

І.О. Сумнікова,  
В.В. Бентрад,  
О.О. Кленов,  
Ю.В. Яніш

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

**Ключові слова:** спермін,  
інгібітори сперміноксидази,  
ODC1, AZIN1, с-Мус, Bcl-XL,  
клітинні лінії LNCaP і DU-145.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.02.119>

## ВПЛИВ СПЕРМІНУ ТА ІНГІБІТОРІВ СПЕРМІНОКСИДАЗИ НА ЕКСПРЕСІЮ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ ТА БІЛКІВ РЕГУЛЯЦІЇ РОСТУ КЛІТИН РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

**Мета:** дослідити вплив сперміну (Спн), інгібіторів сперміноксидази (SMO), та їх комбінованої дії на експресію білків (ODC1, AZIN1, с-Мус та Bcl-XL), задіяних в процесі росту клітин раку передміхурової залози (РПЗ) людини. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на культурах клітин РПЗ людини андрогенчутливої (LNCaP) та андрогенрезистентної (DU-145) ліній. Експресію білків ODC1, AZIN1, с-Мус та Bcl-XL визначали методом Вестерн-блотингу. **Результати:** культивування пухлинних клітин зі Спн або Спн в поєднанні з інгібіторами SMO (хлоргексидином (ХГ) і MDL 72527) призводило до пригнічення вітальності пухлинних клітин та супроводжувалося зниженням рівнів експресії орнітиндекарбоксилази (ODC1) в клітинах. Введення лише інгібіторів SMO мало впливало на експресію ODC1 як в клітинах LNCaP, так і DU-145. Рівень експресії інгібітора антицизу (AZIN1), як і рівень ODC1, знижувався при дії Спн та при поєднаній дії Спн і ХГ в клітинах обох ліній. Зміни експресії с-Мус в клітинах були синхронними змінам експресії ODC1. Встановлено також, що інкубація пухлинних клітин зі Спн або зі Спн поєднано з інгібіторами SMO (MDL 72527 та ХГ) суттєво знижувала експресію Bcl-XL в обох клітинних лініях. **Висновки:** отримані результати підтверджують важливу роль сперміну для розвитку раку передміхурової залози та доповнюють дані щодо можливих механізмів ріст-гальмуючої дії Спн та інгібіторів SMO, що включають їх вплив на експресію білків генів ODC1 і AZIN1, залучених у метаболізм поліамінів, та білків генів с-Мус і Bcl-XL, задіяних в процесах росту та апоптозу. Отримані дані свідчать про важливість подальшого вивчення впливу Спн та його комбінацій з інгібіторами SMO на розвиток РПЗ як перспективних засобів терапії при цій патології.

Рак передміхурової залози (РПЗ) є одним з найбільш поширених новоутворень, що вражає чоловічу популяцію в глобальному масштабі, та другою після раку легень причиною смертності від раку у чоловіків [1, 2]. Незважаючи на прогрес у терапії РПЗ, методи лікування, що застосовуються, далеко не завжди є ефективними, це стосується хворих як з андрогенчутливим, так і андрогенрезистентним раком. Тому залишається нагальна потреба в більш ефективних інноваційних способах лікування цього захворювання. Останнім часом інтенсивно проводяться дослідження засобів, мішенню яких є життєво важливі метаболічні процеси ракової клітини. Однією з таких мішеней може бути метаболізм поліамінів, речовин, які відіграють ключову роль в процесах проліферації, росту та диференціювання клітин.

Поліаміни — спермін (Спн), спермідин (Спд), путресцин (Пут) — природні метаболіти, присутні у всіх еукаріотичних клітинах, беруть участь у про-

цесах регуляції клітинного росту, проліферації, диференціювання та апоптозу. Дисбаланс поліамінів у клітинах може змінювати їх метаболічну активність, впливати на чутливість клітин до стресу, сприяти розвитку злоякісних пухлин [3, 4]. Попередніми дослідженнями було встановлено, що для більшості злоякісних пухлин характерним є інтенсифікація синтезу та накопичення поліамінів. В злоякісних клітинах рівні поліамінів значно вищі, порівняно з нормальними клітинами та клітинами доброякісних пухлин, що сприяє росту злоякісних пухлин, інвазії та метастазуванню [5–7].

Разом з тим, дані світової літератури та дані, отримані нами, показали, що, на відміну від інших злоякісних пухлин, для карцином передміхурової залози характерним є низький вміст Спн [8–11], висока активність сперміноксидази (spermine oxidase, SMO) [12], що розщеплює Спн, та висока активність альдегіддегідрогеназ, що катаболізують

продукти розпаду Спн [13, 14]. Рівні Спн у злоякісних пухлинах передміхурової залози значно нижчі, ніж у доброякісних пухлинах цього органу та у нормальній тканині передміхурової залози. Зменшення концентрації Спн у карциномах передміхурової залози корелює з агресивністю пухлин і високим ризиком їх прогресування [15].

Відомо, що передміхурова залоза людини є органом з найвищою концентрацією Спн, рівні Спн у простаті майже в 30 разів вищі, ніж в інших органах і тканинах [16, 17]. Було висловлене припущення, що Спн може бути фактором, який стримує розвиток злоякісного процесу у передміхуровій залозі, а зниження рівнів Спн у цьому органі може призводити до перетворення нормальних клітин в неопластичні і відігравати функціональну роль у прогресуванні раку [18, 19]. З огляду на це, протипухлинна терапія, розроблена на основі комбінованого застосування Спн та інгібіторів його катаболізму, в майбутньому може стати ефективним засобом для лікування РПЗ.

Механізми протипухлинної дії Спн маловідомі і недостатньо вивчені, хоча в останні роки опубліковано декілька робіт, присвячених цьому питанню. Так, було показано, що одним з механізмів інгібуючої дії Спн на клітини кастраційно-резистентного РПЗ (КРПЗ) є його вплив на сигнальні шляхи рецептора андрогенів (androgen receptor, AR). Спн пригнічував проліферацію клітин КРПЗ шляхом гальмування передачі сигналів повнорозмірного рецептора андрогенів (AR-FL) та його сплайсинг варіанту 7 (AR-V7), а саме — через пряме зв'язування і інгібування аргінін-метилтрансферази, яка регулює передачу сигналів AR у пухлинах передміхурової залози [20].

При дослідженні антипроліферативного впливу Спн на клітини РПЗ *in vitro* та *in vivo* у мишей було виявлено, що Спн пригнічує проліферацію, міграцію та інвазію клітин РПЗ. На думку авторів, потенційним шляхом антипроліферативного впливу може бути спровокована Спн мітофагія. Було виявлено взаємозв'язок між Спн та гемоксигеназою 1 (НМОХ1), білком контролю якості мітохондрій, участь якого у мітохондріальному біогенезі вже доведена. Спн посилював регуляцію НМОХ1, змінюючи доступність хроматину, посилював мітофагію, опосередковану PINK1-PARKIN та індукував загибель клітин РПЗ. Спн порушував потенціал мітохондріальної мембрани та запуслав процес аутофагії пошкоджених мітохондрій. При цьому дію Спн можна було скасувати шляхом пригнічення НМОХ1 або інгібіторами аутофагії. В експериментах *in vivo*, де мишам вводили Спн внутрішньопухлинно, внутрішньочеревно та перорально, також було продемонстровано його протипухлинну дію. Припускають, що Спн вбивав клітини РПЗ через надмірну активацію НМОХ1 та індукцію мітофагії. На думку авторів, резуль-

тати їхнього дослідження є доказом того, що Спн може слугувати в якості багатообіцяючого засобу терапії РПЗ [21].

Нами також було досліджено вплив Спн і інгібіторів SMO на виживаність, та цитоморфологічні характеристики клітин РПЗ людини (LNCaP і DU-145) та встановлено, що Спн та інгібітори SMO — N1,N4-(біс (2,3-бутадієніл)-1,4-бутан-1,4-діамін (MDL 72527) та хлоргексидин (ХГ) при використанні їх окремо, проявляють цитотоксичну дію на клітини РПЗ ліній LNCaP та DU-145. При поєднаному їх застосуванні цитотоксичний ефект на обидві клітинні лінії значно підсилювався [22]. Нами було показано, що поєднане введення в культуральне середовище Спн та інгібіторів SMO підсилює цитотоксичну дію Спн як на клітини LNCaP, так і на клітини DU-145. Встановлено, що цитотоксичні властивості Спн та інгібіторів SMO достовірно сильніше виражені при дії на андрогенчутливу лінію клітин LNCaP, ніж на андрогенрезистентну DU-145. Також було виявлено, що при введенні в культуральне середовище окремо Спн або його комбінації з ХГ пухлинні клітини демонстрували типову апоптотичну морфологію: клітини втрачали відростки, ставали округлими, були відмічені конденсація хроматину, розмиті контури поверхневої мембрани, ядерна фрагментація і наявність апоптотичних тілець [22].

**Метою даного дослідження** було вивчення впливу Спн та інгібіторів SMO (MDL 72527 і ХГ) на експресію в клітинах ліній LNCaP і DU-145 орнітиндекарбоксилази (ODC1), ключового фермента біосинтезу поліамінів, інгібітора антизиму ODC1 (AZIN1) та експресію білків, задіяних в процесі росту та апоптозу c-Мус і Bcl-XL.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведене *in vitro* з використанням двох клітинних ліній РПЗ людини — андрогенчутливі диференційовані LNCaP та андрогенрезистентні низькодиференційовані DU-145. Пухлинні клітини культивували у живильному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном (Biowest, США) з додаванням 10% телячої сироватки і 1% суміші антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин (Biowest, Франція). Використовували для вирощування клітин культуральні флакони (SPL, Корея) з корисною площею 25 або 75 см<sup>2</sup> (5 або 20 мл живильного середовища відповідно) та інкубували у CO<sub>2</sub>-інкубаторі (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Через 24 год їх піддавали дії досліджуваних речовин, а саме Спн (AppliChem, Німеччина) та інгібіторів SMO (ХГ і MDL 72527 (N1,N4-(біс (2,3-бутадієніл)-1,4-бутан-1,4-діамін) Sigma-Aldrich, США). Дію на клітини тестували через добу після введення досліджуваних сполук в культуру.

Для визначення напівінгібуючої дози (IC<sub>50</sub>) досліджуваних агентів клітини розподіляли у плоско-

донні лунки 96-лункового планшета, максимально точно дотримуючись кількості 10 тис. клітин на лунку, і поміщали у CO<sub>2</sub>-інкубатор. Після інкубації у лунки з культурою клітин додавали Спн, послідовно розтитровуючи його до кінцевих концентрацій 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,310; 0,160; 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 мМ у кожній лунці, у п'яти повторях зазначеного ряду концентрацій. ХГ у лунки з клітинами вносили у послідовно розтитрованому діапазоні концентрацій від 100 мкМ до 0,005 мкМ; MDL 72527 — в діапазоні концентрацій від 3,3 мМ до 0,046 мМ. Визначення IC<sub>50</sub> досліджуваних агентів проводили з використанням програми Quest Graph™ IC50 (AAT Bioquest, США), яка на основі закладених у неї даних створює логістичну модель з застосуванням регресійного аналізу на основі чотирьох ключових параметрів, згідно рівняння:

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

де  $Y$  — екстинкція;  $\text{Max}$  і  $\text{Min}$  — її найбільші і найменші значення (оптичні одиниці), визначені експериментально;  $X$  — задана концентрація ліганду; Hill coefficient — коефіцієнт Хілла.

Клітини знімали з поверхні полістиролових флаконів за допомогою 0,25% трипсину (Biowest, Франція), при 37°C, інкубація 1,5–3 хв. Для визначення експресії досліджуваних білків з клітинних ліній раку передміхурової залози LNCaP та DU-145 готували клітинні екстракти з використанням кіта “NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents” (Thermo Scientific, США). Визначення концентрації загального білка в зразках проводили за допомогою методу Бредфорда при довжині хвилі 595 нм [23].

Експресію білків визначали за допомогою гелелектрофорезу в акриламідному гелі та Вестерн-блотингу [24]. Оптимальна концентрація білка в зразках для проведення гелелектрофорезу становила 30 мкг на пробу. Для визначення рівнів експресії білків були використані наступні антитіла: ODC1 Ab-1 (MP 16-2, Mouse MAb, NoeMarkers Fremont, CA), AZIN1 (339-448, Mouse MAb, Abnova), c-Мус (9E10, Mouse MAb, Santa Cruz Biotechnology), Bcl-XL (H-5:sc-839, Mouse MAb, Santa Cruz Biotechnology), моноклональне антитіло до β-актину (clone AC-15, Sigma-Aldrich) та вторинні кон'югати (Dako, polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins /HRP). Антитіла проти β-актину використовували для підтвердження однакового білкового навантаження на гель. Інтенсивність смуг досліджуваних білків на блотах кількісно визначали по відношенню до β-актину за допомогою ImageJ 1.52v. В якості маркерів молекулярної маси були використані MagicMark XP Western Protein Standard (20,0–220,0 кДа) (Invitrogen, cat. No. LC5602). Статистичну обробку результатів про-

водили методами варіаційної статистики з застосуванням стандартних ліцензійних комп'ютерних програм STATISTICA 6.0, Microsoft Excel. Достовірними вважали розбіжності при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження експресії білків ODC1, AZIN1, c-Мус та Bcl-XL проведено на культурах 2 клітинних ліній РПЗ людини — андрогенчутливій LNCaP та андрогенрезистентній DU-145. Нами було показано, що Спн та інгібітори SMO пригнічують ріст клітин ліній LNCaP та DU-145. Клітини андрогенрезистентної лінії DU-145 були більш стійкі до дії Спн та інгібіторів SMO, порівняно з клітинами андрогенчутливої лінії LNCaP. При комбінованому внесенні в культуральне середовище Спн та інгібіторів SMO, останні суттєво підсилювали цитотоксичний ефект Спн. При цьому концентрації Спн та інгібіторів при використанні їх у комбінації були суттєво нижчими, ніж при їх застосуванні окремо.

Вплив Спн та інгібіторів SMO на експресію досліджуваних білків визначали в зразках клітин DU-145 та LNCaP, де під дією зазначених агентів було досягнуто 50% гальмування росту. В табл. представлені концентрації IC<sub>50</sub> для Спн, MDL 72527 і ХГ, а також IC<sub>50</sub> зазначених агентів при застосуванні їх разом.

Таблиця

IC<sub>50</sub> Спн та інгібіторів SMO  
для клітин ліній LNCaP та DU-145

| Чинники впливу  | LNCaP, IC <sub>50</sub> | DU-145, IC <sub>50</sub> |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| Спн             | 1,5 мМ                  | 5,0 мМ                   |
| ХГ              | 10,0 мкМ                | 30,0 мкМ                 |
| Спн + ХГ        | 0,6 мМ + 3,2 мкМ        | 3,0 мМ + 10,0 мкМ        |
| MDL 72527       | 1,1 мМ                  | 1,7 мМ                   |
| Спн + MDL 72527 | 0,62 мМ + 0,12 мМ       | 1,1 мМ + 0,32 мМ         |

Встановлено (див. табл.), що оптимальні концентрації Спн та ХГ, які гальмували ріст близько 50% клітин, становили для лінії LNCaP — 1,5 мМ та 10 мкМ відповідно. IC<sub>50</sub> Спн і ХГ для клітин лінії DU-145 були суттєво вищі і складали: 5 мМ Спн та 30 мкМ ХГ. При поєднаному їх застосуванні ХГ підсилював цитотоксичний ефект Спн. Концентрації Спн і ХГ при їх комбінованому введенні були значно меншими. Так, для досягнення 50% інгібування росту концентрації Спн та ХГ для клітин лінії LNCaP становили 0,6 мМ Спн + 3,2 мкМ ХГ, що, відповідно, у 2,5 та 3 рази нижче, ніж при застосуванні цих агентів окремо. Для 50% пригнічення росту клітин лінії DU-145 концентрації Спн і ХГ при введенні їх у комбінації становили: 3 мМ Спн + 10 мкМ ХГ, що, відповідно, у 1,7 та 3 рази менше, порівняно з використанням їх окремо.

Подібний вплив на виживаність клітин LNCaP та DU-145 спостерігали і при використанні іншого

інгібітора SMO — MDL 72527 як окремо, так і в комбінації зі Спн. IC<sub>50</sub> MDL 72527 для клітин лінії DU-145 становила 1,7 мМ, а для клітинної лінії LNCaP — 1,1 мМ. MDL 72527, як і ХГ, при поєднаному його введенні з Спн, суттєво посилював цитотоксичний ефект останнього на клітини LNCaP та DU-145, при цьому концентрації обох агентів були нижчими, ніж при застосуванні їх окремо. Так, IC<sub>50</sub> комбінації MDL 72527 + Спн для клітин LNCaP становила: 0,12 мМ MDL 72527 + 0,62 мМ Спн; для клітин DU-145 — 0,32 мМ MDL 72527 + 1,1 мМ Спн.

Виявлено, що при введенні Спн в концентрації 5 мМ (IC<sub>50</sub>) в культуральне середовище андроген-резистентної лінії РПЗ DU-145 експресія ODC1 в пухлинних клітинах знижувалася практично до нульових значень (рис. 1).

Введення Спн в концентрації 1,5 мМ (IC<sub>50</sub>) в культуральне середовище андрогенчутливої лінії LNCaP також призводило до зниження рівня експресії ODC1 в клітинах (рис. 2), але значно меншою мірою у порівнянні з клітинами DU-145. Введення в культуральне середовище лише інгібітора SMO (ХГ) мало незначний вплив на експресію ODC1 незалежно від досліджуваної клітинної (див. рис. 1–2). Це свідчить, що зниження експресії ODC1 пов'язане з дією Спн, а не інгібітора SMO (ХГ).

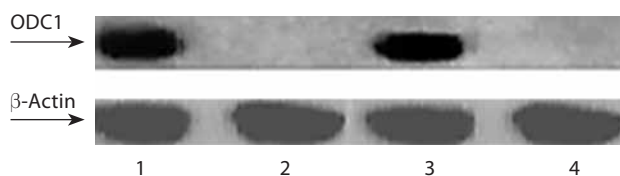
Вплив іншого інгібітора SMO (MDL 72527) на експресію ODC1 в клітинах DU-145 та LNCaP та-

кож був незначний. Поєднане введення Спн і MDL 72527 призводило до суттєвого зниження експресії ODC1, порівняно з контролем, в клітинах обох ліній (рис. 3–4), що, ймовірно, відбувалося завдяки дії Спн.

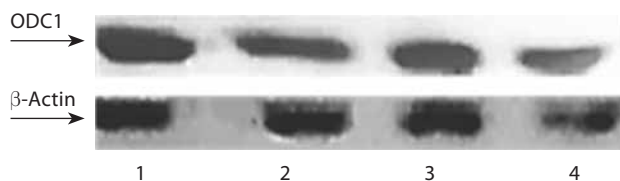
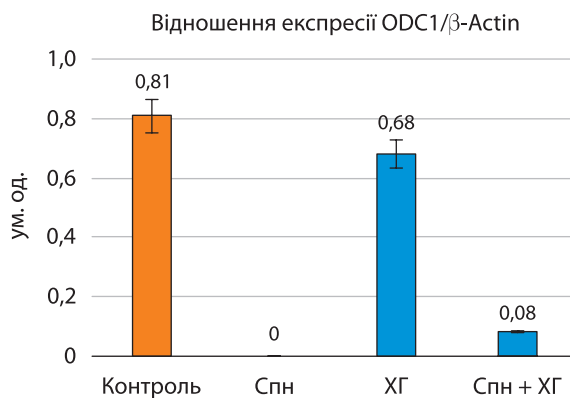
Враховуючи наші попередні дані, отримані на клітинах цих же ліній [25], які продемонстрували, що Спн призводить до суттєвого зменшення продукту ODC1 — путресцину, можна припустити, що Спн спричиняє зниження не тільки експресії білка, а також і ферментативної активності орнітиндекарбоксилази. При цьому, блокування Спн експресії та активності ODC1 може бути пов'язано з індукцією цим поліаміном антизиму ODC1 (AZ). Дані про те, що Спн активує в клітинах карциноми передміхурової залози антизиму ODC були отримані в дослідженні [19]. Антизиму у надмірних кількостях може повністю блокувати ODC1 шляхом зв'язування з останнім та сприяння його деградації на протеасомі 26S [26, 27].

Блокування ODC1 антизимою призводить до зменшення в клітинах синтезу її продукту — путресцину та подальшого зниження важливого для росту клітин спермідину. Це призводить до гальмування росту клітин та зниження їх життєздатності, як *in vitro*, так і *in vivo* [22, 28].

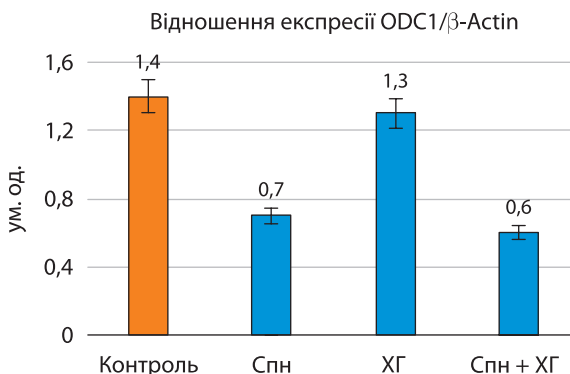
Що стосується інгібітора антизиму AZIN1, то нами продемонстровано, що рівень експресії цього білка під дією Спн, як і рівень ODC1, в клітинах обох ліній істотно зменшувався (рис. 5–6).



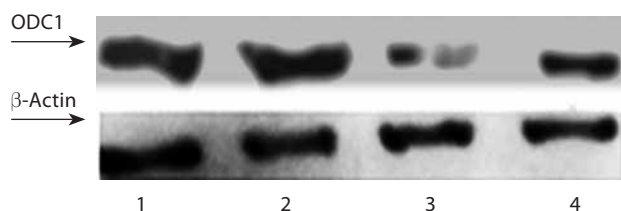
**Рис. 1.** Вплив Спн, ХГ та їх поєднана дія на рівень експресії ODC1 в клітинах DU-145: 1 — контроль; 2 — 5 мМ Спн; 3 — 30 мкМ ХГ; 4 — 3 мМ Спн + 10 мкМ ХГ



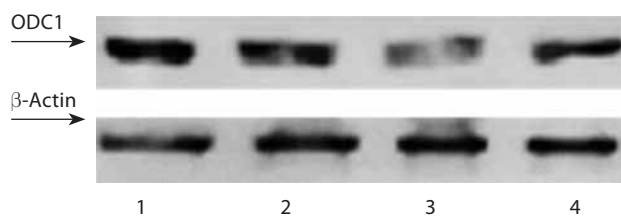
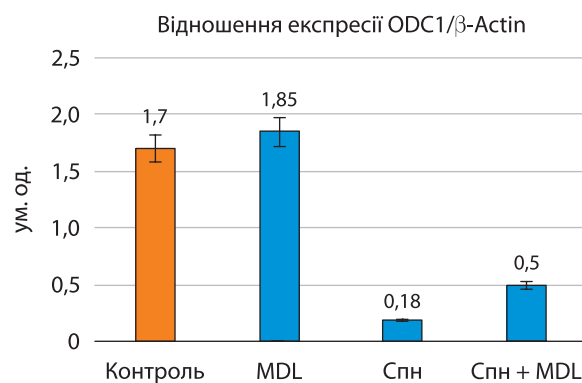
**Рис. 2.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії ODC1 в клітинах LNCaP: 1 — контроль; 2 — 1,5 мМ Спн; 3 — 10 мкМ ХГ; 4 — 0,6 мМ Спн + 3,2 мкМ ХГ



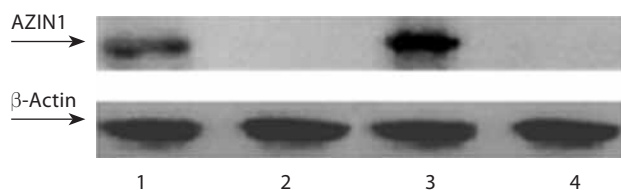
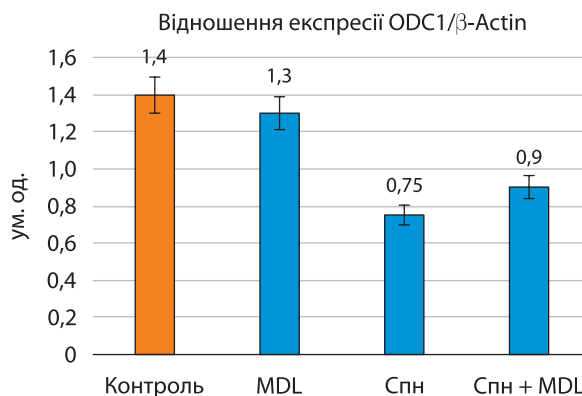




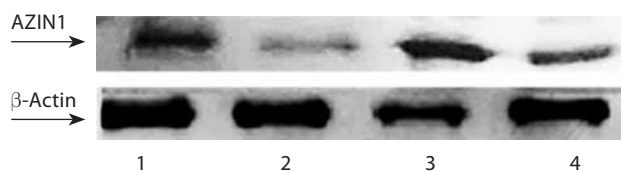
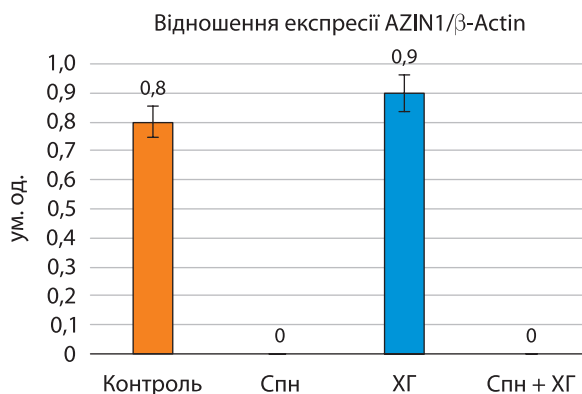
**Рис. 3.** Вплив Спн, MDL 72527 та поєднана їх дія на рівень експресії ODC1 в клітинах DU-145: 1 — контроль; 2 — 1,7 мМ MDL 72527; 3 — 5 мМ Спн; 4 — 1,1 мМ Спн + 0,32 мМ MDL 72527



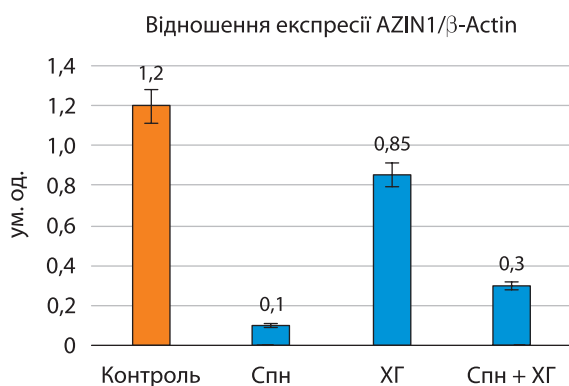
**Рис. 4.** Вплив Спн, MDL 72527 та поєднана їх дія на рівень експресії ODC1 в клітинах LNCaP: 1 — контроль; 2 — 1,1 мМ MDL 72527; 3 — 1,5 мМ Спн; 4 — 0,62 мМ Спн + 0,12 мМ MDL 72527



**Рис. 5.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії AZIN1 в клітинах DU-145: 1 — контроль; 2 — 5 мМ Спн; 3 — 30 мкМ ХГ; 4 — 3 мМ Спн + 10 мкМ ХГ



**Рис. 6.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії AZIN1 в клітинах LNCaP: 1 — контроль; 2 — 1,5 мМ Спн; 3 — 10 мкМ ХГ; 4 — 0,6 мМ Спн + 3,2 мкМ ХГ



ХГ сам по собі не спричиняв суттєвого зниження експресії AZIN1 в клітинах ліній LNCaP та DU-145, але в комплексі зі Спн призводив до зменшення експресії AZIN1, що особливо помітно в клітинах DU-145, де експресія інгібітора антизиму падала до нульових значень (рис. 5). Як видно з представлених даних, зміни експресії AZIN1 були синхронні змінам ODC1.

Відомо, що AZIN1 відіграє вирішальну роль у гомеостазі поліамінів через його взаємодію з регуляторним білком антизиму (AZ). Інгібітор антизиму (AZIN) — білок, який зв'язується з AZ і пригнічує здатність останнього взаємодіяти з ODC1 — ключовим ферментом біосинтезу поліамінів. Надмірна експресія AZIN1 при деяких видах раку може призводити до блокування антизиму ODC1 і, як наслідок, до зростання активності останнього, що, в свою чергу, буде сприяти утворенню необхідних для росту поліамінів. Зниження рівня AZIN1 може нівелювати блокування ODC1 антизиму та сприяти зменшенню експресії/активності ODC1 [29].

Нами також досліджено як впливає Спн та ХГ на експресію в клітинах LNCaP та DU-145 продукта гена *c-Myc*. Відомо, що ген *c-Myc* є “головним регулятором” клітинного метаболізму та проліферації. Активація *c-Myc* стимулює багато метаболічних змін та призводять до злоякісної трансформації. *c-Myc* є багатофункціональним фактором транскрипції, який керує кількома синте-

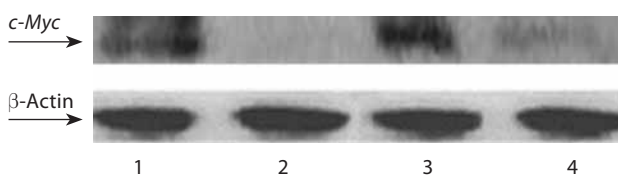
тичними функціями, необхідними для швидкого поділу клітин, і в той же час пригнічує експресію генів з антипроліферативними функціями [30].

При багатьох видах раку надмірно експресується орнітиндекарбоксилаза (ODC1). Було доведено, що надмірна експресія ODC1 пов'язана з активацією *c-Myc*. Сигнальний шлях MYC вважається одним з основних винуватців порушення регуляції метаболізму поліамінів при злоякісному процесі [5]. Протоонкоген *c-Myc* найбільш визнаний транс-активатор транскрипції ODC1. Він зв'язується з консервативною послідовністю E-box (CACGTG) у промоторі ODC1 і стимулює її експресію. При РПЗ також існує тісний зв'язок між *c-Myc* та ключовим ферментом у біосинтезі поліамінів [31–33].

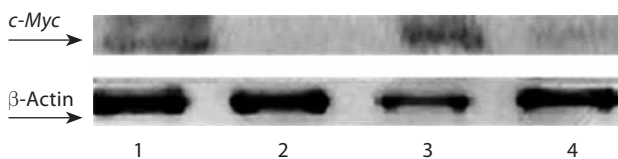
В клітинах передміхурової залози *c-Myc* стимулює онкогенез. Показано, що при РПЗ кількість копій гену *c-Myc* підвищена на 30%. *c-Myc* здатний посилювати синтез поліамінів шляхом позитивної регуляції ODC1.

На рис. 7 представлені отримані дані щодо впливу Спн та ХГ окремо, а також при їх введенні разом на рівень експресії *c-Myc* в клітинах РПЗ лінії DU-145, а на рис. 8 — результати впливу цих агентів на рівень експресії *c-Myc* в клітинах лінії LNCaP.

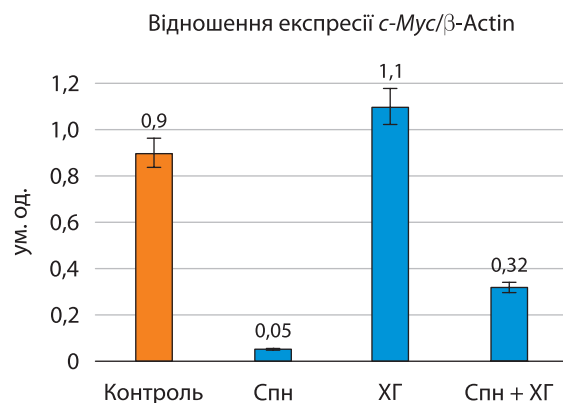
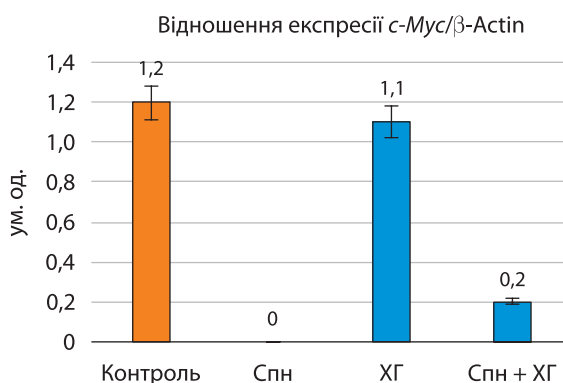
Як видно з рис. 7, інкубація зі Спн призводить до різкого зниження (до нульових рівнів) експресії



**Рис. 7.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії *c-Myc* в клітинах DU-145: 1 — контроль; 2 — 5 мМ Спн; 3 — 30 мкМ ХГ; 4 — 3 мМ Спн + 10 мкМ ХГ



**Рис. 8.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії *c-Myc* в клітинах LNCaP: 1 — контроль; 2 — 1,5 мМ Спн; 3 — 10 мкМ ХГ; 4 — 0,6 мМ Спн + 3,2 мкМ ХГ



c-Myc в клітинах РПЗ лінії DU-145. При інкубації з ХГ експресія c-Myc в пухлинних клітинах змінюється мало. При поєднаному застосуванні Спн і ХГ експресія c-Myc знижувалась більш ніж у 5 разів порівняно з контрольними клітинами та клітинами інкубованими із ХГ, але зниження c-Myc у цьому випадку, ймовірно, було опосередковано дією Спн.

Подібні дані щодо експресії c-Myc при інкубації клітин зі Спн, ХГ та при їх поєднаному застосуванні ми спостерігали і в клітинах LNCaP (рис. 8).

Необхідно зазначити, що зміни експресії c-Myc корелюють/співпадають зі змінами експресії ODC1, що підтверджує взаємозв'язок між c-Myc та ODC1. Зміни експресії c-Myc корелювали також зі змінами вітальності клітин та змінами показника проліферації клітин — молярного співвідношення спермідин/спермін (Спд/Спн), що було продемонстровано нами на цих же клітинних лініях [22, 25].

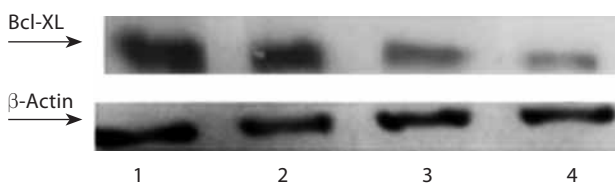
Дослідження [34], опубліковане в Journal of Clinical Investigation, показало, що надекспресія c-Myc у клітинах LNCaP сприяє їхньому росту незалежно від андрогенів. Це свідчить про те, що c-Myc може відігравати ключову роль у прогресії андрогенрезистентного РПЗ [34].

Наші результати підтверджують важливість c-Myc у регуляції росту клітин РПЗ та вказують на потенціал комбінованого застосування Спн та ХГ для модулювання експресії цього онкогена.

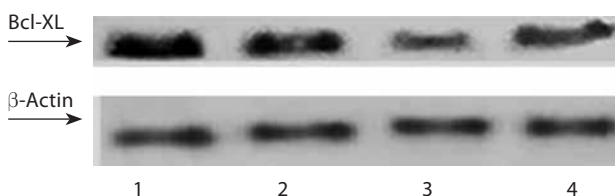
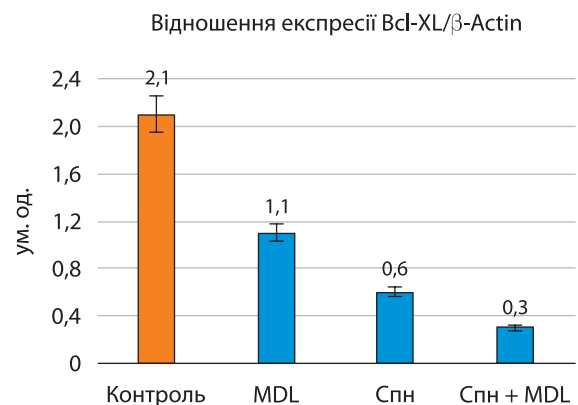
Подальші дослідження можуть зосередитися на механізмах взаємодії цих агентів та їхньому впливі на сигнальні шляхи, пов'язані з c-Myc.

Наступним завданням нашої роботи було дослідити, як впливає Спн та інгібітори SMO на експресію в клітинах LNCaP та DU-145 продукта гена Bcl-XL. Bcl-XL є основним антиапоптичним білком родини Bcl-2. З літературних даних відомо, що надмірна експресія Bcl-XL спостерігається при карциномі передміхурової залози з високим показником Глісона та при багатьох інших видах раку. В дослідженнях *in vitro* показано, що експресія Bcl-XL більш виражена при агресивних формах раку, зокрема в клітинах лінії PC3 рівень експресії Bcl-XL набагато вищий, ніж в LNCaP. Вважають, що надмірна експресія Bcl-XL пов'язана з андрогенрезистентним фенотипом і причетна до розвитку в клітинах РПЗ стійкості до апоптозу [35].

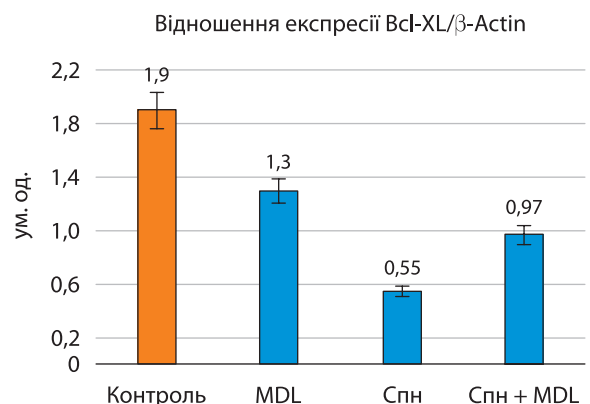
Bcl-XL та Bcl-2 можуть запобігати апоптозу за допомогою подібних механізмів. Так, Bcl-XL і Bcl-2 регулюють потенціал мітохондріальної мембрани, здатні блокувати вивільнення у цитоплазму цитохрому c, що індукуює апоптоз, і фактора, що інгібує апоптоз. Крім того, обидва білки можуть пригнічувати апоптоз, незалежний від цитохрому c, ймовірно, через здатність інгібувати індуковану цитохромом c активність каспази-3 і подальше розщеплення полі (АДФ-рибози)-полімерази та деградацію ламіну B1.

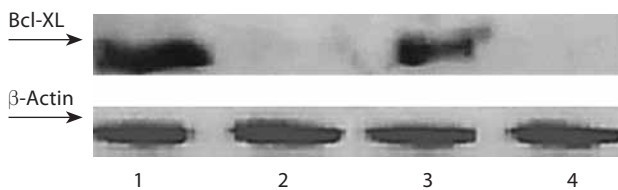


**Рис. 9.** Вплив Спн, MDL 72527 та поєднана їх дія на рівень експресії Bcl-XL в клітинах Du-145: 1 — контроль; 2 — 1,7 мМ MDL 72527; 3 — 3 мМ Спн; 4 — 1,1 мМ Спн + 0,32 мМ MDL 72527

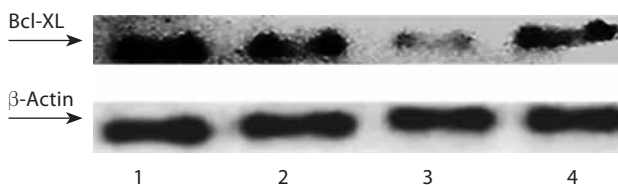
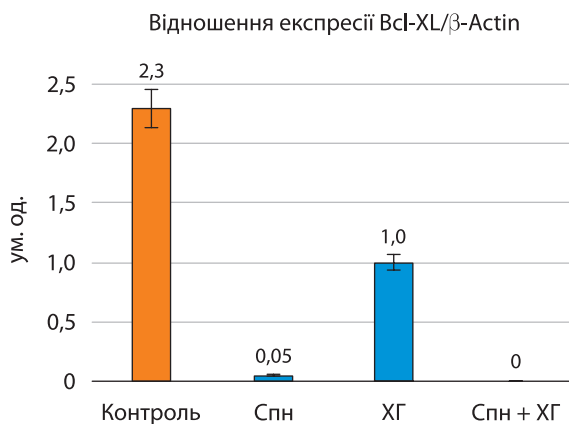


**Рис. 10.** Вплив Спн, MDL 72527 та поєднана їх дія на рівень експресії Bcl-XL в клітинах LNCaP: 1 — контроль; 2 — 1,1 мМ MDL 72527; 3 — 1,5 мМ Спн; 4 — 0,62 мМ Спн + 0,12 мМ MDL 72527

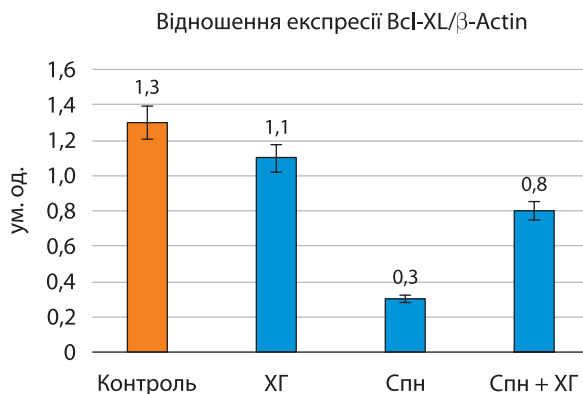




**Рис. 11.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії Bcl-XL в клітинах DU-145: 1 — контроль; 2 — 5 мМ Спн; 3 — 30 мкМ ХГ; 4 — 3 мМ Спн + 10 мкМ ХГ



**Рис. 12.** Вплив Спн, ХГ та поєднана їх дія на рівень експресії Bcl-XL в клітинах LNCaP: 1 — контроль; 2 — 10 мкМ ХГ; 3 — 1,5 мМ Спн; 4 — 0,6 мМ Спн + 3,2 мкМ ХГ



При дослідженні дії Спн та інгібіторів SMO на експресію в клітинах LNCaP та DU-145 продукта гена Bcl-XL нами показано, що інкубація клітин зі Спн, MDL 72527, ХГ та при їх поєднаному застосуванні призводить до зменшення експресії Bcl-XL у клітинах досліджених ліній (рис. 9–12).

Зниження експресії Bcl-XL може свідчити про активацію процесів апоптозу. Отримані нами дані щодо зменшення експресії гена білка Bcl-XL при інкубації клітин зі Спн окремо та Спн разом з інгібіторами SMO співпадають з попередньо отриманими на цих же лініях РПЗ результатами, де було показано, що при інкубації з Спн або одночасно Спн і ХГ пухлинні клітини демонстрували типову апоптотичну морфологію: клітини ставали округлими, відокремлювалися одна від одної і від субстрату, спостерігалась конденсація хроматину, розмиті контури поверхневої мембрани, фрагментація ядер і наявність апоптотичних тілець [22].

## ВИСНОВКИ

1. Культивування клітин РПЗ з Спн викликало зниження рівнів експресії ODC1 від 50% (LNCaP) до 100% (DU-145), а з Спн в комбінації з інгібітором SMO (ХГ) призводило до значно більшого пригнічення експресії ODC1: на 90,1% (DU-145) та на 57,2% (LNCaP) у порівнянні з контролем. Комбінований вплив Спн і MDL 72527 був більш

виражений у клітинах DU-145, ніж у LNCaP (зниження на 70,6% і 35,5% відповідно).

2. Інгібітори SMO (ХГ та MDL 72527) при введенні їх окремо мали незначний вплив на експресію ODC1 як в клітинах LNCaP, так і DU-145.

3. Встановлено, що рівень експресії AZIN1 (інгібітора антизиму ODC1) також знижувався як при дії Спн, так і при поєднаній дії Спн і ХГ в клітинах обох ліній (DU-145 та LNCaP).

4. Показано, що при інкубації клітин з Спн окремо та Спн і ХГ поєднано експресія *c-Мус* в клітинах DU-145 та LNCaP знижувалася, що може свідчити про пригнічення їх проліферативного потенціалу.

5. Спн у чистому вигляді та у поєднанні з інгібіторами SMO достовірно знижував рівень експресії Bcl-XL, що пояснює морфологічно виявлені ознаки апоптозу в клітинах обох ліній.

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

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics 2022. CA: A Cancer J Clinicians 2022; **72** (1): 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>.
2. Fedorenko Z, Sumkina O, Goroh Ye, et al. Cancer in Ukraine, 2021–2022. Morbidity, mortality, performance indicators of



- the oncology service. Bull Natl Cancer Reg Ukr; Kyiv, 2023; **24**: 148 p. [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_24/index.htm](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/index.htm) (in Ukrainian).
3. **Li J, Meng Y, Wu X, et al.** Polyamines and related signaling pathways in cancer. *Cancer Cell Int* 2020; **20** (539): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01545-9>.
  4. **Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW.** Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60** (7): 1394–406. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2332-4>.
  5. **Casero RA Jr, Murray Stewart T, Pegg AE.** Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2018; **18** (11): 681–95. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0050-3>.
  6. **Zaletok S.** The role of polyamines in carcinogenesis and tumor growth. In: *Onkolohiya. Lektsiyi. Chekhun VF (eds). K: Zdorov'ya Ukrayiny, 2010: 354–70.* (in Ukrainian).
  7. **Xuan M, Gu X, Li J, et al.** Polyamines: their significance for maintaining health and contributing to diseases. *Cell Communication and Signaling* 2023; **21**: 348. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01373-0>.
  8. **Giskeodegard GF, Bertilsson H, Selnes KM, et al.** Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLoS One* 2013; **8**: e62375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062375>.
  9. **Peng Q, Wong CYP, Cheuk IW, et al.** Role of spermine in prostate cancer. *Int J Mol Sci* 2021; **22** (9): 4382. <https://doi.org/10.3390/ijms22094382>.
  10. **Zaletok SP, Klenov OO, Bentrads 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).
  11. **Sena LA.** Polyamine metabolism in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 2025; **37** (3): 223–32. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000001134>.
  12. **Goodwin AC, Jadallah S, Toubaji A, et al.** Increased spermine oxidase expression in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia tissues. *Prostate* 2008; **68**, 766–72 (2008). <https://doi.org/10.1002/pros.20735>.
  13. **Püschel J, Dubrowska A, Gorodetska, I.** The multifaceted role of aldehyde dehydrogenases in prostate cancer stem cells. *Cancers* 2021; **13**: 4703. <https://doi.org/10.3390/cancers13184703>.
  14. **Gorodetska Ie, Offermann A, Püschel J, et al.** ALDH1A1 drives prostate cancer metastases and radioresistance by interplay with AR- and RAR-dependent transcription. *Theranostics* 2024; **14** (2): 714–37. <https://doi.org/10.7150/thno.88057>.
  15. **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. <https://doi.org/10.32471/exponcology.2312-8852.vol-44-no-2.17758>.
  16. **Harrison GA.** Spermine in human tissues. *Biochem J* 1931; **25** (6): 1885–92. <https://doi.org/10.1042/bj0251885>.
  17. **Harrison GA.** CLIII. The approximate determination of spermine in single human organs. *Biochem J* 1933; **27** (4): 1152–6. <https://doi.org/10.1042/bj0271152>.
  18. **Smith R, Litwin M, Lu Y, Zetter B.** Identification of an endogenous inhibitor of prostate carcinoma cell growth. *Nature Med* 1995; **1**: 1040–5. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1040>.
  19. **Koike C, Chao DT, Zetter BR.** Sensitivity to polyamine — induced growth arrest correlates with antizyme induction in prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 6109–12. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/24/6109>.
  20. **Li X, Li F, Ye F, et al.** Spermine is a natural suppressor of AR signaling in castration-resistant prostate cancer. *CellPress* 2023; **42** (7): 112798. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112798>.
  21. **Sun J, Chiu PKa-F, Xie T, et al.** Unlocking the potential of spermine: targeting hmx1-induced mitophagy in prostate cancer therapy. *The J Urology* 2024; **211** (5S): e183–e184. <https://doi.org/10.7150/thno.88057>.
  22. **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): 186–93. <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.024> (in Ukrainian).
  23. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72** (1–2): 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
  24. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
  25. **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).
  26. **Li X. and Coffino P.** Regulated degradation of ornithine decarboxylase requires interaction with the polyamine-inducible protein antizyme. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 3556–62. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.8.3556-3562.1992>.
  27. **Murakami Y, Tanaka K, Matsufuji, et al.** Antizyme, a protein induced by polyamines, accelerates the degradation of ornithine decarboxylase in Chinese-hamster ovary-cell extracts. *Biochem J* 1992; **283**: 661–4, 1992. <https://doi.org/10.1042/bj2830661>.
  28. **Murakami Y, Matsufuji S, Miyazaki Y, Hayashi S.** Forced expression of antizyme abolishes ornithine decarboxylase activity, suppresses cellular levels of polyamines and inhibits cell growth. *Biochem J* 1994; **304**: 183–7. <https://doi.org/10.1042/bj3040183>.
  29. **Kim SW, Mangold U, Waghorne C, et al.** Regulation of cell proliferation by the antizyme inhibitor: evidence for an antizyme-independent mechanism. *J Cell Sci* 2006; **119** (12): 2583–91. <https://doi.org/10.1242/jcs.02966>.
  30. **Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, et al.** Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer* 2021; **20** (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01291-6>.
  31. **Bachmann AS, Geerts D.** Polyamine synthesis as a target of MYC oncogenes. *J Biol Chem* 2018; **293** (48): 18757–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003336>.
  32. **Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL.** The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 7804–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7804>.
  33. **Kumar R, Jonnatan S, Sanin DE, et al.** Androgen receptor drives polyamine synthesis creating a vulnerability for prostate cancer. *MedRxiv [Preprint]* 2024; 2024.12.12.24318845. <https://doi.org/10.1101/2024.12.12.24318845>.
  34. **Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH.** Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* 2003; **112** (11): 1724–31. <https://doi.org/10.1172/JCI19035>.
  35. **Castilla C, Congregado B, Chinchón D, et al.** Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinol* 2006; **147** (10): 4960–496. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0502>.

# EFFECT OF SPERMINE AND SPERMINE OXIDASE INHIBITORS ON THE EXPRESSION OF ORNITHINE DECARBOXYLASE AND PROTEINS REGULATING PROTEINS IN PROSTATE CANCER CELLS

I.O. Sumnikova, V.V. Bentrud, O.O. Klenov, Yu.V. Yanish

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

**Summary. Aim:** to study the effect of spermine (Spn), spermine oxidase inhibitors (SMO), and their combined action on the expression of proteins involved in growth processes (ODC1, AZIN1, c-Myc and Bcl-XL) in human prostate cancer (PCa) cell lines. **Object and methods:** the study was performed on human prostate cancer cell cultures — androgen-sensitive (LNCaP) and androgen-resistant (DU-145) lines. Protein expression was determined by Western blotting. **Results:** cultivation of tumor cells with Spn or Spn in combination with SMO inhibitors (chlorhexidine (CH) and MDL 72527) led to inhibition of tumor cell viability and was accompanied by a decrease in the expression of ornithine decarboxylase (ODC1) in the cells. The introduction of SMO inhibitors alone had little effect on ODC1 expression in both LNCaP and DU-145 cells. The expression level of the antizyme inhibitor (AZIN1), as well as the level of ODC1, decreased under the action of SMO and under the combined action of

SMO and CHO in cells of both lines. Changes in c-Myc expression in the cells were synchronous with changes in ODC1 expression. It was also found that incubation of tumor cells with Spn or with Spn combined with SMO inhibitors (MDL 72527 and CH) significantly reduced the expression of Bcl-XL in both cell lines. **Conclusions:** the results confirm the important role of spermine in the development of prostate cancer and complement the data on the possible mechanisms of growth-inhibitory action of Spn and SMO inhibitors, including their effect on the expression of proteins of ODC1 and AZIN1 genes involved in polyamine metabolism and proteins of c-Myc and Bcl-XL genes involved in growth and apoptosis. The data obtained indicate the importance of further studying the effect of Spn and its combinations with SMO inhibitors on the development of PCa as promising therapeutic agents.

**Keywords:** spermine, spermine oxidase inhibitors, ODC1, AZIN1, c-Myc, Bcl-XL, LNCaP and DU-145 cell lines.

## Адреса для листування:

Сумнікова І.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: stepanetsinna@bigmir.net

Одержано: 25.03.2025