

Ю.В. Яніш
М.П. Прилуцький
С.П. Залєток

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології НАН України,
м. Київ, Україна

Ключові слова: спермін,
аміногуанідин, лінія клітин
LNCaP, сумарний поверхневий
заряд, ζ -потенціал.

ВПЛИВ СПЕРМІНУ НА ВИЖИВАНІСТЬ ТА ЕЛЕКТРОКІНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ЛІНІЇ LNCaP

Мета: дослідити зв'язок між виживаністю клітин раку передміхурової залози (РПЗ) людини лінії LNCaP, їх сумарним поверхневим зарядом і ζ -потенціалом за наявності у живильному середовищі надлишку сперміну (Spm) або путресцину (Put) та визначити половинну інгібувальну концентрацію IC_{50} для Spm. **Об'єкт і методи:** дослідження проводили з використанням клітин РПЗ людини лінії LNCaP. Виживаність визначали у зразках клітин, кількістю $0,1-1,5 \cdot 10^6$. Клітини обробляли Spm і Put у концентрації $0,01-10$ мМ та аміногуанідином в концентрації $1,5$ мМ. Для визначення IC_{50} використано програму Quest Graph™ IC_{50} (AAT Bioquest, США). Електрокінетичний, або ζ -потенціал обчислювали за рівнянням М.Р. Смолуховського. Щільність сумарного поверхневого заряду клітин визначали згідно з рівнянням Квінке — Гельмгольца. **Результати:** продемонстровано протективні властивості аміногуанідину відносно інгібувальної дії Spm, якщо вміст останнього дорівнює або перевищує IC_{50} . Показано, що Spm у концентраціях $\geq 1,5$ мМ викликав загибель клітин РПЗ *in vitro* і може розглядатися як потенційний протипухлинний засіб. **Висновок:** головним результатом цього дослідження є встановлення чіткого інгібувального та антипроліферативного ефекту Spm у визначених концентраціях по відношенню до кількості клітин. На тлі зменшення виживаності клітин під дією Spm відбувалася зміна знаку їх поверхневого заряду з негативного на позитивний.

Плазматична мембрана живої клітини має складне аранжування як численними структурними полімерами, що несуть власний заряд, так і неорганічними іонами, залученими до перебігу трансмембранних процесів. Вкрита шаром глікокаліксу, подекуди доволі потужним, вона несе на собі велику кількість молекул, заряджених як позитивно, так і негативно. Величину сумарного поверхневого заряду (СПЗ) і його знак зумовлює суперпозиція зарядів усіх молекул клітинної поверхні [1]. За переваги аніонів він є негативним, що найчастіше спостерігається у фізіологічних умовах, а у разі переважання катіонів — позитивним. Знак СПЗ зумовлює напрям руху окремої клітини у рідкому середовищі, наприклад в ізотонічному буферному розчині, до катода або анода під впливом зовнішнього електричного поля з певним градієнтом напруженості. Електрокінетичний потенціал, зумовлений цим зарядом, у фізичній хімії визначається як стрибок потенціалу між адсорбційним та дифузним шарами іонів подвійного електричного шару дисперсної частинки будь-якої природи, суспендованої в дисперсійному середовищі (електроліті). Він відомий як ζ -потенціал (у сучасній англомовній літературі — Zeta Potential) [1, 2]. СПЗ живих клітин забезпечують вбудовані в мемб-

рану сіалові та асоційовані з нею нуклеїнові кислоти, різноманітні вуглеводи та білки, а також фосфоліпіди і поліаміни (ПА). І хоча молекули ПА несуть позитивний заряд, а білки можуть бути заряджені як позитивно, так і негативно, від'ємний заряд сіалових і нуклеїнових кислот та полісахаридів переважає, що зазвичай і зумовлює негативний СПЗ клітинної поверхні (плазматичної мембрани разом з глікокаліксом) у межах значень рН 7,2–7,4. Зміни фізіологічного стану клітин або метаболічні відхилення від норми негайно позначаються на величині ζ -потенціалу [3]. Наслідком цього є зміни лінійної швидкості руху клітин в електричному полі, яка вимірюється експериментально за сталих значень рН, іонної сили дисперсного розчину і температури. Коливання вмісту певних мембранних компонентів, зокрема антигенів, молекул екстрацелюлярних нуклеїнових кислот, білків або білкових складових трансмембранних каналів, широкого спектру вуглеводів, полікатіонів, у тому числі ПА, може призводити до появи субпопуляцій клітин зі зміненими електрокінетичними властивостями [1, 2]. А це, у свою чергу, може зумовлювати зміни адгезивних властивостей клітин та їх морфологічних характеристик. Із цієї причини дослідження величини ζ -потенціалу і СПЗ

були обрані як методично відповідні для визначення *in vitro* впливу поліамінів сперміну (Spm), путресцину (Put), а також аміногуанідину (AG) (інгібітор діаміноксидаз, фермент катаболізму ПА) на клітини раку передміхурової залози (РПЗ) людини LNCaP. Інтерес до Spm пов'язаний з результатами попередніх досліджень, які показали, що рівень Spm у злоякісно трансформованих клітинах передміхурової залози людини знижений і може відігравати роль важливого прогностичного критерію у перебігу РПЗ [4, 5]. Це відкриває певні перспективи щодо діагностики захворювання і дає підстави для припущення, що високі концентрації Spm здатні пригнічувати ріст пухлинних клітин. AG привертає увагу своєю властивістю інгібувати діаміноксидазу (ДАО) [6, 7], яка наявна у телячій сироватці, що входить до складу живильного середовища для культивування клітинних ліній, зокрема клітинної лінії РПЗ — LNCaP. Відомо, що ПА, зокрема Spm, розщеплюються ДАО сироватки. При окислювальному дезамінуванні Spm утворюється лабільний, схильний до спонтанного розпаду імінодіальдегід, який в подальшому перетворюється на моноокислений спермідин (Spd) і дуже токсичний акролеїн. Іміноальдегіди як продукти позаклітинного окислення Spm і Spd є біологічно активними речовинами. У дуже низьких концентраціях вони проявляють виражену антипроліферативну дію щодо нормальних і злоякісно трансформованих клітин людини і тварин, а також пригнічують ріст і розмноження різних бактерій та вірусів [8].

Метою цього дослідження було вивчити в експериментах *in vitro* вплив ПА (Spm і Put) та AG на електрокінетичні характеристики та виживаність клітин РПЗ лінії LNCaP.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Клітини РПЗ лінії LNCaP культивували у живильному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном з додаванням 10% телячої сироватки і 1% суміші антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин (Biowest, Франція). Клітини вирощували у культуральних флаконах з корисною площею 25 або 75 см², у об'ємі, відповідно, 5 або 20 мл живильного середовища, та інкубували у CO₂-інкубаторі (37 °C, 5% CO₂) для адаптації й активної проліферації культури. Кількість клітин, які вносили для подальшого культивування, варіювала від 0,1 • 10⁶ до 1,5 • 10⁶. Після формування моношару (через 24–48 год) клітини піддавали дії досліджуваних чинників (Spm або Put та їх комбінації з AG) у заданій діапазоні концентрацій. Для їх обрахунку визначили IC₅₀ (inhibitory concentration) для ПА в діапазоні від 0,01 до 10,0 мМ. Інгібувальну дію Spm на клітини лінії LNCaP тестували на першу, другу або третю добу після введення досліджуваних сполук у культуру. У лунки 96-лункового планшета вносили по 10 тис. клітин і поміщали у CO₂-інкубатор. Після інкубації у лунки з культурою клітин додавали Spm (AppliChem, Німеччина), послідовно розтираючи його до кін-

цевих концентрацій 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02 і 0,01 мМ. Ріст біомаси визначали, забарвлюючи моношар клітин 1% кристалічним фіолетовим (Merck, Німеччина) з подальшим вимірюванням екстинкції зразків за допомогою рідера Multiscan Plus (Termolab Systems, Фінляндія).

IC₅₀ визначали за допомогою програми Quest Graph™ IC₅₀ (AAT Bioquest, США), яка на основі закладених у неї даних створює логістичну модель із застосуванням регресійного аналізу на основі чотирьох ключових параметрів, згідно з рівнянням:

$$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{Hill coefficient}}},$$

де Y — екстинкція, Max і Min — її найбільші та найменші значення (оптичні одиниці), визначені експериментально, X — задана концентрація ліганду (у нашому випадку — Spm), Hill coefficient — коефіцієнт Хілла [9].

Цитологічним матеріалом для вимірювання ζ -потенціалу слугували клітини LNCaP, зняті з поверхні культуральних матраців з використанням трипсину і суспендовані у фосфатно-сольовому буфері (phosphate buffered saline — PBS). На кожне вимірювання брали аліквоту 100 тис. клітин; клітини осаджували центрифугуванням на Refrigerated centrifuge SIGMA-1 (США), ресуспендували у K/Na-фосфатному буфері (pH 7,4) для клітинного мікроелектрофорезу за класичною методикою [1, 2].

Для інгібування ДАО сироватки і виключення впливу окислених продуктів Spm на виживаність клітин LNCaP та їх електрокінетичні характеристики використано AG гемісульфат (Sigma-Aldrich, США). З останніх літературних даних відомо, що додавання AG до середовища, яке містить фетальну телячу сироватку, знижує цитотоксичний ефект ПА [6]. Можна очікувати, що застосування AG справлятиме протективну дію на пухлинні клітини, нівелюючи вплив продуктів Spm, окислених ДАО телячої сироватки, і ці зміни можна буде зафіксувати, вимірюючи ζ -потенціал клітин.

Як найбільш інформативні показники субпопуляційного складу було вивчено профілі частотного розподілу досліджуваних клітин за величиною ζ -потенціалу. ζ -потенціал обчислювали за рівнянням М.Р. Смолуховського [10]. Необхідні для підрахунку показники лінійної швидкості руху клітин в електричному полі вимірювали за допомогою світлооптичного мікроскопа МБР-1 з окуляр-мікрометром (сіткою Автанділова), секундоміра та пристрою оригінальної конструкції, використаного у попередніх дослідженнях [1, 2], у якому клітини, суспендовані в K/Na-фосфатному буфері (pH 7,4), рухалися всередині плоскостінного кварцового капіляра. Завдяки цьому усувалися сторонні механічні впливи на характер руху клітин та забезпечувалася можливість використання мікрооб'ємів досліджуваного матеріалу. Відстань між платиновими електродами приладу до-

рівнювала 5 см, градієнт напруженості електричного поля досягав 20 В/см, оскільки до електродів прикладалася напруга у 100 В. Рівняння М.Р. Смолюховського, адаптоване до біологічних об’єктів за фізіологічних значень фізико-хімічних параметрів, має вигляд: $\zeta = 14U$, де U — електрофоретична рухомість, виражена у позасистемних одиницях через відношення експериментально визначеної лінійної швидкості руху клітин (мкм/с) в електричному полі до градієнта напруженості поля (В/см) [11]. Одиниця виміру у системі СІ — мілівольт (мВ).

Напрямок руху клітин під дією зовнішнього електричного поля давав можливість визначити знак СПЗ клітин; його поверхневу щільність (q) обчислювали згідно з рівнянням Квінке—Гельмгольца: $q\delta = \xi\epsilon_a$, де δ — товщина подвійного електричного шару прийнята такою, що дорівнює 10^{-10} м (або 10^{-8} см), ϵ_a — абсолютна діелектрична проникність [1, 2]. Одиниця вимірювання в системі СІ — Кулон на квадратний метр (Кл/м²). Експерименти виконано у трьох повторях по 20 вимірів.

Проведено статистичну обробку отриманих результатів з використанням t -критерію Стюдента (пакет програм STATISTICA 6) [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після інкубації клітин LNCaP зі Spm у концентрації 1,5 мМ спостерігали загибель 50% клітин (рис. 1). Вживаність клітин зростала зі зниженням концентрації Spm. Так, за його концентрації 10,0 мМ частка живих клітин становила 0,8%, у той час як за концентрації в 1,25 мМ — вже 77%, а за концентрації 0,16 мМ сягала $\geq 95\%$ (рис. 1).

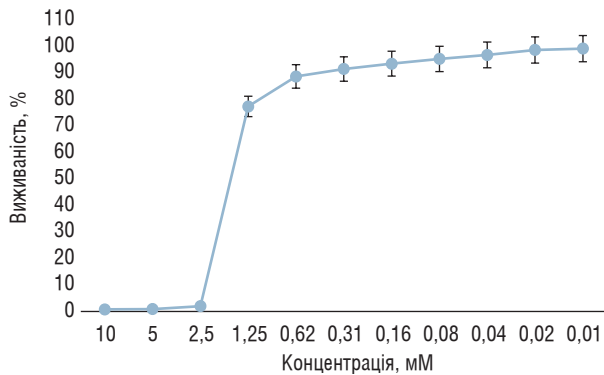


Рис. 1. Вплив Spm на вживаність клітин лінії LNCaP

Результати дослідження дії Spm на електрокінетичні властивості культивованих клітин наведено у табл. 1 і на рис. 2–5. Частотний розподіл інтактних клітин LNCaP і клітин, інкубованих протягом 4-ї доби культивування з досліджуваними сполуками, мав чітко виражений одномодальний характер з максимумом, що відповідав інтервалу 14,0–17,5 мВ (див. рис. 2–5). Відносно вузький профіль одномодального розподілу добре узгоджується з порівняно високою вживаністю досліджуваних клітин, яка за тестом включення барвника трипанового синього (0,4% ТС, Merck, Німеччина) живими клітинами ся-

гала $95,8 \pm 1,4\%$ в контролі і $68,5 \pm 1,5$ та $81,0 \pm 4,6\%$ під дією 1,5 мМ Spm у чистому вигляді та у комбінації його з 1,5 мМ AG відповідно (див. табл. 1). Як відомо, ζ -потенціал мертвих клітин зазвичай має значення, що перевищують 50 мВ [11].

Таблиця 1
Вплив Spm та AG на величину ζ -потенціалу, щільність і знак СПЗ (q) у клітинах лінії LNCaP

Чинник впливу	pH	Вживаність, %	ζ , мВ	$q, \cdot 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	7,4	$95,8 \pm 1,4$	$14,31 \pm 0,34$	$-10,26 \pm 0,36$
Spm 1,5 мМ	7,4	$68,5 \pm 1,5^*$	$13,06 \pm 0,65^{**}$	$+9,36 \pm 0,46^*$
Spm 1,5 мМ + AG 1,5 мМ	7,4	$81,0 \pm 4,6^*$	$16,38 \pm 1,56^{**}$	$-11,75 \pm 1,12^{**}$
Spm 5,0 мМ + AG 1,5 мМ	7,4	$1,0 \pm 0,5^*$	$11,92 \pm 0,54^{**}$	$+8,55 \pm 0,39^*$

Примітки: * — $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

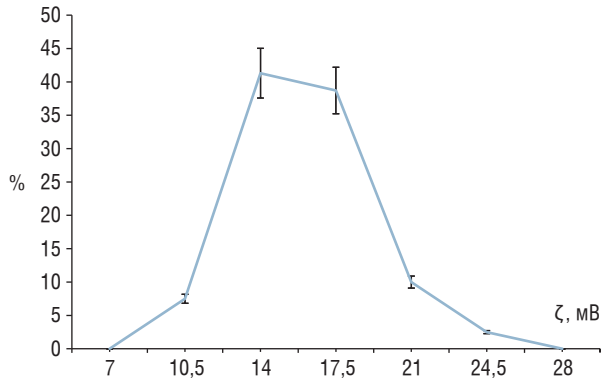


Рис. 2. Частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ -потенціалу (інтактний контроль, СПЗ від’ємний)

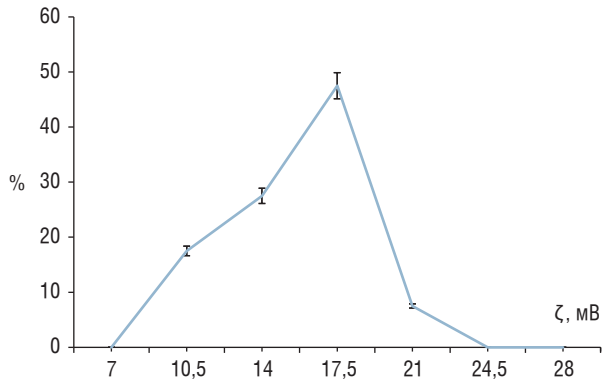


Рис. 3. Вплив 1,5 мМ Spm на частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ -потенціалу (СПЗ позитивний)

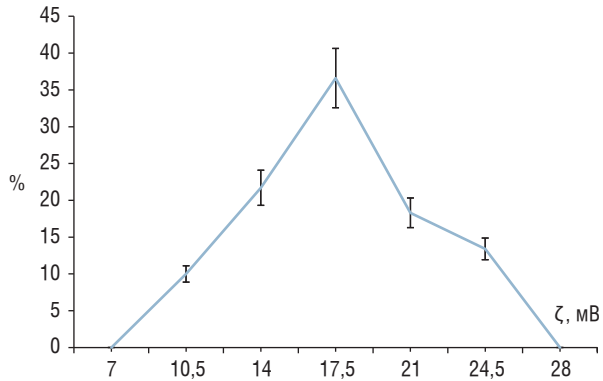


Рис. 4. Вплив комбінації 1,5 мМ Spm і 1,5 мМ AG на частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ -потенціалу (СПЗ від’ємний)

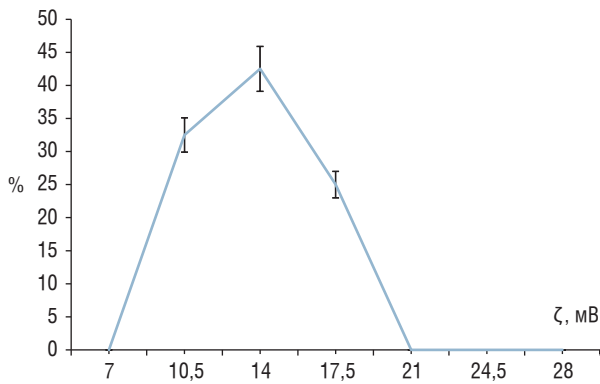


Рис. 5. Вплив комбінації 5,0 мМ Spm і 1,5 мМ AG на частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ-потенціалу (СПЗ позитивний)

За умови комбінованого впливу 5,0 мМ Spm і 1,5 мМ AG виживаність клітин була надзвичайно низькою ($1,0 \pm 0,5\%$). Це, можливо, пов'язано з тим, що основна маса клітин не витримала перевантажень навіть м'якого центрифугування і була зруйнована механічно. Дослідженню піддавалися вцілілі клітини, які зберегли притаманну їм форму і не були забарвлені ТС. Потрібно зауважити, що за морфологією їх цитоплазма набула зернистої структури. Проте профіль частотного розподілу клітин за ζ-потенціалом залишився одномодальним (див. рис. 5).

Клітини інтактного контролю лінії LNCaP за значень рН 7,4 мали ζ-потенціал, що в середньому становив $14,31 \pm 0,34$ мВ і був зумовлений наявністю на їх поверхні від'ємного СПЗ зі щільністю $(10,26 \pm 0,36) \cdot 10^{-2}$ Кл/м² (див. табл. 1, рис. 2). ζ-потенціал клітин лінії LNCaP, що протягом 2–4-ї діб культивування піддавалися впливу Spm (1,5 мМ), за значень рН 7,4 мали ζ-потенціал, що в середньому становив $13,06 \pm 0,65$ мВ. СПЗ цих клітин був позитивним і мав щільність $q = + (9,36 \pm 0,46) \cdot 10^{-2}$ Кл/м² (див. табл. 1, рис. 3).

Клітини лінії LNCaP, які протягом 2–4-ї доби культивування піддавалися комбінованому впливу Spm (1,5 мМ) та AG (1,5 мМ), мали ζ-потенціал, що дорівнював у середньому $16,38 \pm 1,56$ мВ за рН 7,4. Спостерігали відновлення негативного знаку СПЗ, притаманного інтактним клітинам, який мав щільність $q = - (11,75 \pm 1,12) \cdot 10^{-2}$ Кл/м² (див. табл. 1, рис. 4).

Слід зауважити, що клітини лінії LNCaP, які протягом 4-ї доби культивування піддавалися комбінованому впливу Spm (5,0 мМ) та AG (1,5 мМ), не були зруйновані центрифугуванням. Попри згадані вище морфологічні зміни, вони не профарбовувалися ТС та за рН 7,4 мали ζ-потенціал $11,92 \pm 0,54$ мВ. Як і у випадку з чистим Spm, СПЗ цих клітин знову набував позитивного заряду зі щільністю $q = + (8,55 \pm 0,39) \cdot 10^{-2}$ Кл/м² (див. табл. 1, рис. 5).

Інверсію нормального від'ємного заряду клітинної поверхні за фізіологічних значень рН зі зміною його на позитивний спостерігали тільки у разі культивування клітин лінії LNCaP за наявності чисто-

го Spm (1,5 мМ), або комбінації Spm у високій концентрації (5,0 мМ) з AG (1,5 мМ) (див. рис. 2–5). Як і очікувалося, за наявності в культуральному середовищі AG відновлювалися не тільки контрольні значення ζ-потенціалу і щільності поверхневого електричного заряду, але і профіль частотного розподілу клітин за їх величиною (див. табл. 1, рис. 2 і 4). Заслугує на увагу зміна форми моди розподілу: у разі від'ємного заряду клітин права, нисхідна гілка кривої розподілу була помітно краще вираженою. Стосовно інтактних клітин, то вона мала ввігнуту форму, а за умови комбінованого впливу — опуклу, з «плечем», що відповідало значенню ζ-потенціалу 24,5 мВ. Це добре узгоджувалося з показниками виживаності клітин (див. табл. 1) і свідчило про наявність певної субпопуляції клітин з порівняно вищими значеннями ζ-потенціалу внаслідок некробіотичних змін.

Інверсія знаку заряду за культивування клітин лінії LNCaP в присутності Spm (1,5 мМ) свідчить про надлишок полікатіонів вказаного ПА, сорбованих клітинною поверхнею. Ліва, висхідна гілка кривої розподілу мала опуклу форму, з «плечем», що відповідало 10,5 мВ (див. рис. 3). Поясненням цього факту може бути виникнення субпопуляції клітин з порівняно нижчими значеннями ζ-потенціалу, зумовленими сорбцією невеликого надлишку іонів Spm.

Незважаючи на те що концентрація AG 1,5 мМ була достатньою, щоб знівелювати інверсію знаку заряду клітин за концентрації Spm 1,5 мМ, підвищення концентрації Spm до 5,0 мМ знову викликало незворотну інверсію, проти якої дія 1,5 мМ AG вже була неефективною (див. табл. 1, рис. 5). Зауважимо, що крива розподілу і у такому разі мала стабільне «плече», що відповідало 10,5 мВ, як і в експерименті з чистим Spm (див. рис. 3).

Для співставлення впливу вищезазначених чинників було проведено дослід з тестування дії на клітини РПЗ Put. З даних літератури відомо, що Put не має чітко вираженого цитотоксичного ефекту [13]. У всіх досліджених варіантах визначали від'ємний знак СПЗ клітинної поверхні (табл. 2). У порівнянні з інтактним контролем (див. рис. 2) під впливом 1,5 мМ Put зафіксовано появу другорядної моди частотного розподілу клітин лінії LNCaP з піком, що відповідав 24,5 мВ (рис. 6). Максимум головної моди розподілу співпадав з таким у контролі і дорівнював 14,0 мВ (див. рис. 2, 6).

Таблиця 2

Вплив Put та AG на величину ζ-потенціалу та щільність і знак СПЗ (q) у клітинах лінії LNCaP

Чинник впливу	рН	Вживаність, %	ζ, мВ	q, $\cdot 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	7,4	95,8 $\pm$ 1,4	14,31 $\pm$ 0,34	-10,26 $\pm$ 0,36
Put, 1,5 мМ	7,4	91,0 $\pm$ 1,1*	15,93 $\pm$ 1,19*	-11,42 $\pm$ 0,85*
Put 1,5 мМ + AG 1,5 мМ	7,4	94,0 $\pm$ 1,0	14,20 $\pm$ 0,59	-10,18 $\pm$ 0,59
Put 5,0 мМ + AG 1,5 мМ	7,4	95,0 $\pm$ 1,6	17,46 $\pm$ 0,67*	-12,52 $\pm$ 0,48*

Примітки: * — $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Додавання до культурального середовища 1,5 мМ AG, окрім 1,5 мМ Put, викликало відтворення профілю частотного розподілу досліджуваних клітин, дуже близького до кривої розподілу інтактного контролю. Зауважимо тільки певну редукцію нисхідної гілки графіка, що відповідає значенням ζ -потенціалу, більшим за 14,0 мВ. Описана вище другорядна мода виявлена не була (рис. 2, 7).

Як і у дослідженні зі Spm, використання Put у концентрації 5,0 мМ знівелювало дію AG (рис. 7). Відбувається відновлення другорядної моди з максимумом близько 24,5 мВ. Профіль розподілу і значення ζ -потенціалу клітин, що утворюють головну моду, залишаються незмінними (рис. 8).

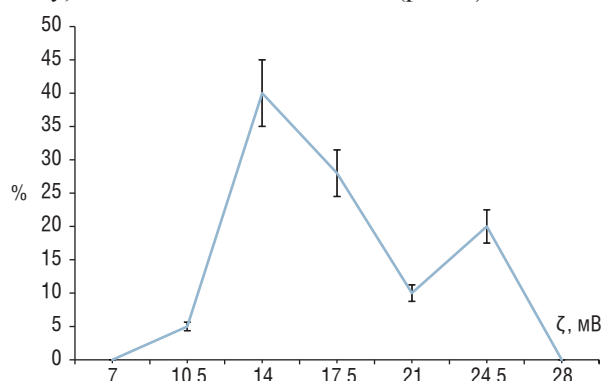


Рис. 6. Вплив 1,5 мМ Put на частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ -потенціалу (СПЗ від'ємний)

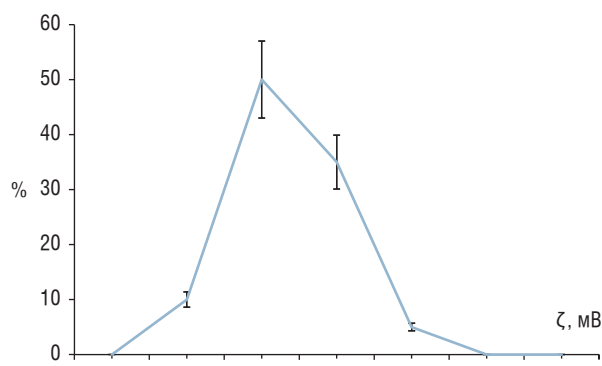


Рис. 7. Вплив комбінації 1,5 мМ Put і 1,5 мМ AG на частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ -потенціалу (СПЗ від'ємний)

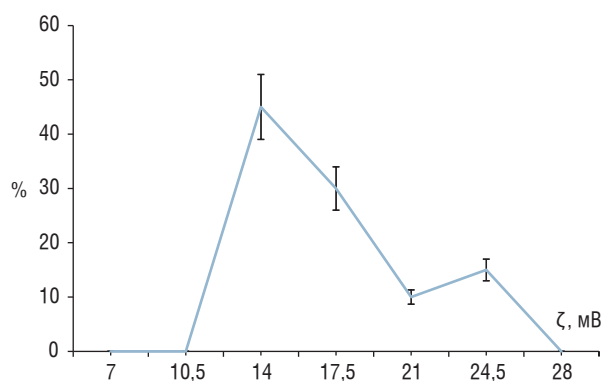


Рис. 8. Вплив комбінації 5,0 мМ Put і 1,5 мМ AG на частотний розподіл клітин лінії LNCaP за величиною ζ -потенціалу (СПЗ від'ємний)

Припущення щодо виникнення невеликої субпопуляції клітин лінії LNCaP, які зазнали некробіотичних змін внаслідок впливу надлишку поліамінів у зовнішньому середовищі і мають підвищений ζ -потенціал, можна й надалі розглядати як слушне. Практично не викликає сумніву продемонстрована на рівні електрокінетичних характеристик протективна дія AG, що нівелює інгібувальний вплив Spm на клітини цієї лінії.

ВИСНОВКИ

Показано інверсію знаку СПЗ клітин лінії LNCaP, культивованих за наявності Spm, концентрація якого становила 1,5 мМ або перевищувала її. Put, застосований у тих самих концентраціях, інверсії знаку заряду не викликав.

Продemonстровано протективні властивості AG щодо інгібувальної дії надлишку Spm на клітини лінії LNCaP, тестовані за величиною їх ζ -потенціалу.

Під впливом Spm виявлено збільшення частки клітин, що мають ζ -потенціал близько 10,5 мВ.

Показано, що під впливом як Spm, так і Put, виникла невелика субпопуляція клітин лінії LNCaP, ζ -потенціал яких коливався навколо значення 24,5 мВ. Можливо, це клітини у стані некробіотичних змін, що узгоджується з показниками виживаності загального клітинного пулу.

Встановлену різницю щодо впливу Spm і Put на клітини РПЗ можна пояснити довжиною вуглецевого скелету та різною кількістю позитивно заряджених аміногруп, а також імовірністю різного впливу цих молекул на клітинну поверхню.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Yanish YuV, Zaletok SP, Klenov OO, *et al.* Electrokinetic characteristics of leukemic cells. *Oncologia* 2020; **22** (1–2): 60–5. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-22-1-2020-g.8728 (in Ukrainian).
2. Yanish YuV, Zaletok SP, Bentrads VV, Sklyarenko LM. Electrokinetic characteristics of lymphoid cells of cancer patients and healthy donors. *Clin Oncol* 2018; **8** (3): 216–9 (in Ukrainian).
3. Akagi T, Kato K, Hanamura N, *et al.* Evaluation of desialylation effect on zeta potential of extracellular vesicles secreted from human prostate cancer cells by on-chip microcapillary electrophoresis. *Jap J of Appl Phys* 2014; **53**: 06JL01.
4. Zaletok SP, Klenov OO, Bentrads VV, *et al.* Polyamines as new potential biomarkers for differential diagnosis of prostate cancer and estimation of its aggressiveness. *Exp Oncol* 2022; **44** (2): 148–54. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17758.
5. Yanish YuV, Zaletok SP, Vityuk NV, Mukha YuP. Application of gold and silver nanoparticles for selective assay of spermine in mixture with spermidine. *Exp Oncol* 2021; **43** (1): 77–81. doi:10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-1.15609.
6. Harms M, von Maltitz P, Grob R, *et al.* Utilization of aminoguanidine prevents cytotoxic of semen. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 8563. doi: 10.3390/ijms23158563.
7. Seiler N, Knodgen B, Bink G, *et al.* Diamine oxidase and catabolism polyamines. *Advances in polyamine research* 1999. N.Y.: Raven press: 412–30.
8. Buckingham L, Hao T, O'Donnell J, *et al.* Ipatasertib, an oral AKT inhibitor, inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in serous endometrial cancer. *Am J Cancer Res* 2022; **12** (6): 2850–62. PMID: 35812065.

9. Ghasemi A, Salari A, Kalantarmahdavi M, Amiryousefi M. Sodium metabisulfite in dried plum and its cytotoxic effects on K-562 and L-929 normal cell lines. *J Food Sci* 2022; **87**: 856–66. doi: 10.1111/1750-3841.16034.
10. Smoluchowski MR. About Brownian molecular motion under action of external forces and their connection with the generalized diffusion equation. *Ann Phys* 1915; **48**: 1103 (in German).
11. Jensen G-L. Electrophoresis of cells. *Immunological methods* (ed. H. Frimel). M: Mir, 1979. 296 p (in Russian).
12. Lakin GF. *Biometrics*. M: Higher School, 1990. 352 p (in Russian).
13. Del Rio B, Redruello B, Linares DM, et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* 2019; **9** (1): 1–7. doi: 10.1038/s41598-018-36239-w.

THE INFLUENCE OF SPERMINE ON THE SURVIVAL AND ELECTROKINETIC CHARACTERISTICS OF HUMAN PROSTATE CANCER LNCaP CELL LINE

Yu.V. Yanish, M.P. Prylutskiy, S.P. Zaletok

R.E. Kavetskyi Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. *Aim:* study the relationship between the survival of human prostate cancer LNCaP cells, their total surface charge and ζ -potential in the presence of an excess of spermine or putrescine in the nutrient medium and to determine the half-inhibitory concentration IC_{50} of spermine. **Object and methods:** the study was conducted using human prostate cancer cells of the LNCaP cell line. Vitality was determined in cell samples, with total number $0.1–1.5 \cdot 10^6$. Cells were treated with spermine, putrescine, and aminoguanidine at concentration range

$0.01–10 \text{ mM}$. The IC_{50} inhibitory dose was determined using the Quest Graph™ IC_{50} program (AAT Bioquest, USA). The electrokinetic, or ζ -potential, was calculated according to the equation of M.R. Smolukhovskiy. The density of the total surface charge of the cells was calculated according to the Quincke-Helmholtz equation. **Results:** the protective properties of aminoguanidine against the inhibitory effect of spermine were demonstrated, if the concentration of the spermine equals or exceeds the IC_{50} . It has been shown that spermine in concentrations of 1.5 mM and higher causes the death of prostate cancer cells in vitro and can be considered as a potential anti-tumor agent. **Conclusion:** the main result of this study is the establishment of a clear inhibitory and antiproliferative effect of spermine in certain concentrations in relation to the number of cells. It was shown that alongside with decreasing of cell vitality under the influence of spermine, there was observed a change in the sign of their surface charge from negative to positive.

Key Words: spermine, aminoguanidine, LNCaP cell line, total surface charge, ζ -potential.

Адреса для листування:

Прилуцький М.П.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: prilutskiy.maxim@gmail.com

Одержано: 22.11.2022