючи циліндричної форми. У культурі також можуть зустрічатися поодинокі клітини, однак мінімальні агрегати можуть нараховувати від 2 до 6 клітин. Ядра мають округлу форму, містять значну частку еухроматину, а також займають понад 40 % внутрішньоклітинного об'єму; у більшості клітин спостерігаються 2-3 ядерця. Клітини LNCaP характеризуються високою біосинтетичною активністю та відносно повільним темпом проліферації з часом подвоєння в межах популяції приблизно 48-60 годин. При досягненні близько 80 % моношару клітини дещо змінюють морфологію та стають менш розпластаними.

2.4. Морфологічна характеристика клітинної лінії DU-145 інтактного контролю

Для додаткового порівняння використовували клітинну лінію раку передміхурової залози DU-145, яким властивий андрогенрезистентний фенотип та низький ступінь диференціації. Цю лінію вперше було отримано у 1975 році з церебрального метастазу аденокарциноми простати 69-річного пацієнта [52]. Клітини DU-145 характеризуються епітеліальним походженням та проявляють виражені адгезивні властивості. В умовах культивування формують щільні колонії. Головною відмінністю клітин лінії DU-145 є їх нечутливість до впливу андрогенних лігандів попри фізичну наявність андрогенових рецепторів на плазматичній мембрані [53].

Клітинам DU-145 притаманна переважно полігональна форма, хоча частина популяції може набувати пірамідальної форми з добре розвиненими відростками. Характерною ознакою є базофільна цитоплазма невеликого об'єму та дрібнозернистої структури. Ядро велике та округле, займає більшу частину клітини. Ядерна оболонка має чіткі контури без виражених інвагінацій, всередині ядра візуалізуються 2-3 ядерця правильної форми.

Клітинна лінія DU-145 відзначається інтенсивною метаболічною та синтетичною активністю. Також спостерігається достатньо швидкий темп росту: час подвоєння популяції становить 30-40 годин. При цьому клітини демонструють здатність до рівномірного утворення моношару на поверхні культурального флакона.

2.5. Культивування клітинних ліній LNCaP та DU-145

Клітинні лінії LNCaP та DU-145 підтримували в умовах стандартного культивування у поживному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози (25 мМ) та додаванням L-глутаміну у концентрації 4 мМ. До середовища вносили 10 % фетальної телячої сироватки, попередньо інактивованої нагріванням при 56°C, яка забезпечувала клітини необхідними поживними компонентами та ростовими факторами. Для запобігання бактеріальній контамінації культуральних зразків використовували 1 % суміш пеніциліну та стрептоміцину.

Пасажування адгезивних клітин передбачало відокремлення їх моношару від поверхні культурального флакону за допомогою розчину трипсину. Усі маніпуляції з промиванням культуральних флаконів та приготуванням необхідних реактивів виконувалися з використанням фосфатно-сольового буферного розчину з рН 7.4.

2.6. Оцінка інгібуючої дії сперміну, силібініну та їх комбінації у різних концентраціях на виживаність клітинних ліній

Оцінка цитотоксичного впливу сперміну та силібініну базувалася на показниках виживаності клітинної культури. Залежно від запланованого обсягу експерименту клітини висівали у флакони з площею 25 або 75 см² з наступним додаванням поживного середовища у об'ємі 5 або 20 мл відповідно до розміру флакона. Подальше культивування проводили у CO₂-інкубаторі в умовах 37°C та 5 % CO₂, що забезпечувало адаптацію та активну проліферацію клітин. Посівна кількість клітин коливалася у діапазоні 0,1-0,15×10⁶ до 1,5×10⁶. Клітини піддавали впливу тестованих сполук приблизно через 24-48 годин після утворення суцільного моношару.

Інгібуючий вплив сперміну (Spn) та силібініну (Sil) на клітинні лінії

аналізували на першу, другу та третю добу після внесення сполук у культуру. Експериментальна схема передбачала розсів клітин у 96-лункові плоскодонні планшети у кількості 1×10^4 клітин у 150 мкл поживного середовища, після чого поміщали у CO₂-інкубатор. Внесення інгібіторів розпочинали через добу після посіву, застосовуючи метод серійних розведень (титрування). Стартові концентрації для першого рядку лунок складали 10 мМ Spn та 2 мМ Sil. Аналіз кожного варіанту проводили у чотирьох повторностях для обох досліджуваних ліній.

Рівень виживаності клітин визначали за фарбуванням зразків 0,08 % трипановим синім. Підрахунок незабарвлених живих та забарвлених мертвих клітин здійснювали під світловим мікроскопом (загальне збільшення $\times 160$) з використанням камери Горяєва [54].

Для аналізу кінетики проліферації клітини розсіювали у 96-лункові планшети за аналогічною схемою. Через добу після посіву проводили заміну середовища на свіже, потім вносили відповідні тестовані інгібітори з подальшим титруванням та інкубацією. Через 24 години поживне середовище видаляли, а клітини фіксували та забарвлювали шляхом додавання 0,5 % розчину кристалічного фіолетового у 70 % метанолі (50 мкл на лунку). Незабарвлені загиблі клітини видаляли промиванням водою, після чого проводили додаткову фіксацію життєздатного моношару 96 % розчином етанолу із розрахунку 100 мкл на лунку.

Детекцію кількості життєздатних клітин проводили колориметричним методом, вимірюючи екстинкцію при довжині хвилі 544 нм на рідері Multiscan Plus. Розрахунок концентрації напівмаксимального інгібування (IC₅₀) виконували за допомогою програмного забезпечення Quest Graph™ IC₅₀.

2.7. Оцінка окремого та комбінованого впливу сперміну та силібініну на виживаність клітинних ліній LNCaP та DU-145

Оцінка впливу сперміну та силібініну, введених як окремо, так і у комбінації, на виживаність клітинних ліній LNCaP та DU-145, проводилася на клітинних зразках, підготовлених за наступною схемою. Клітини висівали у культуральні флакони площею 25 см² та 75 см² у кількості 100 000-150 000, після чого додавали 5 мл поживного середовища DMEM, доповненого 10 % фетальної телячої сироватки та 1 % суміші антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину. Культивування здійснювали у стандартних умовах CO₂-інкубатора (37°C, 5 % CO₂) для досягнення активної фази проліферації.

Внесення сперміну та силібініну здійснювали через 24-48 годин після посіву. Для клітинної лінії LNCaP застосовували спермін у концентрації 1,5 мМ; силібінін – 0,98 мМ; комбінацію сперміну з силібініном – 1,1 мМ та 0,26 мМ. Для клітин DU-145 використовували спермін у концентрації 5,0 мМ; силібінін – 0,62 мМ; комбінацію сперміну з силібініном – 0,83 мМ та 0,46 мМ. Для кожної клітинної лінії один флакон залишали без обробки, використовуючи його як інтактний контроль. Після внесення інгібіторів флакони з клітинами повертали до інкубатора та витримували ще 24-48 годин.

Процедура зняття клітин включала збір культурального середовища у флакони відповідного об'єму (15 або 50 мл) та промивання моношару фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS) для видалення залишків середовища. Для відокремлення адгезованих клітин застосовували 0,25 % розчин трипсину, після внесення якого флакони інкубували при 37°C, 5 % CO₂ протягом 5-8 хвилин. Відокремлені клітини акуратно змивали з поверхні флакону, переносили у підготовлені пробірки та осаджували центрифугуванням при 95 g протягом 5 хвилин. Для більш ефективного очищення клітин від залишків трипсину та живильного середовища супернатант зливали, а клітинний осад піддавали додатковому відмиванню у

2-5 мл PBS з повторним центрифугуванням.

На фінальному етапі клітини ресуспендували. Для визначення кількості живих клітин відбирали аліквоту об'ємом 10 мкл, змішували з 2 мкл 0,08 % розчину трипанового синього та проводили підрахунок у камері Горяєва (результат перераховували на 1 мл суспензії). Цитоморфологічні зміни, зумовлені впливом сперміну та силібініну, оцінювали на фіксованих клітинних препаратах. Для цього клітини попередньо культивували на покривних скельцях у 6-лункових планшетах, після чого здійснювали їх фіксацію та фарбування гематоксилином і еозином [55]. Після підрахунку кількості живих клітин отриману суспензію надалі використовували для підготовки проб, призначених для подальшого хроматографічного аналізу профілю поліамінів.

2.8. Визначення електрокінетичних властивостей клітин ліній LNCaP та DU-145 методом клітинного мікроелектрофорезу

Для вимірювання електрокінетичних властивостей клітини LNCaP та DU-145 знімали з культуральних матраців за допомогою трипсину, осаджували центрифугуванням та ресуспендували у фосфатно-сольовому буферному розчині (рН 7.4). На кожне вимірювання відбирали аліквоту 100 000 клітин. Показники лінійної швидкості руху клітин в електричному полі вимірювали за допомогою світлооптичного мікроскопа CX23, обладнаного окуляр-мікрометром – так званою сіткою Автанділова, у поєднанні з секундоміром та пристроєм оригінальної конструкції. У цьому пристрої суспендовані клітини рухалися всередині плоскостінного кварцового капіляра, за рахунок чого усувалися сторонні механічні впливи на характер руху клітин та забезпечувалася можливість використання мікрооб'ємів досліджуваного матеріалу. Відстань між платиновими електродами приладу становила 5 см, градієнт напруженості електричного

поля досягав $20 \text{ В} \times \text{см}^{-1}$, оскільки до електродів прикладалася напруга у 100 В. Експерименти виконано у трьох повторах по 20 вимірів [8].

У розрахунках ζ -потенціалу застосовували адаптовану форму рівняння Смолюховського для біологічних систем [56]:

$$\zeta = 14U, \quad (2.1)$$

де U – електрофоретична рухливість, виражена у позасистемних одиницях через відношення експериментально визначеної лінійної швидкості руху клітин (мкм/с) в електричному полі до градієнта напруженості поля ($\text{В} \times \text{см}^{-1}$)

Напрямок руху клітин в електричному полі дозволяв визначити знак їхнього поверхневого заряду (СПЗ, q). Поверхневу щільність заряду обчислювали за рівнянням Квінке-Гельмгольца [57]:

$$q\delta = \zeta\epsilon\alpha, \quad (2.2)$$

де δ – товщина подвійного електричного шару (10^{-10} м);

$\epsilon\alpha$ – абсолютна діелектрична проникність

2.9. Визначення вмісту поліамінів у клітинах LNCaP та DU-145 методом високоефективної рідинної хроматографії

Для аналізу внутрішньоклітинного профілю поліамінів використовували контрольні та експериментальні зразки клітин LNCaP, оброблених сперміном у концентрації 1,5 мМ, силібініном – 0,98 мМ, або їх поєднанням – Sprn 1,1 мМ + Sil 0,26 мМ. Аналогічно, для клітинної лінії DU-145 контрольні та оброблені зразки за умови внесення сперміну у концентрації 5 мМ,

силібініну – 0,62 мМ чи їх комбінованої дії – Spn 0,83 мМ + Sil 0,46 мМ.

На першому етапі з кожного варіанта відбирали приблизно 4×10^5 пухлинних клітин. До отриманої клітинної суспензії додавали 200 мкл охолодженої 1 М перхлоратної кислоти, після чого зразки перемішували для ретельної екстракції поліамінів. Суспензію витримували у холодильнику протягом двох діб, після чого проводили центрифугування при 16000 g упродовж 30 хвилин. Для подальшого аналізу використовували надосадову фракцію. З метою нейтралізації екстракту до відібраного надосаду додавали насичений розчин карбонату натрію у об'ємі 50-70 мкл, коригуючи рН до потрібного значення. Далі у кожен зразок вносили 150 мкл розчину дансилхлориду (5-диметиламіно-1-нафталін-сульфонілхлорид), розведеного у ацетоні в концентрації 5 мг/мл.

Реакцію дансильовання поліамінів проводили шляхом інкубації зразків у термостаті при 40°C протягом 1 години. Після цього до проб додавали по 25 мкл розчину проліну, щоб зв'язати надлишок реагенту, і повторно витримували у термостаті ще 15 хвилин. Для вилучення дансильованих похідних здійснювали екстракцію наступним чином: до кожного зразка додавали 0,3 мл циклогексану, інтенсивно перемішували та центрифугували протягом 10 хвилин при 18000 g. Фракцію циклогексану відбирали та переносили у тиглі для вакуумного висушування. Описану процедуру повторювали тричі, після чого зразки повністю висушували та розчиняли у 200 мкл метанолу. Отримані проби піддавали хроматографічному аналізу.

Стандартом слугувала еквімолярна суміш стандартних поліамінів (путресцин \times 2HCl, спермідин \times 3HCl, спермін \times 4HCl) із розрахунку 2,94 нмоль на 40 мкл. Стандартні розчини готували на основі перхлоратної кислоти ідентично до експериментальних зразків. Хроматографічне розділення виконували на колонці Supelko Zorbax ODS 4,6 mm I.D. \times 250 mm. У систему вводили по 40 мкл підготовленого зразка. Аналіз здійснювали в умовах градієнтної елюції, використовуючи суміш вода/ацетонітрил, де концентрацію ацетонітрилу поступово підвищували з 50 % до 100 %

протягом 20 хвилин. Завершальним етапом слугувало промивання колонки чистим ацетонітрилом упродовж наступних 5 хвилин. Швидкість рухомої фази підтримували на рівні 1 мл/хв. Рівень поліамінів реєстрували за допомогою флуориметричного детектора при довжині хвилі опромінювання 342 нм та емісії 512 нм. Кінцевий вміст поліамінів виражали у пікомолях на міліграм білка [58].

2.10. Статистична обробка отриманих результатів

Опрацювання експериментальних даних здійснювали із використанням методів варіаційної статистики за допомогою ліцензійного програмного забезпечення MS Excel 2016 (Microsoft Corporation, США) та Statistica 6.0 (StatSoft, США). Перевірку отриманих результатів на нормальність розподілу проводили за допомогою критерію Шапіро-Вілка. Оцінку статистичної значущості відмінностей між середніми значеннями незалежних вибірок здійснювали із застосуванням t-критерію Стьюдента. Для оцінки взаємозв'язку між досліджуваними показниками використовували методи регресійного аналізу. Статистично достовірними вважали відмінності за умов рівня значущості $p < 0,05$ [59].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виживаність клітин андрогенчутливої лінії LNCaP за дії сперміну та силібініну

Дослідження зв'язку між метаболізмом поліамінів та розвитком раку передміхурової залози беруть свій початок ще з межі XX-XXI століть. Відомо, що найвища концентрація поліамінів міститься саме у передміхуровій залозі, в той час як активність ключових ферментів їх метаболізму ODC, S-аденозилметіоніндекарбоксилази та спермідинсинтази координується андрогенами [60].

Встановлення гіперекспресії *ODC1*, що ініціювала процес трансформації клітини, стало підґрунтям для висунення гіпотези про її функціонування як прото-онкогенного продукту. Логічним продовженням досліджень став порівняльний аналіз активності ODC у пухлинних моделях простати щура, людини та нормальній тканині, який продемонстрував підвищений рівень ферменту у пухлинних зразках [60]. У працях українських науковців, зокрема С. Залеток, було показано 34-кратне зниження рівня сперміну у сечі хворих на РПЗ та кореляційний зв'язок зі стадією захворювання. У злоякісних пухлинах передміхурової залози, порівняно з доброякісними новоутвореннями, рівні путресцину, спермідину та сперміну були підвищеними [9].

Наші попередні дослідження показали виражений цитотоксичний ефект сперміну, який посилювався при його застосуванні з інгібіторами ферментів катаболізму поліамінів, включаючи хлоргексидин, аміногуанідин, паргілін, гопіпол та дисульфідрам [61-64]. Таким чином, було продовжено серію досліджень, спрямованих на пошук способів підвищення цитотоксичної дії сперміну на клітини раку передміхурової залози шляхом впливу на

ферменти, що регулюють його метаболізм.

Відомо, що альдегіддегідрогеназа (aldehyde dehydrogenase, ALDH) є маркером ракових стовбурових клітин при різних онкологічних захворюваннях, включаючи РПЗ [65]. Дослідження демонструють, що підвищена експресія *ALDH1A1* сприяє більш агресивній поведінці ракових клітин, збільшуючи їх здатність до метастазування та стійкість до радіотерапії, а прогресування РПЗ пов'язане з посиленою взаємодією *ALDH1A1* з транскрипційними програмами рецепторів андрогенів та ретиноїдних рецепторів [38].

У якості інгібітора ALDH використовували силібінін – поліфенольний флаволігнан та активний компонент силімарину, екстракту з насіння розторопші плямистої (*Silybum marianum*). Силібінін відомий як гепатопротектор з антиоксидантними, протизапальними, антипроліферативними та проапоптичними властивостями. У останні десятиліття силібінін активно вивчається як протипухлинний агент за рахунок модулюючого впливу на онкогенні шляхи PI3K/Akt, NF-κB, Wnt/β-катенін та MAPK, який забезпечує пригнічення проліферації пухлинних клітин та індукцію зупинки клітинного циклу [66].

Дослідження продемонстрували здатність силібініну регулювати синтез транс-ретиноївої кислоти та 9-цис-ретиноату, який виявляє антипроліферативні властивості, може діяти як ген-супресор у пухлинах передміхурової залози та стимулювати диференціювання протипухлинних макрофагів. Таким чином *ALDH1A1* є потенційною мішенню для силібініну у терапії раку передміхурової залози. У нашій роботі вперше був встановлений вплив силібініну у комбінації зі сперміном на параметри клітин раку передміхурової залози *in vitro* [67].

Визначено, що IC_{50} силібініну у чистому вигляді для андрогенчутливих клітин LNCaP становить 0,98 мМ, для андрогенрезистентних клітин DU-145 – 0,62 мМ. У попередніх роботах показники IC_{50} Spr становили 1,5 мМ та 5 мМ, відповідно. При сумісному введенні сперміну та силібініну значення

IC_{50} Sil змінювалися до 0,26 мМ для клітин LNCaP та до 0,46 мМ для DU-145; IC_{50} Spn – 1,1 мМ та 0,83 мМ, відповідно. Для обох клітинних ліній реалізувався синергічний цитотоксичний ефект сперміну та силібініну у комбінованому застосуванні. Однак у клітинах LNCaP спермін більше потенціював вплив силібініну, аніж навпаки: спостерігалось зниження IC_{50} Sil на 73,5 %, а IC_{50} Spn – тільки на 26,7 %. У клітинах DU-145 IC_{50} Sil знижувалося тільки на 25,8 %, IC_{50} Spn – на 83,4 %.

У нашому дослідженні встановлено, що спермін у концентрації 1,5 мМ пригнічував виживаність клітин андрогенчутливої лінії LNCaP на 22 %: якщо в контрольній групі цей показник становив $98,0 \pm 1,3$ %, то після додавання інгібітора він зменшився до $76,0 \pm 2,2$ % (рис. 3.1)

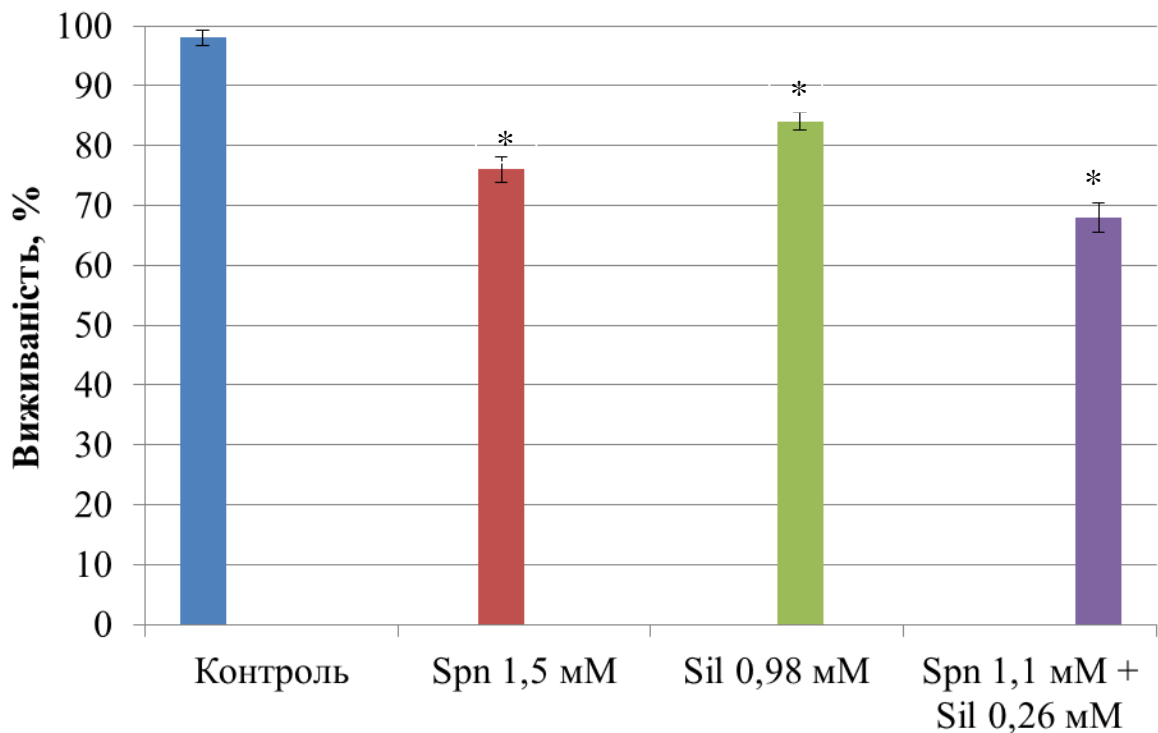


Рис. 3.1. Показники виживаності клітин лінії LNCaP за дії сперміну (Spn) та силібініну (Sil)

* – $p < 0,05$ відносно контролю

Введення силібініну у концентрації 0,98 мМ поступалося за ефективністю – виживаність клітин знизилася всього на 14 %.

Не спостерігалось вираженого цитотоксичного ефекту і за комбінованого застосування сперміну та силібініну: виживаність знижувалася до $68,0 \pm 2,4 \%$.

Встановлено, що антипроліферативний ефект інгібіторів порівняно з цитотоксичним був більш яскраво вираженим. Під дією силібініну рівень проліферації клітин контрольної групи знижувався з $98,0 \pm 1,3 \%$ до $52,6 \pm 3,1 \%$ (рис. 3.2).

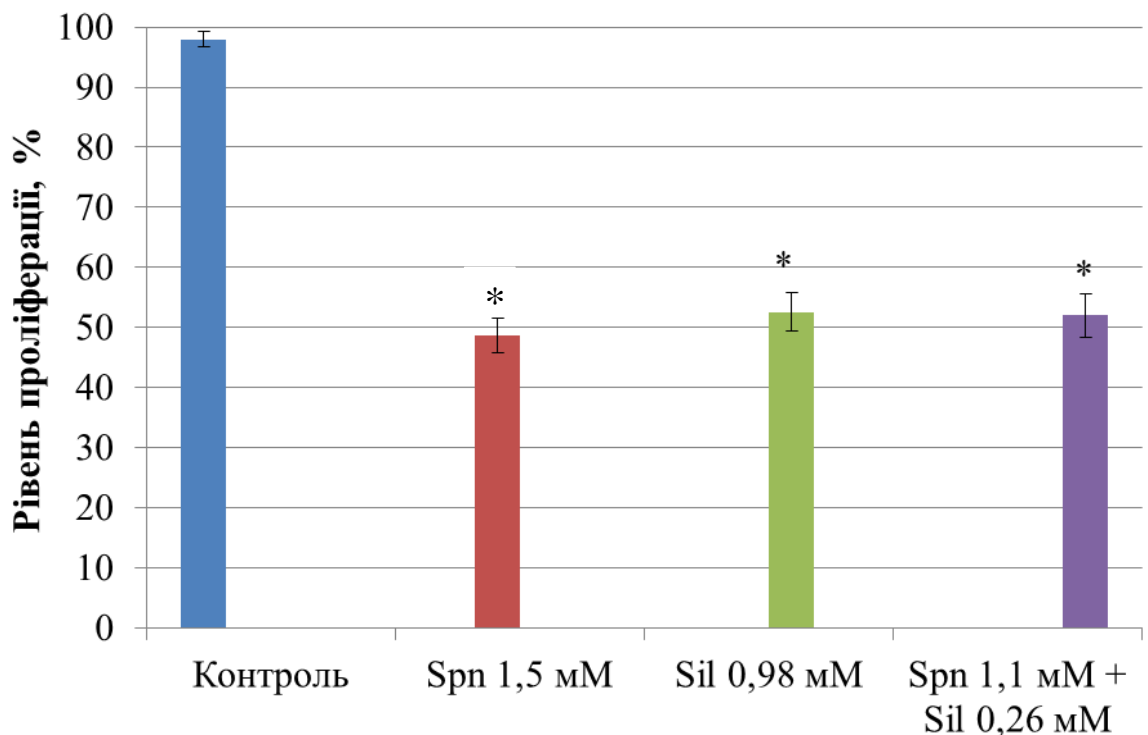


Рис. 3.2. Показники проліферації клітин лінії LNCaP за дії сперміну (Spn) та силібініну (Sil)

* – $p < 0,05$ відносно контролю

Спермін у чистому вигляді стимулював зниження проліферативної активності на $49,4 \%$. Сумісне введення сперміну та силібініну не продемонструвало синергічного ефекту: показники проліферації залишалися на рівні $52,0 \pm 3,6 \%$.

У роботі додатково були проаналізовані морфологічні характеристики клітинної лінії LNCaP контрольного та експериментального варіантів.

Переважає частина контрольної культури належала клітинам типової полігональної форми з псевдоподіями, котрі сприяють адгезії та міграції (рис. 3.3). Великі ядра округлої форми, що характеризувалися наявністю 1-4 чітко візуалізованих ядерців, займали основний об'єм клітини. Наявність деконденсованого хроматину свідчила про високу транскрипційну активність.

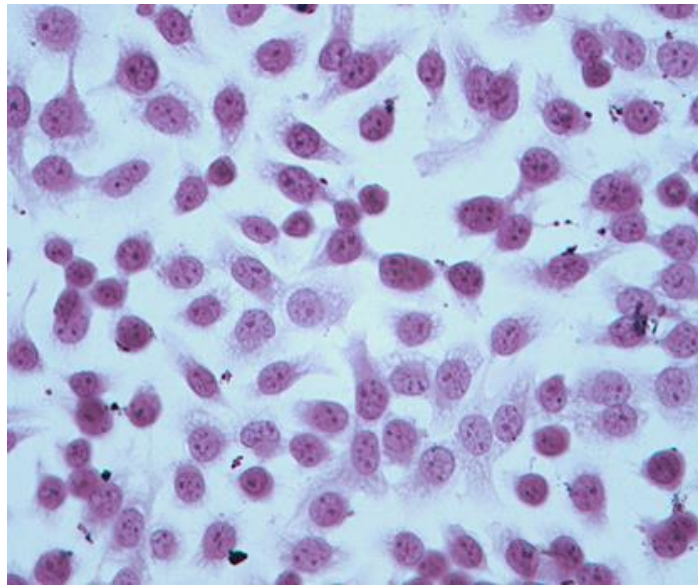


Рис. 3.3. Мікροфотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії LNCaP контрольної групи (збарвлення гематоксилином і еозином; зб. $\times 400$)

Незважаючи на спостереження клітин на стадії інтерфази, були зафіксовані певні ознаки мітозу – наявність метафазних пластинок, анафазних хромосом, а також цитокінез. У процесі мітозу клітини мали типову округлу форму. Отже, клітини лінії LNCaP контрольної групи зберігали високу мітотичну та проліферативну активність.

Продемонстровано дозозалежне зниження виживаності клітин LNCaP та їх транскрипційної активності під дією силібінину за всіх досліджених умов. Силібінін зумовлював зупинку клітинного циклу, про що свідчило перебування однієї частини клітин у інтерфазі без ознак мітозу, а іншої – у

процесі апоптозу (рис. 3.4).

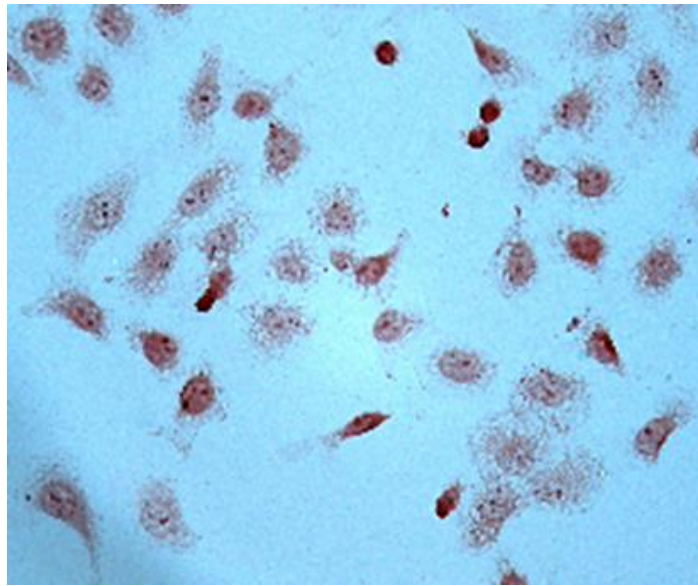


Рис. 3.4. Мікрофотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії LNCaP за присутності 0,5 мМ силібініну у середовищі інкубації (забарвлення гематоксиліном і еозином; зб. $\times 400$)

Введення силібініну у концентрації 0,5 мМ, що становить половину його інгібуючої концентрації у чистому вигляді, у культуру клітин ініціювало появу ознак апоптозу, однак більшість клітин зберігали нативну морфологію. При цьому ядра були еухроматичними, з чіткими ядерцями, що свідчить про збереження транскрипційної активності, а цитоплазма клітин – вакуолізованою.

Інкубація клітин з силібініном у концентрації 0,98 мМ блокувала синтетичні процеси, виживаність клітин, що в результаті призводило до появи гіперхромних ядер та зміни форми клітин (рис. 3.5).

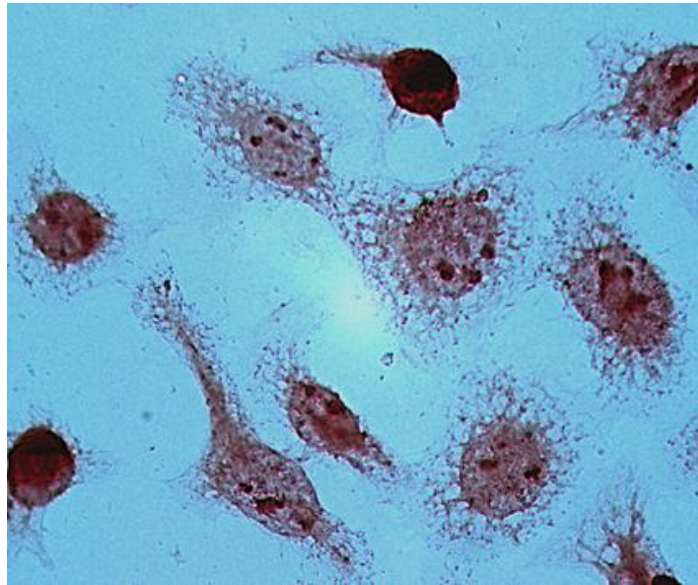


Рис. 3.5. Мікрофотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії LNCaP за присутності 0,98 мМ силібініну у середовищі інкубації (забарвлення гематоксилином і еозином; зб. $\times 900$)

Культивування клітин в умовах комбінованого застосування силібініну у концентрації 0,26 мМ та сперміну у концентрації 1,1 мМ індукувало такі морфологічні зміни як мультіядерність та збільшення розмірів клітин, що характерні для дефектів мітозу та клітинного циклу загалом (рис. 3.6). У полі зору фіксувалися ядра різних розмірів, що варіювали від правильної округлої до витягнутої або неправильної форми. Поява таких морфологічних змін свідчить про блокування процесу цитокінезу або індукцію ендоредуплікації під дією досліджуваних агентів.

У попередній роботі було встановлено, що під впливом 1,5 мМ сперміну клітини LNCaP втрачали округлу форму та псевдоподії внаслідок зміни білкового профілю цитоплазматичної мембрани та цитоскелету клітин [8].

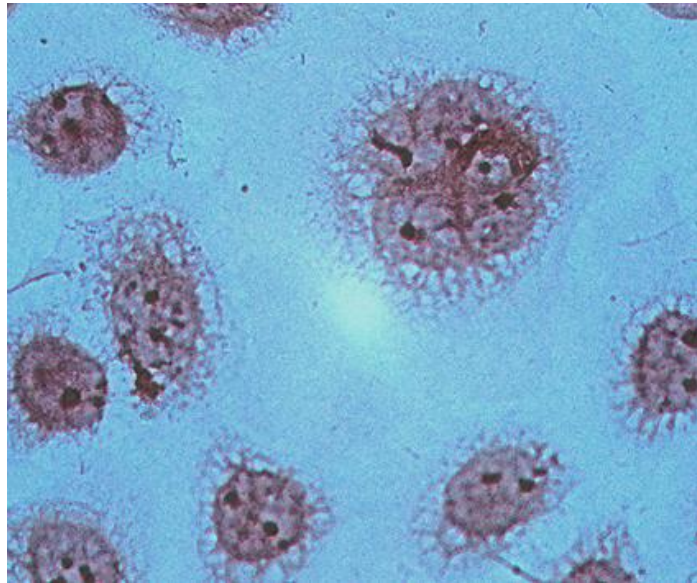


Рис. 3.6. Мікрофотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії LNCaP за присутності 0,26 мМ силібініну та 1,1 мМ сперміну у середовищі інкубації (збарвлення гематоксиліном і еозином; зб. $\times 900$)

Таким чином був продемонстрований дозозалежний цитотоксичний та антипроліферативний вплив силібініну та сперміну на андрогенчутливі клітини лінії LNCaP за умов їх окремого та сумісного застосування.

3.2. Вживаність клітин андрогенрезистентної лінії DU-145 за дії сперміну та силібініну

З огляду на андрогенрезистентний статус клітин лінії DU-145 застосування сперміну у концентрації 5,0 мМ спричинило зменшення частки живих клітин з $97,0 \pm 1,5$ % до $70,0 \pm 2,2$ % (рис. 3.7). Силібін демонстрував менш виражений цитотоксичний ефект – вживаність клітин становила $80,0 \pm 1,9$ %. Комбіноване введення агентів забезпечило цитотоксичний вплив, співмірний з дією сперміну у чистому вигляді – показник вживаності залишався на рівні $72,0 \pm 2,6$ %.

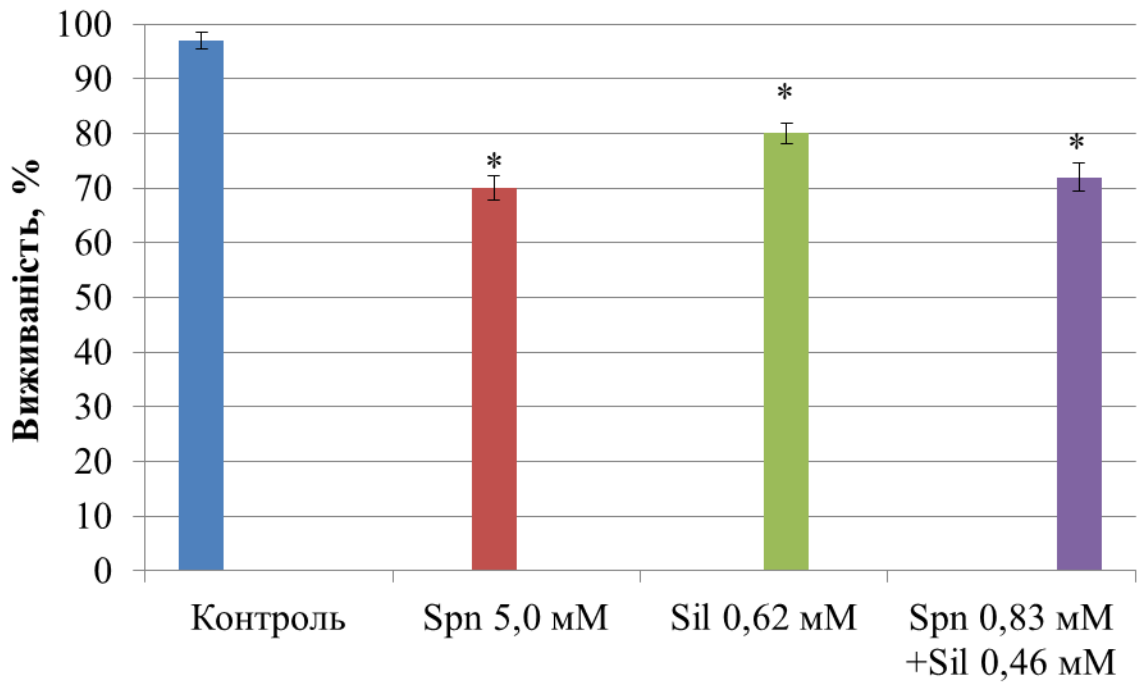


Рис. 3.7. Показники виживаності клітин лінії DU-145 за дії сперміну (Spn) та силібініну (Sil)

* – $p < 0,05$ відносно контролю

Встановлено, що для клітин DU-145, як і для LNCaP, характерне переважання антипроліферативної дії над цитотоксичною. Усі дослідні варіанти інгібіторів діяли майже однаково ефективно, знижуючи рівень проліферації до 50 % (рис. 3.8). Поєднане застосування сперміну та силібініну у значно менших концентраціях демонстрували такий самий потужний ефект, співмірний з дією цих агентів окремо у суттєво більших концентраціях.

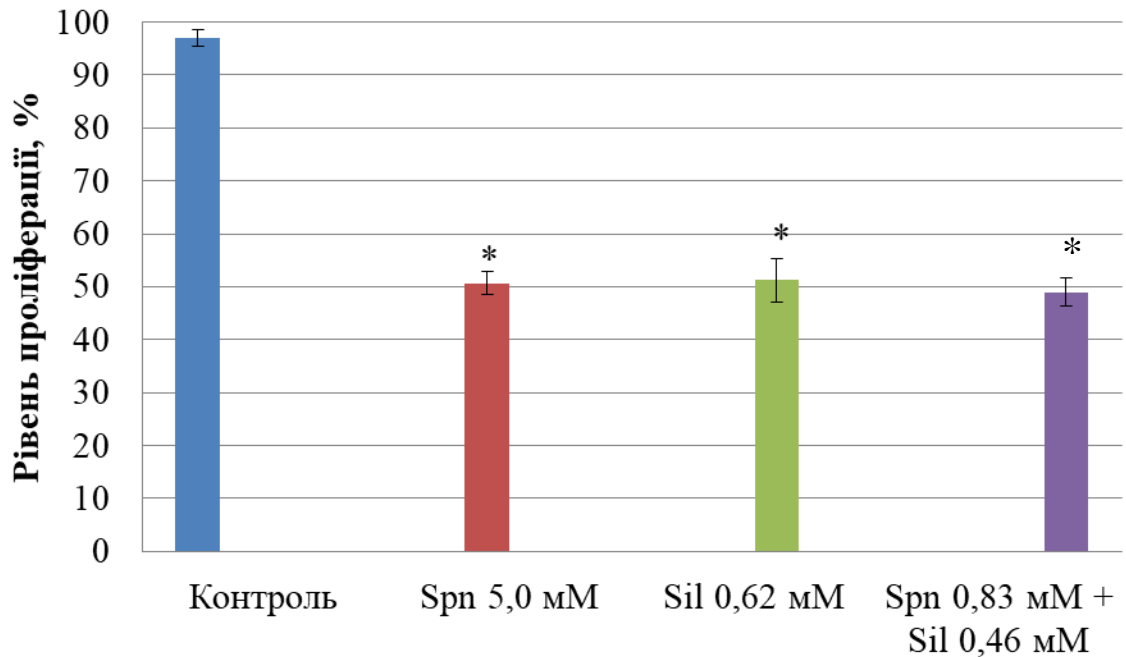


Рис. 3.8. Показники проліферації клітин лінії DU-145 за дії сперміну (Spn) та силібінину (Sil)

* – $p < 0,05$ відносно контролю

Клітини DU-145 контрольного зразка характеризуються типовим для цієї лінії фенотипом із переважанням веретеноподібних та полігональних форм (рис. 3.9). Клітини формували щільний моношар з добре розвиненими філоподіями, міжклітинними контактами та цитоплазматичними відростками, що свідчить про високий ступінь організації цитоскелету та потужний міграційний потенціал клітин. Характерною ознакою було високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення: великі ядра з еухроматином містили 2-3 чітко виражені ядерця. Цитоплазма клітин світла, дрібнозерниста, слабо базofilна. Виявлення мітотичних фігур свідчить про активний проліферативний статус клітин.

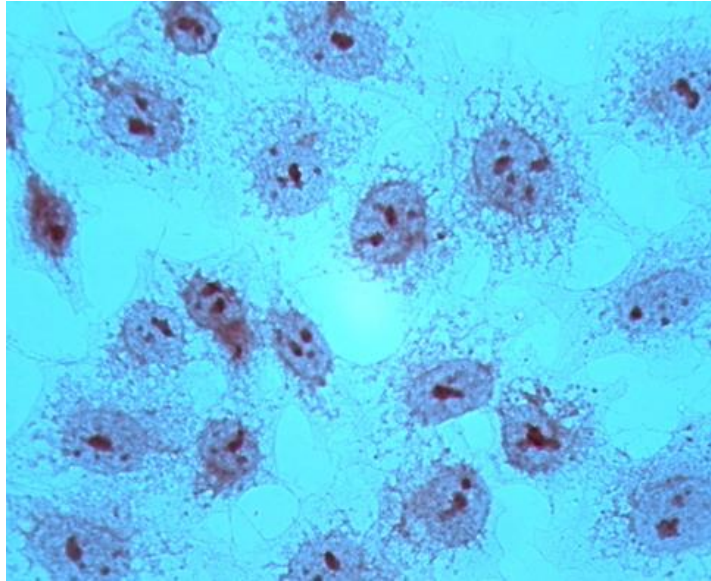


Рис. 3.9. Мікрофотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії DU-145 контрольної групи (зabarвлення гематоксилином і еозином; зб. $\times 900$)

За умов впливу силібініну у концентрації 0,62 мМ у клітинах спостерігалися ознаки порушення організації цитоскелету: втрата відростків, руйнування міжклітинних контактів та зміна форми з веретеноподібної на сферичну. У полі зору зростала частка клітин з ознаками апоптозу: ядра ставали гіперхромними з конденсованим хроматином, зникали ядерця (рис. 3.10). Спостерігалось зменшення об'єму цитоплазми, у певній частині клітин – її вакуолізація.

Окрім апоптичних клітин, фіксувалася поява великих двоядерних клітин, що свідчить про порушення цитокінезу та ймовірної індукції поліплоїдії. Відсутність мітотичних фігур та перебування клітин у інтерфазі свідчить про блокування мітотичної активності та клітинного циклу під впливом силібініну.

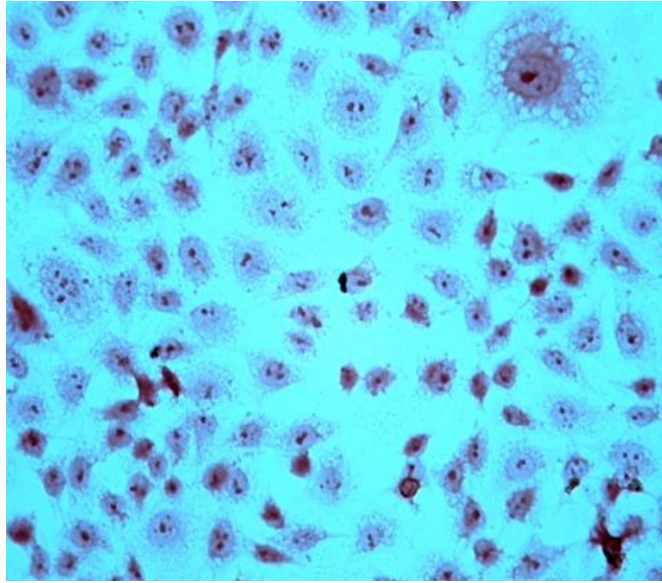


Рис. 3.10. Мікрофотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії DU-145 за присутності 0,62 мМ силібініну у середовищі інкубації (забарвлення гематоксилином і еозином; зб. \times 400)

У попередній роботі було встановлено, що спермін у концентрації 5,0 мМ спричиняв округлення клітин DU-145 та втрату адгезивних властивостей. Дезорганізація цитоскелету призводила до втрати псевдоподій. У полі зору фіксувалася поява апоптичних тілець, мембранних пухирців та відшарування везикул від деформованої плазматичної мембрани. Крім того, спостерігалася значна кількість мертвих клітин [7].

За умов комбінованої дії силібініну та сперміну певна частина клітин зберігала нативну веретеноподібну форму зі світлими еухроматичними ядрами та цитоплазматичними відростками. Інша частина клітин демонструвала такі апоптичні зміни як втрата міжклітинних контактів, округлення, темні конденсовані ядра, відсутність ядерців та поява апоптичних тілець (рис. 3.11). Навіть у клітинах з нормальною морфологією спостерігалася вакуолізація цитоплазми.

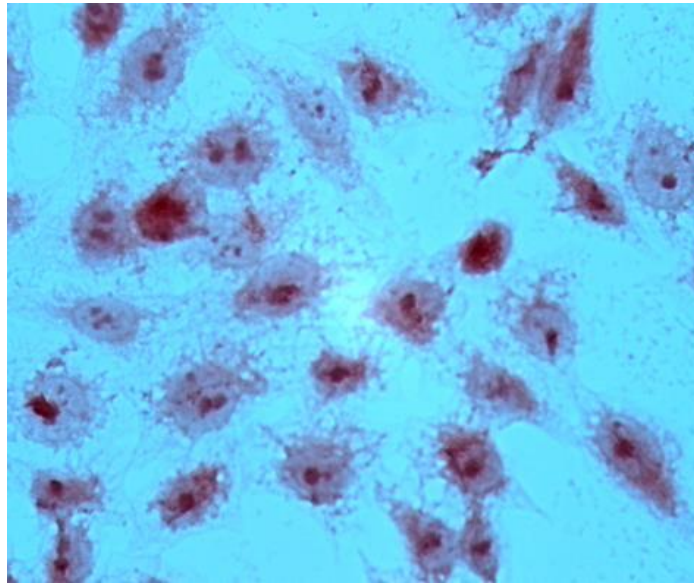


Рис. 3.11. Мікрофотографія фіксованих препаратів культивованих клітин лінії DU-145 за присутності 0,46 мМ силібініну та 0,83 мМ сперміну у середовищі інкубації (зabarвлення гематоксиліном і еозином; зб. $\times 900$)

Отже, у клітинній лінії DU-145 сумісне застосування силібініну та сперміну ініціювало запуск апоптозу, тоді як введення силібініну у чистому вигляді спричиняло цитостатичний ефект, що зумовлювало утворення апоптичних та багатоядерних клітин. Специфічність такої реакції може пояснюватися біологічними властивостями клітин DU-145, у яких спермін блокує клітинний цикл та цитокінез, сприяючи розмноженню атипових багатоядерних клітин. У свою чергу комбінована дія силібініну та сперміну ймовірно стимулювала розвиток оксидативного стресу, що перевищувало адаптаційні властивості андрогенрезистентних клітин DU-145 і, таким чином, дозволяло подолати їх резистентність з подальшим запуском апоптозу.

Таким чином, на клітинних лініях LNCaP та DU-145 був продемонстрований різноспрямований ефект силібініну та сперміну при комбінованому застосуванні. Менш агресивні андрогенчутливі клітини LNCaP були більш вразливими до дії силібініну, тоді як виживаність DU-145 ефективніше пригнічувалася під впливом сперміну. Така відмінність підкреслює важливу роль ALDH у системі клітинного захисту. Синергічна

дія обох інгібіторів стимулювала розвиток так званого тандемного альдегідного шоку: окрім накопичення токсичних альдегідів, силібінін посилював цитотоксичний ефект сперміну через інгібування ALDH-залежних систем детоксикації у пухлинних клітинах.

3.3. Електрокінетичні характеристики клітин ліній LNCaP та DU-145 за дії сперміну та силібініну

Відомо, що усі живі клітини оточені мембранами, котрі слугують основним інтерфейсом взаємодії із зовнішнім середовищем та за рахунок вибіркової проникності дозволяють клітинам регулювати своє внутрішньоклітинне середовище в межах, необхідних для оптимального функціонування. Мембранні насоси, спільно з поверхневим зарядом цитоплазми, створюють різницю концентрацій іонів між внутрішнім та зовнішнім середовищами клітини. Це, у свою чергу, разом з різницею зарядів на шарах мембрани, призводить до виникнення мембранного потенціалу [68].

Однією з важливих властивостей біологічної мембрани є її електричний заряд і різниця потенціалів між мембраною та навколишнім розчином. Дослідження демонструють відмінності у електричній провідності та діелектричній проникності нормальних клітин порівняно зі злоякісними. Нерівномірний рух іонів зумовлює дисбаланс заряду між внутрішньо- та позаклітинними компартментами. Відповідно, іонний дисбаланс відіграє вагомую роль у дерегуляції іонної активності, зміні різниці електричного потенціалу мембрани, зміні форми клітини, рН. Це має місце при процесах пухлиногенезу, ангіогенезу, інвазії та метастазуванні ракових клітин [69, 70].

Тому нашим наступним завданням було виміряти ζ -потенціал та щільність СПЗ клітин LNCaP та DU-145 під впливом сперміну, силібініну та їх комбінації.

У контрольній групі клітини лінії LNCaP демонстрували відносно

високе додатне значення ζ -потенціалу та щільність негативного СПЗ, що відповідає нормальному стану мембранного гомеостазу клітин за фізіологічних умов (табл. 3.1). За дії силібініну показники ζ -потенціалу знижувалися на 26 %, а знак щільності СПЗ змінювався з негативного на позитивний.

Таблиця 3.1

Значення ζ -потенціалу та щільності сумарного поверхневого заряду андрогенчутливих клітин LNCaP у присутності сперміну (Spn) та силібініну (Sil) *in vitro* ($M \pm SD$; $n = 3$)

Чинники впливу	ζ , мВ	$q, \times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	$14,07 \pm 1,58$	$- 8,51 \pm 1,13$
Sil (0,98 мМ)	$10,44 \pm 0,79^*$	$+ 7,48 \pm 0,57^*$
Spn (1,5 мМ)	$11,80 \pm 0,89^*$	$+ 8,47 \pm 0,64^*$
Sil (0,26 мМ) + Spn (1,1 мМ)	$11,30 \pm 1,21^*$	$+ 8,10 \pm 0,86^*$

* – $p < 0,05$ відносно контрольної групи

Обробка сперміном зумовлювала зниження значення ζ -потенціалу з $14,07 \pm 1,58$ мВ до $11,80 \pm 0,89$ мВ. Також спостерігалася інверсія знаку щільності СПЗ під впливом сперміну, що може пояснюватися його полікатіонною природою: позитивно заряджені аміногрупи утворюють електростатичні зв'язки з негативно зарядженими компонентами мембрани, тобто відбувається нейтралізація заряду. Однак при надмірній сорбції сперміну здійснюється перенасичення клітинної мембрани позитивним

зарядом, що, відповідно, призводить до зміни знаку СПЗ. Комбіноване застосування силібініну та сперміну знижувало ζ -потенціал відносно контролю на 19,7 %, тоді як СПЗ набував додатного значення, близького до показника при дії сперміну окремо.

На противагу цьому, зміни у андрогенрезистентних клітинах DU-145 під впливом досліджуваних агентів мали дещо відмінний характер. Застосування силібініну у концентрації 0,62 мМ призводило до підвищення показника ζ -потенціалу та інверсії знаку СПЗ з негативного на позитивний (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Значення ζ -потенціалу, щільності сумарного поверхневого заряду андрогенрезистентних клітин DU-145 у присутності сперміну (Spn) та силібініну (Sil) *in vitro* ($M \pm SD$; n = 3)

Чинники впливу	ζ , мВ	$q_s \times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	15,26 \pm 0,75	- 10,94 \pm 0,38
Sil (0,62 мМ)	19,42 \pm 1,98*	+ 13,92 \pm 0,85*
Spn (5,0 мМ)	9,19 \pm 0,46*	+ 6,59 \pm 0,33*
Sil (0,46 мМ) + Spn (0,83 мМ)	16,18 \pm 2,08*	+ 11,60 \pm 1,49*

* – $p < 0,05$ відносно контрольної групи

Введення сперміну зумовлювало виникнення значно нижчого позитивного поверхневого заряду, що є ключовою відмінністю реакції клітин DU-145 порівняно з лінією LNCaP. Гіпотетично це може бути пов'язано зі зниженою спорідненістю поверхні клітин DU-145 до сперміну, що є

результатом унікального іонного профілю мембрани цієї клітинної лінії.

Динаміка значень ζ -потенціалу підтверджує гіпотезу конкурентної взаємодії інгібіторів: якщо силібінін підвищував цей показник на 27,3 %, а спермін його знижував на 39,8 %, то комбінація цих агентів нівелювала ці зміни, повертаючи потенціал до контрольних значень. Також при сумісному застосуванні силібініну та сперміну не спостерігалось збільшення величини щільності СПЗ відносно окремої дії сперміну. Це може вказувати на конкуренцію двох інгібіторів за місце зв'язування на поверхні клітини, як це було продемонстровано у попередній роботі з іншим інгібітором альдегіддегідрогенази – дисульфірамом.

Таким чином, було встановлено, що силібінін та спермін по-різному впливають на ζ -потенціал та щільність сумарного поверхневого заряду клітинних ліній LNCaP та DU-145. Комбіноване введення обох інгібіторів демонструвало часткову взаємну нейтралізацію їх ефектів, котра виражалася у зниженні ζ -потенціалу клітин DU-145 до контрольних значень та у відсутності подальшого підвищення величини щільності сумарного поверхневого заряду, що може бути пов'язано з відмінностями у іонному аранжуванні поверхні клітин LNCaP та DU-145.

Отримані дані узгоджуються з результатами дослідження Ю. Яніша та співавторів, де вивчався вплив сперміну у поєднанні з іншими інгібіторами альдегіддегідрогенази – дисульфірамом та госиполом на параметри клітин LNCaP та DU-145 [64]. Було продемонстровано суттєве зниження ζ -потенціалу та інверсію негативного СПЗ на позитивний під впливом кожного інгібітора окремо у клітинах LNCaP. Комбіноване застосування дисульфіраму та госиполу зі сперміном нейтралізувало ці ефекти. Клітинні лінії демонстрували специфічну відповідь на дію агентів: андрогенрезистентні клітини DU-145 не змінювали своїх електрокінетичних властивостей. Це свідчить про відмінність іонного аранжування поверхні андрогенчутливих та андрогенрезистентних клітин [64].

Ключовим аспектом, що узгоджується з попередніми дослідженнями є

припущення про конкуренцію інгібіторів за ділянки зв'язування на поверхні клітин. У дослідженні Ю. Яніша та співавторів цей ефект виражався у нівелюванні окремого впливу сперміну на клітини LNCaP в умовах його комбінованого застосування з дисульфідом [64]. Дисульфід у чистому вигляді зумовлював зниження ζ -потенціалу та щільності СПЗ без зміни знаку заряду, тоді як інкубація клітин зі сперміном спричиняла інверсію знаку СПЗ з негативного на позитивний. Комбіноване застосування агентів призводило до зменшення щільності СПЗ, але без зміни знаку заряду. У свою чергу сумісна дія сперміну та силібінину у клітинах лінії DU-145 демонструвала подібний ефект: значення щільності СПЗ поверталось до контрольного рівня, однак це супроводжувалося інверсією знаку СПЗ [64].

Таким чином, на основі порівняння отриманих результатів з літературними даними можна зробити висновок, що зміна електрокінетичних параметрів клітин під дією сперміну та інгібіторів ALDH є важливою складовою їх цитотоксичної дії. Особливої уваги заслуговує стійкість андрогенрезистентних клітин лінії DU-145 до модифікації електрокінетичних властивостей, що можливо демонструє терапевтичний потенціал впливу на метаболізм поліамінів та системи альдегідної детоксикації.

3.4. Вміст поліамінів у клітинах ліній LNCaP та DU-145 за дії сперміну та силібінину

Одним із стратегічних завдань сучасної науки є пошук нових перспективних підходів до лікування різних типів раку, зокрема тих, котрі спрямовані на регуляцію обміну поліамінів. Попри досягнутий прогрес у дослідженні метаболізму поліамінів, подальше вивчення особливостей їх обміну в різних типах клітин і тканин залишається важливим для повного розуміння їхньої біологічної ролі у клітинній фізіології та патофізіології.

Починаючи з 1971 року у наукових публікаціях почали з'являтися

відомості про зв'язок між рівнями поліамінів сечі, таких як спермідин, путресцин та спермін, і розвитком злоякісних новоутворень. Дослідження продемонстрували значно вищу добову екскрецію спермідину у пацієнтів з раком передміхурової залози порівняно з контрольною групою. Водночас у групі з 30 пацієнтів з раком простати було зафіксоване підвищення кількості путресцину, що виділяється з сечею за добу, тоді як наявність сперміну у біоматеріалі ідентифікувати не вдалося [71].

Результати іншого дослідження підтверджують достовірну кореляцію між ступенем диференціації пухлин та зниженим рівнем сперміну у сечі. Статистичне порівняння найнижчого та найвищого кватилів рівня сперміну виявило трикратне зростання ризику розвитку низькодиференційованого РПЗ (49,3 % проти 16,7 %) та збільшення ризику високодиференційованого РПЗ у 3,5 рази (31,3 % проти 8,7 %), що підкреслює клінічну значущість використання сперміну як складової прогностичного індексу [71].

Зокрема, доведено кореляцію між підвищеним рівнем ацетильованих поліамінів у пухлинах раку грудної залози та активацією спермідин/спермін- N^1 -ацетилтрансферази, а також одночасним пригніченням поліаміноксидази [72]. Схожа тенденція спостерігається і у випадку колоректального раку: у пацієнтів спостерігалось значне підвищення рівня N^1, N^{12} -діацетилсперміну у порівнянні з контрольною групою, тоді як рівень діацетильованого кадаверину знижувався, а рівень діацетильованого путресцину підвищувався порівняно з пацієнтами із запальними захворюваннями кишечника [73]. Отже, виявлені зміни профілю поліамінів та їх похідних під час злоякісних трансформацій підтверджують перспективність їх подальшого дослідження як можливих діагностичних та прогностичних маркерів.

Тому одним із наших завдань було вивчити вплив силібініну та сперміну на профіль основних та ацетильованих фракцій поліамінів у клітинах ліній LNCaP та DU-145. У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що культивування клітин LNCaP за присутності сперміну у концентрації 5,0 мМ

зумовлювала підвищення рівня сперміну та N¹-ацетилспермідину (AcSpd), а також зниження рівня ацетилпутресцину (AcPut), путресцину (Put) та спермідину (Spd) [74]. Силібінін у концентрації 0,98 мМ спричиняв зниження рівня основних, за виключенням путресцину, та ацетильованих фракцій поліамінів (рис. 3.12). Наприклад, рівень спермідину зменшувався на 35 %, а рівень сперміну – з контрольного значення 1567,64 пмоль × мг білка⁻¹ до 1219,94 пмоль × мг білка⁻¹.

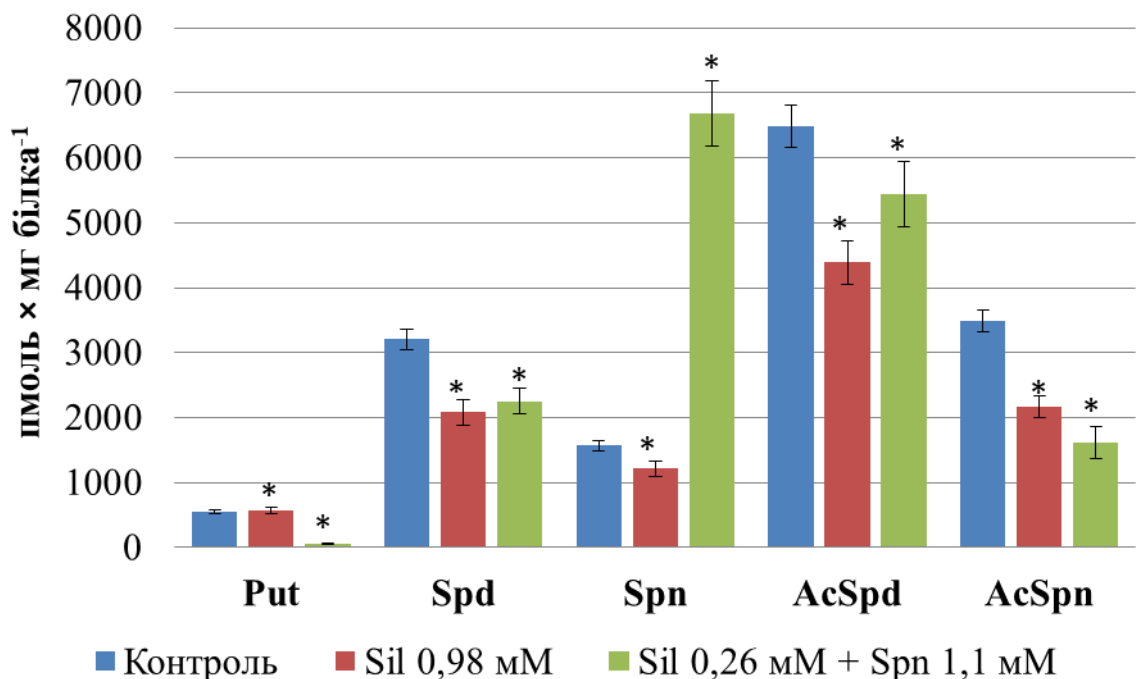


Рис. 3.12. Вміст поліамінів у клітинах лінії LNCaP за дії силібініну та його комбінації зі сперміном

* – $p < 0,05$ відносно контрольної групи

На противагу цьому, рівень путресцину під впливом силібініну достовірно не змінився порівняно з контрольною групою, навіть спостерігалось підвищення на 3,6 %. Фіксувалось зниження фракцій ацетильованих поліамінів – N¹-ацетилспермідину та N¹-ацетилсперміну (AcSpn) на 32,5 % та 38 % відповідно.

Можливо це може бути викликано безпосереднім або опосередкованим блокуванням активності спермідин/спермін N¹-ацетилтрансферази, внаслідок

чого сповільнюється ацетилювання спермідину та сперміну, відповідно скорочується пул ацетильованих поліамінів. Звідси логічно випливає пояснення, чому рівень путресцину лишався сталим – через дефіцит ацетильованих субстратів для поліаміноксидази. Не виключено, що запаси путресцину могли швидко витратитися клітиною, наприклад для підтримки проліферації або у якості субстрату для ресинтезу спермідину та сперміну під дією спермідинсинтази і спермінсинтази відповідно. Зниження рівня сперміну може вказувати на активацію сперміноксидази силібініном. Паралельно було зафіксовано зменшення молярного співвідношення спермідин/спермін (Spd/Spn), що корелювало зі зниженням показника проліферації з 98 % до 52,6 %.

Інкубація клітин лінії LNCaP в умовах комбінованого застосування силібініну у концентрації 0,26 мМ та сперміну у концентрації 1,1 мМ зумовлювала зниження рівня N¹-ацетилспермідину на 16,6 %, N¹-ацетилсперміну – на 53,8 %, спермідину – на 29,6 %. Відмінність у впливі силібініну окремо та у комбінації з екзогенним сперміном проявлялася у зниженні рівня путресцину на 89,1 % та підвищенні внутрішньоклітинного рівня сперміну у 4,3 раза порівняно з контролем. Зменшення профілю путресцину може пояснюватися додатковим до SSAT1 пригніченням активності ODC, що зумовлює подальший дефіцит спермідину. Ця гіпотеза узгоджується з результатами попереднього дослідження, де вплив 1,5 мМ сперміну на клітини лінії LNCaP спричиняв зниження експресії білкового продукту гена *ODC1* на 50 %. Показник проліферації клітин під дією комбінації силібініну та сперміну достовірно не відрізнявся від результатів, що були отримані за умов впливу силібініну окремо. Натомість додавання сперміну зумовило зниження виживаності клітин на 30 % порівняно з контрольною групою та на 16 % порівняно з силібініном у чистому вигляді. Також спостерігалось зменшення показника молярного співвідношення Spd/Spn у 6 разів.

Встановлено, що андрогенрезистентні клітини DU-145 більш стійкі до

дії силібініну, на відміну від андрогенчутливих клітин LNCaP. Порівняно з контрольною групою не були зафіксовані статистично значущі зміни рівнів спермідину, сперміну та N¹-ацетилсперміну, однак профіль путресцину знижувався на 29 %, а N¹-ацетилспермідину – на 44,1 % (рис. 3.13). Гіпотетично зменшення рівня путресцину може бути пов'язане з пригніченням активності SSAT1 або з активацією PAOX, що зумовлює прискорений катаболізм ацетильованих форм поліамінів. На відміну від клітин лінії LNCaP, у клітинах DU-145 силібінін ймовірно не впливав на активність SMOX, оскільки рівень сперміну лишався стабільним. Незмінний профіль спермідину, сперміну та N¹-ацетилсперміну може пояснюватися компенсаторним поповненням пулу поліамінів за рахунок інтерконверсії. Обробка силібініном практично не змінювала значення індексу Spd/Spn, однак знижувала показник проліферації клітин на 45,8 %.

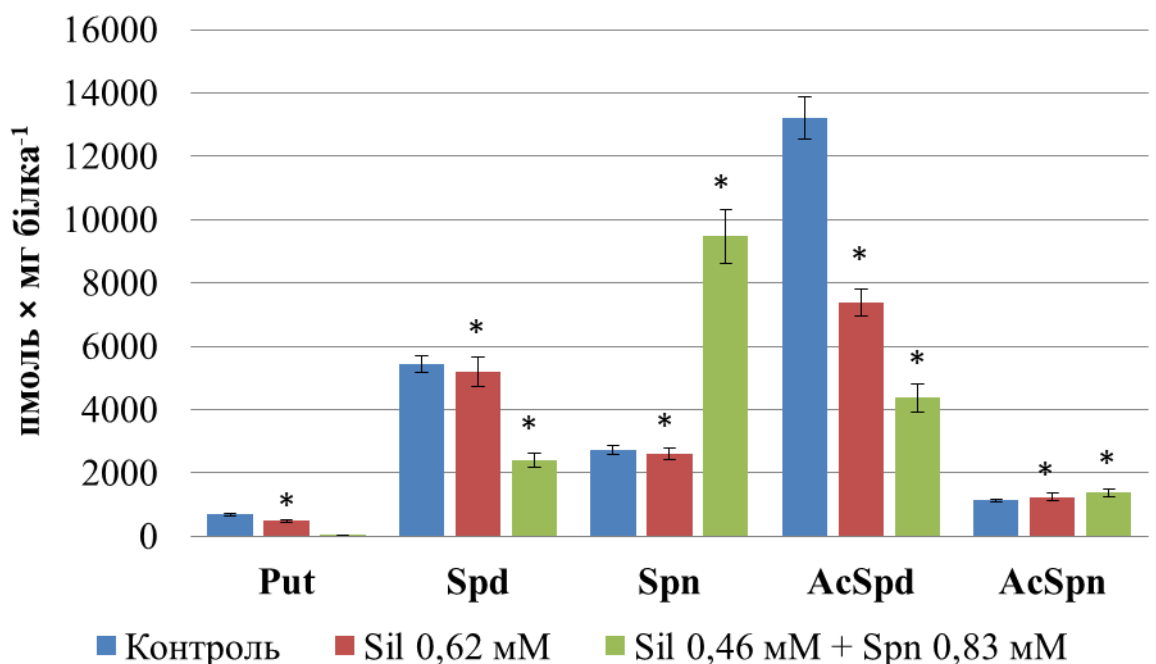


Рис. 3.13. Вміст поліамінів у клітинах лінії DU-145 за дії силібініну та його комбінації зі сперміном

* – $p < 0,05$ відносно контрольної групи

Комбіноване застосування силібініну у концентрації 0,46 мМ та сперміну у концентрації 0,83 мМ демонструвало більш яскраво виражений ефект на клітини DU-145: рівень путресцину знижувався на 97,7 % , вміст N¹-ацетилспермідину – на 67 %, а спермідину – на 56,7 %. Додавання екзогенного сперміну до середовища інкубації очікувано призводило до 3,5-кратного зростання рівня внутрішньоклітинного сперміну. Також спостерігалось підвищення рівня N¹-ацетилсперміну на 22 %, що може пояснюватися субстратною перевагою SSAT1 до сперміну за умов його надлишку. Показник молярного співвідношення Spd/Spn зменшувався у 8 разів.

Отримані результати демонструють відмінність у модуляції метаболізму поліамінів силібініном та сперміном окремо або у комбінованому застосуванні у клітинних лініях раку передміхурової залози залежно від їх андрогенної чутливості. Подібні закономірності спостерігалися у попередньому нашому дослідженні, де у якості інгібіторів ALDH використовувалися дисульфірам та госипол [64]. Зокрема, дисульфірам у андрогенчутливих клітинах LNCaP сприяв потужному накопиченню ацетильованих форм поліамінів, ймовірно за рахунок активації SSAT1. На відміну від дисульфіраму, силібінін зменшував рівень ацетильованих поліамінів, що свідчить про безпосереднє або опосередковане блокування SSAT1. Госипол демонстрував потужний інгібуючий вплив, знижуючи профіль N¹-ацетилсперміну та путресцину до нуля, гіпотетично через пригнічення активності ODC [64].

Особливо показовими є результати комбінованого застосування інгібіторів ALDH зі сперміном. У попередньому нашому дослідженні дисульфірам та госипол у поєднанні зі сперміном стимулювали різке зниження путресцину та молярного співвідношення Spd/Spn, що підсилювало їх антипроліферативний ефект [64]. Суміш силібініну та сперміну зумовлювала зниження рівня путресцину та спермідину, особливо у клітинах DU-145, що узгоджується з гіпотезою про пригнічення

синтетичного шляху поліамінів під впливом екзогенного сперміну [64].

Андрогенрезистентні клітини DU-145 демонстрували підвищену стійкість до впливу всіх трьох інгібіторів ALDH. Дисульфірам і госипол не викликали значних змін рівня ацетильованих поліамінів, а профіль спермідину та сперміну лишався практично незмінним. Під дією силібініну у клітинах також не було зафіксовано достовірного зниження профілю спермідину, сперміну та N¹-ацетилсперміну.

Одним з важливих показників стану метаболізму поліамінів слугував індекс Spd/Spn. Літературні дані визначають молярне співвідношення спермідину до сперміну як можливий функціональний маркер проліферативного потенціалу клітини, зважаючи на роль спермідину у клітинному рості, а сперміну – у диференціації [75]. Попередні дослідження Ю. Яніша та співавторів встановили кореляцію між індексом Spd/Spn та виживаністю пухлинних клітин. Застосування інгібіторів сперміноксидази у комбінації зі сперміном зумовлювали збільшення рівня внутрішньоклітинного сперміну та зниження профілю путресцину, і відповідно спермідину. У результаті відзначалося зменшення молярного співвідношення Spd/Spn, що вказує на більш виражене пригнічення клітинного росту за умов впливу суміші інгібіторів, порівняно з їх окремим використанням, навіть за значно вищих концентрацій [74].

Узагальнюючи отримані результати, у роботі був встановлений антипроліферативний та проапоптичний вплив силібініну та сперміну як окремо, так у комбінації на андрогенчутливу лінію клітин LNCaP, та проапоптичний і цитотоксичний ефекти – на андрогенрезистентні клітини DU-145. Виявлені зміни електрокінетичних властивостей та профілю поліамінів, зокрема зниження молярного співвідношення Spd/Spn, підтверджують протипухлинну дію обох інгібіторів.

Отримані результати можуть мати важливе практичне значення, оскільки обґрунтовують доцільність впливу на метаболізм поліамінів та систему детоксикації альдегідів у якості перспективної стратегії терапії раку

передміхурової залози.

ВИСНОВКИ

У ході роботи було встановлено, що спермін та силібінін виявляють виражений різноспрямований вплив на життєдіяльність клітин раку передміхурової залози залежно від їхньої андрогенної чутливості, що проявляється у синергічному пригніченні виживаності та проліферації андрогенрезистентної лінії DU-145, зміні електрокінетичного потенціалу мембран та перебудові профілю поліамінів у бік зниження проліферативного статусу клітин.

1. Встановлено, що цитотоксична та антипроліферативна дія сперміну і силібініну має виражений клітинно-специфічний характер. Силібінін більш виражено пригнічував життєздатність андрогенчутливих клітин лінії LNCaP переважно через активацію апоптотичних шляхів, тоді як у андрогенрезистентній лінії DU-145, на яку потужніше діє спермін, його ефект реалізується через пригнічення мітотичної активності та зупинку клітинного циклу.
2. Виявлено зміни електрокінетичних властивостей клітин раку передміхурової залози під дією сперміну і силібініну. У клітинах лінії LNCaP їх окрема та комбінована дія зумовлювала зниження ζ -потенціалу та інверсію знаку СПЗ на позитивний, причому відсутність змін його величини за комбінованої дії свідчить про конкуренцію за ділянки зв'язування. У клітинах лінії DU-145 комбінація агентів відновлювала рівень ζ -потенціалу до контрольного рівня, що вказує на відмінності іонного аранжування клітинної поверхні.
3. Продемонстровано чутливість клітин лінії LNCaP до змін профілю поліамінів під дією силібініну та метаболічну стійкість клітин лінії DU-145. Комбіноване застосування сперміну та силібініну в обох лініях призводило до виснаження пулу спермідину та накопичення сперміну, що супроводжувалося різким зниженням індексу Spd/Spn і свідчить про пригнічення проліферативного потенціалу клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Cancer Statistics Center. American Cancer Society.* Available at: <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/> (Accessed: 27 February 2026).
2. Schafer, E., Laversanne, M., Sung, H. et al. (2025). Recent patterns and trends in global prostate cancer incidence and mortality: an update. *Eur Urol.*, 87(3), pp. 302–313.
3. Jang, A., Lanka, S. and Ruan, H. (2023). Novel therapies for metastatic prostate cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 23(12), pp. 1251–1263.
4. Nuhn, P., De Bono, J. and Fizazi, K. (2019). Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology. *European Urology*, 75(1), pp. 88–99.
5. Залєток, С., Кленов, О., Гоголь, С., Бентрад, В., Стаховський, Е., Вітрук, Ю. та Гречко, Б. (2019). Поліаміни крові та сечі як нові діагностичні маркери раку передміхурової залози. *Онкологія*, 21(3), сс. 219–223.
6. Peng, Q., Wong, C. and Cheuk, I. (2021). The Emerging Clinical Role of Spermine in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(9), p. 4382.
7. Яніш, Ю., Прилуцький, М. та Сумнікова, І. (2023). Вплив сперміну та хлоргексидину на виживаність, електрокінетичні та цитоморфологічні характеристики клітин раку передміхурової залози людини. *Онкологія*, 25 (3), сс. 190–198.
8. Яніш, Ю., Прилуцький, М. та Залєток, С. (2022). Вплив сперміну на виживання та електрокінетичні характеристики лінії клітин раку передміхурової залози LNCaP. *Онкологія*, 24 (3), сс. 163–168.
9. Dinavahi, S., Bazewicz, C. and Gowda, R. (2019). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(10), pp. 774–789.

10. Zanoni, M., Bravaccini, S. and Fabbri, F. (2022). Emerging Roles of Aldehyde Dehydrogenase Isoforms in Anti-cancer Therapy Resistance. *Front. Med., Sec. Translational Medicine*, [online], Volume 9: 795762. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.795762> [Accessed 1 Mar. 2022].
11. Sagar, N., Tarafdar, S., Agarwal, S. et al. (2021). Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management. *Medical Sciences*, 9(2), p. 44.
12. Wallace, H., Fraser, A. and Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.*, 376 (1), pp. 1–14.
13. Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2019). The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 107, pp. 104–115.
14. Sagar, N., Tarafdar, S., Agarwal, S. et al. (2021). Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management. *Medical Sciences*, [online], Volume 9(2), 44. Available at: <https://doi.org/10.3390/medsci9020044> [Accessed 9 June 2021].
15. Li, H., Wu, B., Kanchwala, M. et al. (2022). YAP/TAZ drives cell proliferation and tumour growth via a polyamine-eIF5A hypusination-LSD1 axis. *Nature Cell Biology*, 24(3), pp. 373–383.
16. Liao, R., Chen, X., Cao, Q. et al. (2024). AMD1 promotes breast cancer aggressiveness via a spermidine-eIF5A hypusination-TCF4 axis. *Breast Cancer Research*, [online], Volume 26(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-024-01825-6> [Accessed 24 Apr. 2024].
17. Zabala-Letona, A., Arruabarrena-Aristorena, A., Martín-Martín, N. et al. (2017). mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. *Nature*, 547(7661), pp. 109–113.
18. Chenna, S., Gajula, S. and Nalla, L. (2025). Polyamine metabolism in cancer: drivers of immune evasion, ferroptosis and therapy resistance. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, [online], Volume 27, e39.

Available at: [10.1017/erm.2025.10026](https://doi.org/10.1017/erm.2025.10026) [Accessed 14 Nov. 2025].

19. Bi, G., Liang, J., Bian, Y. et al. (2024). Polyamine-mediated ferroptosis amplification acts as a targetable vulnerability in cancer. *Nat Commun*, [online], Volume 15(2461). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46776-w> [Accessed 19 Mar. 2024].
20. Song, H., Kim, J., Yoo, M. et al. (2006). Polyamine induces apoptosis through the calcium signaling in human prostate cancer cells. *Journal of Life Science*, 16(3), pp. 433–441.
21. Zahedi, K., Barone, S. and Soleimani, M. (2022). Polyamines and Their Metabolism: From the Maintenance of Physiological Homeostasis to the Mediation of Disease. *Medical Sciences*, [online], Volume 10(3), p. 38. Available at: <https://doi.org/10.3390/medsci10030038> [Accessed 15 July 2022].
22. Casero, R. and Pegg, A. (2009). Polyamine catabolism and disease. *Biochemical Journal*, 421(3), pp. 323–338.
23. Tse, R., Ding, X., Wong, C. et al. (2022). The Association between Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase (SSAT) and Human Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, [online], Volume 23(11), 5926. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23115926> [Accessed 25 May 2022].
24. Cervelli, M., Amendola, R., Polticelli, F. and Mariottini, P. (2011). Spermine oxidase: ten years after. *Amino Acids*, 42, pp. 441–450.
25. Sierra, J., Piazuolo, M., Luis, P. et al. (2020). Spermine oxidase mediates *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation, DNA damage, and carcinogenic signaling. *Oncogene*, 39(22), pp. 4465–4474.
26. Šebela, M. and Rašková, M. (2023). Polyamine-Derived Aminoaldehydes and Acrolein: Cytotoxicity, Reactivity and Analysis of the Induced Protein Modifications. *Molecules*, [online], Volume 28(21), 7429. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules28217429> [Accessed 4 Nov. 2023].
27. Yu, Z., Li, W. and Brunk, U. (2003). 3-Aminopropanal is a

- lysosomotropic aldehyde that causes oxidative stress and apoptosis by rupturing lysosomes. *APMIS*, 111(6), pp. 643–652.
28. Burcham, P. (2017). Acrolein and Human Disease: Untangling the Knotty Exposure Scenarios Accompanying Several Diverse Disorders. *Chem Res Toxicol.*, 30(1), pp. 145–161.
29. Kopera, M., Gwozdziński, K. and Pieniżek, A. (2024). Acrolein Induces Changes in Cell Membrane and Cytosol Proteins of Erythrocytes. *Molecules*, [online], Volume 29(11), 2519. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules29112519> [Accessed 27 May 2024].
30. Shortall, K., Djeghader, A., Magner, E. and Soulimane, T. (2021) Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. *Front. Mol. Biosci.*, [online], Volume 8, 659550. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.659550> [Accessed 14 May 2021].
31. Heider, J. and Hege, D. (2025). The aldehyde dehydrogenase superfamilies: correlations and deviations in structure and function. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [online], Volume 109(1), 106. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13467-5> [Accessed 29 Apr. 2025].
32. Xanthis, V., Mantso, T., Dimtisi, A., Pappa, A. and Fadoulglou, V. (2023). Human Aldehyde Dehydrogenases: A Superfamily of Similar Yet Different Proteins Highly Related to Cancer. *Cancers*, [online], Volume 15(17), 4419. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15174419> [Accessed 4 Sep. 2023].
33. Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., et al. (2013). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med.*, 56, pp. 89–101.
34. Gao, J., Hao, Y., Piao, X. and Gu, X. (2022). Aldehyde Dehydrogenase 2 as a Therapeutic Target in Oxidative Stress-Related Diseases: Post-Translational Modifications Deserve More Attention. *Int J Mol Sci.*, [online], Volume 23(5), 2682. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23052682> [Accessed 28 Feb. 2022].

35. Beretta, M., Wölkart, G., Schernthaner, M., et al. (2012). Vascular bioactivation of nitroglycerin is catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenase-2. *Circ Res.*, 110(3), pp. 385–393.
36. Vassalli, G. (2019). Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells International*, [online], 3904645. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/3904645> [Accessed 13 Jan. 2019].
37. Nguyen, A., Facey, C. and Boman, B. (2025). The Significance of Aldehyde Dehydrogenase 1 in Cancers. *Int. J. Mol. Sci.*, [online], Volume 26, 251. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms26010251> [Accessed 30 Dec. 2024].
38. Gorodetska, I., Offermann, A., Püschel, J. et al. (2024). ALDH1A1 drives prostate cancer metastases and radioresistance by interplay with AR- and RAR-dependent transcription. *Theranostics*, 14(2), pp. 714–737.
39. Holbert, C., Cullen, M., Casero, R. and Stewart, T. (2022). Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nat Rev Cancer.*, 22(8), pp. 467–480.
40. Maksymiuk, A., Sitar, D., Ahmed, R. et al. (2018). Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase-1 as a diagnostic biomarker in human cancer. *Future Science OA*, [online], Volume 4(10), FSO345. Available at: <https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0077> [Accessed 10 Sep. 2018].
41. Maksymiuk, A., Tappia, P., Sitar, D. et al. (2018). Use of amantadine as substrate for SSAT-1 activity as a reliable clinical diagnostic assay for breast and lung cancer. *Future Science OA*, [online], Volume 5(2), FSO365. Available at: <https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0106> [Accessed 11 Dec. 2018].
42. Buelvas, N., Ugarte-Vio, I., Asencio-Leal, L. et al. (2023). Indomethacin Induces Spermidine/Spermine-N¹-Acetyltransferase-1 via the Nucleolin-CDK1 Axis and Synergizes with the Polyamine Oxidase Inhibitor Methoctramine in Lung Cancer Cells. *Biomolecules*, [online], Volume

- 13(9), 1383. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom13091383> [Accessed 12 Sep. 2023].
43. Murray Stewart, T., Desai, A., Fitzgerald, M. et al. (2020). A phase I dose-escalation study of the polyamine analog PG-11047 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 85(6), pp. 1089–1096.
44. Ohkubo, S., Mancinelli, R., Miglietta, S. et al. (2019). Maize polyamine oxidase in the presence of spermine/spermidine induces the apoptosis of LoVo human colon adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.*, 54(6), pp. 2080–2094.
45. Vujcic, S., Diegelman, P., Bacchi, C. et al. (2002). Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem J*, 367(3), pp. 665–675.
46. Sun, L., Yang, J., Qin, Y. et al. (2019). Discovery and antitumor evaluation of novel inhibitors of spermine oxidase. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 34(1), pp. 1140–1151.
47. Koppaka, V., Thompson, D., Chen, Y. et al. (2012). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev.*, 64(3), pp. 520–539.
48. Dinavahi, S., Bazewicz, C., Gowda, R. and Robertson, G. (2019). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.*, 40(10), pp. 774–789.
49. Kulsum, S., Sudheendra, H., Pandian, R. et al. (2017). Cancer stem cell mediated acquired chemoresistance in head and neck cancer can be abrogated by aldehyde dehydrogenase 1 A1 inhibition. *Mol. Carcinog.*, 56(2), pp. 694–711.
50. Yang, S., Martinez, N., Yasgar, A. et al. (2018). Discovery of Orally Bioavailable, Quinoline-Based Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) Inhibitors with Potent Cellular Activity. *J Med Chem.*,

- 61(11), pp. 4883–4903.
51. Horoszewicz, J., Leong, S., Kawinski, E. et al. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research*, 43(4), pp. 1809–1818.
52. Stone, K., Mickey, D., Wunderli, H., Mickey, G. and Paulson, D. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International journal of cancer*, 21(3), pp. 274–281.
53. Saranyutanon, S., Deshmukh, S., Dasgupta, S. et al. (2020). Cellular and Molecular Progression of Prostate Cancer: Models for Basic and Preclinical Research. *Cancers*, [online], Volume 12(9), 2651. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12092651> [Accessed 17 Sep. 2020].
54. Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), pp. A3.B.1–A3.B.3.
55. Kiernan, J. (2008). *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham: Scion.
56. Smoluchowski, M. (1915). About Brownian molecular motion under action of external forces and their connection with the generalized diffusion equation. *Ann. Phys.*, 48, pp. 1103–1112.
57. Hunter, R. (1981). *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. London: Academic Press.
58. Кленов, О., Яніш, Ю. та Сумнікова, І. (2025). Вплив інгібіторів альдегіддегідрогеназ та їх комбінації зі сперміном на профіль поліамінів в клітинах ліній раку передміхурової залози людини. *Онкологія*, 27(1), сс. 44–50.
59. Glantz, S. (2012). *Primer of Biostatistics*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical.
60. Schipper, R., Romijn, J., Cuijpers, V. and Verhofstad, A. (2003). Polyamines and prostatic cancer. *Biochem Soc Trans.*, 31(2), pp. 375–380.
61. Яніш, Ю., Прилуцький, М., Сумнікова, І., Кленов, О., Сташенко, В., Залєток, С. та Вороніна, О. (2023). Вплив сперміну та хлоргексидину

- на виживаність, електрокінетичні та цитоморфологічні характеристики клітин раку передміхурової залози людини. *Онкологія*, 25(3), сс. 186–193.
62. Яніш, Ю., Прилуцький, М., Вороніна, О. та Залєток, С. (2023). Вплив сперміну та аміногуанідину на морфофункціональні характеристики клітин раку передміхурової залози людини лінії LNCaP. *Онкологія*, 25(1), сс. 24–31.
63. Яніш, Ю., Залєток, С., Вороніна, О., Сумнікова, І., Стащенко, В., Кленов, О. та Бентрад, В. (2024). Вплив паргіліну, сперміну та їх комбінацій на андрогензалежні та андрогеннезалежні клітини раку передміхурової залози людини *in vitro*. *Онкологія*, 26(3), сс. 186–196.
64. Яніш, Ю., Залєток, С., Вороніна, О., Сумнікова, І., Кленов, О. та Стащенко, В. (2025). Вплив дисульфіраму, госсиполу, сперміну та їх комбінації на клітини раку передміхурової залози людини *in vitro*. *Онкологія*, 27(1), сс. 27–43.
65. Ma, M., He, W. and Zhao, K. (2022). Targeting aldehyde dehydrogenase for prostate cancer therapies. *Front. Oncol.*, [online], Volume 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1006340> [Accessed 10 Oct. 2022].
66. Ray, P., Islam, M., Islam, M. et al. (2024). A comprehensive evaluation of the therapeutic potential of silibinin: a ray of hope in cancer treatment. *Front. Pharmacol.*, [online], Volume 15, 1349745. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1349745> [Accessed 29 Feb. 2024].
67. Jiang, Y., Song, H., Jiang, L. et al. (2020) Silybin Prevents Prostate Cancer by Inhibited the ALDH1A1 Expression in the Retinol Metabolism Pathway. *Front. Cell Dev. Biol.*, [online], Volume 8, 574394. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.574394> [Accessed 31 Aug. 2020].
68. Zhang, Q., Li, S. and Yang, Y. (2021). Studying structure and functions of cell membranes by single molecule biophysical techniques. *Biophys Rep.*, 7(5), pp. 384–398.

69. Prevez, H., Jimenez, A. and Oria, E. (2022). Simulations of surface charge density changes during the untreated solid tumour growth. *R. Soc. Open Sci.*, [online], Volume 9 (11). Available at: <https://doi.org/10.1098/rsos.220552> [Accessed 30 Nov. 2022].
70. Hughes, M. (2024). The cellular zeta potential: cell electrophysiology beyond the membrane. *Integrative Biology*, [online], Volume 16. Available at: <https://doi.org/10.1093/intbio/zyae003> [Accessed 30 Jan. 2024].
71. Chiu, P., Fung, Y. and Teoh, J. (2021). Urine spermine and multivariable Spermine Risk Score predict high-grade prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 24(2), pp. 542–548.
72. Fahrman, J., Vykoukal, J. and Fleury, A. (2020). Association Between Plasma Diacetylspermine and Tumor Spermine Synthase With Outcome in Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 112(6), pp. 607–616.
73. Venäläinen, M., Roine, A. and Häkkinen, M. (2018). Altered Polyamine Profiles in Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 38(6), pp. 3601–3607.
74. Кленов, О., Залеток, С., Яніш, Ю. та Сумнікова, І. (2025). Вплив сперміну та його комбінації з інгібіторами сперміноксидази на профіль поліамінів і виживаність клітин раку передміхурової залози людини. *Онкологія*, 26(2), сс. 112–119.
75. Higuchi, C. and Wang, W. (1995). Comodulation of cellular polyamines and proliferation: biomarker application to colorectal mucosa. *J Cell Biochem.*, 57(2), pp. 256–261.