

Ю.В. Яніш¹<https://orcid.org/0009-0006-8485-1233>**С.П. Залєток¹**<https://orcid.org/0000-0002-1910-1341>**О.К. Вороніна²**<https://orcid.org/0000-0002-7065-374X>**І.О. Сумнікова¹**<https://orcid.org/0009-0004-1382-0507>**О.О. Кленов¹**<https://orcid.org/0009-0003-6630-1607>**В.О. Сташенко¹**<https://orcid.org/0009-0007-5163-2410>

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

² Київський національний університет ім. Т.Г. Шевченка, Київ, Україна

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.04.223>

КОМБІНОВАНИЙ ВПЛИВ ІНГІБІТОРА АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗИ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ І СПЕРМІНУ НА КЛІТИНИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено модифікації цитотоксичної дії сперміну (*Spr*) на клітини раку передміхурової залози людини (РПЗ) *in vitro* за рахунок інгібування активності альдегіддегідрогенази (ALDH) силібініном (*Sil*), який належить до родини флавонолігнанів і є основним діючим компонентом стандартизованого екстракту розторопші плямистої (*Silybum marianum*) силімарину. **Мета:** вивчення впливу *Sil* (окремо або в комбінації з *Spr*) на життєздатність, електрокінетичні властивості клітин РПЗ, а також на профіль основних і ацетильованих поліамінів (ПА), активність сперміноксидази (SMOX) та поліаміноксидази (PAOX), експресію антиапоптотичного білка Bcl-XL в цих клітинах. **Об'єкт і методи:** об'єктами досліджень були високодиференційовані андрогенчутливі клітини лінії LNCaP та низькодиференційовані андрогенрезистентні клітини лінії DU-145. Виживаність клітин оцінювали за тестом з трипановим синім, проліферацію — з кристалічним фіолетовим. ζ -потенціал та щільність сумарного поверхневого заряду (СПЗ) розраховували на основі визначеної методом клітинного мікроелектрофорезу лінійної швидкості руху клітин в електричному полі, а його знак — за напрямом руху. Активність ферментів катаболізму ПА оцінювали за змінами рівня їх субстратів у клітинах: *Spr* для SMOX та N^1 -ацетилспермідину (N^1 -AcSpd) — для PAOX. Експресію білка Bcl-XL визначали з застосуванням електрофорезу в акриламідному гелі та Вестерн-блотингу. **Результати:** визначені інгібуючі концентрації (IC_{50}) *Sil* за умови використання чистої сполуки та при комбінованій дії з *Spr*. Культивування клітин LNCaP з чистим *Sil*, чистим *Spr* або з їх комбінацією викликало зниження ζ -потенціалу і інверсію знаку СПЗ з від'ємного на позитивний. Величина позитивного заряду у даних варіантах достовірно не відрізнялася, що свідчило про конкуренцію між *Sil* і *Spr* за ділянки зв'язування. Культивування клітин DU-145 з *Sil* призводило до збільшення ζ -потенціалу, з *Spr* — до його зниження, комбінація *Sil* зі *Spr* — повернення до контрольних значень. *Sil*, *Spr*, і їх комбінація викликали інверсію знаку СПЗ клітин DU-145 на позитивний, але *Spr* спричиняв достовірно меншу його величину порівняно з клітинами LNCaP, що свідчило про відмінності іонного аранжування андрогенрезистентних і андрогенчутливих клітин. *Sil* продемонстрував антипроліферативну та проапоптотичну дію на клітини LNCaP, пропорційно залежну від концентрації. Показані відмінності в іонному аранжуванні клітин LNCaP і DU-145. Виявлено конкуренцію між *Sil* і *Spr* за ділянки зв'язування на клітинній поверхні. *Sil* в клітинах ліній LNCaP та DU-145 викликав різноспрямовані зміни активності SMOX і PAOX. *Sil* і його комбінація з *Spr* викликали зниження експресії гена Bcl-XL на рівні кодованого ним антиапоптотичного

Ц и т у в а н н я: Яніш Ю.В., Залєток С.П., Вороніна О.К., Сумнікова І.О., Кленов О.О., Сташенко В.О. Комбінований вплив інгібітора альдегіддегідрогенази рослинного походження і сперміну на клітини раку передміхурової залози. Онкологія. 2025. 27, № 4. С. 223–231. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.04.223>

© РН “Akademperiodyka” of the NAS of Ukraine, 2025. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

білка. Комбінована дія була максимальною в андрогенрезистентних клітинах DU-145. **Висновки:** відмічали кількісно протилежний характер впливу *Sil* та *Spn* на клітини РПЗ з різним ступенем диференціювання і різною агресивністю пухлинного росту. На менш злоякісні андрогенчутливі клітини LNCaP сильніший цитотоксичний вплив мав *Sil*, водночас життєздатність більш агресивних андрогенрезистентних клітин DU-145 потужніше пригнічував *Spn*. У випадку комбінованої дії *Sil* і *Spn* мав місце тандемний альдегідний шок: *Sil* не тільки здійснював власний ефект, опосередкований через накопичення отруйних альдегідів, але й підсилював цитотоксичні властивості *Spn*, пригнічуючи ALDH-залежні шляхи детоксикації.

Ключові слова: спермін, силібінін, рак передміхурової залози, клітинні лінії LNCaP та DU-145, ζ -потенціал, поверхневий заряд, апоптоз.

Наші попередні дослідження продемонстрували зв'язок між метаболізмом поліамінів (ПА) і перебігом раку передміхурової залози (РПЗ). Виявлені особливості метаболізму залежали від ступеня агресивності малігнізованих пухлин передміхурової залози людини та ризику прогресування захворювання. Були показані суттєві відмінності в експресії генів на рівні кодованих ними ферментів синтезу ПА: орнітіндекарбоксилази (ODC), спермідинсинтази і спермінсинтази, а також ферментів катаболізму ПА: Spd/Spn-N¹-ацетилтрансферази (SSAT) і PAOX в клітинах РПЗ у порівнянні з доброякісною гіперплазією передміхурової залози (ДГПЗ). Для ДГПЗ, на відміну від РПЗ, характерним виявився високий рівень експресії генів ферментів синтезу ПА (ODC і спермінсинтази) та знижений рівень експресії генів ферментів їх катаболізму (PAOX і SSAT). Продemonстровано, що нижчий вміст сперміну (Spn) асоціювався з вищим ступенем агресивності РПЗ та з високою імовірністю свідчив про ризик прогресування захворювання. Такі зміни метаболізму ПА, очевидно, є характерною особливістю злоякісних пухлин простати, що відрізняє їх від злоякісних новоутворень інших локалізацій [1, 2].

Останніми роками увагу дослідників привернула роль, яку відіграють у злоякісному рості ізоферменти ALDH. Показано, що ферменти підроддини ALDH1A, зокрема ALDH1A3, задіяні в механізмах виникнення надмірної проліферації, хіміорезистентності та інвазивності при різних видах раку. Були виконані розробки ALDH1A3-селективних інгібіторів і специфічних флуоресцентних зондів, які виявилися потенційно корисними при терапії раку та резекції пухлини під контролем флуоресценції [3]. Надмірна експресія ALDH тісно пов'язана зі стійкістю до терапії та самовідновленням, диференціюванням і захистом ракових стовбурових клітин від окисного стресу. Спрямовання уваги на ці ферменти може складати нову потенційну стратегію подолання терапевтичної резистентності у хворих на рак. Інгібітори ALDH класифікуються на основі їх специфічності: інгібітори ALDH широкого спектру дії та інгібітори, специфічні для ізоформ [4]. Представлені нижче дослідження є логічним продовженням розробки

способів впливу на клітини РПЗ *in vitro* з використанням екзогенного Spn у комбінації з інгібуванням ALDH за допомогою фармакопейних препаратів, у даному випадку — сполукою рослинного походження силібініном (Sil).

Мета: вивчення впливу Sil (окремо або в комбінації з Spn) на життєздатність, електрокінетичні властивості клітин РПЗ, а також на профіль основних і ацетильованих ПА, активність сперміноксидази (SMOX) та поліамінооксидази (PAOX), експресію антиапоптотичного білка Bcl-XL в цих клітинах.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджували дію Sil (Thermo Scientific, Китай) і Spn (AppliChem, Німеччина) на клітини РПЗ *in vitro*. В якості тест-об'єктів використовували культури двох клітинних ліній — андрогенчутливої високодиференційованої LNCaP та андрогенрезистентної низькодиференційованої DU-145. Клітини вирощували в культуральних флаконах (SPL, Корея) у CO₂-інкубаторі (5% CO₂, 37°C), в живильному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном (Biowest, США), з додаванням 10% інактивованої сироватки при 56° телячої сироватки і 1% суміші пеніциліну та стрептоміцину (Biowest, Франція). За добу вносили досліджувані чинники, а ще через 24 год. знімали трипсином (0,25%) адгезовані на дні культурального флакона клітини, відмивали центрифугуванням (1000 об/хв) і ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері. Вживаність визначали за тестом виключення барвника трипанового синього живими клітинами (кінцева концентрація 0,08%), підраховуючи забарвлені мертві клітини під мікроскопом (160×) у камері Горяєва.

Електрокінетичні характеристики клітин вивчали, вміщуючи їх у K/Na-фосфатний буфер (pH 7,4) для мікроелектрофорезу. Електрокінетичний потенціал (ζ) і щільність сумарного поверхневого заряду (СПЗ, q) обчислювали за рівняннями Смолуховського і Квінке-Гельмгольца, як викладено у [5–7], на основі вимірів лінійної швидкості руху клітин в електричному полі. Знак СПЗ визначали за напрямом руху клітин в електричному полі до анода або катода.

Для дослідження кінетики проліферації здійснювали культивування у плоскодонних 96-лункових планшетах, по 10 тис. клітин і 150 мкл живильного середовища на лунку. Через 24 год середовище в лунках замінювали на свіже і додавали у відповідні ряди тестовані сполуки для подальшого титрування і інкубації. Наступної доби середовище видаляли і до кожної лунки додавали 0,5% розчин кристалічного фіолетового у 70% метанолі (50 мкл/лунку). Незабарвлені мертві клітини змивали водою, забарвлені додатково фіксували 96% етанолом (100 мкл/лунку). Кількість живих клітин визначали за допомогою приладу Lybsystems Multiskan Plus (Фінляндія) — за величиною екстинкції при $\lambda = 544$ нм. Виміри проводили у чотирьох повторях для кожної концентрації сполук або їх суміші.

Обчислення інгібуючої дози IC_{50} проводили з використанням програми Quest Graph™ IC_{50} (AAT Bioquest, США), яка на основі закладених у неї даних створює логістичну модель з застосуванням регресійного аналізу на основі чотирьох ключових параметрів, згідно рівняння:

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

де Y — екстинкція; Max і Min — найбільші і найменші значення екстинкція (оптичні одиниці), визначені експериментально; X — задана концентрація ліганду (у нашому випадку — Spn, Sil або їх комбінації), Hill coefficient — коефіцієнт Хілла [8].

Профіль основних ПА (путресцин (Put), спермідин (Spd), спермін (Spn)) та їх ацетильованих (N^1 -AcSpd і N^1 -AcSpn) форм визначали методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [9], активність ферментів катаболізму ПА оцінювали за змінами рівня їх субстратів у клітинах: Spn для SMOX та N^1 -AcSpd — для PAOX, експресію білка Bcl-XL — з застосуванням електрофорезу в акриламідному гелі та Вестерн-блотингу [10]. Для підтвердження рівномірного білкового навантаження на гель використовували антитіла проти β -актину [11].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням програм STATISTICA 6, Microsoft Excel. Достовірними вважалися розбіжності, більші за 5% ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив Sil та його комбінації з Spn на проліферацію, виживаність і електрокінетичні характеристики клітин РПЗ *in vitro*. Визначені інгібуючі концентрації (IC_{50}) для Sil (при застосуванні окремо) та комбінації Sil і Spn на андрогенчутливі клітини LNCaP. При окремому використанні IC_{50} Sil = 0,98 мМ;

у випадку комбінованого впливу IC_{50} Sil = 0,26 мМ, IC_{50} Spn = 1,1 мМ. Згідно попередніх досліджень IC_{50} Spn, застосованого у чистому вигляді, для клітин LNCaP дорівнював 1,5 мМ [5]. При поєднаній дії обидві сполуки підсилювали свій цитотоксичний вплив на андрогенчутливі клітини LNCaP, проте Spn більшою мірою потенціював вплив Sil, ніж навпаки: IC_{50} Sil знижувався на 73,5%, а IC_{50} Spn — тільки на 26,7%.

При дослідженні впливу Sil або комбінації Sil і Spn на андрогенрезистентні клітини DU-145 отримані наступні результати: при окремому використанні сполуки IC_{50} Sil = 0,62 мМ; при комбінованому впливі IC_{50} Sil = 0,46 мМ, IC_{50} Spn = 0,83 мМ. За результатами попередніх досліджень IC_{50} Spn у чистому вигляді для клітин DU-145 становив 5,0 мМ [7]. У разі поєднаного використання обидві сполуки взаємно підсилювали цитотоксичний вплив на андрогенрезистентні клітини DU-145. Як і у випадку з клітинами лінії LNCaP, спостерігали зниження IC_{50} Sil на 25,8%, IC_{50} Spn — на 83,4%.

Таким чином, при комбінованому застосуванні Sil і Spn на даних клітинних моделях РПЗ відмічали кількісно протилежний характер впливу досліджуваних сполук: на менш злоякісні андрогенчутливі клітини LNCaP сильніше діяв Sil, водночас життєздатність більш агресивних андрогенрезистентних клітин DU-145 потужніше пригнічував Spn. Це свідчило про важливу роль, яку відіграє *ALDH* у механізмах захисту клітин. У випадку комбінованої дії Sil і Spn мав місце своєрідний *тандемний альдегідний шок*: Sil не тільки здійснював власний ефект, опосередкований через накопичення у клітинах отруйних альдегідів, але й посилював цитотоксичні властивості Spn, пригнічуючи *ALDH*-залежні шляхи детоксикації у пухлинних клітинах.

Встановлено, що при рН 7,4 Sil, застосований окремо у концентрації IC_{50} (0,98 мМ), знижував ζ -потенціал клітин лінії LNCaP на 26,0%, викликаючи інверсію знаку СПЗ з від'ємного на позитивний: $+7,48 \pm 0,57$ проти $-8,51 \pm 1,13$ ($\times 10^{-2}$ Кл/м²) в контролі. Чистий Spn у концентрації IC_{50} (1,5 мМ) діяв схожим чином: знижував ζ -потенціал клітин LNCaP на 16,2%, змінюючи СПЗ з $-8,51 \pm 1,13$ в контролі на $+8,47 \pm 0,64$ ($\times 10^{-2}$ Кл/м²) (табл. 1).

При вивченні комбінованого впливу на електрокінетичні характеристики клітин Sil і Spn були використані у відповідних IC_{50} , визначених для їх суміші: 0,26 та 1,1 мМ відповідно. При рН 7,4 виявлено зниження ζ -потенціалу клітин LNCaP на 19,7% відносно контролю, яке супроводжувалося інверсією знаку СПЗ, аналогічно впливу даних сполук, застосованих окремо. Величина його для клітин лінії LNCaP під дією Sil, Spn та комбінації Sil + Spn не тільки набувала позитивних значень, але й достовірно не відрізнялася у всіх трьох варіантах між собою: $+7,48 \pm 0,57$, $+8,47 \pm 0,64$

Таблиця 1

Вплив силібініну (Sil), сперміну (Spn) та їх комбінації на проліферацію, виживаність і електрокінетичні характеристики клітин лінії LNCaP

Тест-варіант	Рівень проліферації культури, %	Вживаність досліджених клітин, %	ζ , мВ	q , 10^{-2} Кл**/м ²
Контроль	98,0 ± 1,3	98,0 ± 1,3	14,07 ± 1,58	-8,51 ± 1,13
Sil (0,98 мМ)	52,6 ± 3,1*	84,0 ± 1,5*	10,44 ± 0,79*	+7,48 ± 0,57*
Spn (1,5 мМ)	48,6 ± 2,9*	76,0 ± 2,2	11,80 ± 0,89	+8,47 ± 0,64*
Sil (0,26 мМ) + Spn (1,1 мМ)	52,0 ± 3,6*	68,0 ± 2,4*	11,30 ± 1,21	+8,10 ± 0,86*

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

Таблиця 2

Вплив силібініну (Sil), сперміну (Spn) та їх комбінації на проліферацію, виживаність і електрокінетичні характеристики клітин лінії DU-145

Тест-варіант	Рівень проліферації культури, %	Вживаність досліджених клітин, %	ζ , мВ	q , 10^{-2} Кл**/м ²
Контроль	97,0 ± 1,5	97,0 ± 1,5	15,26 ± 0,75	-10,94 ± 0,38
Sil (0,62 мМ)	51,2 ± 4,1*	80,0 ± 1,9*	19,42 ± 1,98*	+13,92 ± 0,85*
Spn (5,0 мМ)	50,6 ± 2,2*	70,0 ± 2,2*	9,90 ± 0,46*	+6,59 ± 0,33*
Sil (0,46 мМ) + Spn (0,83 мМ)	49,0 ± 2,6*	72,0 ± 2,6*	16,18 ± 2,08	+11,60 ± 1,49*

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

і $+8,10 \pm 0,86$ ($\times 10^{-2}$ Кл/м²) відповідно, порівняно з $-8,51 \pm 1,13$ ($\times 10^{-2}$ Кл/м²) в контролі (див. табл. 1).

Дещо відмінну дію Sil (0,62 мМ), Spn (5,0 мМ) та комбінації Sil + Spn (в концентраціях 0,46 та 0,83 мМ відповідно) було виявлено для клітин DU-145 (табл. 2). Так, при застосуванні у чистому вигляді Sil і Spn призводили до інверсії знаку СПЗ. Розбіжність полягала в тому, що Spn викликав появу достовірно меншого позитивного СПЗ, ніж у клітин лінії LNCaP ($+6,59 \pm 0,33 \times 10^{-2}$ Кл/м² у порівнянні з $+8,47 \pm 0,64 \times 10^{-2}$ Кл/м²). Причиною могла бути викликана відмінностями іонного аранжування менша спорідненість поверхні клітин DU-145 до цього ПА ніж у клітин LNCaP. На користь цього припущення свідчив факт, що вплив Sil викликав достовірне збільшення ζ -потенціалу на 27,3%, вплив Spn — достовірне його зменшення на 39,8%, а їх суміш практично повертала значення ζ -потенціалу клітин DU-145 до контрольного рівня. Оскільки комбінація Sil з Spn (також інвертуючи знак СПЗ) не викликала збільшення його величини у порівнянні з впливом чистого Sil, можна було припустити, що обидві сполуки конкурували за ділянки зв'язування на клітинній поверхні, як це було показано раніше для іншого інгібітора ALDH — дисульфіраму [12] (див. табл. 1, 2).

Вплив Sil і його комбінації зі Spn на профіль основних та ацетильованих ПА, активність SMOX і PAOX в клітинах РПЗ in vitro. Проведено дослідження впливу Sil та його комбінації з Spn на про-

філь основних (Put, Spd, Spn) та ацетильованих (N1-AcSpd і N1-AcSpn) фракцій ПА в андроген-чутливих клітинах лінії LNCaP і андрогенрезистентних клітинах лінії DU-145.

Культигування андрогенчутливих клітин LNCaP з Sil викликало значне зниження рівня основних ПА за винятком Put, і ацетильованих форм Spd і Spn. Також спостерігали зниження молярного співвідношення Spd/Spn, що слугувало маркером пригнічення проліферації від 98,0% в контролі до 52,6% [9] під впливом даного інгібітора ALDH (табл. 3). Під впливом Sil рівень N1-AcSpd знижувався на 32,5%, а N1-AcSpn — на 38,0%. Це могло б свідчити про зростання активності PAOX, але вміст Put, який також мав би при цьому зростати, залишався практично незмінним. Пояснення, імовірно, полягає у пригніченні активності SSAT паралельно з активацією ODC; при цьому пул ацетильованих ПА зменшувався, а рівень Put зберігався за рахунок прямого синтезу з орнітину. Згідно такого припущення Sil, застосований у чистому вигляді, не впливав на активність PAOX. Водночас рівень Spn знижувався на 22,2%, що свідчило про активацію SMOX під впливом Sil (рис. 1).

При культивуванні клітин LNCaP в присутності комбінації Sil і Spn спостерігали зниження рівня майже всіх ПА: вміст Spd — на 29,6%, N1-AcSpd — на 16,6% і N1-AcSpn — на 53,8%. На відміну від дії Sil, застосованого окремо, його комбінований вплив з Spn призводив до зменшення вмісту Put на 89,1% та зростання рівня Spn більш ніж у чотири

Таблиця 3

Зміни рівня ПА (нМ/мг білка) в клітинах LNCaP під впливом Sil та його комбінації з Spn

Діюча сполука, тест-варіант	Контроль	Sil (0,98 мМ)	Sil (0,26 мМ) + Spn (1,1 мМ)
Put	550,3 ± 48,3	570,3 ± 54,3	60,2 ± 4,6*
Spd	3206,2 ± 278,6	2081,6 ± 194,6*	2256,8 ± 202,6*
Spn	1567,6 ± 168,2	1219,9 ± 116,4*	6685,6 ± 498,4*
N ¹ -AcSpd	6490,4 ± 360,5	4387,2 ± 325,9*	5437,9 ± 498,8*
N ¹ -AcSpn	3490,9 ± 218,6	2168,2 ± 176,9*	1614,6 ± 248,5*
Індекс Spd/Spn	2,05 ± 0,08	1,71 ± 0,09*	0,34 ± 0,02*
Рівень проліферації культури, %	98,0 ± 1,3	52,6 ± 3,1*	52,0 ± 3,6*
Вживаність клітин, %	98,0 ± 1,3	84,0 ± 1,5*	68,0 ± 2,4*

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

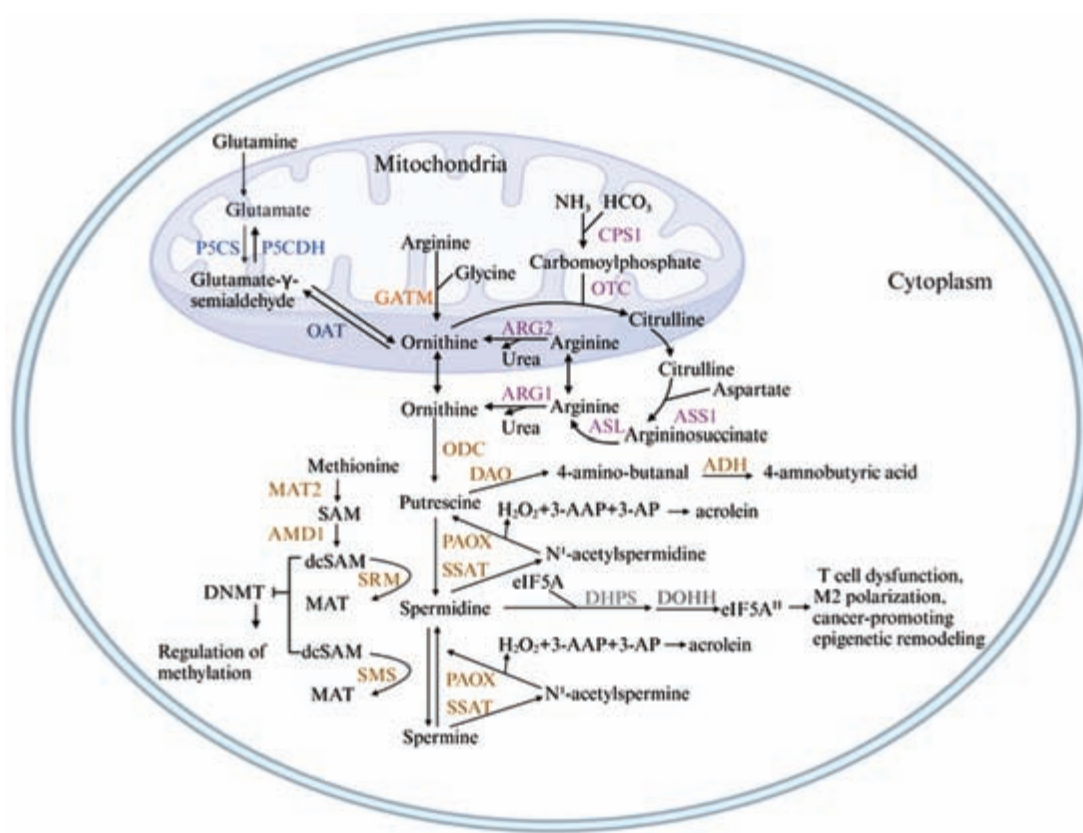


Рис. 1. Метаболізм ПА в клітинах ссавців згідно [13]

рази, вірогідно за рахунок екзогенної сполуки. Цим можна пояснити ту обставину, що хоча молярне співвідношення Spd/Spn було значно нижчим при культивуванні клітин в присутності суміші Sil і Spn, рівень проліферації культури залишався практично таким же, як і при застосуванні Sil окремо. В той час як виживаність досліджених клітин знизилася на 29,6% відносно контролю внаслідок цитотоксичної дії надлишку Spn (табл. 3). Можливе пояснення такого ефекту полягає в тому, що при дії суміші Sil зі Spn до пригнічення активності SSAT долучилося пригнічення ODC, яке спричинило дефіцит Put і, як наслідок, зниження рівня Spd. В попередніх дослідженнях при дії IC₅₀

Spn (1,5 мМ) на клітини LNCaP відмічали зниження експресії гена *ODC1* на рівні білка вдвічі [11], що підтверджує таке припущення (див. рис. 1).

При культивуванні андрогенрезистентних клітин DU-145 з чистим Sil рівні Spd, Spn і N¹-AcSpn достовірно не змінювалися. Водночас вміст Put зменшувався на 29,0%, а N¹-AcSpd — на 44,1%. Це могло бути наслідком активації PAOX на фоні суттєвого зниження активності ODC. Незмінний рівень субстрату SMOX (Spn) свідчив про відсутність впливу Sil на активність даного ферменту в клітинах DU-145. Стабільний рівень Spd, Spn і N¹-AcSpn міг утримуватися за рахунок явища інтерконверсії [14]. Зниження індексу Spd/Spn не

Зміни рівня PA в клітинах DU-145 під впливом Sil та його комбінації зі Spn (нМ/мг білка)

Діяча сполука, тест-варіант	Контроль	Sil (0,62 мМ)	Sil (0,46 мМ) + Spn (0,83 мМ)
Put	680,6 ± 59,8	484,6 ± 38,8*	15,5 ± 0,6*
Spd	5443,1 ± 653,2	5192,5 ± 467,3	2410,1 ± 230,2*
Spn	2715,3 ± 190,1	2595,8 ± 181,7	9478,3 ± 853,1
N ¹ -AcSpd	13211,5 ± 1453,3	7381,5 ± 442,9*	4369,9 ± 443,3*
N ¹ -AcSpn	1129,8 ± 73,5	1240,9 ± 117,9	1369,6 ± 123,3*
Індекс Spd/Spn	2,01 ± 0,08	2,00 ± 0,10	0,25 ± 0,02*
Рівень проліферації культури, %	97,0 ± 1,5	51,2 ± 4,1*	49,0 ± 2,6*
Вживаність досліджених клітин, %	97,0 ± 1,5	80,0 ± 2,2*	72,0 ± 2,8*

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

спостерігалось, а проліферативна активність культури залишалась на половинному рівні відносно контролю, як це і мало бути при дії IC₅₀ будь-яких зовнішніх чинників (табл. 4, див. рис. 1).

При культивуванні клітин DU-145 в присутності комбінації Sil та Spn спостерігали зниження рівня Spd на 56,7%, N¹-AcSpd — на 67,0%, а вміст Put зменшувався на 97,7%. Виявлено підвищення рівня N¹-AcSpn на 22,0%. Можливо, це пов'язано з відповідними змінами активності PAOX і SSAT на фоні практично повного відключення ODC за рахунок Spn. Блокування експресії гена ODC1 на рівні білка у клітинах DU-145 під впливом IC₅₀ Spn (5,0 мМ для клітин цієї лінії) було показано раніше [11]. Значно зростає тільки рівень Spn, очевидно, за рахунок екзогенної сполуки. Саме тому індекс Spd/Spn при культивуванні андрогенрезистентних клітин в присутності комбінації Sil та Spn був значно нижчим, ніж у контролі або при дії чистого Sil. Вживаність клітин була нижчою, ніж в контролі та при культивуванні клітин з чистим Sil, хоча і не відрізнялась так кардинально, як показник Spd/Spn (табл. 4, див. рис. 1).

Згідно даних літератури і попередніх досліджень вважається, що Spd відповідає за проліферацію, а Spn за диференціювання клітин [15]. Тому зниження молярного співвідношення Spd/Spn в клітинах РПЗ можна було вважати сигналом, що свідчив про певне гальмування пухлинного росту. Надлишок Spn в тест-системах, де він використовувався у чистому вигляді або у складі комбінації з іншою сполукою, відповідно викликав більш різке зниження індексу Spd/Spn, проте його прогностичне значення за таких обставин могло нівелюватися саме за рахунок високого вмісту екзогенного Spn і вимагало обережної трактовки отриманих результатів.

Вплив Sil і його комбінації зі Spn на експресію білка Bcl-XL в клітинах РПЗ in vitro. Bcl-XL є головним антиапоптотичним білком родини Bcl-2, його посилена експресія притаманна карциномі простати з високим показником Глісона, пов'язана

з андрогенрезистентним фенотипом і сприяє виникненню в клітинах РПЗ стійкості до апоптозу [11]. Тому особливий інтерес становило дослідження дії Sil і його комбінації з Spn на рівень експресії білка, який кодується геном Bcl-XL, саме в андрогенчутливих клітинах LNCaP. Раніше було показано, що інгібітор ALDH дисульфідрам, застосований у чистому вигляді, справляв на клітини цієї лінії проапоптотичний ефект, в той час як при комбінуванні його зі Spn цитотоксичний вплив останнього переважав над апоптозом [12]. Пригнічення експресії системи ген/білок Bcl-XL є перспективним чинником впливу на запрограмовану загибель клітин РПЗ.

Для андрогенчутливих клітин лінії LNCaP Sil у чистому вигляді мав концентрацію IC₅₀ = 0,98 мМ. У випадку застосування суміші Sil зі Spn концентрація вказаних сполук також відповідала IC₅₀, розрахованим для їх комбінації, і становила 0,26 мМ і 1,1 мМ відповідно.

Результати Вестерн-блотингу показали, що і чистий Sil, і особливо його комбінація з Spn викликали пригнічення експресії гена Bcl-XL на рівні кодованого ним антиапоптотичного білка (рис. 2). Це вказувало на можливість запобігання виникненню у андрогенчутливих клітин РПЗ як резистентності до хіміопрепаратів, так і формуванню у них андрогенрезистентного фенотипу — за допомогою інгібіторів ALDH, які своєю чергою підсилюють цитотоксичну дію Spn.

Для андрогенрезистентних клітин лінії DU-145 Sil у чистому вигляді мав концентрацію IC₅₀ = 0,62 мМ. У випадку застосування суміші Sil зі Spn концентрація вказаних сполук також відповідала IC₅₀, розрахованим для їх комбінації, і становила 0,46 і 0,83 мМ відповідно.

У клітинах DU-145 Sil у чистому вигляді знижував експресію гена Bcl-XL на рівні кодованого ним білка дещо меншою мірою (на 37,5% у порівнянні з 56,0% у LNCaP), проте комбінована дія Sil + Spn мала ефект 94,4% проти 75,0% у клітинах LNCaP (рис. 2, 3).

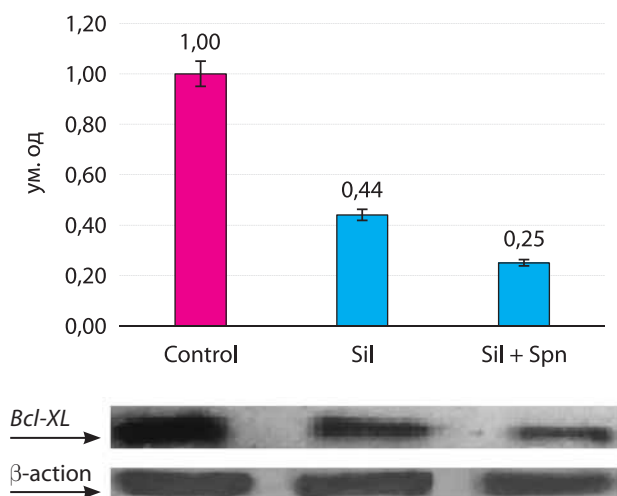


Рис. 2. Вплив Sil і його комбінації з Spn на експресію гена *Bcl-XL* (на рівні білка) в андрогенчутливих клітинах РПЗ лінії LNCaP

Таким чином, інгібітор Sil блокував в клітинах РПЗ *ALDH*-залежні шляхи детоксикації альдегідів, що накопичувалися в процесі катаболізму ПА, зокрема й під впливом надлишку Spn при їх комбінованому застосуванні. Різниця в дії на андрогенчутливі клітини лінії LNCaP і на андрогенрезистентні клітини лінії DU-145 носила переважно кількісний характер, але комбінація Sil з Spn виявилася найбільш ефективною проти клітин лінії

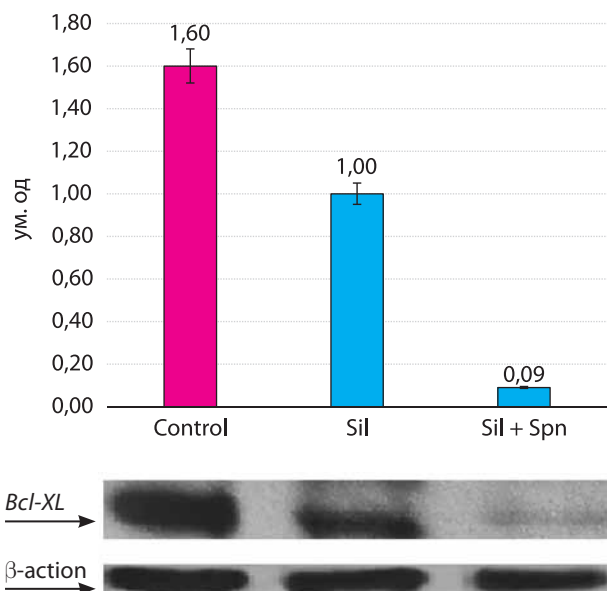


Рис. 3. Вплив Sil і його комбінації з Spn на експресію гена *Bcl-XL* (на рівні білка) в андрогенрезистентних клітинах РПЗ лінії DU-145

DU-145. За умови одночасної дії на клітини РПЗ Sil і Spn виникало явище, для якого нами була запропонована назва *тандемного альдегідного шоку* (рис. 4). Подібний ефект спостерігався і з іншими інгібіторами *ALDH* [12], тому можна припустити, що він є універсальним механізмом дії сполук, які пригнічують її активність.

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗ НА КЛІТИНИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

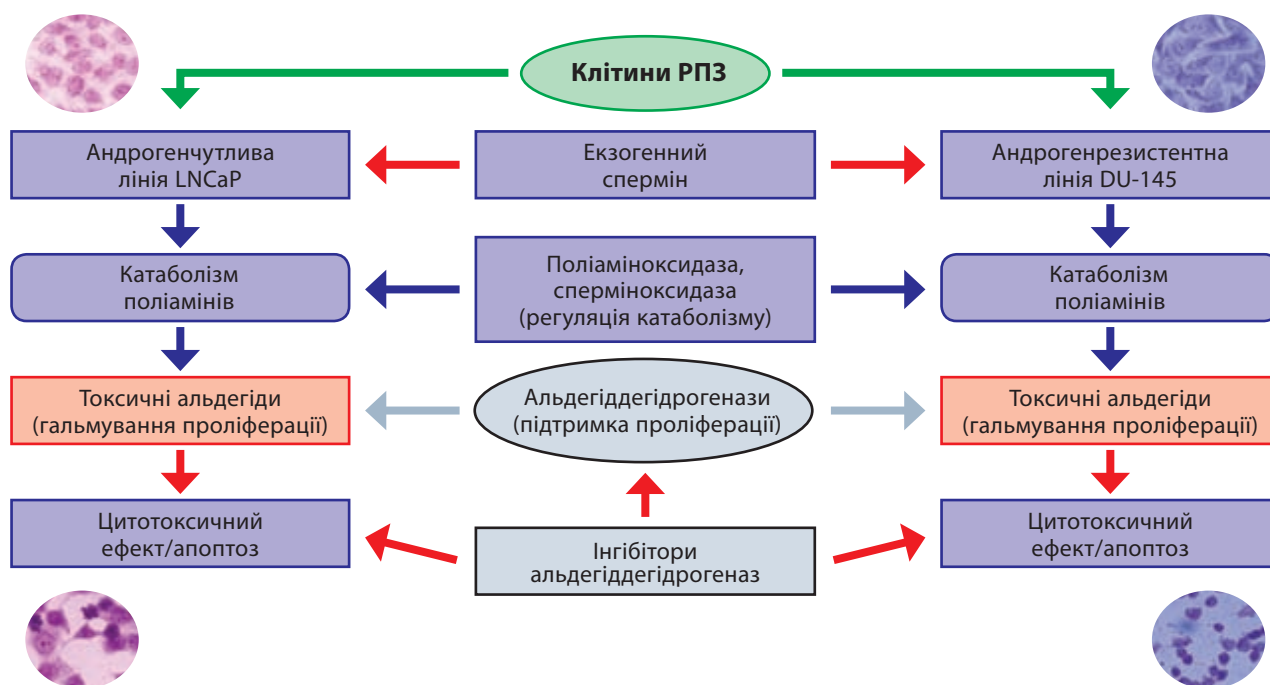


Рис. 4. Схема загального механізму виникнення *тандемного альдегідного шоку*, викликаного поєднаним впливом Spn і інгібіторів *ALDH* на клітини РПЗ

У підсумку потрібно зауважити, що останнім часом увага онкологів саме до Sil помітно зросла. Багатопланові властивості роблять його перспективним, принаймні як препарат супроводу, при хіміотерапії злоякісних новоутворень різних локалізацій [16].

ВИСНОВКИ

1. При комбінованому застосуванні інгібітора *ALDH* Sil з Spn відмічали кількісно протилежний характер їх впливу на клітинні моделі РПЗ з різним ступенем диференціювання і, як наслідок, з різною агресивністю пухлинного росту. На менш злоякісні андрогенчутливі клітини LNCaP сильніший цитотоксичний вплив мав Sil, водночас життєздатність більш агресивних андрогенрезистентних клітин DU-145 потужніше пригнічував Spn.

2. У випадку комбінованої дії Sil і Spn мав місце *тандемний альдегідний шок*: Sil не тільки здійснював власний ефект, опосередкований через накопичення у клітинах отруйних альдегідів, але й підсилював цитотоксичні властивості Spn, пригнічуючи *ALDH*-залежні шляхи детоксикації у пухлинних клітинах.

3. Показано відмінності в іонному аранжуванні поверхні клітин LNCaP і DU-145, а також конкуренцію між інгібітором *ALDH* Sil і Spn за ділянки зв'язування на клітинній поверхні.

4. Продemonстровано, що Sil в клітинах ліній LNCaP та DU-145 викликав різноспрямовані зміни активності *SMOX* і *PAOX*.

5. Sil у чистому вигляді і в комбінації з Spn викликали зниження експресії гена *Bcl-XL*, визначеної за рівнем кодованого ним антиапоптозного білка, в клітинах обох досліджених ліній. Комбінована дія була максимально вираженою в андрогенрезистентних клітинах DU-145.

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

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Zaletok SP, Klenov OO, Gogol SV, *et al.* Blood and urine polyamines as new diagnostic markers of prostate cancer. *Oncology* 2019; **21** (3): 219–23. <https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.7755> (in Ukrainian).
2. Zaletok SP, Klenov OO, Bentrad 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/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17758>.
3. Magrassi L, Pinton G, Luzzi S, *et al.* A new vista of aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3): New specific inhibitors and activity-based probes targeting ALDH1A3 dependent pathways in glioblastoma, mesothelioma and other cancers. *Cancers* 2024; **16**: 2397. <https://doi.org/10.3390/cancers16132397>.
4. Kargbo R. Discovery of selective aldehyde dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer. *ACS Med Chem Lett* 2023; **14**: 131–32. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.2c00543>.
5. 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. <https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10728>. (in Ukrainian)
6. 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)
7. 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): 186–193. <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.03.186> (in Ukrainian).
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.
9. Klenov OO, Yanish YuV, Sumnikova IO. The effect of aldehyde dehydrogenase inhibitors and their combination with spermine on the profile of polyamines in human prostate cancer cell lines. *Oncology* 2025; **27** (1): 44–50. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.044>. (in Ukrainian)
10. 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>.
11. Sumnikova IO, Bentrad VV, Klenov OO, Yanish YuV. Effect of spermine and spermine oxidase inhibitors on the expression of ornithine decarboxylase and regulating proteins in prostate cancer cells. *Oncology* 2025; **27** (2): 119–28. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025/02/119>. (in Ukrainian)
12. Yanish YuV, Zaletok SP, Voronina OK, *et al.* The effect of disulfiram, gossypol, spermine and their combinations on human prostate cancer cells in vitro. *Oncology* 2025; **27** (1): 27–43. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.027>. (in Ukrainian)
13. Wu JY, Zeng Y, You YY, Chen QY. Polyamine metabolism and anti-tumor immunity. *Front Immunol* 2025; **16**: 1529337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1529337>.
14. Goodwin AC, Jadallah S, Toubaji A, *et al.* Increased spermine oxidase expression in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia tissues. *Prostate* 2008 May 15; **68** (7): 766–72. <https://doi.org/10.1002/pros.20735>.
15. Zaletok SP, Klenov OO, Bentrad 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)
16. Roca E, Colloca G, Lombardo F, *et al.* The importance of integrated therapies on cancer: Silibinin, an old and new molecule. *Oncotarget* 2024; **15**: 345–53. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.28587>.

COMBINED ACTION OF A PLANT-ORIGINAL ALDEHYDE DEHYDROGENASE INHIBITOR AND SPERMINE ON PROSTATE CANCER CELLS

Y.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, Kyiv, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,
Ukraine

Summary. Modifications of the cytotoxic effect of spermine (Spn) on human prostate cancer (PCA) cells in vitro were investigated by inhibiting aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity with silibinin (Sil). The latter belongs to the flavonolignan family and is the main active component of the standardized milk thistle extract (*Silybum marianum*) silymarin, which is used as a hepatoprotector.

Aim: to study the effect of Sil on the viability, electrokinetic properties of PCA cells, the profile of basic and acetylated polyamines (PA), the activity of spermine oxidase (SMOX) and polyamine oxidase (PAOX), the expression of the antiapoptotic protein Bcl-XL in these cells, as well as changes in the effect of Spn on these parameters when combined with the specified inhibitor.

Object and methods: the 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. Cell survival was assessed by the trypan blue test, proliferation by crystal violet. The ξ -potential and total surface charge density (TSC) were calculated based on the linear velocity of cell movement in the electric field determined by cell microelectrophoresis, and its sign by the direction of movement. The activity of PA catabolic enzymes was assessed by changes in the level of their substrates in the cells: Spn for SMOX and N^1 -acetylspermidine (N^1 -AcSpd) for PAOX. Bcl-XL protein expression was determined using acrylamide gel electrophoresis and Western blotting. **Results:** the inhibitory concentrations (IC_{50}) of Sil were determined when using the pure compound and when combined with Spn. Cultivation of LNCaP cells with pure Sil, pure Spn, or their combination caused a decrease in the ξ -potential and an inversion of the TSC sign from negative to positive. The magnitude of the positive charge in these variants did not

differ significantly, indicating competition between Sil and Spn for binding sites. Cultivation of DU-145 cells with Sil led to an increase in the ξ -potential, and the combination of Sil with Spn caused its value to return to control values, while Spn, used in its pure form, reduced their ξ -potential in the same way as in LNCaP cells. Both Sil, Spn, and their mixture also caused a positive sign reversal of the TSC of DU-145 cells, but Spn caused a significantly smaller value compared to LNCaP cells, which indicated differences in the ionic arrangement of androgen-resistant and androgen-sensitive cells. Sil demonstrated an anti-proliferative and proapoptotic effect on LNCaP cells, proportionally dependent on the concentration. Differences in the ionic arrangement of LNCaP and DU-145 cells were shown. Competition between Sil and Spn for binding sites on the cell surface was revealed. Sil in LNCaP and DU-145 cell lines caused different-directional changes in SMOX and PAOX activity. Both Sil itself and especially the combination of Sil with Spn caused a decrease in Bcl-XL gene expression at the level of the antiapoptotic protein encoded by it. The combined effect was maximal in androgen-resistant DU-145 cells. **Conclusions:** when combining Sil with Spn, a quantitatively opposite nature of their effects on PCa cells with different degrees of differentiation and different aggressiveness of tumor growth was observed. Sil had a stronger cytotoxic effect on the less malignant androgen-sensitive LNCaP cells, while Spn more potently suppressed the viability of the more aggressive androgen-resistant DU-145 cells. In the case of the combined action of Sil and Spn, a tandem aldehyde shock occurred: Sil not only exerted its own effect mediated through the accumulation of toxic aldehydes, but also enhanced the cytotoxic properties of Spn, inhibiting ALDH-dependent detoxification pathways.

Keywords: spermine, silibinin, prostate cancer, LNCaP and DU-145 cell lines, ξ -potential, 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: 30.10.2025

Рекомендовано до друку: 01.12.25

Підписано до друку: 02.02.2026