

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І
РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО**

САМОЙЛЕНКО ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА

УДК: 616-006.04:577.218:616-085

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ МОДИФІКАЦІЇ
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ ПРИ
ПУХЛИННОМУ ПРОЦЕСІ**

14.01.07 – онкологія



АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2025

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ.

Науковий керівник

- доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Ганусевич Ірина Іванівна,
завідувачка відділу патофізіології
метастазування Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор
Телегєєв Геннадій Дмитрович,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України;
- доктор біологічних наук, професор
Гарманчук Людмила Василівна,
професор кафедри екології та зоології ННЦ
"Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса
Шевченка.

Захист відбудеться «12» листопада 2025 р. о 13 годині 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитися на сайті ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України за адресою https://www.iepor.site/?page_id=179 та у бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий «__» жовтня 2025 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Л.М. Шлапацька

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Прогресування злоякісних новоутворень супроводжується перебудовою клітинного метаболізму, зокрема обміну поліамінів (ПА), який є критичним для забезпечення репарації ДНК, проліферації, диференціювання та виживання пухлинних клітин. Ключовим ферментом цього обміну є орнітиндекарбоксилаза (ОДК), яка каталізує утворення путресцину – першого поліаміну в каскаді біосинтезу ПА. Надмірна активність ОДК сприяє неконтрольованому поділу клітин, гальмуванню апоптозу, неоангіогенезу та резистентності до терапії (Casero R.A. et al., 2016; Mounce V.C. et al., 2020).

Ген *odc1* є транскрипційною мішенню онкобілків (зокрема c-Мус) та чутливим індикатором проліферативної активності, підвищений рівень експресії якого відмічають у клітинах раку товстої кишки, легені, передміхурової та молочної залози, гліобластоми та нейробластоми (Chen Y., 2023). Пухлини з високою активністю ОДК характеризуються агресивним перебігом, несприятливим прогнозом та резистентністю до лікування, що свідчить про ключову роль цього ферменту як потенційної мішені для терапії. Проте молекулярні механізми модифікації функціонального стану ОДК у злоякісно трансформованих клітинах на сьогодні залишаються вивченими фрагментарно. Зокрема, недостатньо охарактеризовані епігенетичні та сигнальні механізми, які впливають на експресію гена *odc1*, його транскрипційну активацію або пригнічення функціонування. У ряді публікацій продемонстровано, що підвищення експресії *odc1* асоціюється з активністю онкобілка c-Мус та корелює з агресивним фенотипом злоякісних новоутворень різного гістогенезу (Chen Y. et al., 2023; Zhang L. et al., 2024). Модифікація функціонального стану ОДК здійснюється на кількох рівнях: транскрипційному, посттрансляційному, сигнальному та епігенетичному. На транскрипційному рівні експресія *odc1* зумовлена дією c-Мус, NF-κB, HIF-1α. Посттрансляційно рівень активності ферменту регулюється білком-антизимом OAZ1, який ініціює деградацію ОДК, та білком AZIN1, що, навпаки, їй перешкоджає. У багатьох типах пухлин виявлено порушення балансу пригнічення та активації *azin1*, що призводить до стабілізації функціональності ОДК та накопичення ПА (Erales J. et al., 2014; Tulluri N. et al., 2021).

В рамках сучасних підходів у лікуванні онкологічних хворих активно вивчаються сполуки, здатні пригнічувати активність ОДК – як прямі інгібітори (наприклад, α-дифторметилорнітин (ДФМО), так і непрямі (нораргінін, полігексаметилenguанідин (ПМГ), метилглюксаль-біс-гуанілгідразон (МГБГ)), що впливають на епігенетичну регуляцію та сигнальні шляхи. ДФМО вже продемонстрував протипухлинну активність на моделях колоректального раку, нейробластоми та гліобластоми (Chen X. et al., 2019; Gerner E.W. et al., 2009), а також у клінічних дослідженнях пацієнтів із рецидивуючими колоректальними аденомами. В той же час, встановлено, що його дія має тимчасовий характер: після припинення лікування відбувається відновлення проліферативної активності трансформованих клітин, що свідчить про наявність адаптивних або компенсаторних механізмів, які дозволяють клітинам обходити блокування поліамінового синтезу – зокрема шляхом активації транспорту ПА або перебудови

метаболічної мережі (Liu T. et al., 2023). Враховуючи зазначене, критично важливим є вивчення механізмів, які лежать в основі тимчасового пригнічення проліферації, щоб забезпечити стійкий протипухлинний вплив, спрямований на модифікацію функціонального стану ОДК. Крім того, ОДК наразі розглядається не лише як мішень молекулярно-спрямованого впливу, але і як важливий біомаркер. Відомо, що моніторинг активності ОДК дозволяє з'ясувати характер біологічної відповіді на терапію, а також є ефективним підходом для визначення механізмів дії токсичних речовин (Pegg A.E., 2006). Зокрема, нові препарати-інгібітори ОДК демонструють високу потужність пригнічення ферменту *in vitro* та *in vivo* (Schultz C.R. et al., 2025), а методи метаболічного обмеження (наприклад, дієтичне зменшення споживання аргініну та прийом аспірину) вже використовуються у клінічних дослідженнях (Zell J.A. et al., 2023).

Розуміння механізмів молекулярно-біологічної модифікації функціонального стану ОДК при пухлинному процесі дозволить ідентифікувати ключові ланки регуляції обміну ПА та створить теоретичне підґрунтя для визначення предикторів ефективності терапії інгібіторами ОДК.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у відповідності з планами науково-дослідних робіт Інституту за темами: «Дослідження молекулярних механізмів протипухлинної дії природних поліфенолів, що пов'язані з їх впливом на метаболізм поліамінів» (2006-2008 рр., державний реєстраційний № 0105U005559.), «Дослідити характер метилювання ДНК в пухлинних клітинах за умов блокування синтезу поліамінів» (2010-2012 рр., державний реєстраційний № 0109U007154), «Особливості метаболізму аргініну та поліамінів за умов впливу модуляторів їх обміну при пухлинному рості» (2013-2015 рр., державний реєстраційний № 0112U004715). Робота підтримана фондом УНТЦ – грант 4894 «Development of nanotechnology of nanoplant composites and investigation of their antitumor and antioxidant activities» (2011-2013 рр.).

Мета дослідження. Визначити молекулярно-біологічні особливості регуляції функціонального стану орнітиндекарбоксилази (ОДК) при пухлинному рості за умов впливу синтетичних інгібіторів ензиму.

Задачі дослідження:

1. Вивчити особливості дії синтетичних інгібіторів ОДК – нораргініну, ДФМО, МГБГ та ПМГ – на показники функціонального стану ензиму у клітинах карциносаркоми Уокер (W-256) щурів, карциноми легені Льюїс (КЛЛ) та лімфолейкозів L1210 і P388 мишей.

2. Дослідити показники перебігу W-256, КЛЛ та лімфолейкозів L1210 і P388 в залежності від вмісту та рівня активності ОДК при застосуванні синтетичних інгібіторів ензиму.

3. Визначити вміст білків, залучених у регуляцію функціонального стану ОДК (p50, p65, Bcl-xL, c-Myc, p53), та рівень активності РНКаз у клітинах W-256, лімфолейкозів L1210 та P388 за дії досліджуваних інгібіторів.

4. Дослідити рівні метилування генів, асоційованих з функціональним станом ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*), у клітинах КЛЛ, лімфолейкозів L1210 та P388 під впливом синтетичних інгібіторів ензиму.

5. Вивчити кореляційні зв'язки між рівнями метилування генів-регуляторів ОДК та активністю/вмістом ензиму у клітинах пухлини, показниками перебігу W-256, КЛЛ, лімфолейкозів L1210 і P388 за умов дії застосованих інгібіторів.

6. На основі даних багатофакторного кореляційного аналізу ідентифікувати ключові епігенетичні чинники екзогенної регуляції ОДК при пухлинному процесі.

Об'єкт дослідження: карциносаркома Уокер (W-256), карцинома легені Льюїс (КЛЛ), лімфолейкози L1210 та P388.

Предмет дослідження: активність ОДК в клітинах КЛЛ та вміст ОДК в клітинах W-256, L1210, P388; вміст білків фактора транскрипції NF-κ (p50, p65), c-Myc, p53, Bcl-xL в клітинах W-256, L1210, P388; рівень метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1* в клітинах КЛЛ, L1210, P388.

Методи дослідження. В роботі використані методи експериментальної онкології; біохімічні і спектрофотометричні методи – для визначення активності ОДК, методи гель-електрофорезу, Вестерн-блот аналіз та метод поверхневого плазмонного резонансу (ППР) – для оцінки рівнів білків, продуктів генів, залучених у процеси злоякісного росту; метод зимографії – для визначення активності РНКаз; метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі – для аналізу статусу метилування CpG-острівців у промоторах генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*; методи статистики - t-критерій Ст'юдента, кореляційний аналіз та багатофакторний регресійний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в результаті комплексного експериментального дослідження *in vivo* ідентифіковано ключові епігенетичні механізми модифікації функціонального стану ОДК у пухлинних клітинах за умов впливу синтетичних інгібіторів ензиму – нораргініну, α-диформетилорнітину (ДФМО), полігексаметиленгуанідину (ПМГ) та метилглюксаль-біс-гуанілгідрозон (МГБГ).

Розширено фундаментальні знання щодо низки молекулярно-біологічних механізмів екзогенного інгібування вмісту та активності ОДК при пухлинному рості.

Вперше показано, що протипухлинна дія інгібіторів ОДК реалізується шляхом гіперметилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*, що супроводжується зниженням активності ензиму та асоціюється з гальмуванням росту пухлин; зміни співвідношення сигнальних білків (p50, p65, c-Myc, p53, Bcl-xL), що модулюють транскрипційну активність *odc1*; активації РНКаз, як складової супресії трансляції ОДК.

Вперше виявлено, що поєднаний вплив інгібіторів ДФМО та нораргініну формує ефективну епігенетичну сигнатуру, яка забезпечує значне пригнічення експресії та активності ОДК і вагомий протипухлинний ефект порівняно із застосуванням інших досліджуваних сполук.

Вперше на основі результатів багатофакторного регресійного аналізу визначено гени, статус метилування яких є незалежним епігенетичним чинником, що у сукупності впливає на характер модифікації функціонального стану ОДК та

перебіг пухлинного процесу за умов сумісного застосування ДФМО та нораргініну. Ідентифіковано патерн універсальних (*odc1*, *smox*) та модель-специфічних (*oaz1*, *sat1*, *amd1*, *azin1*) генів, рівень метилування яких регулює активність та вміст ОДК за умов комбінованої дії інгібіторів ДФМО та нораргініну.

Практичне значення одержаних результатів. Обґрунтовано доцільність використання комплексу синтетичних інгібіторів ОДК як ефективного засобу зниження активності ферменту, що супроводжується пригніченням пухлинного росту та зменшенням метастазування. Отримані результати можуть бути використані для розробки підходів до підвищення ефективності прогнозування перебігу онкологічних захворювань і вдосконалення терапевтичних підходів шляхом розробки мішень-орієнтованих стратегій лікування, спрямованих на ОДК як ключову молекулярну мішень обміну ПА.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є закінченим самостійним дослідженням, в якому повноцінно реалізовано творчі ідеї автора. Дисертантом особисто визначена мета, розроблена програма і задачі наукової роботи, визначено методологію та заплановано дослідження. Автором здійснено інформаційний пошук та аналіз сучасної літератури за тематикою роботи. Здобувачем особисто виконано експериментальну частину роботи, зокрема експерименти на тваринах - забір біологічного матеріалу, приготування клітинних та ядерних екстрактів із пухлинних клітин, визначення вмісту та активності білків, метилування генів, залучених у регуляцію ОДК у пухлинних клітинах. Автором проведено аналіз, теоретичне узагальнення і статистичну обробку одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на науково-практичних форумах: Міжнародній конференції «Пухлина та організм: сучасні аспекти старої проблеми» (Київ, 2010); Ukrainian-Swedish Workshop «New approaches in diagnostics and treatment of cancer» (Київ, 2011); VII з'їзді онкологів і радіологів країн СНД (Астана, 2012); International Conference and Exhibition on Nutritional Science & Therapy (Філадельфія, 2012); 5-й Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» "СЕМСТ-5" (Одеса, 2012); Міжнародному конгресі «Polyamines Biological and Clinical Perspectives» (Стамбул, 2012); 11th International Congress on Targeted Anticancer Therapies (Париж, 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць, серед яких 8 статей (5 – у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України, у тому числі 4 – у журналах, що індексуються у міжнародних наукометричних базах), 1 патент України на корисну модель та 8 тез у збірниках матеріалів наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 180 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», чотирьох розділів результатів власних досліджень, розділу «Узагальнення та обговорення результатів», висновків та списку використаних джерел, який налічує 205 посилань, з них 9 кирилицею. Роботу ілюстровано 37 рисунками та 17 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. Експериментальні дослідження проводили на чотирьох моделях перещеплюваних пухлин – W-256, КЛЛ та лімфолейкозах мишей L1210 і P388, отриманих із клітинного банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Дослідження виконані на 400 експериментальних тваринах, зокрема 60 білих нелінійних щурах та 340 мишах (лінії C57Bl/6 і гібриди CDF і BDF1) розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Всі дослідження проводили згідно Міжнародних правил проведення робіт із експериментальними тваринами (Directive, 2010). Штам W-256 перещеплювали самицям нелінійних щурів масою близько 150 г підшкірно суспензією клітин по 6×10^6 клітин/тварину. Мишам ліній C57Bl/6 перещеплювали КЛЛ внутрішньомязево (в стегно по 3×10^5 клітин/мишу), штам L1210 – гібридам BDF1 внутрішньочеревно по 4×10^5 клітин/мишу, штам P388 – гібридам CDF внутрішньочеревно по 5×10^5 клітин/мишу в 0,2 мл 0,9% розчину хлориду натрію.

У роботі використано інгібітори ОДК, які мають протипухлинні властивості: нораргінін (Cayman Chemical, США) – інгібітор аргінази (сумарна доза 300 мг/кг маси), α -дифторметилорнітин (ДФМО) (Sigma-Aldrich, США) – інгібітор активності ОДК (сумарна доза 4000 мг/кг маси), полігексаметиленгуанідин (ПМГ) (Інститут органічного синтезу, Рига, Латвія) – інгібітор ОДК (сумарна доза 9 мг/кг маси); метилглюксаль-біс-гуанілгідрозон (МГБГ) (Sigma-Aldrich, США) – інгібітор S-аденозилметионіндекарбоксилази (S-АМДК) (сумарна доза 50 мг/кг маси). Інгібітори готували безпосередньо перед використанням і вводили мишам та щурам у черевну порожнину, починаючи з 7 доби після перещеплення КЛЛ (5-разово, через добу) та на 2-гу добу після перещеплення W-256, L1210 і P388 (6-разово). Перед кожною ін'єкцією тварин зважували і вираховували індивідуальну дозу препарату. Контрольним тваринам вводили по 0,2 мл ізотонічного стерильного розчину натрію хлориду. На 12-ту добу після перещеплення W-256 та на 26-ту добу після перещеплення КЛЛ проводили декапітацію тварин під ефірним наркозом. Для оцінки протипухлинної дії досліджуваних агентів проводили вимірювання маси та розмірів пухлини по формулі Шрека (Эммануэль, 1977). У тварин із асцитними пухлинами злоякісно трансформовані клітини вимивали з черевної порожнини фізіологічним розчином і підраховували у камері Горяєва через 10 діб у мишей з L1210 та через 7 діб у мишей з P388.

Протипухлинний ефект інгібіторів ОДК у щурів з W-256 оцінювали за масою пухлин, у мишей з КЛЛ оцінювали за об'ємом пухлин та кількістю та об'ємом метастазів, у мишей з L1210 та P388 – за кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині за введення інгібіторів ОДК.

Визначення розмірів пухлин, кількості та об'єму метастазів. Об'єм пухлини та метастазів оцінювали за формулою:

$$V = \pi abc / 6, \text{ мм}^3$$

де a , b , c – найбільші лінійні розміри пухлини, мм.

Кількість метастазів у легенях тварин визначали на 26 добу після перещеплення пухлини. Після забою тварин видаляли легені та візуально визначали і підраховували метастази.

Визначення активності ОДК. Активність ОДК у пухлинних клітинах визначали за методикою Luqman et al. (2013) та оцінювали на багатофункціональному рідері для мікропланшета Synergy HT, модель SIAFRTD (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) при довжині хвилі 426 нм.

Визначення активності РНКаз досліджували методом зимографії із застосуванням електрофорезу в 20% поліакриламідному гелі у системі Laemmli (Laemmli, 1970). Електрофорез проводили у вертикальних блоках гелю, у якості субстрату до складу гелю вводили 2,5 мг/мл високополімерної РНК дріжджів *Torula* (*Torulopsis utilis*) (Sigma-Aldrich, США). Після проведення електрофорезу гелі інкубували в 0,1 М трис-НCl протягом 60 хв при 37° С та промивали 0,01 М трис-НCl протягом 10 хв і фарбували 0,2% розчином толуїдинового синього (Sigma-Aldrich, США) в 0,01 М трис-НCl протягом 20 хв. Гелі сканували за допомогою HP Scanjet 5590. Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

Визначення вмісту білків. Загальну концентрацію білка в екстрактах клітин та ядер, виготовлених за методом Sovac (Sovak et al., 1997), визначали методом Бредфорда (Bradford, 1976). Вміст білків фактора транскрипції NF-κB (p50, p65), Bcl-xL, c-Myc, p53 досліджували методом ППР на спектрометрі «Плазмон 05», розробленого в Інституті фізики напівпровідників НАН України. Для вивчення вмісту білків за методом ППР була застосована наступна процедура: 1) на проміжний шар імобілізували моноклональні антитіла мишей проти досліджуваного білка (Santa Cruz Biotech., CA, USA) в концентрації 2 мкг/мл у 0,01 М натрій-ацетатному буфері (pH 5,5) протягом 30 хв. з наступним промиванням кювети цим же буфером протягом 10 хв.; 2) для блокування залишкових альдегідних груп до кювети ППР вводили 0,1М розчин етаноламіну в 0,05 М натрій-фосфатному буфері (pH 7,3) протягом 30 хв; 3) в кювету вводили ядерний (або клітинний) екстракт, який містив 10-100 мкг загального білка (оптимальною виявилася кількість загального білка 25-50 мкг) в буфері 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20. При інтерпретації даних вважали, що зміна кута ППР прямо пропорційна поверхневій концентрації білка. Дані ППР було обраховано за допомогою комп'ютерних програм Biosuplar-400 та OriginPro 8.5.1. Вміст ОДК визначали за допомогою вестерн-блот аналізу (Tsang et al., 1983). В роботі використовували моноклональні антитіла миші проти ОДК та вторинні IgG кози проти антитіл миші, кон'югованих з пероксидазою хрину (Santa Cruz Biotech., CA, США).

*Аналіз рівня метилювання генів *odc1, oaz1, azin1, smox, sat1* та *amd1*.* ДНК виділяли з клітин КЛЛ, P388 та L1210 з використанням набору GenJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) згідно протоколу виробника, після чого ДНК обробляли метил-чутливою та метил-залежною рестриктазами протягом 6 год при 37°C, потім – 20 хв при 65°C для інактивації ферментів рестрикції. Отримані зразки ДНК в подальшому використовували в кількісній ПЛР при таких умовах: 95°C – 10 хв; 40 циклів – 97°C, 15 с; 72°C – 1 хв. В якості контролю використана необроблена рестриктазами ДНК. Роботи виконувались згідно протоколу виробника (SaBiosciences Corp., США, Kit for MethyloProfiler DNA Methylation qPCR Assay).

Статистичні методи. Статистичну обробку отриманих результатів дослідження здійснювали з використанням програмного забезпечення Statistica (v. 8) та MS Excel. Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували t-критерій Стюдента. Ключові гени модифікації функціонального стану ОДК за дії інгібіторів ензиму визначали за допомогою кореляційного аналізу та багатофакторного лінійного регресійного аналізу (<https://www.datatab.net/statistics-calculator/regression>). За рівень статистичної достовірності прийнято $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Активність та вміст ОДК у клітинах експериментальних пухлин за дії синтетичних інгібіторів ензиму. Досліджено вплив синтетичних інгібіторів ОДК – нораргініну, ДФМО, МГБГ та ПМГ – на показники функціонального стану ензиму, зокрема його активність і вміст, у клітинах W-256, КЛЛ, лімфолейкозів L1210 та Р388. При застосуванні ДФМО, як необоротного інгібітора ОДК, активність ферменту у клітинах КЛЛ склала $0,325 \pm 0,060$ у. о., та була на 60% меншою порівняно з контрольними значеннями ($p < 0,05$) (рис. 1).

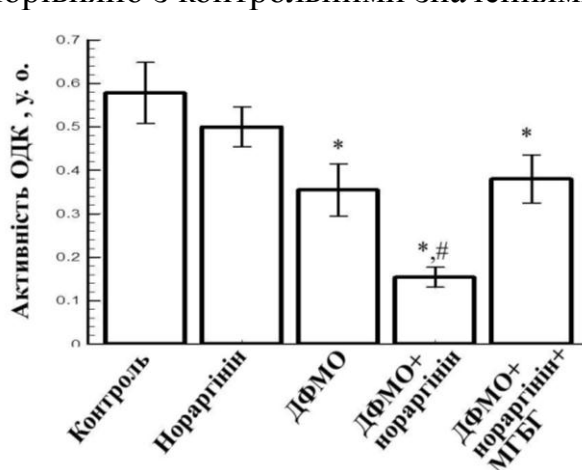


Рис. 1. Активність ОДК у клітинах КЛЛ після дії інгібіторів ензиму.

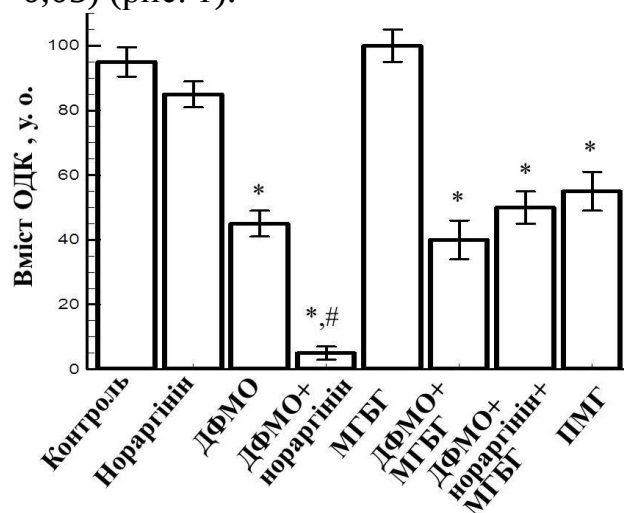


Рис. 2. Вміст ОДК у клітинах L1210 після дії інгібіторів ензиму.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з іншими інгібіторами

Нораргінін при окремому застосуванні не виявив достовірного впливу на активність ОДК у клітинах КЛЛ. Найнижчий рівень активності ОДК в пухлині спостерігали при поєднаному застосуванні ДФМО з нораргініном – $0,154 \pm 0,023$ у. о., що становить лише 27% від контрольного значення ($0,578 \pm 0,070$ у. о.) ($p < 0,05$), і свідчить про синергічний ефект інгібіторів, спрямований як на блокування біосинтезу ПА, так і на зменшення доступності субстрату – орнітину. Додавання МГБГ до вказаних інгібіторів не посилювало їхній вплив на активність ОДК у тканині КЛЛ, яка становила $0,380 \pm 0,055$ у. о. і складала 66% від контрольних значень ($p < 0,05$) (рис. 1).

При дослідженні вмісту ензиму у клітинах L1210 виявлено достовірно нижчі від контрольних значень показники в усіх експериментальних групах, окрім мишей,

яким вводили нораргінін або МГБГ (рис. 2). При застосуванні ДФМО вміст ОДК був достовірно нижчим у 2 рази ($45,0 \pm 4,7$ у. о.), його комбінації з нораргініном - у 10 разів ($5,0 \pm 1,6$ у. о.), але додавання до них МГБГ знизило ефективність поєднаного впливу інгібіторів ($50,0 \pm 6,2$ у. о.) ($p < 0,05$). Застосування ПМГ призвело до зменшення активності ОДК у 1,7 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$). Таким чином, найбільш ефективним щодо зменшення функціональної активності ОДК у клітинах L1210 та КЛЛ є поєднане застосування ДФМО та нораргініну.

У клітинах лімфолейкозу Р388 при комбінованому введенні ДФМО і МГБГ встановлено зменшення вмісту ОДК в 1,6 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Застосування ж ПМГ у монорежимі зумовило статистично значуще зниження вмісту ОДК у клітинах Р388 та W-256 у 1,9 раза ($p < 0,05$) та у 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно.

Отже, поєднане застосування синтетичних інгібіторів ОДК забезпечує підсилення ефекту кожного з них, застосованого окремо, що свідчить про доцільність комбінованого підходу до інгібування ОДК при створенні мішень-спрямованих протипухлинних препаратів.

Вплив інгібіторів ОДК на ріст та прогресію солідних та асцитних експериментальних пухлин різного гістогенезу. Досліджено вплив інгібіторів ОДК на перебіг експериментальних пухлин з урахуванням показників функціонального стану ензиму. Встановлено, що ПМГ викликав достовірне зниження маси W-256 у 2 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Суттєве гальмування росту КЛЛ за умов як окремого, так і комбінованого застосування інгібіторів ОДК, зафіксовано починаючи з 15-ї доби експерименту (рис. 3). Протипухлинна активність нораргініну знижувалась від 15-ї до 26-ї доби

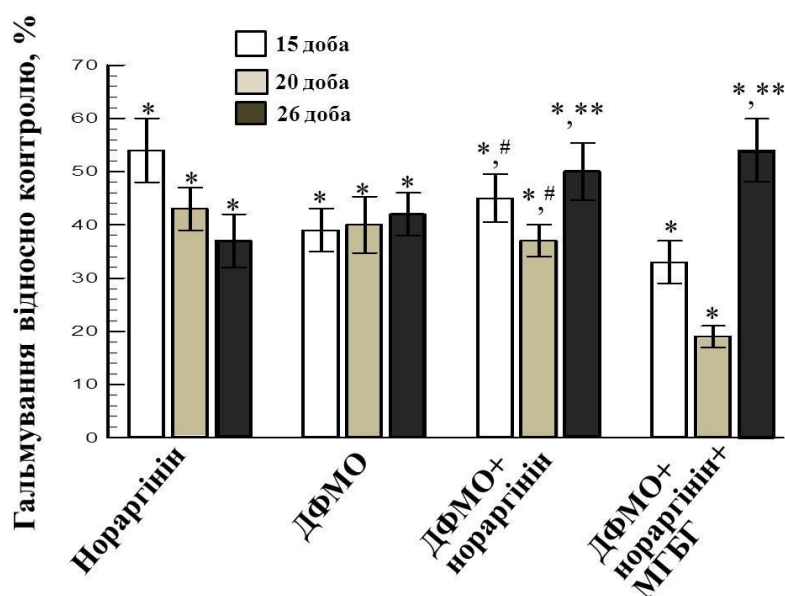


Рис. 3. Гальмування росту КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з іншими інгібіторами; # – $p < 0,05$ порівняно з ДФМО+нораргінін+МГБГ

спостереження, в той час як ефект ДФМО утримувався на одному рівні (від 39 до 42%), а поєднане застосування ДФМО з нораргініном та комбінація ДФМО з нораргініном і МГБГ призводило до найбільшого гальмування росту КЛЛ на момент

виведення тварин з експерименту – 50 та 54% відповідно (26 доба). Зазначимо, що за поєднаного впливу ДФМО з нораргініном на 15-у та 20-у добу спостереження зафіксовано достовірно вищий протипухлинний ефект у порівнянні з трикомпонентною комбінацією ДФМО, нораргініну та МГБГ, що свідчить про стабільну протипухлинну дію комбінації ДФМО з нораргініном, яка асоційована з високоефективним зниженням активності ОДК в КЛЛ (див. рис. 1).

Вірогідно, за умови поєднаного використання двох інгібіторів реалізується синергічний механізм блокади поліамінового обміну – як через зменшення продукції орнітину, так і за рахунок пригнічення декарбоксилювання залишкового орнітину.

Результати дослідження впливу інгібіторів ОДК на метастатичну активність КЛЛ свідчать про відсутність достовірного ефекту жодного із застосованих інгібіторів як окремо, так і у поєднанні при обрахунку кількості метастазів у тварин на 26-й день спостереження (табл.1). Натомість при застосуванні ДФМО як окремо, так і у поєднанні з нораргініном або з нораргініном та МГБГ спостерігається достовірне зменшення об'єму метастазів у 16 разів, у 14 та у 22 разів відповідно. Такий результат свідчить про вплив досліджуваних інгібіторів ОДК на проліферацію пухлинних клітин, але не на процеси, пов'язані з їхньою дисемінацією. Цей факт додатково підтверджує, що протипухлинна і, зокрема, антиметастатична дія використаних сполук реалізується шляхом пригнічення синтезу ПА через вплив на функціональний стан ОДК, яка є фактором мікрооточення як первинної пухлини, так і сайтів віддаленого метастазування. Також, вірогідно, що, як при окремому, так і при поєднаному з іншими інгібіторами застосуванні, саме ДФМО забезпечує ефективне зменшення об'єму метастазів КЛЛ.

Таблиця 1

Вплив інгібіторів ОДК на показники метастазування карциноми легені Льюїс

Групи	Середня кількість метастазів, n	Середній об'єм метастазів, мм ³
Контроль	11,0±2,2	160,1±44,1
Нораргінін	16,6±3,2	138,8±44,2
ДФМО	12,0±0,7	9,8±2,3*
ДФМО+нораргінін	11,0±2,3	11,9±5,3*
ДФМО+нораргінін+ МГБГ	11,8±3,1	7,3±2,5*

*Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем*

Також нами було вивчено протипухлинний вплив інгібіторів ОДК і на моделях лімфолейкозів мишей L1210 та P388, ефект дії яких оцінювали на 10-й та 7-й день спостереження, відповідно, за кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині (рис. 4).

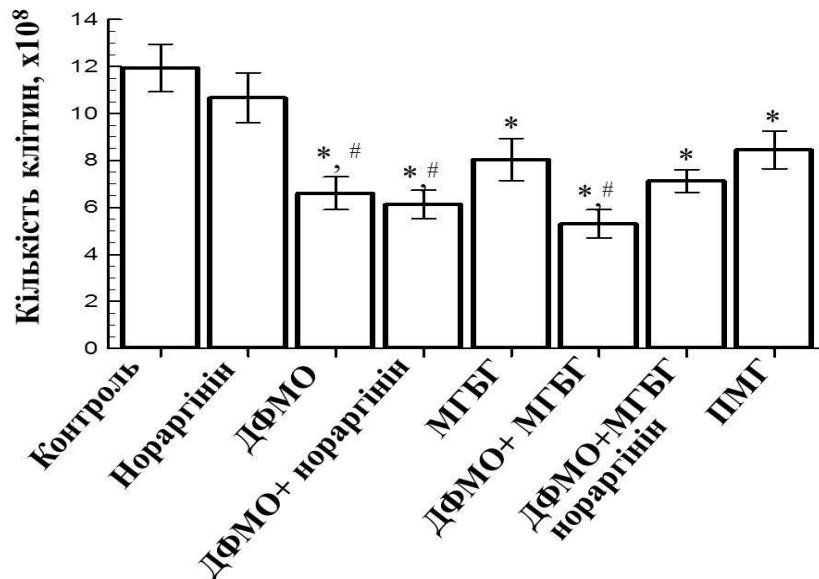


Рис. 4. Кількість клітин в асцитній рідині лімфолейкозу L1210 за дії синтетичних інгібіторів ОДК.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з МГБГ, ПМГ та нораргініном

Моновплив ДФМО, МГБГ, ПМГ призвів до зменшення кількості пухлинних клітин у мишей з L1210 на 45%, 33% та 32%, відповідно, порівняно з контролем ($p < 0,05$) (рис.4). Додавання нораргініну до ДФМО не зумовило посилення його протипухлинного ефекту. Натомість МГБГ суттєво підвищувала ефективність впливу ДФМО, що сприяло гальмуванню росту пухлини на 55% ($p < 0,05$).

У мишей з лімфолейкозом Р388 за дії ДФМО із МГБГ, а також при окремому застосуванні ПМГ, відмічено достовірне зниження кількості пухлинних клітин в асцитній рідині порівняно з контролем, що відповідало 27% та 18% гальмування пухлинного росту.

Кореляційний аналіз виявив наявність тісних прямих позитивних залежностей між активністю та вмістом ОДК з показниками пухлинного росту перещеплюваних новоутворень за дії синтетичних інгібіторів ензиму (рис. 5 – 8). Показано, що за умов дії синтетичних інгібіторів ензиму об'єм пухлини та метастазів корелює з активністю ОДК у тканині КЛЛ (відповідно $r=0,76$ та $r=0,77$; $p < 0,05$); об'єм пухлини – з вмістом ОДК у тканині W-256, кількість пухлинних клітин в асцитній рідині – з вмістом ОДК в клітинах L1210 і Р388 (відповідно $r=0,82$, $r=0,81$ та $r=0,65$; $p < 0,05$). Виявлені кореляції свідчать про те, що протипухлинний ефект застосованих інгібіторів ОДК реалізується шляхом зниження функціонального стану ензиму, зокрема, його активності та вмісту у злоякісно трансформованих клітинах.

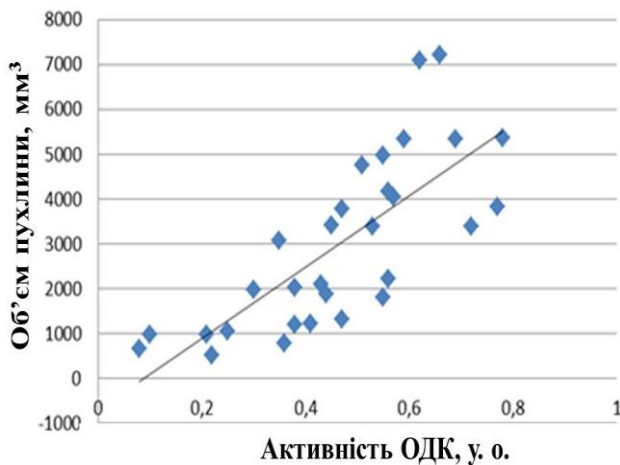


Рис. 5. Зв'язок між активністю ОДК у тканині КЛЛ та об'ємом пухлини за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,76$; $p<0,05$)

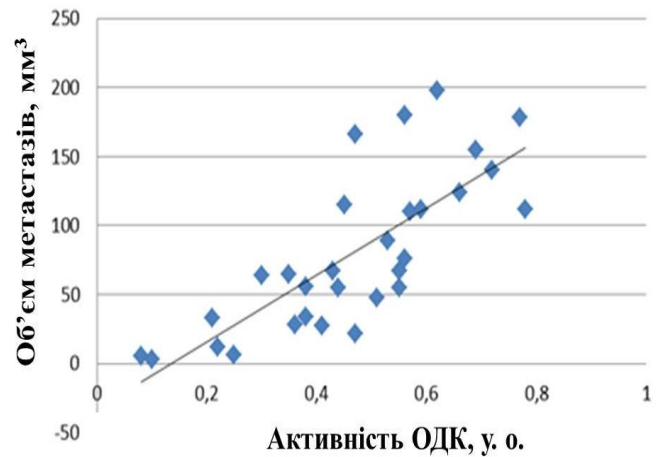


Рис. 6. Зв'язок між активністю ОДК у тканині КЛЛ та об'ємом метастазів за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,77$; $p<0,05$)

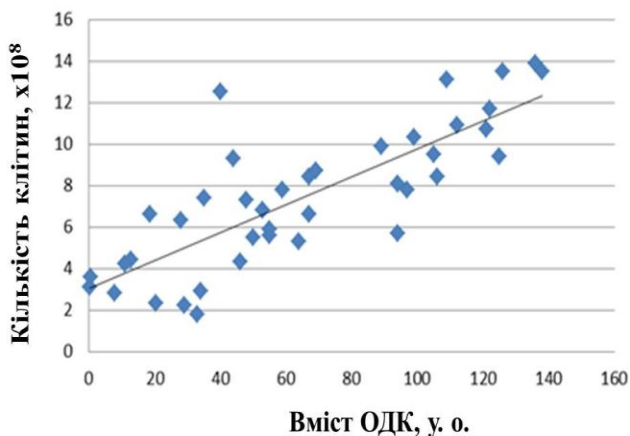


Рис. 7. Зв'язок між вмістом ОДК та кількістю клітин L1210 в асцитичній рідині за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,81$; $p<0,05$)

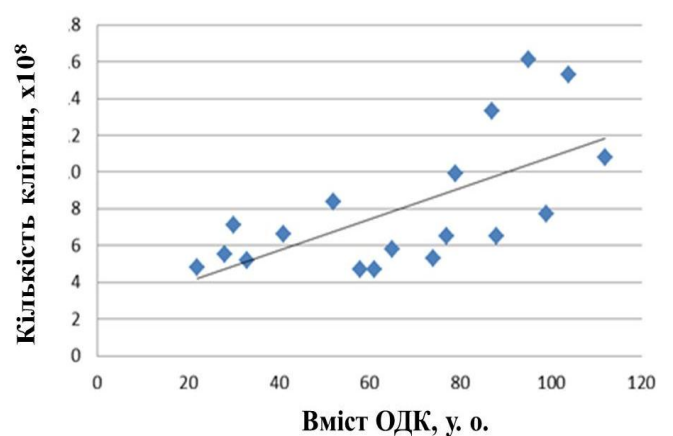


Рис. 8. Зв'язок між вмістом ОДК та кількістю клітин P388 в асцитичній рідині за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,65$; $p<0,05$)

Вміст білків, залучених до регуляції ОДК, у тканині солідних та асцитних перещеплюваних пухлин за умов дії інгібіторів ОДК. Наступний етап дослідження полягав у вивченні вмісту білків, які беруть участь у регуляції гена *odc1*, і активності РНКаз у тканині W-256 під впливом ПМГ та у клітинах лімфолейкозів L1210 і P388 при поєднаному застосуванні ДФМО та МГБГ (рис. 9-10).

Щодо ключових компонентів сигнального шляху NF-κB, встановлено, що зниження вмісту ОДК у клітинах W-256 під впливом ПМГ супроводжується зменшенням вмісту ключової субодиниці NF-κB, а саме p65 (на 36%), тоді як вміст p50 залишається незмінним. У клітинах L1210 за умов комбінованої дії ДФМО та МГБГ зниження вмісту ОДК асоційоване зі зменшенням вмісту p50 (на 63%) і p65 (на 33%). У клітинах L1210 за дії ДФМО та МГБГ також встановлено пригнічення

експресії білків, залучених до регуляції ОДК – с-Мус (на 67%) і антиапоптичного білка Bcl-xL (на 69%), а також зростання експресії p53 на 35% (рис. 9).

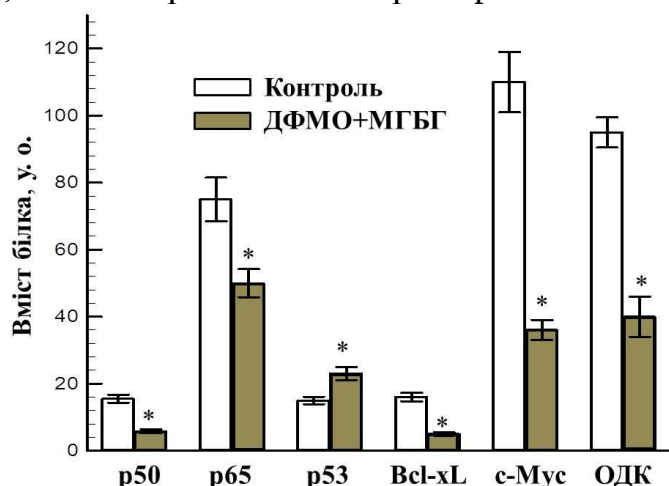


Рис. 9. Вміст ОДК та білків, залучених у регуляцію її функціонального стану, у клітинах L1210 за умов комбінованої дії ДФМО та МГБГ.

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Натомість, у клітинах P388 при поєднаному застосуванні ДФМО і МГБГ відмічено достовірне зростання вмісту білків комплексу NF- κ B (p50 – на 23%, p65 – на 86%) і p53 – на 51% та водночас зменшення вмісту с-Мус – на 13% і Bcl-xL – на 20% (рис. 10).

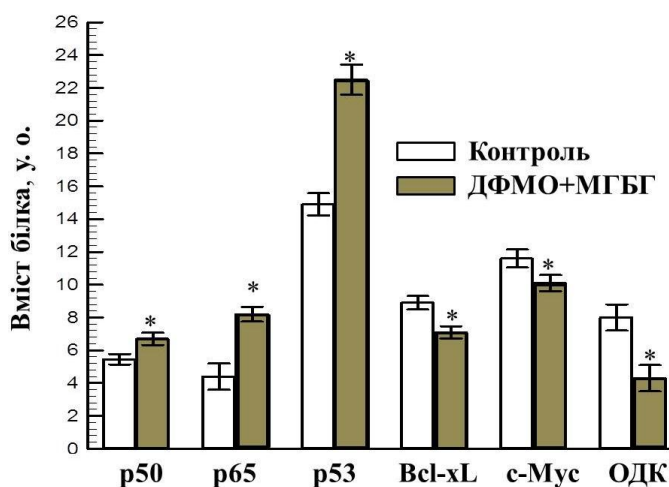


Рис. 10. Вміст ОДК та білків, залучених у регуляцію її функціонального стану, у клітинах P388 при поєднаному застосуванні ДФМО і МГБГ.

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

З огляду на роль РНКаз як ключових ферментів деградації мРНК, що опосередковують посттранскрипційну регуляцію мРНК гена *odc1* та інших генів-регуляторів ОДК, досліджено активність РНКаз у клітинах L1210 та P388 за комбінованої дії інгібіторів ОДК (ДФМО та МГБГ) (рис. 11). Встановлено, що після дії ДФМО із МГБГ у клітинах L1210 та P388 спостерігалось підвищення активності РНКаз на 40% ($212,5 \pm 20,7$ у. о.) та на 50% ($180,2 \pm 16,5$ у. о.), відповідно, відносно контролю ($p < 0,05$) (рис. 11).

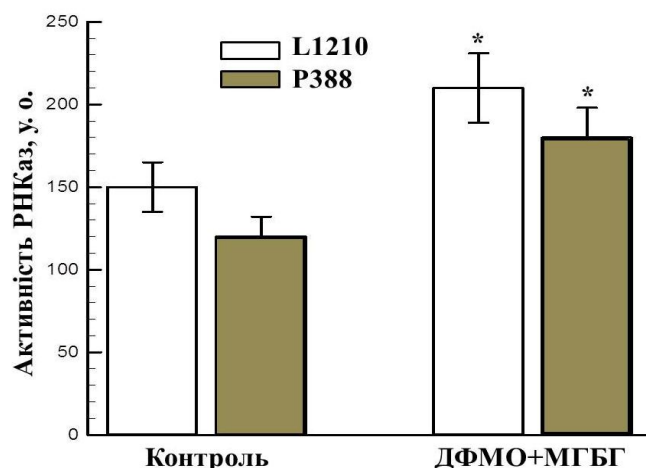


Рис. 11. Активність РНКаза у клітинах L1210 та P388 за умов комбінованої дії інгібіторів ОДК ДФМО та МГБГ.

Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

Статус метилювання генів, залучених до регуляції ОДК, у клітинах солідних та асцитних експериментальних пухлин після дії синтетичних інгібіторів ензиму. Проаналізовано зміни рівнів метилювання промоторних ділянок генів, залучених до регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox*, *amd1*) у клітинах КЛЛ, L1210 і P388 після дії інгібіторів ОДК (ДФМО, нораргінін, МГБГ) (рис. 12 – 15).

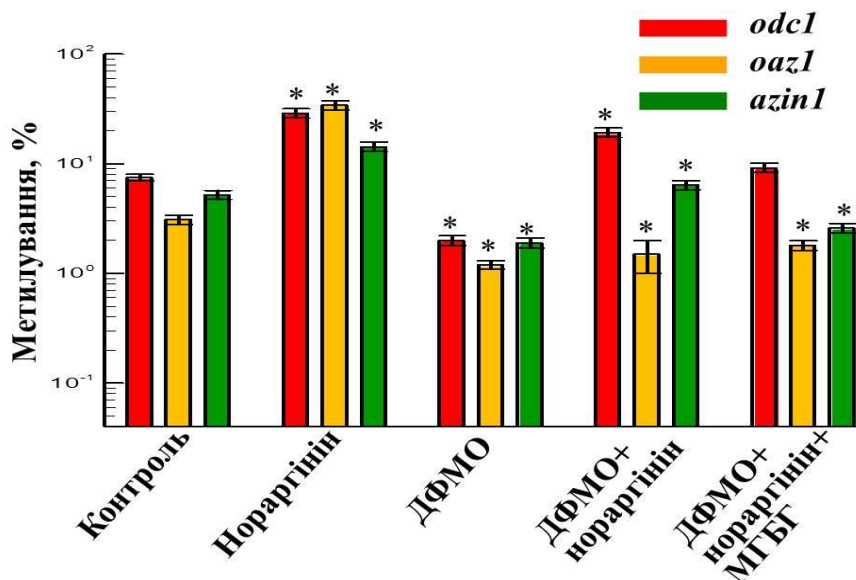


Рис. 12. Метилювання генів *odc1*, *oaz1*, *azin1* у клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК**.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** – результати представлені у логарифмічній шкалі

Показано, що при застосуванні нораргініну у клітинах КЛЛ рівні метилювання генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1* збільшуються порівняно з контрольними значеннями у 3,9, 11,2, 2,7 та 11,2 раза, відповідно ($p < 0,05$). При застосуванні ДФМО рівні метилювання гена *sat1* зростають у 6,2 раза у порівнянні з контролем, в той час як

поєднане використання ДФМО та нораргініну спричиняє зростання рівней метилювання генів *odc1* та *smox* відповідно у 2,5 та у 3,8 раза ($p < 0,05$) (рис. 12, 13).

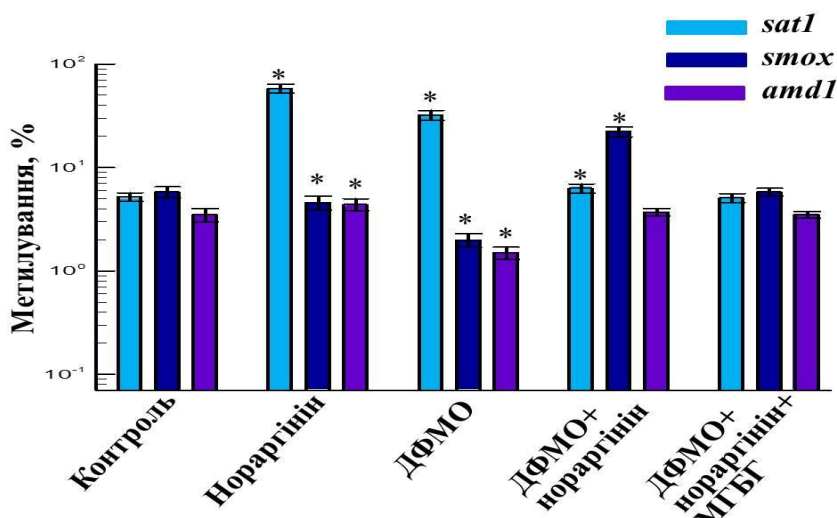


Рис. 13. Метилювання генів *sat1*, *smox*, *amd1* у клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК**.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** – результати представлені у логарифмічній шкалі

Отримані дані свідчать про те, що комбіноване застосування ДФМО, нораргініну та МГБГ на моделі КЛЛ переважно впливає на гени прямої регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*), що підтверджує доцільність комплексної терапії для зниження функціональної активності ферменту. Відсутність суттєвих змін метилювання *sat1*, *smox*, *amd1* після дії зазначеної комбінації інгібіторів ОДК вказує на те, що вони не залучені до деградації ПА та донорів метильних груп (рис. 13).

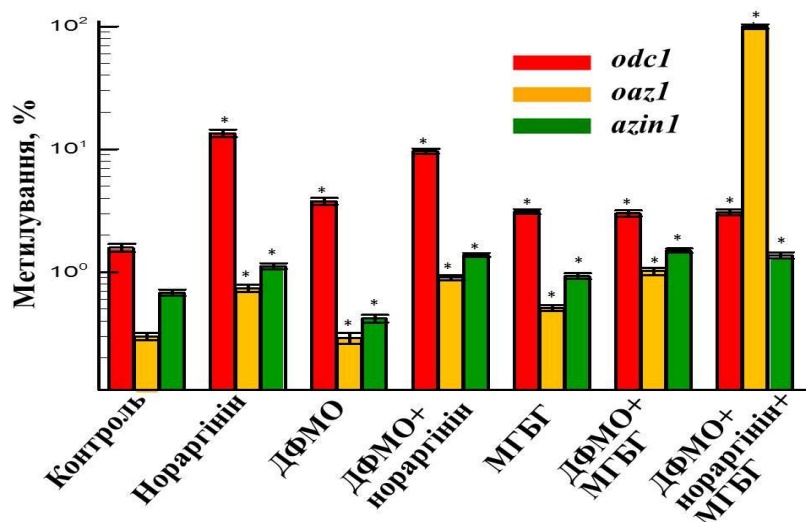


Рис. 14. Метилювання генів *odc1*, *oaz1*, *azin1* у клітинах L1210 за дії інгібіторів ОДК**.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** – результати представлені у логарифмічній шкалі

У клітинах L1210 після дії нораргініну спостерігали значно вищі порівняно з контролем рівні метилювання гена *odc1* (у 8,5 рази, $p < 0,05$) та *sat1* (у 4 рази, $p < 0,05$) (рис. 14-15).

Якщо у клітинах L1210 за дії ДФМО відмічено підвищення метилювання лише генів *odc1* (у 2,4 рази, $p < 0,05$) та *smox* (у 1,7 рази, $p < 0,05$) при одночасному зниженні метилювання *azin1* (у 1,6 рази, $p < 0,05$) та *sat1* (у 3,2 рази $p < 0,05$), то додавання нораргініну суттєво модифікувало цей епігенетичний профіль. Зокрема, за умов сумісного застосування ДФМО та нораргініну рівень метилювання гена *odc1* зріс у 6 разів порівняно з контролем, що більш ніж у 2,5 рази перевищує ефект ДФМО у монорежимі (рис. 14).

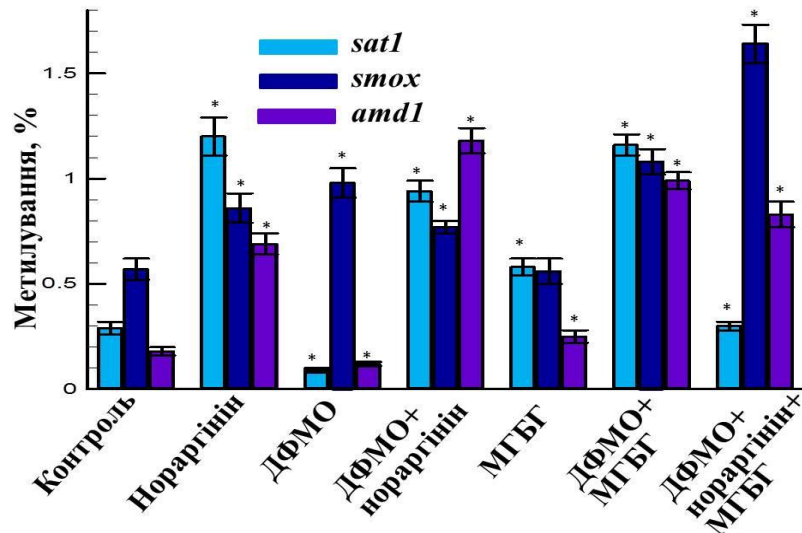


Рис. 15. Метилювання генів *sat1*, *smox*, *amd1* у клітинах L1210 за дії інгібіторів ОДК.

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Крім того, при комбінованому застосуванні ДФМО і нораргініну відмічено суттєве підвищення метилювання порівняно із контролем *oaz* (у 3 рази, $p < 0,05$), *azin1* (у 2 рази, $p < 0,05$) (рис. 14) та *sat1* (у 3,2 рази, $p < 0,05$), *amd1* (у 6,6 разів, $p < 0,05$) (рис. 15), що призводить до зниження синтезу ОДК та посилення її деградації (не блокується антизим OAZ1), а також обмеження компенсаторної реакції клітини, яка спрямована на підтримку рівноваги ПА за умов блокади гена *odc1* та блокування обхідного шляху активації обміну ПА. Отримані дані свідчать, що додавання нораргініну до ДФМО дозволяє підсилити метилювання ключових генів регуляції ОДК (*odc1*, *azin1*, *sat1*) та її непрямих модифікаторів (*amd1*), що потенційно забезпечує більш стійке та тривале зниження її функціональної активності.

Застосування МГБГ як самостійного засобу призводило до підвищення рівня метилювання *odc1* – у 2 рази, *oaz1* – у 1,7 рази, *azin1* – у 1,4 рази, *sat1* – у 2 рази та *amd1* – у 1,4 рази у клітинах L1210 порівняно з контролем ($p < 0,05$), що свідчить про часткову участь МГБГ в епігенетичній регуляції функціонального стану ОДК. За умов комбінованої дії ДФМО та МГБГ виявлено достовірне підвищення рівня метилюванням *odc1* – у 1,9 рази, *oaz1* – у 3,4 рази, *azin1* – у 2,2 рази (рис. 14), *sat1* – у 4 рази, *smox* – у 1,9 рази та *amd1* – у 5,5 рази (рис. 15) порівняно з контролем ($p < 0,05$), що асоціювалося з найвищою протипухлинною ефективністю, яка

проявлялася зменшенням кількості клітин L1210 (рис. 4). Додавання нораргінину до комплексу ДФМО та МГБГ призводило до суттєвих змін епігенетичного профілю досліджених генів, зокрема спостерігалось різке зростання ступеня метилювання *oaz* – у 333 рази, *odc1* та *azin1* – у 2 рази (рис. 14), *amd1* – у 4,6 рази та *smox* – у 2,9 рази на тлі відсутності достовірних змін у метилюванні *sat1* (рис. 15). Зазначені зміни метильованого статусу досліджених генів, ймовірно, сприяє зниженню протеасомної деградації ОДК через надмірне метилювання *oaz1* і, на тлі незмінного *sat1* та підвищеного метилювання *amd1*, послаблює обмеження пулу ПА. Це частково нівелює блокаду синтезу ОДК та пояснює менш виражений протипухлинний ефект щодо зниження кількості клітин L1210 у порівнянні з комбінованою дією ДФМО та МГБГ.

При дослідженні рівнів метилювання генів, що регулюють функціональний стан ОДК, у моделі лімфолейкозу P388 аналізували лише два гени – *odc1* та *oaz1* – за умов комбінованої дії ДФМО і МГБГ. Порівняно з контролем встановлено достовірне підвищення метилювання *odc1* та *oaz1* - відповідно у 2,5 та 2,3 рази. При порівнянні з моделлю L1210 за тих самих умов виявлено інший епігенетичний профіль, за якого співвідношення кратності метилювання *odc1/oaz1* становило приблизно 1,1 (2,5/2,3) для P388 та 0,56 (1,9/3,4) для L1210, що може вказувати на відмінності у механізмах регуляції.

У клітинах L1210 більш виражене метилювання *oaz1* знижує експресію білка OAZ, обмежує деградацію ОДК і частково компенсує пригнічення її синтезу, яке опосередковується метилюванням *odc1*. Натомість, у клітинах P388 спостерігається відносно збалансоване підвищення метилювання обох генів, що, ймовірно, дозволяє підтримувати вищу транскрипційну та функціональну активність ОДК. Саме ця збережена активність може зумовлювати більш агресивний перебіг пухлинного процесу у P388.

Отже, різниця у співвідношенні рівнів метилювання є ключовим показником чутливості клітин до інгібіторів. Клітини L1210 виявляють більшу схильність до зниження активності ОДК під впливом інгібіторів, тоді як P388 зберігає відносну резистентність.

Виявлено обернену залежність між рівнями вмісту ОДК та метилювання генів *odc1* та *oaz1* за умов сумісного застосування ДФМО та МГБГ для клітин L1210 ($r=-0,55$ та $r=-0,49$, відповідно, $p<0,05$) та P388 ($r=-0,41$ та $r=-0,37$, відповідно, $p<0,05$). При цьому, високі рівні метилювання промоторів *odc1* та *oaz1* співвідносяться не лише зі зниженням вмісту ОДК в клітинах L1210 і P388, а і з високим протипухлинним ефектом поєднано застосованих інгібіторів ДФМО та МГБГ ($p<0,05$). Тож застосування інгібіторів ОДК спричиняє значущі різноспрямовані епігенетичні зміни низки генів, що забезпечує пригнічення експресії та/або активності ОДК і стабілізацію обміну ПА.

Ідентифікація ключових епігенетичних факторів екзогенної регуляції ОДК у клітинах експериментальних пухлин з використанням багатофакторного аналізу.

Комплексний аналіз метилювання генів-регуляторів ОДК у поєднанні з оцінкою активності та вмісту ферменту та перебігу пухлинного процесу є ключовим для розуміння механізмів дії інгібіторів.

З метою виявлення таких епігенетичних змін, що відіграють ключову роль у модифікації функціонального стану досліджуваного ензиму, нами досліджено кореляційні зв'язки між рівнями метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1* та *amd1* – з одного боку, показниками функціонального стану ОДК у пухлинних клітинах і характеристиками перебігу КЛЛ і лімфолейкозу L1210 у мишей за поєднаного впливу інгібіторів ДФМО та нораргініну – з іншого. Вибір інгібіторів зумовлений високим протипухлинним ефектом і низькими рівнями активності і вмісту ОДК при їхньому застосуванні. У підсумку, виявлено низку статистично значущих залежностей різного напрямку та сили між рівнями метилування деяких із досліджуваних генів, а саме *odc1*, *smox*, *sat1* та активністю і вмістом ОДК у пухлинних клітинах і показниками прогресування КЛЛ та L1210 (табл. 2).

Таблиця 2

Кореляційний аналіз зв'язків між рівнями метилування генів та показниками функціонального стану ОДК, характеристиками перебігу пухлинного процесу за поєднаної дії ДФМО з нораргініном*

Ген	КЛЛ			L1210	
	Активність ОДК	Об'єм пухлини	Об'єм метастазів	Вміст ОДК	Кількість пухлинних клітин
<i>odc1</i>	-0,64*	-0,44*	-0,39*	-0,55*	-0,35*
<i>oaz1</i>	-0,29	-0,30	-0,28	-0,32	-0,27
<i>azin1</i>	-0,20	-0,31	-0,29	-0,31	-0,30
<i>sat1</i>	-0,53*	-0,23	-0,47*	-0,43*	-0,25
<i>smox</i>	-0,33*	-0,18	-0,31	-0,25	-0,31
<i>amd1</i>	-0,32	-0,21	-0,32	-0,28	-0,32

Примітка.* – коефіцієнт кореляції $p < 0,05$

Отримані результати дають лише часткове уявлення про вплив застосованих інгібіторів на означені показники, що є наслідком обмежень методу монофакторного кореляційного аналізу, який при визначенні зв'язку між двома змінними не враховує вплив інших факторів.

На відміну від цього, багатофакторний регресійний аналіз дозволяє виявити незалежні чинники, які визначають змінну величину (в нашому випадку це активність ОДК в клітинах КЛЛ, або вміст ОДК в клітинах L1210). Тож на основі результатів багатофакторного регресійного аналізу нами ідентифіковано гени, рівні метилування яких є незалежними епігенетичними чинниками, що у сукупності визначають характер модифікації функціонального стану ОДК та перебіг пухлинного процесу за дії інгібіторів ензиму.

Як видно з даних, наведених на рис. 16 та рис. 17, при поєднаному застосуванні ДФМО та нораргініну рівні метилування генів *odc1*, *smox* незалежно корелюють з рівнями активності ОДК у клітинах КЛЛ ($\beta = -0,41$, $p = 0,00016$; $\beta = -0,31$, $p = 0,004$, відповідно) (рис. 16, а), об'ємом пухлини ($\beta = -0,48$, $p = 0,002$; $\beta = -0,45$, $p = 0,013$, відповідно) (рис. 16, б) та метастазів ($\beta = -0,43$, $p = 0,0041$; $\beta = -0,42$, $p = 0,016$, відповідно) (рис. 16, в); гена *oaz1* з активністю ОДК у клітинах КЛЛ ($\beta =$

0,23, $p=0,0085$) (рис. 16, а); гена *odc1* – з вмістом ОДК у клітинах L1210 ($\beta = -0.52$; $p = 0.0008$) та генів *odc1* і *amd1* – з кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з лімфолейкозом L1210 ($\beta = -0,35$; $p = 0,017$; $\beta = -0,34$; $p = 0,019$, відповідно) (рис. 17).

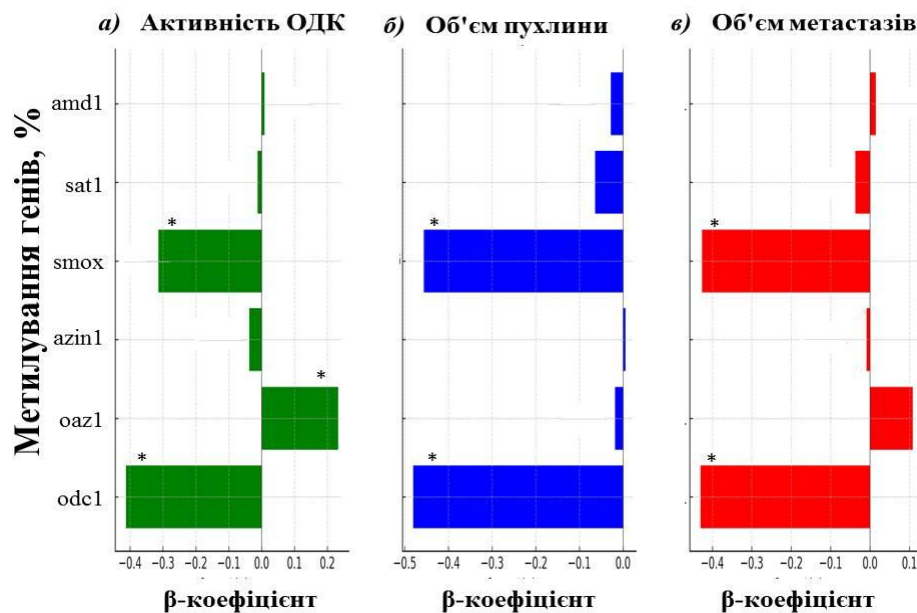


Рис. 16. Зв'язок між рівнем метилювання генів та активністю ОДК у клітинах КЛЛ, об'ємом пухлини та метастазів.

Примітка. * – $p < 0,05$

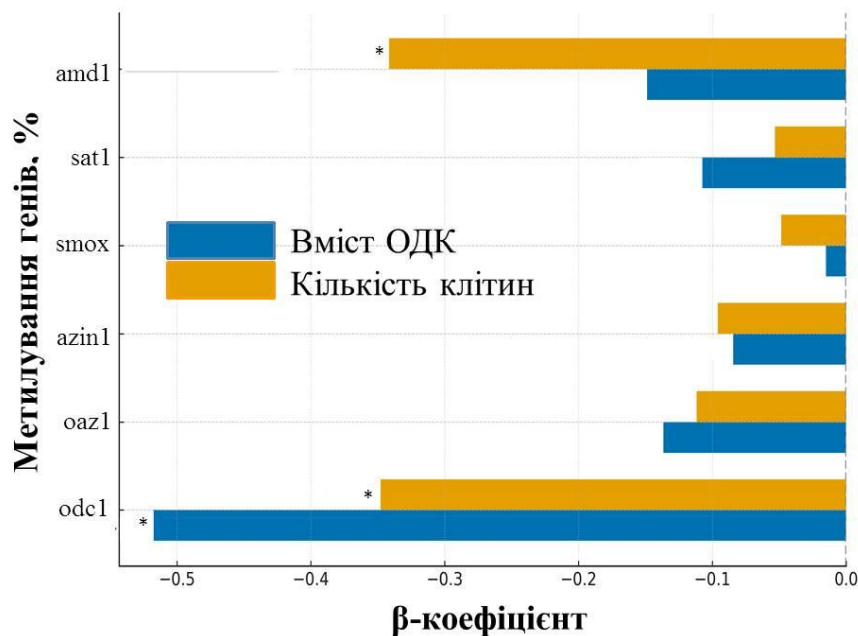


Рис. 17. Зв'язок між рівнем метилювання генів та вмістом ОДК і кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з лімфолейкозом L1210.

Примітка. * – $p < 0,05$

Отже, наведені дані свідчать, що статус метилування генів *odc1* та *smox* у клітинах КЛЛ і *odc1* та *amd1* в клітинах L1210 є ключовими епігенетичними факторами, що обумовлюють протипухлинний ефект інгібіторів ОДК внаслідок модифікації її функціонального стану.

ВИСНОВКИ

Молекулярно-біологічні дослідження механізмів регуляції ОДК при пухлинному рості набувають особливої актуальності в умовах пошуку нових ефективних мішеней для протипухлинної терапії. Одним із перспективних підходів є застосування синтетичних інгібіторів ОДК, дія яких реалізується не лише шляхом безпосереднього зниження активності та вмісту ензиму, але й завдяки епігенетичній модифікації експресії регуляторних генів і зміні рівнів експресії білків, залучених до контролю його функціонального стану. У даному дисертаційному дослідженні проаналізовано вплив синтетичних інгібіторів ОДК (ДФМО, нораргінін, МГБГ, ПМГ) на перебіг асцитних та солідних експериментальних пухлин різного гістогенезу з урахуванням активності та вмісту ензиму, експресії білків та метилування генів, задіяних у регуляції ОДК у пухлинних клітинах, та визначено ключові епігенетичні фактори модифікації функціонального стану ензиму, що опосередковують протипухлинний ефект застосованих сполук.

1. Визначено, що серед досліджених синтетичних інгібіторів ОДК - нораргініну, ДФМО, МГБГ та ПМГ, поєднана дія ДФМО та нораргініну призводить до найвищого зменшення рівня активності ензиму у тканині карциноми легені Льюїс та вмісту ензиму в клітинах лімфолейкозу L1210 відповідно у 3,7 та 10 разів порівняно з контролем ($p < 0,05$), тоді як при окремому їх застосуванні та інших комбінаціях лише у 2,2 – 3,25 раза ($p < 0,05$). Встановлено, що при дії ПМГ вміст ОДК у клітинах P388 та W-256 знижувався відповідно у 1,6 та 1,4 раза, тоді як за умов комбінованого впливу ДФМО та МГБГ у клітинах P388 спостерігалось зменшення вмісту ензиму у 2 рази порівняно з контролем.
2. Показано, що сумісне застосування інгібіторів ОДК достовірно підвищує їх протипухлинну активність. Комбіноване введення як ДФМО з нораргініном, так і ДФМО, нораргініну та МГБГ призводить до найбільшого гальмування росту КЛЛ на 26-й день спостереження порівняно з їх застосуванням у монорежимі. Спостереження на 15-у та 20-у добу зафіксувало достовірно вищий протипухлинний ефект за умов сумісного застосування ДФМО та нораргініну порівняно з комбінацією ДФМО, нораргініну та МГБГ, що свідчить про стабільну протипухлинну дію ДФМО з нораргініном, яка асоційована з високоефективним зниженням активності ОДК у тканині КЛЛ. При застосуванні ДФМО окремо, а також у комбінації з нораргініном і з нораргініном та МГБГ, спостерігається значне зменшення об'єму метастазів (у 16,3, 13,5 та 21,9 раза відповідно), натомість жоден із інгібіторів, застосованих як окремо, так і в комбінаціях, не вплинув на кількість метастазів у мишей з КЛЛ. Найбільше пригнічення росту L1210 спостерігалось при сумісному застосуванні ДФМО із МГБГ (у 2,3 раза) та дещо менше при застосуванні одного лише ДФМО та при комбінації ДФМО з нораргініном (у 1,8 та 2 рази відповідно). При цьому, при

сумісному застосуванні ДФМО та МГБГ кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з Р388 достовірно зменшувалася лише у 1,3 раза. Під впливом ПМГ маса пухлини W-256 знижувалася у 2 рази, а кількість клітин Р388 – у 1,2 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$). Показано, що за дії синтетичних інгібіторів ензиму об'єм пухлини та метастазів КЛЛ позитивно корелює з активністю ОДК (відповідно $r = 0,76$ та $r = 0,77$; $p < 0,05$); об'єм пухлини W-256 – з вмістом ОДК в клітинах ($r = 0,82$; $p < 0,05$), кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей – з вмістом ОДК в клітинах L1210 і Р388 (відповідно $r = 0,81$ та $r = 0,65$; $p < 0,05$). Отримані результати свідчать, що високий протипухлинний ефект застосованих інгібіторів ОДК реалізується через механізми блокування як синтезу, так і активації ензиму.

3. Встановлено що за умов комбінованої дії ДФМО та МГБГ зниження вмісту ОДК у клітинах L1210 та Р388 супроводжується достовірним пригніченням експресії Bcl-xL (на 69% та 20% відповідно), c-Myc (на 67% та 13% відповідно), зростанням експресії p53 (на 35% та 51% відповідно). Водночас, відмічені протилежні зміни у вмісті ключових субодиниць NF- κ B – p50 та p65: у клітинах L1210 при зниженні вмісту ОДК зафіксовано зменшення експресії p50 на 63% та p65 на 33%, тоді як в клітинах Р388 - зростання вмісту p50 на 23%, а p65 – на 86%. У клітинах W-256 ПМГ обумовлює зниження вмісту ОДК поряд зі зменшенням експресії p65 (на 36%) та відсутністю змін у вмісті p50.
4. Виявлено як спільні для деяких інгібіторів особливості метилування генів-регуляторів ОДК, так і відмінності в епігенетичних механізмах реалізації їхньої дії. У клітинах КЛЛ визначено зростання рівнів метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1* (у 2,7 - 11,2 раза) при застосуванні нораргініну; гена *sat1* – у 6,2 раза при застосуванні ДФМО; генів *odc1* та *smox* – відповідно у 2,5 та у 3,8 раза при поєднаній дії ДФМО та нораргініну ($p < 0,05$). Встановлено, що у клітинах L1210 комбіноване застосування інгібіторів ОДК та у монорежимі по-різному модифікує метилування генів-регуляторів ензиму. Якщо під впливом ДФМО метилування *odc1* підвищується у 2,4 раза, то додавання нораргініну до ДФМО спричиняє не лише найбільш виражене підвищення метилування гена *odc1* у 6 разів порівняно з контролем ($p < 0,05$), а й достовірне зростання метилування *azin1* та *amd1*. Виявлено обернену залежність між рівнями вмісту ОДК та метилування генів *odc1* та *oaz1* за комбінованої дії ДФМО та МГБГ у клітинах L1210 ($r = -0,55$ та $r = -0,49$, відповідно ($p < 0,05$)) та у клітинах Р388 ($r = -0,41$ та $r = -0,37$, відповідно ($p < 0,05$)).
5. З'ясовано значення низки епігенетичних чинників у забезпеченні функціональної активності ОДК та протипухлинній дії за поєданого впливу ДФМО та нораргініну. Рівень метилування гена *odc1* обернено корелює з рівнями активності ОДК в пухлині, об'ємом пухлини та метастазів у мишей з КЛЛ (відповідно $r = -0,64$, $r = -0,44$, $r = -0,39$; $p < 0,05$) та з вмістом ОДК в пухлинних клітинах і кількістю клітин в асцитній рідині мишей з L1210 (відповідно $r = -0,55$, $r = -0,35$; $p < 0,05$). Встановлено обернений кореляційний зв'язок між рівнем метилування гена *sat1* і рівнем активності ОДК в пухлині та об'ємом метастазів у мишей з КЛЛ (відповідно $r = -0,53$, $r = -0,47$; $p < 0,05$) та з вмістом ОДК у клітинах

L1210 ($r=-0,43$; $p<0,05$). Рівень метилювання гена *smox* обернено корелює з активністю ОДК у тканині КЛЛ ($r=-0,33$; $p<0,05$).

6. На основі результатів багатофакторного регресійного аналізу доведено, що рівні метилювання генів *odc1* та *smox* у клітинах КЛЛ і *odc1* та *amd1* у клітинах L1210 є ключовими епігенетичними факторами, що впливають на модифікацію функціонального стану ОДК і, як наслідок, обумовлюють протипухлинний ефект інгібіторів ОДК. За умов сумісного застосуванняДФМО та нораргініну рівні метилювання генів *odc1*, *smox* незалежно корелюють з рівнями активності ОДК у клітинах КЛЛ ($\beta = -0,41$, $p=0,00016$; $\beta = -0,31$, $p=0,004$, відповідно), об'ємом пухлини ($\beta = -0,48$, $p = 0,002$; $\beta = -0,45$, $p = 0,013$, відповідно) та метастазів ($\beta = -0,43$, $p = 0,0041$; $\beta = -0,42$, $p = 0,016$, відповідно); гена *oaz1* з активністю ОДК у клітинах КЛЛ ($\beta = 0,23$, $p=0,0085$); гена *odc1* – з вмістом ОДК у клітинах L1210 ($\beta = -0,52$; $p = 0,0008$) та генів *odc1* і *amd1* – з кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з лімфолейкозом L1210 ($\beta = -0,35$; $p = 0,017$; $\beta = -0,34$; $p = 0,0190$, відповідно).

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Самойленко, О. А., Ганусевич, І. І. Епігенетичні механізми регуляції орнітиндекарбоксилази при лейкемії. Онкологія. 2025. Том. 27. № 1. С. 62–66. (Дисертантом проведено дослідження вмісту білка с-Мус, рівень метилювання генів *odc1* та *oaz1*, аналіз та обробку отриманих даних, аналіз літературних джерел за темою дослідження, написання та оформлення статті). DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.062>

2. Samoilenko, O. A., Milinevska, O. A., Karnaushenko, O. V, Shlyakhovenko, V. A., Zaletok, S. P. Effect of polyamine metabolism inhibitors on Lewis lung carcinoma growth and metastasis. Experimental Oncology. 2015. Vol. 37. No. 2. P. 151–153. (Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті). Doi: <https://nasplib.isoftware.kiev.ua/handle/123456789/145472>

3. Shlyakhovenko, V., Samoilenko, O. Photopolymerization with EDTA and Riboflavin for Proteins Analysis in Polyacrylamide Gel Electrophoresis. The Protein Journal. 2022. Vol. 41. No. 4. P. 438–443. (Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10930-022-10068-3>

4. Zaletok, S., Gulua, L., Wicker, L., Shlyakhovenko, V., Gogol, S., Orlovsky, O., Karnaushenko, O., Verbinenko, A., Milinevska, V., Samoilenko, O., Todor, I., Turmanidze, T. Green tea, red wine and lemon extracts reduce experimental tumor growth and cancer drug toxicity. Experimental Oncology. 2015. Vol. 37. No. 4. P. 262–271. (Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, участь у підготовці статті до друку).

Doi: <https://nasplib.isoftware.kiev.ua/handle/123456789/145472>

5. Samoilenko, O., Zaletok, S., Orlovskiy, O., Gogol, S. Additive antitumor effect

of plant polyphenols and synthetic inhibitors of polyamines biosynthesis. *Experimental Oncology*. 2011. Vol. 33. No. 3. P. 186–189. Doi: <http://dspace.nbuv.gov.ua/bitstream/handle/123456789/138637/10-Samoylenko.pdf?sequence=1>.

6. Samoylenko, O. A., Alexandrova, N. O., Ushenin, Yu. V., Zaletok, S. P. Development of a method to immobilize DNA on the «Biosuplar-5» SPR-spectrometer sensory chip for the study of polyamines effect on functional activity of transcription factors and expression of oncogenes dependent on them. *Український Медичний Альманах*. 2008. Vol. 11. No. 3. P. 25–35. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*.

7. Самойленко, О. А., Орловський, О. А., Кленов, О. О., Міліневська, В. О., Карнаушенко, О. В., Вербиненко, А. В., Шляховенко, В. О., Залеток, С. П. Роль метилування генів ферментів метаболізму поліамінів в забезпеченні тривалості протипухлинної дії α -дифторметилорнітину. *Збірник «Актуальні Проблеми Розвитку Світової Науки»*. 2017. Т. 1. С. 9–16. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, участь у підготовці статті до друку)*.

8. Залеток, С. П., Самойленко, О. А., Орловський, О. А., Міліневська, В. О., Кленов, О. О., Карнаушенко, О. В., Вербиненко, А. В., Шляховенко, В. О. Вплив нораргініну (nor-Noha) на рівень метилування генів, пов'язаних з метаболізмом поліамінів, і швидкість росту карциноми легені Lewis. *Збірник «Актуальні проблеми розвитку світової науки»*. 2017. Т. 1. С. 16–23. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, участь у підготовці статті до друку)*.

9. Патент 45097 України на корисну модель МПК А61Р 43/00. Спосіб лікування злоякісних пухлин / С.П. Залеток, О.А. Самойленко, О.А. Орловський, О.О. Кленов, С.В. Гоголь, І.В. Малицька, В.В. Жиленко; заявник і патентовласник Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України; заявл. 25.05.2009; опубл. 26.10.2009. Бюл. № 20. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, участь у підготовці матеріалу для патентування)*.

10. Zaletok, S., Samoylenko, O., Orlovsky, O., Gogol, S., Klenov, O., Shapochka, D., Gulua, L. Effect of plant polyphenols on experimental tumor growth. International conference «Tumor and host: novel aspects of old problem», Kiev, September 21-24 2010. *Experimental Oncology*. 2010. V. 32. Supplement.

11. Samoylenko, O., Zaletok, S., Orlovskiy, O., Gogol, S. Additive antitumor effect of plant polyphenols and synthetic inhibitors of polyamines biosynthesis. The first Ukrainian-Swedish Workshop «New approaches in diagnostics and treatment of cancer», Київ, 13-14 червня 2011. *Experimental Oncology*. 2011. Vl. 33(3). P. 186–189

12. S. Zaletok, O. Samoylenko, L. Gulua, O. Orlovsky, S. Gogol, V. Milinevska, A. Verbinenko and O. Karnaushenko. Influence of nano green tea extract and nano composite of green tea extract and red wine lees on the growth of experimental tumors in animals. Thesis of Int. Conf. Exhib. Nutr. Sci. Ther. USA, Hilt. Philadelphia Cent.

City, 27-29 August, 2012. J Nutr Food. 2012. V. 2. P. 24.

13. Samoylenko, O., Zaletok, S., Zhuravel, O., Gogol, S. and Gulua, L. Molecular mechanisms of antitumor action of nano green tea extract and nanocomposite of green tea extract and red wine lees. Thesis of Int. Conf. Exhib. Nutr. Sci. Ther. USA, Hilt. Philadelphia Cent. City, 27-29 August, 2012. J Nutr Food. 2012. V. 2. P. 25.

14. Самойленко, Е., Залеток, С., Гоголь, С., Орловский, А., Ушенин, Ю., Бекетов, Г., Самойлов, А., Христосенко, Р., Дорожинский, Г., Гулуа, Л. Определение содержания белков фактора транскрипции NF-κB и продуктов зависимых от него генов в экстрактах клеток животных с помощью поверхностного плазмонного резонанса. 5-та Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-5), Одеса, 4-8 червня 2012 р. Матеріали з'їзду. 2012. С. 199.

15. Залеток, С., Гулуа, Л., Шляховенко, В., Орловский, А., Гоголь, С., Самойленко, Е., Кленов, О., Карнаушенко, Е., Вербиненко, А., Милиневская, В., Жиленко, В. Влияние наноэкстрактов зеленого чая и красного винограда на рост перевивных опухолей у экспериментальных животных. VII з'їзд онкологів і радіологів країн СНД, Астана, 5-7 вересня 2012 р. Матеріали з'їзду. 2012. С. 496.

16. Zaletok, S.P., Samoylenko, O.A., Zhuravel, O.V., Orlovsky, O.A. Effect of synthetic inhibitors of polyamine synthesis and plant polyphenols on the development of lymphocytic leukemia L1210 in mice, global methylation of DNA, methylation of ODC gene and polyamines contents in tumor cells. Thesis of International Congress on «Polyamines: Biological and Clinical Perspectives», Istanbul, 2-7 September 2012. Abstract Book. 2012. P. 239-241.

17. Zaletok, S., Samoylenko, O., Zhuravel, O., Gulua, L., Chekhun, V. Anticancer effect of green tea nanoextract is associated with modifications in methylation of genes involved in proliferation and apoptosis. Thesis of 11th Int. Symp. (TAT 2013), Paris, 4–6 March 2013. Ann Oncol. 2013. V. 24. P. i25.

АНОТАЦІЯ

Самойленко О.А. Молекулярно-біологічні механізми модифікації функціонального стану орнітиндекарбоксилази при пухлинному процесі. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2025.

У дисертаційній роботі на основі результатів комплексних експериментальних досліджень *in vivo* визначено молекулярно-біологічні особливості регуляції функціонального стану орнітиндекарбоксилази (ОДК) при пухлинному рості за впливу синтетичних інгібіторів ензиму (α-дифторметилорнітин (ДФМО), нораргінін, метилгліоксаль-біс-гуанілгідразон (МГБГ), полігексаметилenguанідин (ПМГ)). Встановлено, що протипухлинна дія цих сполук реалізується через зниження активності та вмісту ОДК у пухлинних клітинах, що супроводжується гальмуванням росту пухлини, зменшенням метастазування або зниженням кількості пухлинних клітин в асциті.

Уперше встановлено, що протипухлинна дія синтетичних інгібіторів ОДК реалізується через гіперметилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1* та *amd1*,

зниження активності або вмісту ОДК у пухлинних клітинах карциносаркоми Уокер (W-256), карциноми легені Льюїс (КЛЛ), лімфолейкозів L1210 і P388, зміні рівня експресії білків p50, p65, с-Мус, Bcl-xL, p53, а також активації РНКаз як фактора супресії трансляції ОДК. Показано, що поєднане застосування ДФМО та нораргініну зумовлює найвираженіше зниження активності ОДК – до 27 % від контрольного рівня – та досягає найвищого протипухлинного ефекту в моделі КЛЛ, що представлено у пригніченні росту пухлини на 50 % і значне зменшення об'єму метастазів. У моделі L1210 ця комбінація спричиняла зменшення вмісту ОДК у 10 разів і зниження кількості пухлинних клітин на 49 %. На відміну від цього, у моделі P388 зафіксовано нижчу чутливість до інгібіторів, що супроводжувалося збереженням високих рівнів експресії білків NF-κB (p50/p65) та зниженням вмісту с-Мус і Bcl-xL.

Виявлено тісні обернені зв'язки між рівнями метилування ключових генів-регуляторів (*odc1*, *sat1*, *smox*) та активністю/вмістом ОДК у пухлинних клітинах, а також показниками пухлинної прогресії – об'ємом пухлини, кількістю пухлинних клітин і метастазів. Багатофакторний регресійний аналіз уперше засвідчив, що рівні метилування генів *odc1*, *smox* і *amd1* є незалежними предикторами функціонального стану ОДК.

При комбінованій дії ДФМО та нораргініну виявлено пригнічення активності ОДК за рахунок одночасного впливу на метаболізм ПА і епігенетичну регуляцію, перевершуючи за ефективністю інші комбінації досліджених інгібіторів.

Отримані результати мають важливе практичне значення для розробки нових протипухлинних стратегій, спрямованих на модифікацію функціонального стану ОДК. Виявлені гени-регулятори метилування можуть бути використані як предиктори чутливості до терапії та мішені для молекулярно-спрямованих втручань.

Ключові слова: орнітиндекарбоксилаза (ОДК), метилування генів, інгібітори ОДК, с-Мус, фактор транскрипції NF-κB, карцинома легені Льюїс, лімфолейкоз L1210, P388, ДФМО, нораргінін.

SUMMARY

Samoylenko O.A. Molecular and biological mechanisms of the modification of ornithine decarboxylase functional state during tumor progression. – Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences in the specialty 14.01.07 – Oncology – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is devoted to elucidating the molecular-biological features of the regulation of the functional state of ornithine decarboxylase (ODC) during tumor growth under the influence of synthetic enzyme inhibitors.

This study analyzes the effects of synthetic ODC inhibitors (DFMO, norarginine, MGBG, PMG) on the progression of ascitic and solid experimental tumors of different histogenesis, taking into account ODC activity and content, the expression of regulatory proteins, and the methylation of genes involved in ODC regulation in tumor cells. Key epigenetic factors responsible for modification of the enzyme's functional state that mediate the antitumor effect of the applied compounds were identified.

Among the tested synthetic ODC inhibitors – norarginine, DFMO, MGBG, and PMG – the combined action of DFMO and nor-arginine produced the greatest decrease in enzyme activity in Lewis lung carcinoma tissue and in enzyme content in L1210 leukemia cells, lowering these parameters by 3.7-fold and 10-fold, respectively, compared with control ($p<0.05$), whereas single administration or other combinations reduced them only 2.2–3.25-fold ($p<0.05$). Under the action of PMG, ODC content in P388 and W-256 cells decreased 1.6-fold and 1.4-fold, respectively, while combined DFMO and MGBG treatment in P388 cells resulted in a twofold decrease compared with control.

It was shown that combined application of ODC inhibitors significantly enhances their antitumor activity. Co-administration of DFMO with norarginine, as well as the triple combination of DFMO, norarginine, and MGBG, led to the greatest inhibition of Lewis lung carcinoma growth on day 26 of observation compared with monotherapy. Observations on days 15 and 20 revealed a significantly stronger antitumor effect of the DFMO + norarginine combination than of the DFMO + norarginine + MGBG combination, indicating a stable antitumor action of DFMO with norarginine associated with highly effective suppression of ODC activity in Lewis carcinoma tissue. Administration of DFMO alone, as well as in combination with norarginine or with nor-arginine and MGBG, resulted in a marked decrease in metastatic volume (by 16.3-, 13.5-, and 21.9-fold, respectively), whereas none of the inhibitors, whether alone or in combinations, affected the number of metastases in mice with Lewis carcinoma. The greatest inhibition of L1210 growth was observed with the combined application of DFMO and MGBG (2.3-fold), with slightly less effect from DFMO monotherapy or the DFMO + norarginine combination (1.8- and 2-fold, respectively). In mice with P388 leukemia, DFMO + MGBG treatment reduced the number of tumor cells in the ascitic fluid by 1.3-fold. Under PMG treatment, W-256 tumor mass decreased twofold and the number of P388 cells by 1.2-fold compared with control ($p<0.05$).

Correlation analysis demonstrated that, under the action of synthetic ODC inhibitors, tumor and metastasis volumes of Lewis carcinoma positively correlate with ODC activity ($r = 0.76$ and $r = 0.77$, $p<0.05$); W-256 tumor volume correlates with ODC content in cells ($r = 0.82$, $p<0.05$); and the number of tumor cells in the ascitic fluid correlates with ODC content in L1210 and P388 cells ($r = 0.81$ and $r = 0.65$, $p<0.05$). These findings indicate that the high antitumor effect of the applied ODC inhibitors is realized through mechanisms that block both the synthesis and activation of the enzyme.

When W-256 cells are exposed to PMG, the decrease in ODC content is accompanied by a reduction in the key subunit of NF- κ B, specifically p65 (by 36%), while the content of p50 remains unchanged. In L1210 cells, the combined action of DFMO and MGBG leads to a decrease in ODC content, which is associated with a reduction in p50 (by 63%) and p65 (by 33%). Additionally, in L1210 cells treated with DFMO and MGBG, the expression of proteins involved in ODC regulation was suppressed, including c-Myc (by 67%) and the anti-apoptotic protein Bcl-xL (by 69%), while the expression of p53 increased by 35%.

Both common and distinct patterns of methylation of ODC-regulatory genes were revealed for different inhibitors. In Lewis carcinoma cells, norarginine increased methylation of *odc1*, *oaz1*, *azin1*, and *sat1* genes 2.7- to 11.2-fold; DFMO increased *sat1* methylation 6.2-fold; and combined DFMO + norarginine increased *odc1* and *smox*

methylation 2.5- and 3.8-fold, respectively ($p < 0.05$). In L1210 cells, the inhibitors and their combinations differentially modified methylation of ODC-regulatory genes: DFMO alone increased *odc1* methylation 2.4-fold, whereas addition of norarginine to DFMO produced the most pronounced effect, raising *odc1* methylation sixfold ($p < 0.05$) along with significant increases in *azin1* and *amd1* methylation. An inverse relationship was observed between ODC content and methylation of *odc1* and *oaz1* under DFMO + MGBG treatment in L1210 cells ($r = -0.55$ and $r = -0.49$; $p < 0.05$) and in P388 cells ($r = -0.41$ and $r = -0.37$; $p < 0.05$).

The level of *odc1* methylation inversely correlated with ODC activity in tumor tissue, tumor volume, and metastasis volume in Lewis carcinoma ($r = -0.64$, $r = -0.44$, $r = -0.39$; $p < 0.05$) and with ODC content and tumor cell number in ascitic fluid of L1210 leukemia ($r = -0.55$ and $r = -0.35$; $p < 0.05$). *Sat1* methylation inversely correlated with ODC activity in tumor tissue and metastasis volume in Lewis carcinoma ($r = -0.53$ and $r = -0.47$; $p < 0.05$) and with ODC content in L1210 cells ($r = -0.43$; $p < 0.05$). *Smox* methylation inversely correlated with ODC activity in Lewis carcinoma tissue ($r = -0.33$; $p < 0.05$).

Multifactor regression analysis demonstrated that methylation levels of *odc1* and *smox* in Lewis carcinoma and *odc1* and *amd1* in L1210 cells are key epigenetic factors that influence the modification of ODC functional status and, consequently, determine the antitumor effect of ODC inhibitors. Under combined DFMO and norarginine treatment, methylation of *odc1*, *smox* genes independently correlated with ODC activity in LLC cells ($\beta = -0.41$, $p = 0.00016$; $\beta = -0.31$, $p = 0.004$, respectively), with tumor volume ($\beta = -0.48$, $p = 0.002$; $\beta = -0.45$, $p = 0.013$, respectively), and with metastasis volume ($\beta = -0.43$, $p = 0.0041$; $\beta = -0.42$, $p = 0.016$, respectively); methylation of the *oaz1* gene correlated with ODC activity in LLC cells ($\beta = 0.23$, $p = 0.0085$); *odc1* methylation correlated with ODC content in L1210 cells ($\beta = -0.52$; $p = 0.0008$), and methylation of *odc1* and *amd1* correlated with tumor cell number in ascitic fluid of L1210 leukemia ($\beta = -0.35$; $p = 0.017$; $\beta = -0.34$; $p = 0.019$, respectively).

The obtained results emphasize the importance of combined ODC inhibition for achieving sustained enzyme blockade through transcriptional, post-translational, and epigenetic mechanisms. These data provide a molecular basis for the rational development of combined targeted therapeutic approaches aimed at enhancing antitumor efficacy and reducing the risk of adaptive resistance.

Key words: ornithine decarboxylase (ODC), gene methylation, ODC inhibitors, c-Myc, NF- κ B transcription factor, Lewis carcinoma, L1210 leukemia, DFMO, norarginine.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ПА	поліаміни
AZIN1	інгібітор антизиму
OAZ1	антизим
S-АМДК	S-аденозилметионіндекарбоксилаза
ДФМО	α -дифторметилорнітин
КЛЛ	карцинома легені Льюїс
МГБГ	метилгліоксаль-біс-гуанілгідрозон
ОДК	орнітиндекарбоксилаза
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПМГ	полігексаметиленгуанідин
ППР	поверхнево плазмонний резонанс
S-АМДК	S-аденозилметионіндекарбоксилаза
ДФМО	α -дифторметилорнітин