

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

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

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ключові слова: рак передміхурової залози, клітинні лінії LNCaP і DU-145, дисульфідрам, госсипол, спермін, ζ -потенціал, поверхневий заряд клітин, апоптоз.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.027>

ВПЛИВ ДИСУЛЬФІРАМУ, ГОССИПОЛУ, СПЕРМІНУ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЇ НА КЛІТИНИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

Мета: вивчення впливу тетраетилтіураму дисульфідру (дисульфідраму, DS) і госсиполу (Gos) на життєздатність, електрокінетичні та цитоморфологічні властивості клітин раку передміхурової залози (РПЗ) і модифікацій за цими ознаками дії сперміну (Spn) при поєднаному його застосуванні з вказаними інгібіторами. **Об'єкт і методи:** тест-об'єктами були високодиференційовані андрогенчутливі клітини лінії LNCaP та низькодиференційовані андрогенрезистентні клітини лінії DU-145. Вивчання клітин визначали з використанням трипанового синього; вплив на проліферативну активність оцінювали колориметрично (забарвлення кристалічним фіолетовим), величину екстинкції зразків вимірювали при $\lambda = 544$ нм. Електрокінетичні параметри (ζ -потенціал, щільність сумарного поверхневого заряду (СПЗ) і його знак) визначали методом клітинного мікроелектрофорезу. Цитоморфологічні зміни досліджували за допомогою оптичного мікроскопа на фіксованих препаратах клітин, вирощених на покривних скельцях і забарвлених гематоксиліном та еозинном. **Результати:** інгібуючі концентрації (IC_{50}) використаного у чистому вигляді DS для клітин ліній LNCaP і DU-145 виявилися практично однаковими. При поєднаному застосуванні DS і Spn IC_{50} DS для обох клітинних ліній також мало відрізнялися між собою. Наявність у діючій суміші DS потенціювала антипроліферативні властивості Spn як у випадку андрогенчутливих клітин LNCaP, так і андрогенрезистентних DU-145. Зниження від'ємного СПЗ клітин LNCaP під впливом DS робить можливим припущення про конкуренцію між DS і Spn за рецептори зв'язування, оскільки збільшення позитивного СПЗ, викликаного дією чистого Spn, при їх комбінації не спостерігалось. Клітини лінії LNCaP, культивовані в присутності Gos або його комбінації із Spn, в електричному полі не рухалися взагалі внаслідок того, що катіони і аніони клітинної поверхні взаємно врівноважувалися. На відміну від них, клітини DU-145 зберігали на своїй поверхні необхідний для руху в електричному полі катіонно-аніонний дисбаланс. Це свідчило про різну іонну аранжировку їх поверхні. Проапоптотичний ефект інгібіторів альдегіддегідрогенази (ALDH) на клітини РПЗ людини *in vitro* і підсилення цитотоксичної дії Spn при їх комбінованому застосуванні можна пояснити накопиченням в клітинах отруйних альдегідів, які виникають в процесі метаболізму поліамінів і окиснення ALDH. **Висновки:** Gos справляє проапоптотичний вплив і на андрогенчутливі (LNCaP), і на андрогенрезистентні (DU-145) клітини РПЗ людини. Комбіноване застосування Gos і Spn викликало апоптоз в культурі високодиференційованих клітин лінії LNCaP; DS і Spn — в культурі клітин лінії DU-145. Андрогенчутливі і андрогенрезистентні клітини РПЗ мають різне іонне аранжування поверхневої мембрани: у клітин LNCaP DS і Spn конкурують за однакові ділянки зв'язування, чого не відбувається у клітин DU-145.

Серед поліамінів пухлин велику роль відіграють спермін (spermine, Spn) та спермідин (spermidine, Spd): перший відповідає за диференціювання клітин, а другий — за їх проліферацію. Зокрема, в клітинах раку передміхурової залози

(РПЗ), на відміну від клітин дотичної до пухлин нормальної тканини або доброякісних гіперпластичних клітин, відмічено знижений вміст саме Spn [1]. У попередніх дослідженнях показано, що Spn має цитотоксичний ефект на клітини РПЗ,

який може бути підсилений за рахунок впливу на ферменти його метаболізму тими чи іншими сполуками [2]. Пошук таких сполук був предметом попередніх тематичних розробок [2–6]. Наразі на клітинах РПЗ двох ліній, що відрізняються ступенем диференціювання і злоякісності, вивчена модифікація цитотоксичних властивостей Spn під впливом інгібіторів альдегіддегідрогенази (ALDH) — тетраетилтіураму дисульфід (дисульфіраму, DS) і госсиполу (Gos).

Жива клітина має складну електричну будову поверхні, обумовлену як структурними елементами, що несуть власний заряд, так і іонами, залученими до перебігу трансмембранних процесів. Вона несе на собі велику кількість молекул, заряджених як позитивно, так і негативно, величину сумарного поверхневого заряду (СПЗ) та його знак обумовлює суперпозиція зарядів всіх її поверхневих полікатионів, поліаніонів і неорганічних іонів. За переваги аніонів СПЗ є негативним, що найчастіше спостерігається у фізіологічних умовах, а за переваги катионів — позитивним. Знак СПЗ обумовлює напрям руху окремої клітини у рідкому середовищі до катода чи анода під впливом зовнішнього електричного поля з певним градієнтом напруженості [3]. Зміни фізіологічного стану клітин або метаболічні відхилення від норми одразу позначаються на величині їх електрокінетичного (ζ) потенціалу [4, 5], наслідком чого є зміни лінійної швидкості руху клітин в електричному полі. Експресія певних мембранних компонентів може викликати виникнення субпопуляцій клітин з відмінними від норми електрокінетичними характеристиками [6]. Оскільки ці характеристики суттєво залежать від стану клітинної поверхні і його змін під дією зовнішніх чинників, їх вибір в якості маркерів впливу на пухлинні клітини методологічно виправданий.

Мета дослідження: вивчення впливу тетраетилтіураму дисульфід (дисульфіраму, DS) і госсиполу (Gos) на життєздатність, електрокінетичні та цитоморфологічні властивості клітин РПЗ і модифікацій за цими ознаками дії Spn при поєднаному його застосуванні з вказаними інгібіторами.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тест-об'єктами слугували культури двох варіантів клітин РПЗ людини: андрогенчутливих високодиференційованих клітин лінії LNCaP та андрогенрезистентних низькодиференційованих клітин лінії DU-145, які різняться між собою за характером і кінетикою адгезійного росту [7, 8]. Клітини вирощували в живильному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном, з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки і 1% суміші антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин (всі реагенти Biowest, Франція) у культуральних флаконах (SPL, Корея). Після 24 год культивування в CO₂-інкубаторі за стандартних умов

(5% CO₂, 37°C) клітини піддавали дії досліджуваних чинників, а ще через 24 год знімали 0,25% розчином трипсину (Biowest, Франція), відмивали фосфатно-сольовим буфером, після чого визначали їх виживаність, електрокінетичний потенціал (ζ), щільність (q) СПЗ та його знак при pH 7,3 — як викладено у [3–6]. Виживаність визначали в тесті з трипановим синім (ТС, 0,08%) з використанням камери Горяєва. Для дослідження впливу DS (Thermo Scientific, Німеччина), Gos (Cayman Chemical Company, США) та їх комбінації із Spn (Sigma-Aldrich, США) на проліферативні властивості, клітини висаджували у плоскодонні лунки 96-лункових планшетів (по 1×10^4 кл./лунку). Через 24 год у лунки першого ряду додавали DS у концентрації 625 нМ, Spn — 10,0 мМ та DS + Spn (625 нМ і 10,0 мМ відповідно), кожний варіант у чотирьох повторях. Так само у лунки першого ряду іншого планшета вносили Gos у концентрації 150 мкМ, Spn — 10,0 мМ та Gos + Spn (150 мкМ і 10,0 мМ відповідно). Після подальшого двократного титрування клітини культивували з тестованими сполуками 24 год (5% CO₂, 37°C). Живі клітини фіксували і забарвлювали 0,5% розчином кристалічного фіолетового у метанолі, елюювали барвник етанолом. Кількість живих клітин визначали за допомогою приладу Lybsystems Multiskan Plus (Фінляндія), за величиною екстинкції при $\lambda = 544$ нм. Виміри проводили у чотирьох повторях кожної концентрації сполук або їх комбінації. Обрахунки значень IC₅₀ виконували із застосуванням нелінійного регресійного аналізу у програмі Quest Graph™ IC50 Calculator, AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>). Цитоморфологічні зміни, викликані дією DS, Gos та їх комбінації із Spn, вивчали на фіксованих препаратах клітин, вирощених на покривних скельцях і забарвлених гематоксиліном та еозином [9]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента [10] та пакета програм STATISTICA 6.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив DS, Gos, Spn та їх комбінації на проліферативну активність, виживаність і електрокінетичні властивості клітин РПЗ людини *in vitro*. Встановлено, що інгібуючі концентрації використаного у чистому вигляді DS для високодиференційованих андрогенчутливих клітин лінії LNCaP та низькодиференційованих андрогенрезистентних клітин лінії DU-145 виявилися практично однаковими: IC₅₀ = 24,7 і 25,3 нМ відповідно. IC₅₀ Spn при окремому застосуванні складали 1,5 мМ для клітин лінії LNCaP та 5,0 мМ — для клітин DU-145. У випадку поєднаного застосування DS і Spn інгібуючі концентрації досліджуваних сполук також мало відрізнялися між собою. При дії комбінації DS

із Spn на клітини лінії LNCaP IC_{50} DS = 21,6 нМ, а на клітини лінії DU-145 — 19,5 нМ. Водночас наявність у діючій суміші DS значною мірою потенціювала інгібуючі властивості Spn у випадку і андрогенчутливих, і андрогенрезистентних клітин РПЗ людини: IC_{50} Spn зменшувався на 76,0% для клітин лінії LNCaP та на 92,0% для клітин лінії DU-145. Складалося враження, що якісне значення мав сам факт присутності DS у концентрації 20,0–25,0 нМ: на його фоні в обох модельних варіантах відбувалося кількісно достовірне зростання антипроліферативної дії Spn, більш значуще у випадку андрогеннезалежних клітин РПЗ.

При застосуванні чистої сполуки для клітин LNCaP IC_{50} Gos = 31,4 мкМ, для клітин DU-145 IC_{50} Gos = 33,9 мкМ. Якщо ж Gos застосовували у комбінації із Spn, для клітин LNCaP IC_{50} Gos = 15,4 мкМ, IC_{50} Spn = 1,0 мМ. За умови комбінованого впливу Gos і Spn для клітин DU-145 IC_{50} Gos = 21,8 мкМ, IC_{50} Spn = 1,2 мМ. Таким чином, відносно інгібуючої концентрації Spn, застосованого у чистому вигляді, його IC_{50} для клітин LNCaP знизилася на 33,4%, а для клітин DU-145 на 76,0%. Але при комбінованому застосуванні із Spn зміни IC_{50} стосувалися і самого Gos. Так, для андрогенчутливих клітин лінії LNCaP IC_{50} Gos у порівнянні з чистим Gos знизилася на 50,4%, а для андрогенрезистентних клітин лінії DU-145 — на 35,7%.

DS, застосований окремо, викликав достовірне зниження ζ -потенціалу і поверхневої щільності сумарного електричного заряду (q) андрогенчутливих клітин лінії LNCaP, не змінюючи від'ємного

знаку заряду. Чистий Spn викликав інверсію знаку СПЗ на позитивний, а комбінований вплив суміші цих сполук призводив до часткового, але не остаточного нівелювання впливу чистого Spn: СПЗ клітин зменшувався, залишаючись позитивним. Якщо зниження від'ємного СПЗ клітин LNCaP під впливом окремо DS було викликане експресією катіонів на клітинній поверхні, стає можливим припущення про конкуренцію між DS і Spn за рецептори зв'язування, оскільки збільшення щільності (q) позитивного СПЗ при їх комбінованій дії не спостерігали (табл. 1).

Реакція андрогенрезистентних клітин РПЗ на наявність у живильному середовищі DS, Spn або їх комбінації була суттєво іншою у порівнянні з андрогенчутливими клітинами. За величиною ζ -потенціалу жодний з тест-варіантів не відрізнявся достовірно від контрольних значень. За умови впливу чистого DS на клітини лінії DU-145 спостерігали аналогічну картину: знак СПЗ і його щільність (q) не відрізнялись від контролю. У випадку дії як чистого Spn, так і суміші DS із Spn, спостерігали інверсію знаку СПЗ на позитивний, причому варіанти Spn і DS + Spn за даним показником також суттєво не відрізнялися один від одного (табл. 2).

Експерименти з визначення електрокінетичних характеристик клітин обох ліній, які піддавалися впливу Gos та Gos + Spn, дали дещо неочікувані результати. Андрогенчутливі клітини LNCaP, які були культивовані в присутності лише Gos (32,0 мкМ) або Gos (15,4 мкМ) + Spn (1,0 мМ), при рН 7,3 в електричному полі (20,0 В/см) не рухалися

Таблиця 1

Вплив *in vitro* дисульфіраму (DS), сперміну (Spn) та їх комбінації на виживаність і електрокінетичні характеристики андрогенчутливих клітин РПЗ людини лінії LNCaP (рН 7,3)

Тест-варіант (концентрація речовини)	Вживаність, %	ζ , мВ	q , $\times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	97,0 $\pm$ 1,4	9,90 $\pm$ 1,03	-7,10 $\pm$ 0,74
DS (25,0 нМ)	54,9 $\pm$ 2,0*	7,47 $\pm$ 0,82*	-5,36 $\pm$ 0,59*
Spn (1,5 мМ)	52,5 $\pm$ 1,5*	10,01 $\pm$ 0,50	+7,18 $\pm$ 0,36*
DS (22,0 нМ) + Spn (0,4 мМ)	48,5 $\pm$ 1,9*	5,93 $\pm$ 0,59*	+4,25 $\pm$ 0,42*

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

Таблиця 2

Вплив *in vitro* дисульфіраму (DS), сперміну (Spn) та їх комбінації на виживаність і електрокінетичні характеристики андрогенрезистентних клітин РПЗ людини лінії DU-145 (рН 7,3)

Тест-варіант	Вживаність, %	ζ , мВ	q , $\times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	94,0 $\pm$ 2,2	10,41 $\pm$ 0,89	-7,46 $\pm$ 0,64
DS (25,0 нМ)	55,0 $\pm$ 1,4*	10,07 $\pm$ 1,21	-7,22 $\pm$ 0,87
Spn (5,0 мМ)	49,3 $\pm$ 2,0*	9,19 $\pm$ 0,46	+6,59 $\pm$ 0,33*
DS (20,0 нМ) + Spn (0,4 мМ)	53,0 $\pm$ 1,9*	9,75 $\pm$ 0,89	+6,99 $\pm$ 0,64*

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

Вплив *in vitro* госсиполу (Gos), сперміну (Spn) та їх комбінації на виживаність і електрокінетичні характеристики андрогенрезистентних клітин РПЗ людини лінії DU-145 (pH 7,3)

Тест-варіант	Вживаність, %	ζ , мВ	$q, \times 10^{-2}$ Кл/м ²
Контроль	96,0 $\pm$ 1,2	12,38 $\pm$ 0,74	-8,88 $\pm$ 0,53
Gos (34,0 мкМ)	53,0 $\pm$ 1,6*	7,29 $\pm$ 0,40*	-5,23 $\pm$ 0,29*
Spn (5,0 мМ)	49,3 $\pm$ 2,0*	9,19 $\pm$ 0,46*	+6,59 $\pm$ 0,33*
Gos (22,0 мкМ) + Spn (1,2 мМ)	51,0 $\pm$ 2,1*	8,96 $\pm$ 0,68*	+6,42 $\pm$ 0,49*

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

взагалі ні до катода, ні до анода внаслідок того, що катіони і аніони клітинної поверхні взаємно врівноважилися. На відміну від них, андроген-резистентні клітини DU-145 зберігали на своїй поверхні необхідний для руху в електричному полі катіонно-аніонний дисбаланс. Gos, застосований окремо, викликав достовірне зниження величини ζ -потенціалу андрогенрезистентних клітин лінії DU-145, причому їх СПЗ залишався від'ємним, як і у клітин контролю. Можливо, тут мала місце експресія катіонів на клітинній поверхні, як і у андрогенчутливих клітин лінії LNCaP. Під впливом Spn, застосованого і окремо, і у комбінації з Gos, спостерігалася інверсія знаку СПЗ на позитивний, причому величини поверхневої щільності заряду (q) не тільки не відрізнялися між собою, а і практично дорівнювали відповідним значенням для клітин DU-145 при дії суміші DS із Spn. Це свідчить на користь того, що андрогенрезистентні і андрогенчутливі клітини РПЗ людини мають різну іонну аранжировку поверхні (табл. 3).

Вплив DS, Gos, Spn та їх комбінована дія на цитоморфологічні характеристики клітин РПЗ людини *in vitro*. Клітини контролю лінії LNCaP мали типову для них морфологію: великі полігональні клітини з відростками. Своїми відростками клітини контактували одна з одною. Ядра в клітинах займали майже весь об'єм, мали округлу форму, в них переважав еухроматин та чітко виражені 2–4 ядерця. Цитоплазма майже не розвинена, світло зафарбована. Такі морфологічні ознаки свідчать про активний синтез білків та утворення енергії в клітинах (рис. 1, а–г).

Gos (31,0 мкМ) демонструє проапоптотичну дію на клітини лінії LNCaP. Індукований Gos апоптоз характеризувався конденсацією хроматину, зморщуванням клітин та утворенням апоптотичних пухирців. Поруч із нормальними клітинами чітко помітні клітини в апоптозі: клітини темні, зменшені в розмірі, плазматична мембрана пошкоджена, а цитоплазма вакуолізувалась (рис. 2, б–г). Хроматин ставав щільним, утворюючи темні ділянки (рис. 2, в). Цитоплазма таких клітин щільніша, клітини набували більш компактної форми, розпадались на невеликі округлі фрагменти — апоптотичні тілця (рис. 2, а–г).

Такі внутрішньоклітинні процеси, як індукція апоптозу, можуть бути пов'язані з взаємодією Gos з білками родини Bcl-2, наслідком чого є індукція каспазозалежного шляху та мітохондріально-опосередкованого апоптозу, вплив на клітинні сигнальні шляхи, клітинний цикл та фрагментацію ДНК [11].

Переважає більшість клітин, культивованих під комбінованим впливом Gos (15,4 мкМ) + Spn (1,0 мМ), мала змінену морфологію в порівнянні з контролем. Були помітні типові витягнуті клітини з відростками, але більшість їх поступово вкорочувала свої відростки, клітини ставали округлими і втрачали контакти між собою. Була порушена взаємодія між клітинами, змінений цитоскелет, переважали округла форма і зменшений розмір клітин, гіперхромні ядра (рис. 3, а–б). Також були відмічені ознаки апоптозу, такі як каріопікноз і каріореक्सис, поява апоптотичних тілець (рис. 3, в–г).

Отже, поєднання Gos (15,4 мкМ) і Spn (1,0 мМ) призводило до початкових апоптотичних процесів в переважній більшості клітин РПЗ андрогензалежної лінії LNCaP.

Клітини лінії LNCaP, культивовані в присутності DS (25,0 нМ), мали переважно подовжену форму, утворюючи контакти між собою, та велике овальне ядро з помітними ядерцями, що свідчило про високий рівень метаболічної активності. Але в усіх полях зору з'являлися округлі клітини без псевдоподій, які втратили здатність до міграції та контактів. В ядрах таких клітин була помітна конденсація хроматину, зникнення ядерця (рис. 4, а–б). Каріопікноз, помітний в деяких клітинах, скоріш за все є першою ознакою апоптозу (рис. 4, в–г).

Отже, DS в концентрації 25,0 нМ справляв цитотоксичний та проапоптотичний вплив на клітини РПЗ андрогенчутливої лінії LNCaP.

Культивування клітин лінії LNCaP з DS (22,0 нМ) та Spn (0,4 мМ) одночасно викликало збільшення кількості багатоядерних клітин, а також округлих клітин з пікнотичними ядрами та каріореक्सисом. Хроматин в ядрах ущільнювався, ядра ставали гіперхромними. Ядра були зменшені в розмірах, втрачали нормохромність та ядерця (рис. 5, а–г).

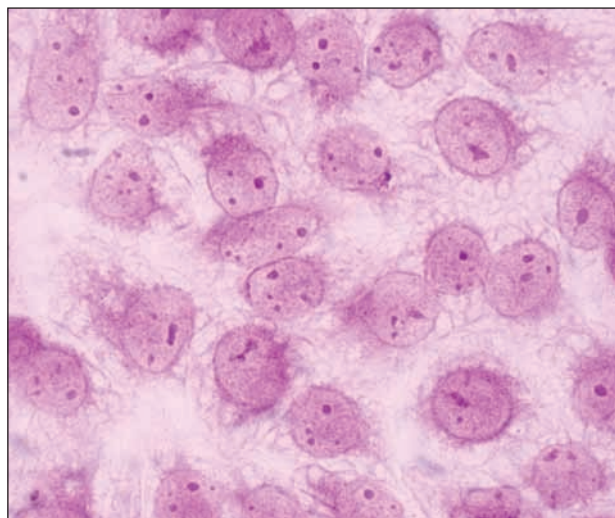
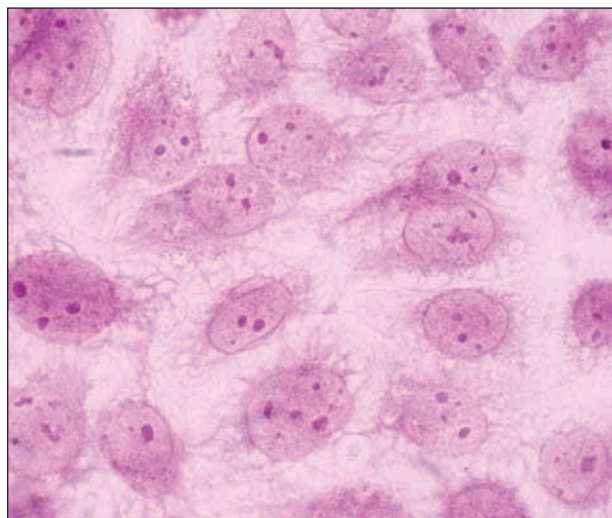
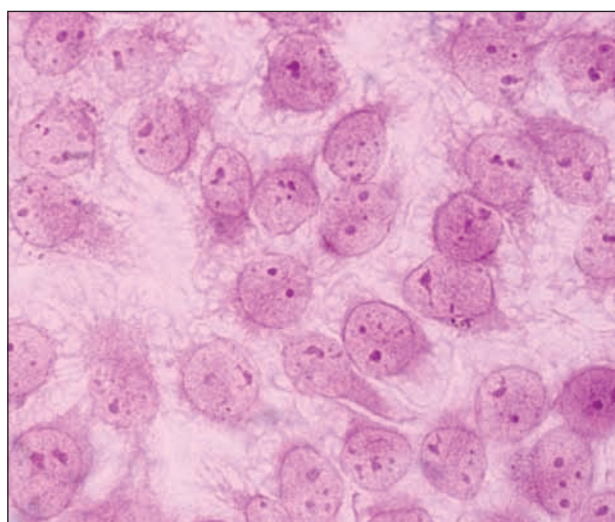
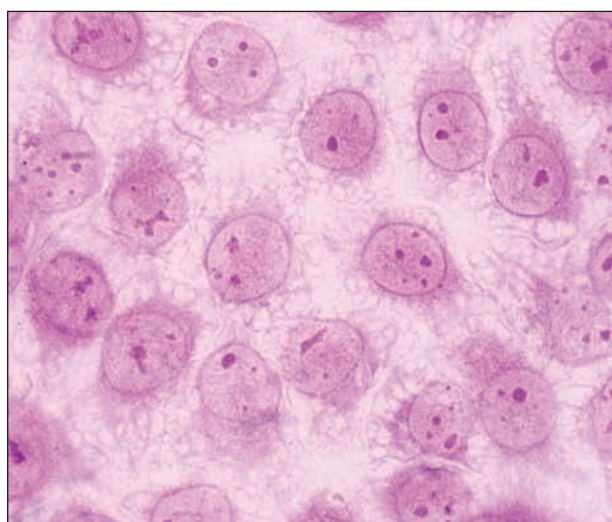
*a**б**в**г*

Рис. 1. Морфологія клітин лінії LNCaP у контролі: *a* — великі веретеноподібні клітини, світлі ядра з 2–3 ядерцями; *б* — клітини з відростками, з великим світлим ядром, що займає майже весь об'єм цитоплазми; *в* — клітини контактують одна з одною за допомогою відростків; *г* — синтетично-активні клітини з добре розвиненим цитоскелетом, світлим еухроматином в ядрі та ядерцями. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. ×1000

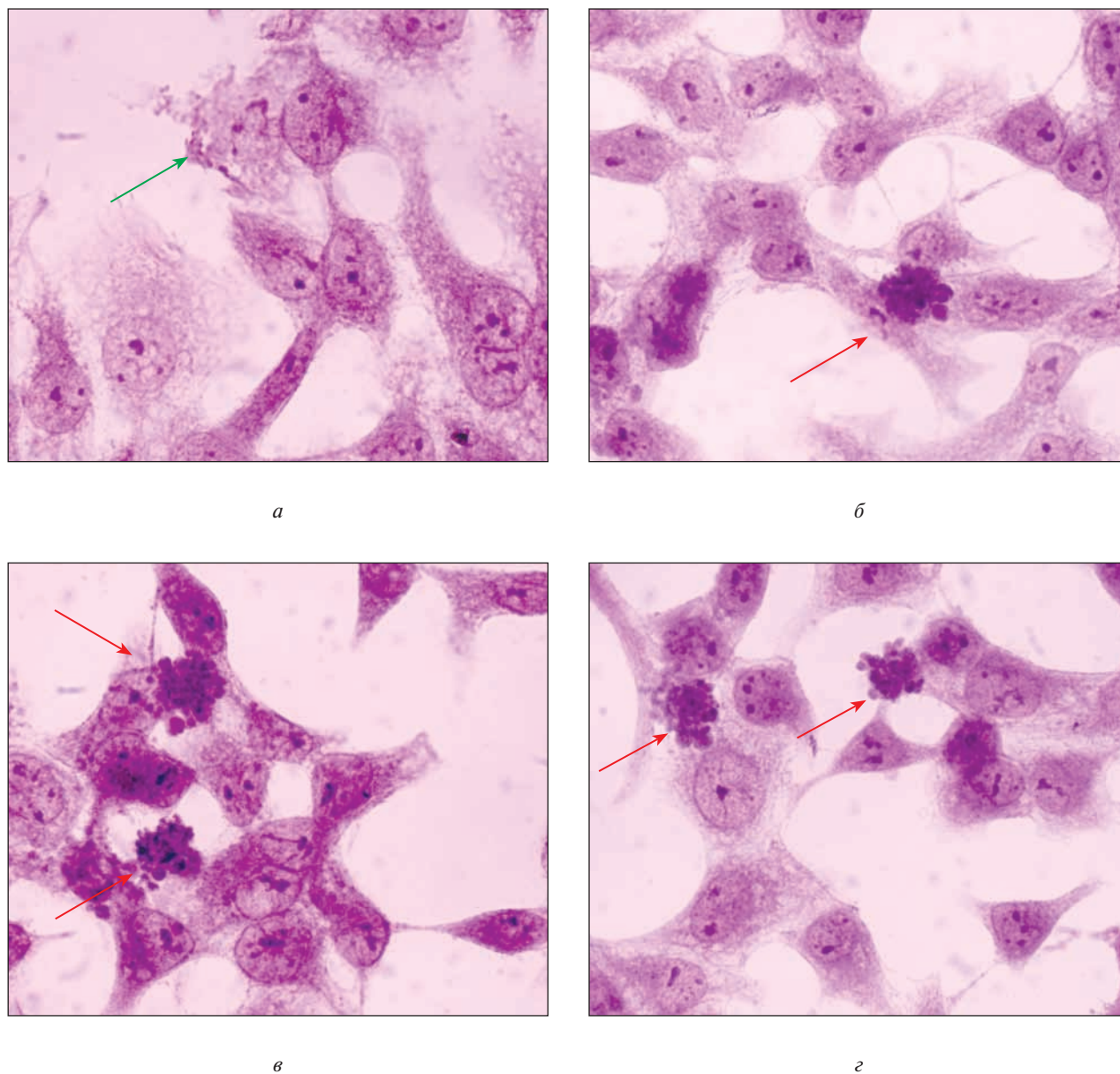


Рис. 2. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок культивування в присутності Gos (31,0 мкМ): *а* — клітини LncaP типової морфології, зеленою стрілкою показана клітина на ранній стадії апоптозу: втрачені відростки, зруйновані мембрана та ядерна оболонка (зелена стрілка); *б* — пікнотичні ядра та апоптоз в клітинах; *в* — поруч з клітинами звичайної морфології помітні апоптотичні клітини з конденсацією хроматину; *г* — червоними стрілками показані клітини в апоптозі, розпад клітин на мікропухирці. Забарвлення гематоксилином та еозином. 36. $\times 1000$

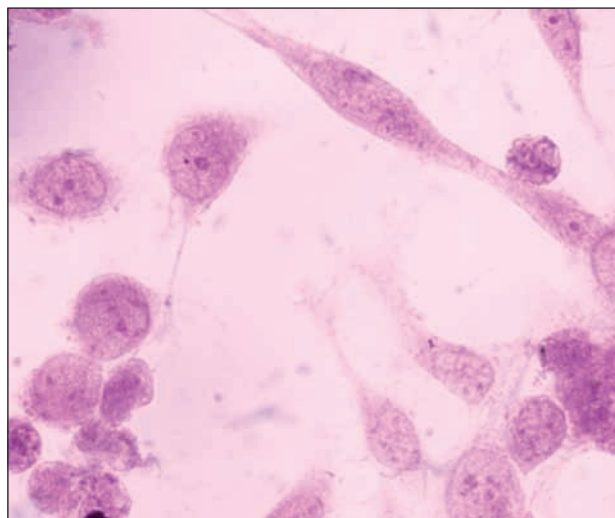
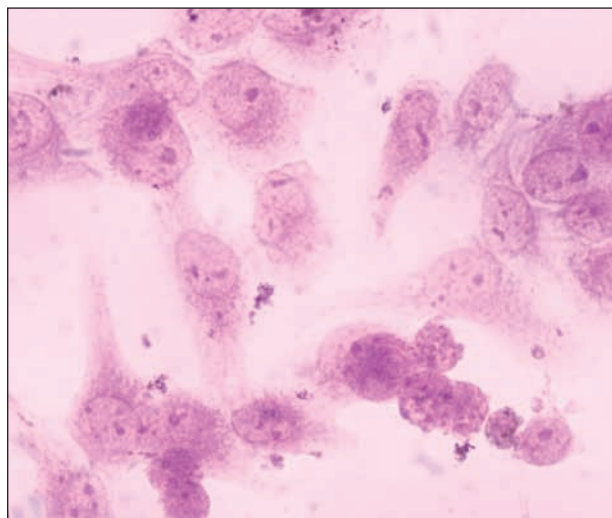
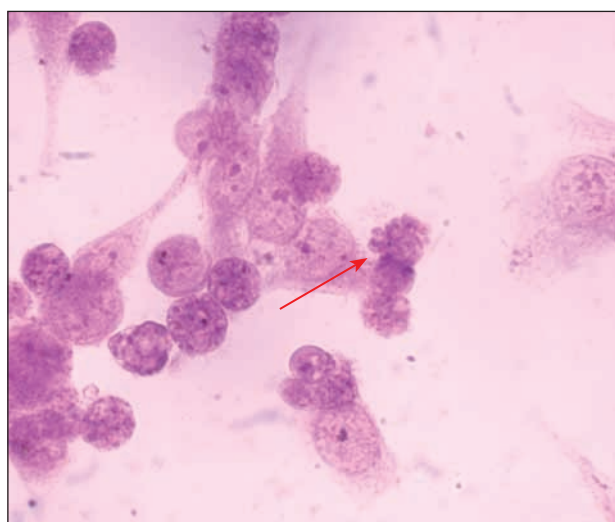
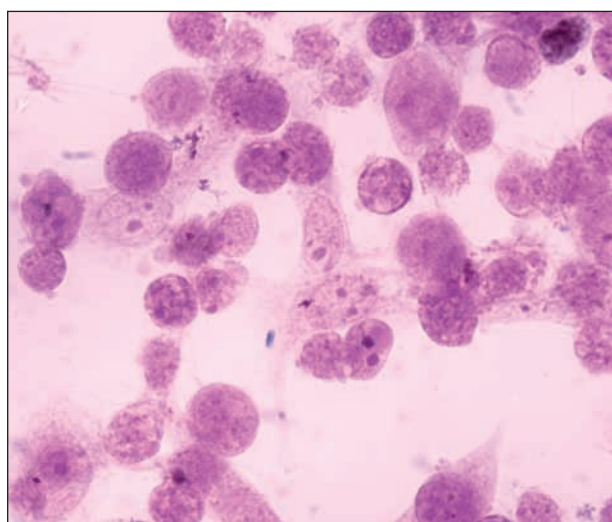
*a**б**в**г*

Рис. 3. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок комбінованого впливу Gos (15,4 мкМ) та Spn (1,0 мМ): *a* — поруч з клітинами з відростками помітні округлі клітини; *б* — темні округлі клітини зменшеного розміру, з конденсованим хроматином; *в* — більшість клітин втратила відростки, клітина з апоптотичними пухирцями (червона стрілка); *г* — темні округлі клітини, в деяких з них почався каріолізис. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 1000$

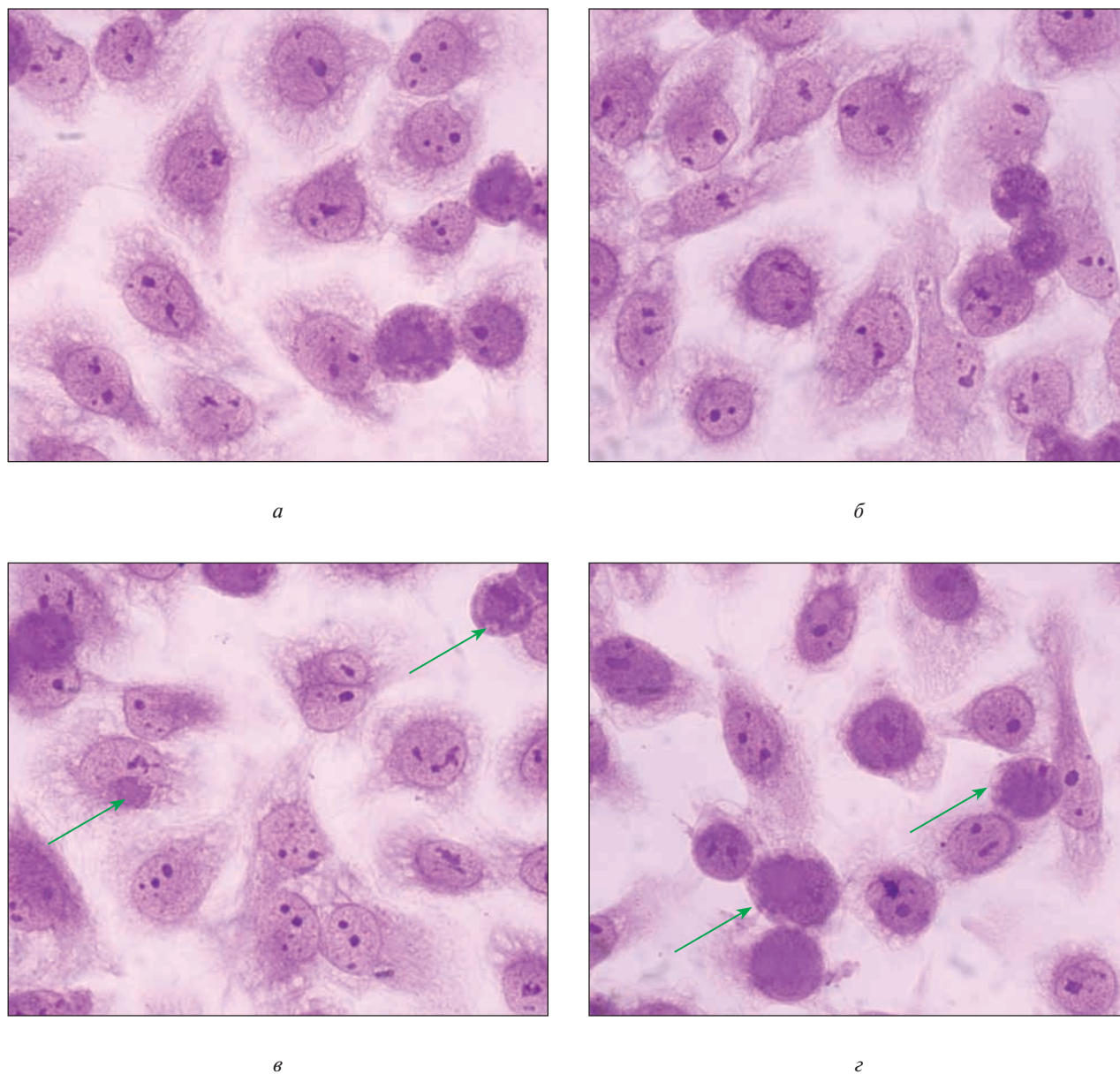


Рис. 4. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок культивування в присутності DS (25,0 нМ): *a* — в полі зору помітні округлі клітини з конденсованим хроматином в ядрах; *б* — втрата псевдоподій клітинами, округлі клітини; *в* — компактизація хроматину в ядрах, каріопікноз (зелена стрілка); *г* — каріопікноз в клітинах (зелена стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. $\times 1000$

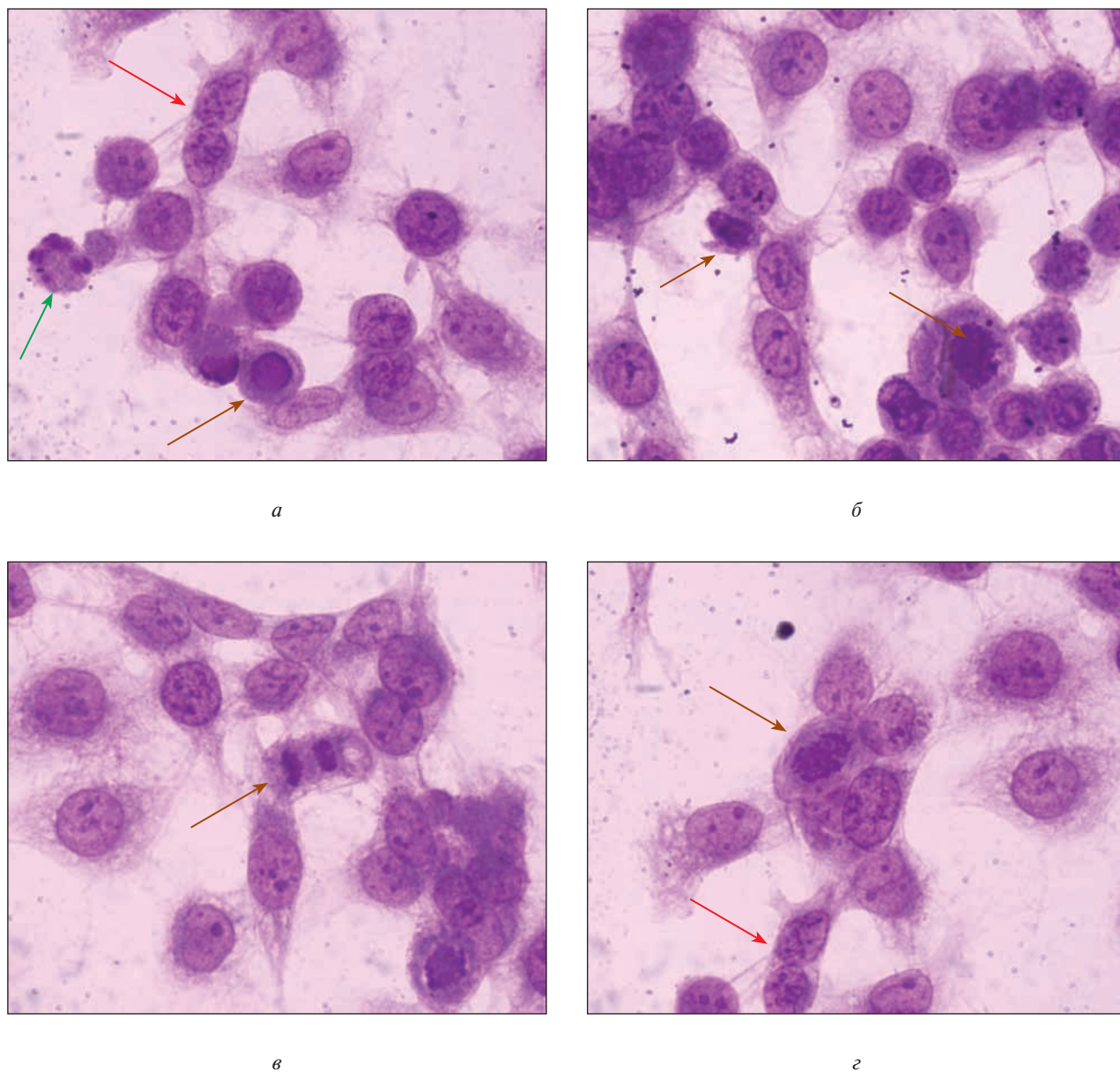


Рис. 5. Зміни морфології клітин лінії LNCaP внаслідок комбінованого впливу DS (22,0 нМ) та Spn (0,4 мМ): *a* — багатоядерна клітина (червона стрілка), клітина з апоптотичними тільцями (зелена стрілка), каріопікноз (коричнева стрілка); *б* — клітини з каріопікнозом та каріолізісом; *в* — клітина з каріолізісом; *г* — багатоядерна клітина (червона стрілка), клітина з каріопікнозом (коричнева стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 1000$

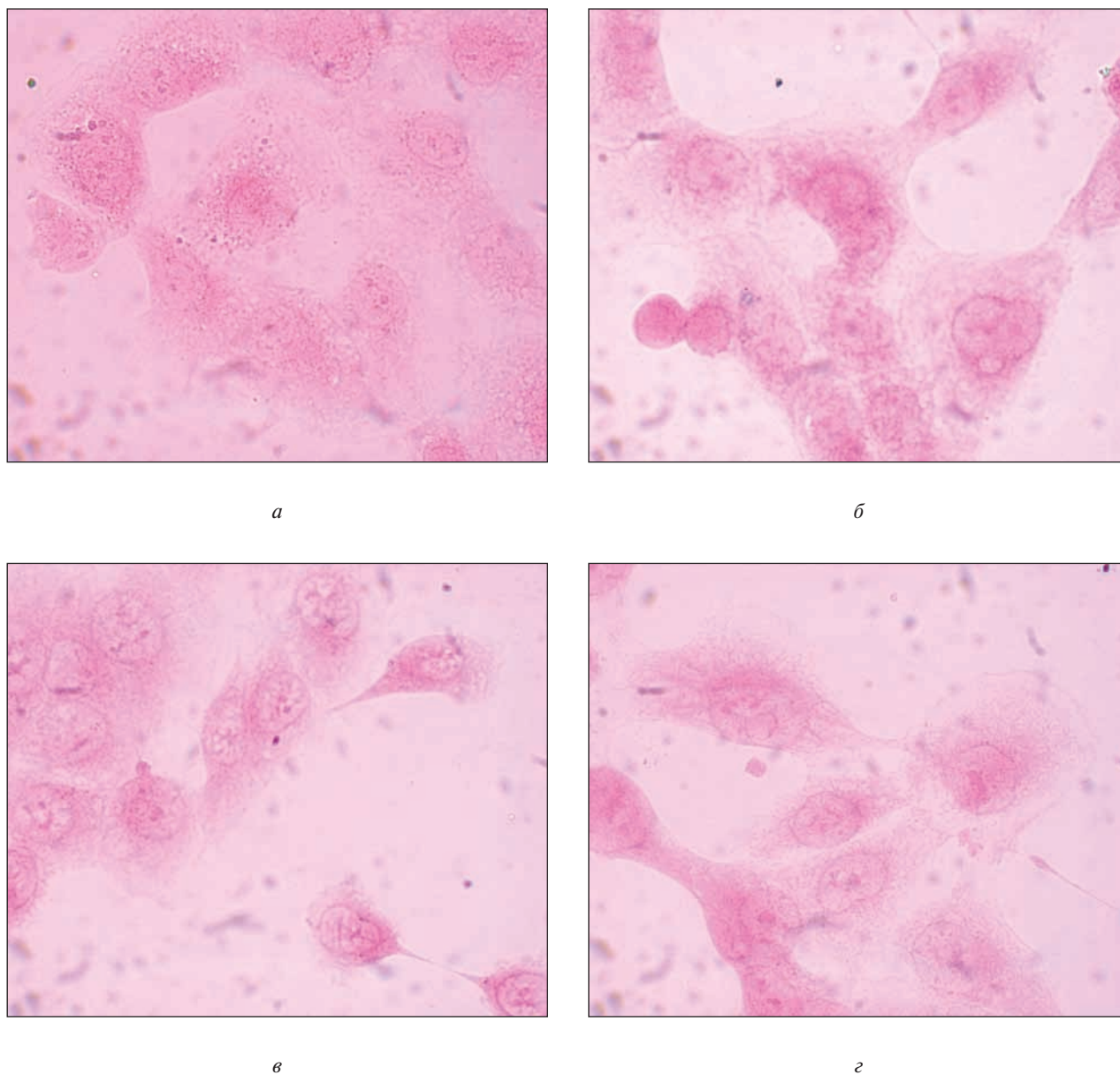


Рис. 6. Морфологія клітин лінії DU-145 у контролі: *а* — великі веретеноподібні клітини, світлі ядра з 2–3 ядерцями; *б* — клітини з відростками, з великим світлим ядром, що займає майже весь об'єм цитоплазми; *в* — клітини контактують одна з одною за допомогою відростків; *г* — синтетично-активні клітини з добре розвиненим цитоскелетом, світлим еухроматином в ядрі та ядерцями. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. $\times 1000$

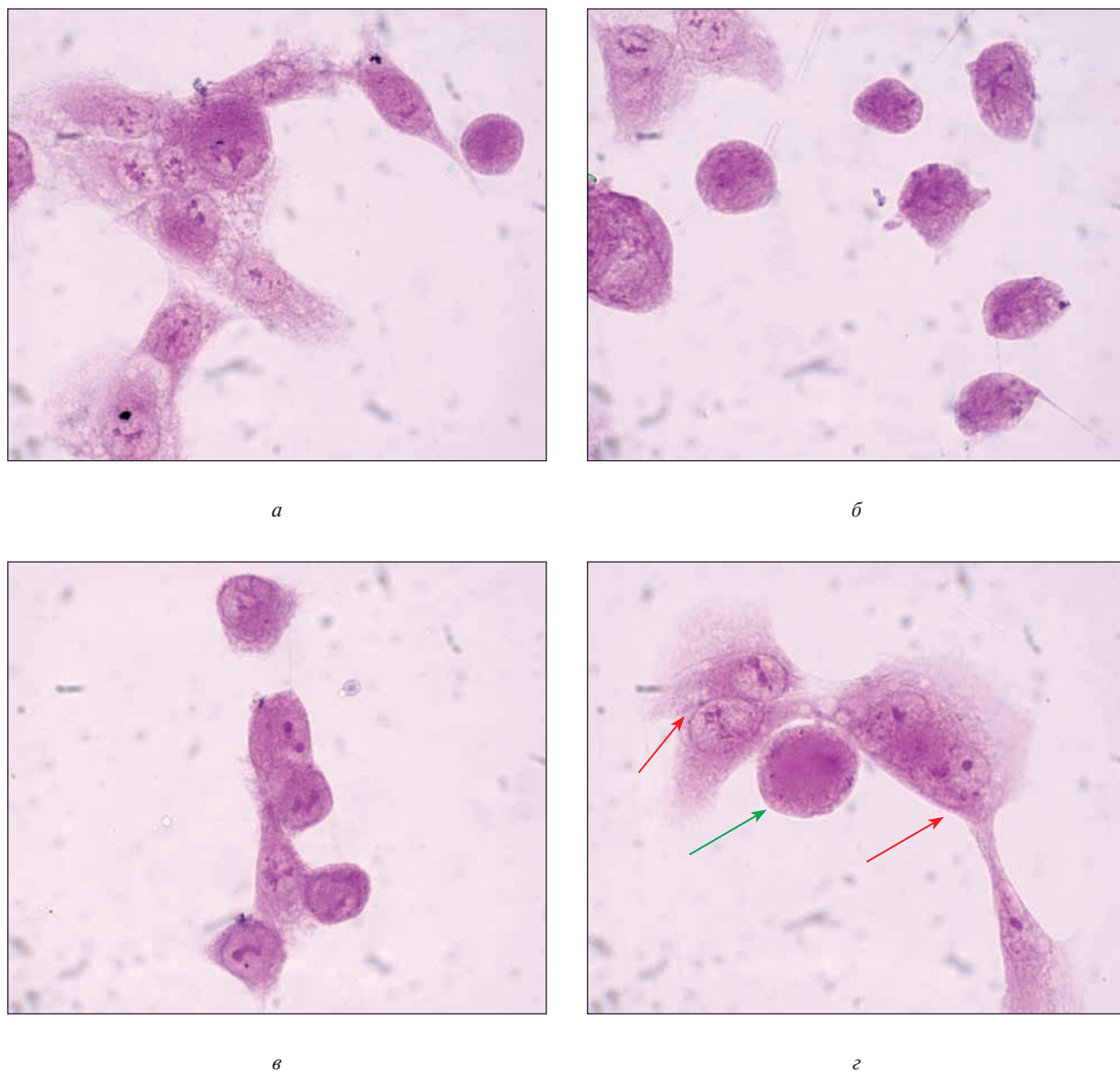


Рис. 7. Зміни морфології клітин лінії DU-145 внаслідок культивування в присутності Gos (34,0 мкМ): *а* — веретеноподібні та округлі нетипові клітини; *б* — клітини без відростків, з темними ядрами, конденсованим хроматином; *в* — більшість клітин без відростків; *г* — багатоядерні клітини (червона стрілка), округла клітина з конденсованим хроматином і каріолізісом (зелена стрілка). Зabarвлення гематоксиліном та еозином. 3б. $\times 1000$

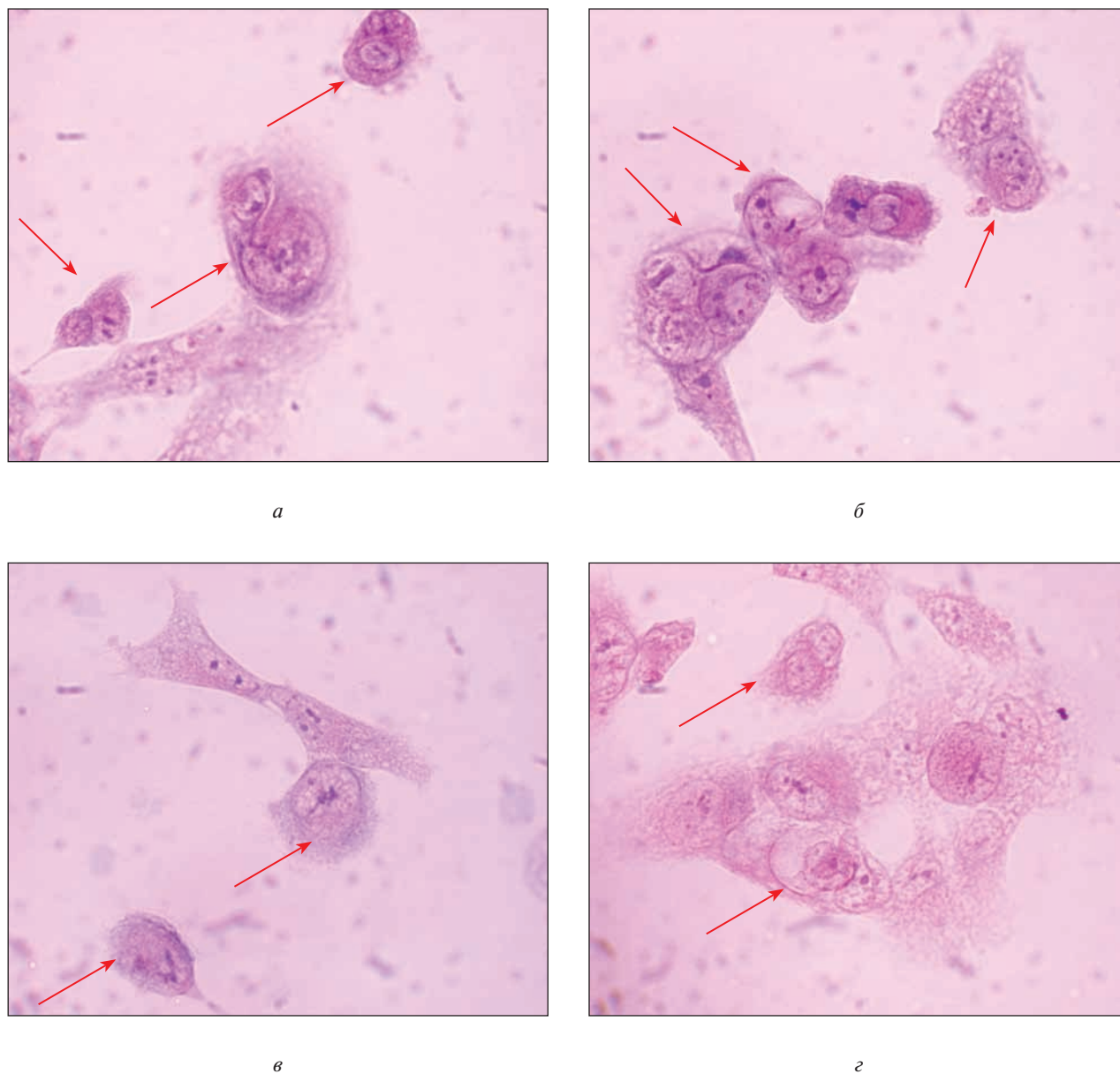


Рис. 8. Зміни морфології клітин лінії DU-145 внаслідок комбінованого впливу Gos (22,0 мкМ) і Spn (1,2 мМ):
а — двоядерні клітини, що втратили відростки; *б* — багатоядерні клітини з ядрами неправильної форми;
в — поруч з веретеноподібними клітинами помітні округлі клітини з каріолізісом; *г* — багатоядерні клітини.
Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36. $\times 1000$

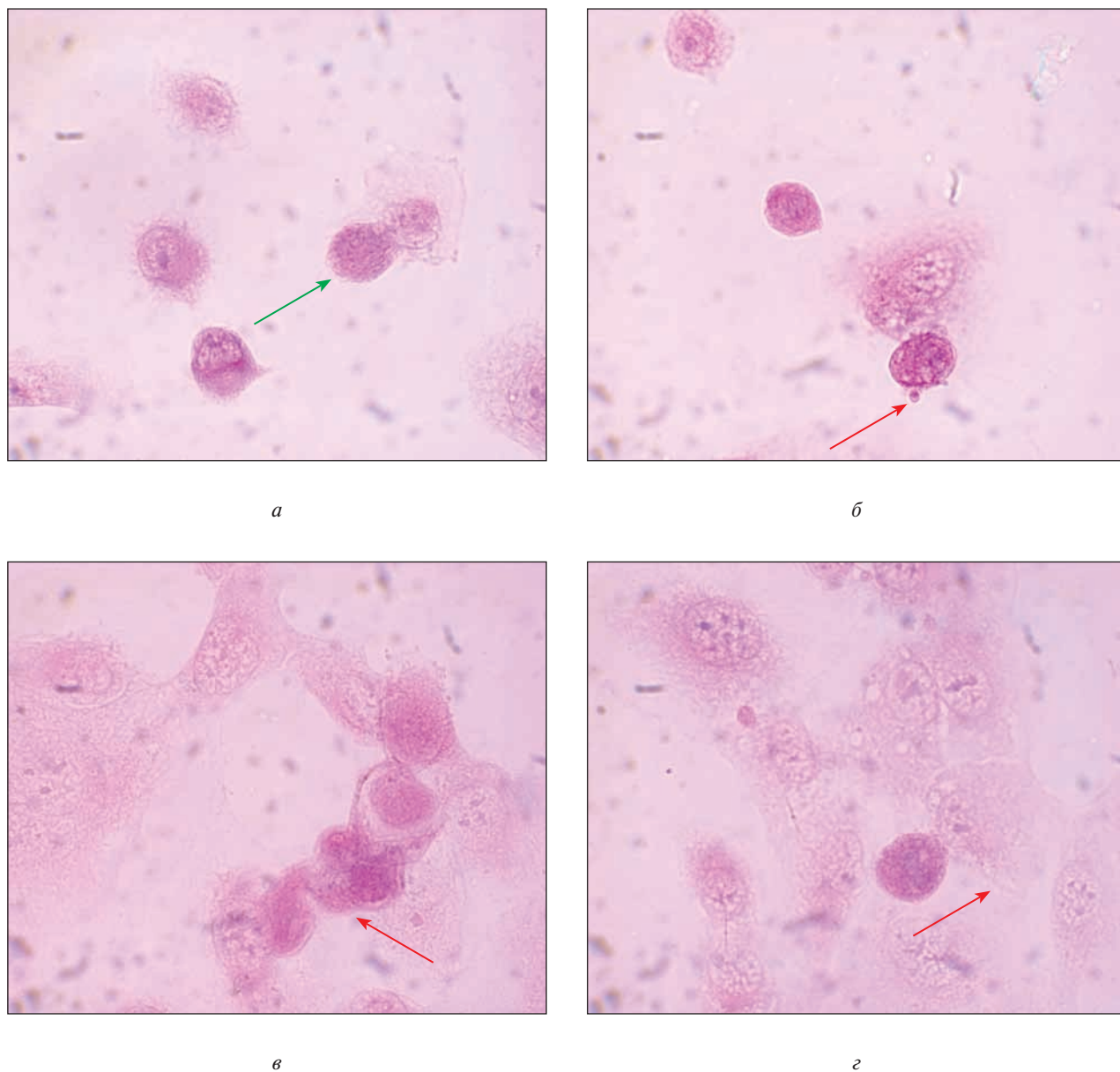


Рис. 9. Зміни морфології клітин лінії DU-145 внаслідок культивування в присутності DS (25,0 nM): *а* — округлі клітини без відростків, конденсація хроматину, відсутність ядерної оболонки (зелена стрілка); *б* — клітини в апоптозі: округлі, компактизований хроматин, поява мікропухирців (червона стрілка); *в* — клітини без відростків з темними ядрами неправильної форми та розмірів; *г* — апоптотична клітина. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 1000$

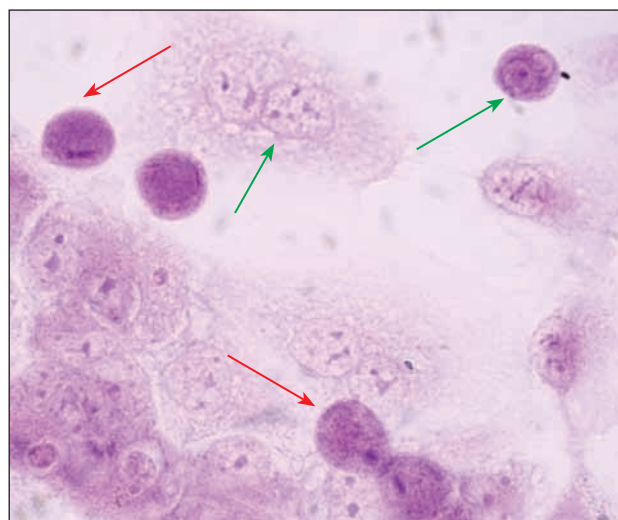
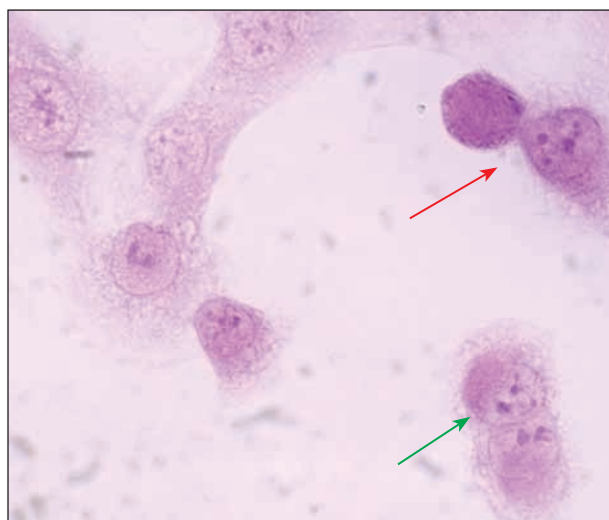
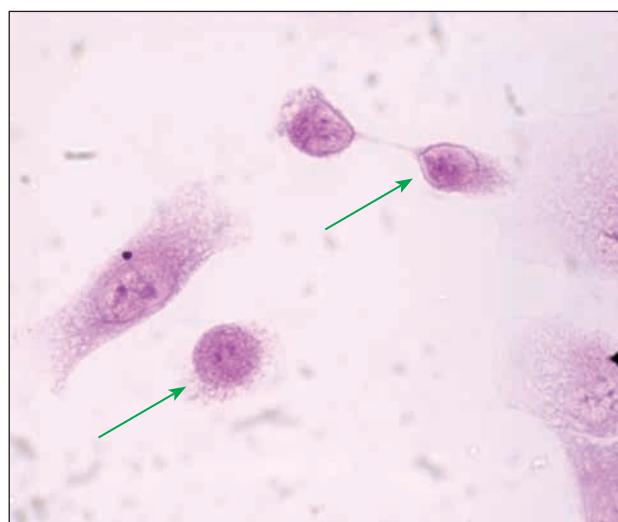
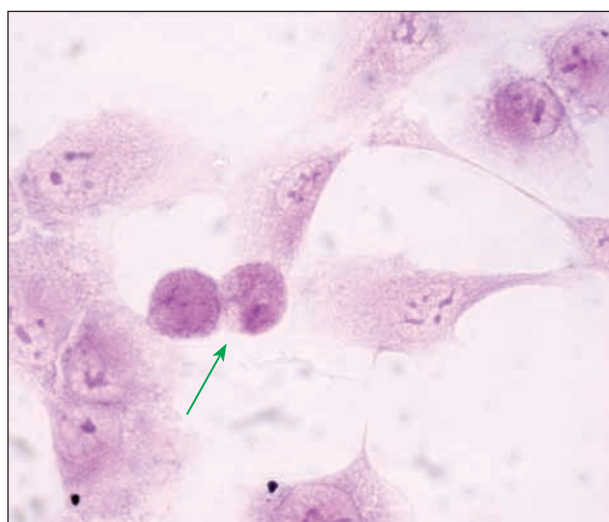
*a**б**в**г*

Рис. 10. Зміни морфології клітин лінії DU-145 внаслідок комбінованого впливу DS (20,0 нМ) і Spn (0,4 мМ): *a* — багатоядерні клітини (зелена стрілка), клітини в апоптозі (червона стрілка); *б* — багатоядерні клітини (зелена стрілка), клітини в апоптозі (червона стрілка); *в* — клітини, що втрачають контакти та відростки; *г* — округлі клітини з конденсованим хроматином. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. 36. ×1000

При комбінованому впливі DS та Spn збільшувалась частка клітин з апоптотичними ознаками. DS, вочевидь, справляє проапоптотичний вплив на андрогенчутливі клітини РПЗ лінії LNCaP через активацію апоптозних чи пригнічення метаболічних шляхів.

Стосовно андрогенчутливих клітин РПЗ людини лінії LNCaP можна зробити наступні попередні висновки: Gos, застосований в концентрації IC₅₀, мав апоптотичний вплив — певна частка клітин утворювала апоптотичні пухирці, що свідчило про клітинну загибель. Gos в поєднанні із Spn, обидва в концентраціях IC₅₀, визначених для їх суміші, викликали початок апоптозу майже в усіх клітинах (візуально — у більшій частки клітин, ніж в попередньому варіанті). Але апоптоз у даному випадку перебував на ранніх етапах, поява апоптотичних пухирців спостерігалася тільки у окремих поодиноких клітин.

DS в концентрації IC₅₀ на клітинах лінії LNCaP демонстрував проапоптотичний ефект. Водночас у випадку комбінації із Spn, в концентраціях IC₅₀, визначених для суміші, переважно спостерігалася більш виражена цитотоксична дія.

Аналогічні дослідження були виконані і на андрогенрезистентних клітинах РПЗ лінії DU-145. Клітини контролю мали витягнуту, веретеноподібну форму, з чіткими краями. Ядра клітин, досить великі відносно розміру цитоплазми, містили чіткі ядерця, що свідчило про активний синтез рРНК, характерний для злоякісних клітин. Клітини мали помірну кількість цитоплазми, забарвлену базифільно, і контактували між собою за допомогою філоподій (рис. 6, а–г).

Частина клітин лінії DU-145, які були культивовані в присутності 34,0 мкМ Gos, демонструвала значні зміни у своїй структурі, характерні для цитоскелетних порушень та апоптозу. Відростки та міжклітинні контакти були втрачені, що свідчило про втрату здатності до адгезії та міграції. У результаті цього клітини набували округлої або сферичної форми. Цитоплазма клітин була значно зменшена, що свідчило про її деградацію. Водночас ядра клітин демонстрували значну конденсацію хроматину, інтенсивно базифільного забарвлення. Конденсація хроматину є типовим маркером апоптозу (рис. 7, а–г).

Такі морфологічні зміни можуть бути наслідком індукції апоптозу Gos через пригнічення експресії генів антиапоптотичних білків родини Bcl-2 [12].

У клітин DU-145, які були культивовані в присутності Gos і Spn (22,0 мкМ і 1,2 мМ відповідно) привертала увагу поява багатоядерних клітин, що було ознакою порушення мітозу. Багатоядерність клітин могла бути наслідком порушення механізмів поділу ядра або поділу без цитокінезу. Форма ядер змінена, зморщена. У деяких клітинах спостерігався лізис ядерної оболонки, що було ознакою

деструкції ядра або ранніх стадій апоптозу, коли ядерні структури розпадаються внаслідок активації протеолітичних ферментів. Округлі клітини, позбавлені псевдоподій, свідчили про порушення цитоскелетної організації. Втрата псевдоподій є маркером порушення адгезійних властивостей клітин та їхньої здатності до міграції, що могло бути результатом впливу цитотоксичних агентів. Такі морфологічні зміни, як багатоядерність, лізис ядерної оболонки та втрата псевдоподій, вказують на порушення клітинного циклу та активацію апоптозу (рис. 8, а–г).

Введення 25,0 нМ DS у культуру призвело до індукції апоптозу у частини клітин лінії DU-145. Спостерігалась зміна типової морфології: клітини втрачали відростки і набували округлої форми, плазматична мембрана часто не мала чітких контурів. Цитоплазма таких клітин була базифільною, з ознаками дегенерації, ядра зменшені в розмірах, гіперхромні, внутрішньоядерні структури не диференціювались. Вплив DS мав виражений пригнічуючий та цитотоксичний ефект на пухлинні клітини, сприяючи процесу їх апоптозу (рис. 9, а–г).

Клітини лінії DU-145, культивовані в присутності DS і Spn одночасно (20,0 нМ і 0,4 мМ відповідно) зазнали значних морфологічних змін, втратили свою характерну форму і набули округлого вигляду. Відростки, які притаманні клітинам даної лінії, повністю відсутні. Плазматична мембрана ставала нечіткою, з розмитими контурами, що є ознакою порушення її цілісності (рис. 10, а–г). Зростає кількість двоядерних клітин (рис. 10, а). Хроматин у ядрах набув темного забарвлення, став конденсованим, ядерна оболонка зникала, що було типовим проявом апоптозу.

Отже, культивування клітинної лінії DU-145 з Gos приводило до появи апоптотичних клітин (проапоптотична дія), Gos разом із Spn — до порушень клітинного циклу та клітинної загибелі (цитостатичний та цитотоксичний вплив). Введення в культуру DS або комбінації DS із Spn викликало апоптоз у клітин андрогенрезистентної лінії DU-145.

ВИСНОВКИ

1. Gos справляє проапоптотичний вплив і на андрогенчутливі клітини РПЗ людини лінії LNCaP, і на андрогенрезистентні — лінії DU-145, швидше за все за рахунок пригнічення експресії генів антиапоптотичних білків родини Bcl-2.

2. При поєднаному застосуванні Gos і Spn викликали початок апоптозу в культурі високкодиференційованих клітин лінії LNCaP.

3. DS справляв проапоптотичний ефект і на клітини лінії LNCaP, і на клітини лінії DU-145, хоча його комбінація із Spn у клітин LNCaP викликала переважно цитотоксичну дію.

4. У андрогенрезистентних клітин лінії DU-145 поєднане застосування Gos і Spn викликало багатоядерність, лізис ядерної оболонки та втрату псевдоподій, що свідчило про порушення клітинного циклу та активацію апоптозу.

5. В культурі клітин лінії DU-145 комбіноване застосування DS і Spn значно стимулювало апоптоз.

6. Андрогенчутливі і андрогенрезистентні клітини РПЗ мають різне іонне аранжування поверхневої мембрани: у клітин LNCaP DS і Spn конкурують за однакові ділянки зв'язування на поверхні, чого не відбувається у клітин DU-145.

7. Культивування за наявності у живильному середовищі Gos (у чистому вигляді або в комбінації із Spn) призводило до взаємного врівноваження катіонів і аніонів на поверхні клітин LNCaP, чого не спостерігалось у клітин DU-145.

8. Проапоптотичний ефект інгібіторів ALDH на клітини РПЗ людини *in vitro* і підсилення цитотоксичної дії Spn в разі комбінованого їх застосування можна пояснити накопиченням в клітинах отруйних альдегідів, які виникають в процесі метаболізму поліамінів і окиснення власне ALDH.

Подяка за консультативну і практичну допомогу висловлюється співробітникам ІЕПОР — д.б.н., проф. Наталії Лук'яновій; к.б.н., ст. наук. співр. Олександрі Лиховій і аспіранту Олександрі Мушію.

Дослідження виконані в межах НДР за темою № 2.2.5.444 “Комбінована дія сперміну і модулаторів його катаболізму як перспективна модель лікування раку передміхурової залози”, 2022 — 2026 рр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Zaletok SP, Klenov OO, Bentrud VV, *et al.* Polyamines in prostate cancer: the relationship with the aggressiveness of tumors and the risk of disease progression. *Oncology*

- 2023; **25** (2): 128–38. <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.02.128>. (in Ukrainian)
2. Klenov OO, Zaletok SP, Yanish YuV, Sumnikova IO. Effect of spermine and its combination with sperminoxidase inhibitors on the profile of polyamine and survival of human prostate cancer cells. *Oncology* 2024; **26** (2): 112–9. <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.02.112>. (in Ukrainian)
3. Yanish YuV, Prylutskyi MP, Zaletok SP. The influence of spermine on the survival and electrokinetic characteristics of human prostate cancer LNCaP cell line. *Oncology* 2022; **24** (3): 163–8. doi: <https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10728> (in Ukrainian)
4. Yanish YuV, Prylutskyi MP, Voronina OK, Zaletok SP. The influence of spermine and aminoguanidine on the morphofunctional characteristics of human prostate cancer cell line LNCaP. *Oncology* 2023; **25** (1): 45–52. <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.024> (in Ukrainian)
5. Yanish YuV, Prylutskyi MP, Sumnikova IO, *et al.* The influence of spermine and chlorhexidine on the survival, electrokinetic and cytomorphological characteristics of human prostate cancer cells. *Oncology* 2023; **25** (3): 190–8. <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.03.186> (in Ukrainian)
6. Yanish YuV, Zaletok SP, Voronina OK, *et al.* The effect of pargiline, spermine and their combinations on androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer cells *in vitro*. *Oncology* 2024; **26** (3): 186–96. <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.03.186> (in Ukrainian)
7. Horoszewicz J, Leong S, Kawinski E, *et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research* 1983; **43** (4): 1809–18.
8. Stone K, Mickey D, Wunderli H, *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978; **21** (3): 274–81.
9. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham. UK: Scion, 2008. 571 p.
10. Lakin GF. *Biometriya*. M.: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.
11. Renner O, Mayer M, Leischner C, *et al.* Systematic review of gossypol/AT-101 in cancer clinical trials. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland) 2022; **15** (2): 144. <https://doi.org/10.3390/ph15020144>
12. Paunovic D, Rajkovic J, Novakovic R, *et al.* The potential roles of gossypol as anticancer agent: advances and future directions. *Clin Med* 2023; **18**: 163. <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00869-8>.

THE EFFECT OF DISULPHIRAM, GOSSYPOL, SPERMINE AND THEIR COMBINATIONS ON HUMAN PROSTATE CANCER CELLS *IN VITRO*

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

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

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to study the effect of tetraethylthiuram disulfide (disulfiram, DS) and gossypol (Gos) on the viability, electrokinetic and cytomorphological properties of prostate cancer (PCa) cells and modifications in these features of spermine (Spn) action when combined with these inhibitors. **Object and methods:** the test objects of the

study were highly differentiated androgen-sensitive cells of the LNCaP line and poorly differentiated androgen-resistant cells of the DU-145 line; the latter phylogenetically originate from a tumor with a more aggressive course of the disease. Cell survival was determined using trypan blue, the effect of the studied compounds on proliferative activity was assessed colorimetrically, staining live cells with crystal violet, the extinction value of the samples was measured at $\lambda = 544$ nm. Electrokinetic parameters (ξ -potential, density of total surface charge (TSC) and its sign) were determined by cell microelectrophoresis. Cytomorphological changes were examined using an optical microscope on fixed preparations of cells grown on coverslips and stained with hematoxylin and eosin. **Results:** inhibitory concentrations (IC_{50}) of DS used in pure form for LNCaP and DU-145 cells were almost

the same. In the case of combined use of DS and Spn, the IC_{50} of DS for both cell lines also differed little. At the same time, the presence of DS in the active mixture potentiated the antiproliferative properties of Spn both in the case of androgen-sensitive LNCaP and androgen-resistant DU-145 PCa cells. The decrease in the negative TSC of LNCaP cells under the influence of DS makes it possible to assume competition between DS and Spn for binding receptors, since the increase in the positive TSC caused by the action of pure Spn was not observed when they were combined. Androgen-sensitive LNCaP cells cultured in the presence of Gos or its combination with Spn did not move at all in an electric field due to the fact that the cations and anions of the cell surface were mutually balanced. In contrast, androgen-resistant DU-145 cells retained on their surface the cation-anion imbalance necessary for movement in an electric field. This indicated a different ionic arrangement of their surface. The proapoptotic effect of ALDH inhibitors on human PCa cells in vitro and the enhancement of the cytotoxic effect of Spn in the case of their combined use can be explained by the accumulation in the cells of toxic aldehydes that arise during the metabolism of polyamines and oxidation

of ALDH itself. Conclusions: Gos exerts a proapoptotic effect on both androgen-sensitive human PCa cells of the LNCaP line and androgen-resistant DU-145 lines. When combined, Gos and Spn induced apoptosis in a culture of highly differentiated LNCaP cells. In a culture of DU-145 cells, the combined use of DS and Spn potently stimulated apoptosis. Androgen-sensitive and androgen-resistant prostate cancer cells have different ionic arrangements: in LNCaP cells, DS and Spn compete for the same binding sites on their surface, which does not occur in DU-145 cells.

Keywords: prostate cancer, LNCaP and DU-145 cell lines, disulfiram, gossypol, spermine, ζ -potential, cell surface charge, apoptosis.

Адреса для листування:

Яніш Ю.В.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: yanish.yuriy@gmail.com

Одержано: 18.12.2024