

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

Національна академія наук України

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

Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

САМОЙЛЕНКО ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА

УДК: 616-006.04:577.218:616-085

ДИСЕРТАЦІЯ

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА МОДИФІКАЦІЯ
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ ПРИ
ПУХЛИННОМУ ПРОЦЕСІ**

14. 01. 07 – онкологія

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.А. Самойленко

Науковий керівник Ганусевич Ірина Іванівна, доктор біологічних наук.

Київ – 2025

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.

Прогресія пухлини є складним багатофакторним процесом, у якому ключову роль відіграють молекулярно-біохімічні зміни, що сприяють проліферації, інвазії та метастазуванню. Одним із важливих регуляторів цих процесів є орнітиндекарбоксилаза (ОДК) – фермент, що каталізує перший етап біосинтезу поліамінів (ПА). Відомо, що проліферація як нормальних, так і злоякісно трансформованих клітин, неможлива за відсутності або недостатності певної кількості ПА. Тож підвищена активність ОДК асоційована з посиленою проліферацією пухлинних клітин, ангіогенезом і зниженням ефективності традиційної хіміотерапії. З огляду на важливу роль ОДК у регуляції пухлинного росту, сучасні можливості застосування екзогенних чинників, задіяних у регуляції активності ОДК, відкривають перспективи для мішеней-спрямованого впливу на перебіг пухлинної хвороби.

В рамках сучасних підходів у лікуванні онкологічних хворих активно вивчаються сполуки, здатні пригнічувати активність ОДК – як прямі так і непрямі інгібітори, що впливають на епігенетичну регуляцію та сигнальні шляхи. Однак, як показали подальші дослідження, їх дія має тимчасовий характер. Після припинення лікування відбувається відновлення проліферативної активності пухлинних клітин, що свідчить про наявність адаптивних або компенсаторних механізмів, які дозволяють клітинам обходити блокування поліамінового синтезу – зокрема шляхом активації транспорту ПА або зміни метаболічного профілю клітини. Тому критично важливим є вивчення механізмів, які лежать в основі тимчасового

пригнічення проліферації, щоб забезпечити стійкий протипухлинний вплив, спрямований на модифікацію функціонального стану ОДК. Проте молекулярні механізми модифікації функціонального стану ОДК у пухлинних клітинах на сьогодні залишаються вивченими фрагментарно. Зокрема, недостатньо охарактеризовані епігенетичні та сигнальні чинники, які впливають на експресію гена *odc1*, його транскрипційну активацію або пригнічення. Розуміння механізмів молекулярно-біологічної модифікації функціонального стану ОДК при пухлинному процесі дозволить ідентифікувати ключові вузли регуляції обміну ПА, що створить теоретичне підґрунтя для визначення предикторів ефективності терапії інгібіторами ОДК.

Дисертаційна робота присвячена визначенню молекулярно-біологічним особливостям регуляції функціонального стану ОДК при пухлинному рості за впливу синтетичних інгібіторів ензиму.

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.

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 разу ($p < 0,05$). Встановлено, що при дії ПМГ вміст ОДК у клітинах P388 та W-256 знижувався відповідно у 1,6 та 1,4 разу, тоді як за умов комбінованого

впливу ДФМО та МГБГ у клітинах P388 спостерігалось зменшення вмісту ензиму у 2 рази порівняно з контролем.

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 достовірне зменшення об'єму метастазів (у 16, 14 та 22 рази відповідно). Натомість жоден з 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 та МГБГ (у 2,3 разу) та дещо менше при застосуванні одного лише ДФМО та 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 P388 достовірно зменшувалася лише у 1,3 разу. Під впливом ПМГ маса пухлини W-256 знижувалася у 2 рази, а кількість клітин P388 – у 1,2 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$). 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 $r=0,77$; $p < 0,05$); кількість пухлинних клітин в асцитній рідині – з вмістом ОДК в клітинах W-256, L1210 і P388 (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.

Встановлено, що зниження вмісту ОДК у клітинах W-256 під впливом ПМГ супроводжується зменшенням вмісту ключової субодиниці NF- κ B, 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 – c-Мус (на 67%) і антиапоптичного білка Bcl-xL (на 69%), а також зростання експресії p53 на 35%.

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 разів) при застосуванні нораргініну; гена *sat1* – у 6,2 разів при застосуванні ДФМО; генів *odc1* та *smox* – відповідно у 2,5 та у 3,8 разу при поєднаній дії ДФМО та нораргініну ($p < 0,05$). Встановлено, що у клітинах L1210 інгібітори ОДК та їхня комбінація по-різному модифікують метилування генів-регуляторів ензиму. Якщо під впливом ДФМО метилування *odc1* підвищується у 2,4 разу, 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 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, $p < 0,05$).

З'ясовано значення низки епігенетичних чинників у забезпеченні функціональної активності ОДК та протипухлинній дії інгібіторів ензиму. 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 $r=-0,55$, $-0,35$; $p<0,05$). Рівень метилювання гена *sat1* обернено залежить від рівня активності ОДК в пухлині і об'ємом метастазів у мишей з КЛЛ (відповідно $r=-0,53$, $r=-0,47$; $p<0,05$) та з вмістом ОДК в клітинах L1210 ($r=-0,43$; $p<0,05$). Рівень метилювання гена *smox* обернено корелює з активністю ОДК у тканині КЛЛ ($r=-0,33$; $p<0,05$).

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. При поєднаному застосуванні ДФМО 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 ($\beta = -0,35$; $p = 0,017$; $\beta = -0,34$; $p = 0,019$, відповідно)

Отримані результати підкреслюють значущість комбінованого пригнічення ОДК для досягнення стійкої блокади ферменту через транскрипційні, посттрансляційні та епігенетичні механізми. Ці дані створюють молекулярне підґрунтя для раціональної розробки комбінованих підходів таргетної терапії, спрямованих на підвищення протипухлинної ефективності та зменшення ризику розвитку адаптивної резистентності.

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

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.

Tumor progression is a complex multifactorial process in which molecular and biochemical changes play a key role by promoting proliferation, invasion, and metastasis. One of the critical regulators of these processes is ornithine decarboxylase (ODC), the enzyme that catalyzes the first step of polyamine (PA) biosynthesis. It is well established that the proliferation of both normal and malignantly transformed cells cannot occur without an adequate supply of PAs. Accordingly, elevated ODC activity is associated with enhanced tumor-cell proliferation, angiogenesis, and decreased efficacy of conventional chemotherapy. Given the pivotal role of ODC in regulating tumor growth, modern strategies aimed at targeting factors that modulate ODC activity offer promising opportunities for directed therapeutic intervention in cancer.

Within current approaches to cancer therapy, considerable attention is focused on compounds capable of inhibiting ODC activity – both direct inhibitors and indirect agents that affect epigenetic regulation and signaling pathways. However, subsequent studies have shown that the effects of these compounds are transient. After treatment cessation, tumor cells recover their proliferative activity, indicating the presence of adaptive or compensatory mechanisms that enable the cells to bypass polyamine-synthesis blockade, for example through activation of PA transport or changes in the cellular metabolic profile. Therefore, elucidating the mechanisms underlying this transient inhibition of proliferation is critical to achieving a sustained antitumor effect directed at modifying the functional state of ODC. Yet, the molecular mechanisms of such modification in tumor cells remain only partially explored. In particular, the epigenetic and signaling factors that

regulate *odc1* gene expression and its transcriptional activation or repression are insufficiently characterized. Understanding these molecular-biological mechanisms will allow the identification of key regulatory nodes of PA metabolism and provide a theoretical basis for predicting the therapeutic efficacy of ODC inhibitors.

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

This study analyzed the effects of synthetic ODC inhibitors – α -difluoromethylornithine (DFMO), norarginine, methylglyoxal-bis-guanylhydrazone (MGBG), and polyhexamethylene guanidine (PHMG) – on the course of ascitic and solid experimental tumors of different histogenesis. The analysis considered enzyme activity and content, expression of regulatory proteins, and methylation of ODC-related genes in tumor cells, and it identified key epigenetic factors of functional ODC modification mediating the antitumor effects of these compounds.

Among the inhibitors tested (norarginine, DFMO, MGBG, and PMG), the combined action of DFMO and norarginine produced the greatest decrease in ODC activity in Lewis lung carcinoma tissue and in ODC content in L1210 leukemia cells – 3.7-fold and 10-fold reductions, respectively, compared with control ($p < 0.05$). In contrast, single administration or other combinations achieved only 2.2–3.25-fold decreases ($p < 0.05$). Under PMG treatment, ODC content in P388 and W-256 cells decreased 1.6- and 1.4-fold, respectively, while combined DFMO + MGBG treatment reduced ODC content in P388 cells twofold relative to 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 DFMO + norarginine + MGBG, produced the greatest inhibition of Lewis lung carcinoma growth by day 26 of observation compared with monotherapy. On days 15 and 20, a significantly stronger antitumor effect was recorded for DFMO + norarginine than for DFMO + norarginine + MGBG, 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 norarginine and MGBG, resulted in a marked decrease in metastatic volume (16.3-, 13.5-, and 21.9-fold, respectively), whereas none of the inhibitors – alone or in combination – affected the number of metastases in mice with Lewis carcinoma. The strongest inhibition of L1210 growth was observed with DFMO + MGBG (2.3-fold), with slightly lesser effects for DFMO alone and DFMO + nor-arginine (1.8- and 2-fold, respectively). In P388 leukemia, DFMO + MGBG reduced the number of tumor cells in ascitic fluid by 1.3-fold. Under PHMG treatment, W-256 tumor mass decreased twofold and P388 cell number by 1.2-fold compared with control ($p < 0.05$).

Correlation analysis demonstrated that, under synthetic ODC inhibitor treatment, 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 ascitic fluid correlates with ODC content in L1210 and P388 cells ($r = 0.81$ and $r = 0.65$; $p < 0.05$). These results indicate that the high antitumor effect of 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.

Keywords: ornithine decarboxylase (ODC), gene methylation, ODC inhibitors, c-Myc, NF- κ B transcription factor, lung carcinoma Lewis (LLC), Leukemias L1210, Leukemias P388, DFMO, norarginine, MGBG, PMG.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Самойленко, & 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., & Samoylenko, 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., Samoylenko, 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. Samoylenko, 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 OA, O. 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., & Залєток, С. П. Роль метилювання 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. Залєток, 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 метилювання 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. Залєток, 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. Міжнародній конференції «Пухлина та організм: сучасні аспекти старої проблеми» (Київ, 21-24 вересня 2010).

11. Ukrainian-Swedish Workshop «New approaches in diagnostics and treatment of cancer» (Київ, 13-14 червня 2011)

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.

13. O. Samoylenko, S. Zaletok, O.Zhuravel, S. Gogol and L. Gulua. 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.

14. Е. Самойленко, С. Залеток, С. Гоголь, А. Орловский, Ю. Ушенин, Г. Бекетов, А. Самойлов, Р. Христосенко, Г. Дорожинский, Л. Гулуа. 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.

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 СДГ, Астана, 5-7 вересня 2012 р.

16. S.P. Zaletok, O.A. Samoylenko, O.V Zhuravel, O.A. Orlovsky. 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.

17. S. Zaletok, O. Samoylenko, O. Zhuravel, L. Gulua, V. Chekhun. 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА: СТРУКТУРА ТА БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ.	28
1.1.1. <i>Структура</i>	28
1.1.2. <i>Біологічні функції і роль у клітині</i>	28
1.1.3. <i>Механізми регуляції ОДК</i>	30
1.2. Роль орнітиндекарбоксилази у пухлинному процесі.....	31
1.3. ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА ЯК МОЛЕКУЛА-МІШЕНЬ ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ	33
1.4. МЕХАНІЗМИ ЕНДОГЕННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ	35
1.5. ІНГІБІТОРИ ОДК	41
1.5.1. <i>Прямі інгібітори</i>	42
1.5.2. <i>Непрямі інгібітори</i>	43
1.6. ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ОДК	44
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	54
2.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ТВАРИНИ	54
2.2. МОДЕЛІ ПУХЛИННОГО РОСТУ	59
2.3. ОТРИМАННЯ ЗРАЗКІВ	61
2.4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОТРИМАНИХ ЗРАЗКІВ.....	63
2.5. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА МЕТОДОМ БРЕДФОРДА	63
2.6. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКІВ МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ (ППР).....	64
2.7. АНАЛІТИЧНИЙ ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗ	66
2.8. ВЕСТЕРН-БЛОТ АНАЛІЗ (ІМУНОБЛОТАНАЛІЗ).....	67
2.9. ВИДІЛЕННЯ ДНК ТА АНАЛІЗ МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ ФЕРМЕНТІВ РЕГУЛЯЦІЇ ОДК (<i>ODC1, OAZ1, AZIN1, SAT1, SMOX, AMD1</i>) МЕТОДОМ ПЛР В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ (RT- PCR)	68

2.10. МАТЕМАТИЧНА ТА СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ.....	71
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ОДК НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНЗИМУ В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ТА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН	72
3.1. АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ОДК У КЛІТИНАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН ЗА ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ЕНЗИМУ	72
3.2. ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ОДК НА РІСТ ТА ПРОГРЕСІЮ СОЛІДНИХ ТА АСЦИТНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ	77
РОЗДІЛ 4 ВМІСТ БІЛКІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ ОДК, У ТКАНИНІ СОЛІДНИХ ТА АСЦИТНИХ ПЕРЕЩЕПЛЮВАННИХ ПУХЛИН ЗА УМОВ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ ОДК	91
4.1. ВМІСТ БІЛКІВ ФАКТОРУ ТРАНСКРИПЦІЇ NF-κB У КЛІТИНАХ W-256 ЗА ДІЇ ПМГ	92
4.2. ВМІСТ БІЛКІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ ОДК, У КЛІТИНАХ L1210 ЗА ДІЇ ДФМО ТА МГБГ	93
4.3. ВМІСТ БІЛКІВ, ЗАДІЯНИХ У РЕГУЛЯЦІЇ ОДК, В КЛІТИНАХ P388 ЗА ДІЇ ДФМО+МГБГ	95
4.4. АКТИВНІСТЬ РНКаз У КЛІТИНАХ L1210 ТА P388 ЗА ДІЇ ДФМО У ПОЄДНАННІ З МГБГ	99
РОЗДІЛ 5 СТАТУС МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ ОДК, У КЛІТИНАХ СОЛІДНИХ ТА АСЦИТНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН ПІСЛЯ ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ЕНЗИМУ	104
5.1. СТАТУС МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ <i>ODC1</i> , <i>OAZ1</i> , <i>AZIN1</i> , <i>SMOX</i> , <i>SAT1</i> ТА <i>AMD1</i> В КЛІТИНАХ КЛЛ ПІСЛЯ ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ОДК.....	104
5.2. СТАТУС МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ <i>ODC1</i> , <i>OAZ1</i> , <i>AZIN1</i> , <i>SMOX</i> , <i>SAT</i> , <i>AMD1</i> В КЛІТИНАХ L1210 ПІСЛЯ ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ОДК	118
5.3. СТАТУС МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ <i>ODC1</i> ТА <i>OAZ1</i> В КЛІТИНАХ L1210 ТА P388 ПІСЛЯ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ ОДК.....	123

РОЗДІЛ 6 КЛЮЧОВІ ЕПІГЕНЕТИЧНІ ЧИННИКИ ЕКЗОГЕННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ У ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ. БАГАТОФАКТОРНИЙ АНАЛІЗ	131
6.1. Вплив метилування генів-регуляторів ОДК на активність та вміст ензиму в пухлинних клітинах та перебіг експериментальних пухлин. Кореляційний аналіз	131
6.2. Ідентифікація ключових епігенетичних факторів екзогенної регуляції ОДК у клітинах карциноми легені Льюїс з використанням багатофакторного аналізу	133
6.3. Ідентифікація ключових епігенетичних факторів екзогенної регуляції ОДК у клітинах L1210 з використанням багатофакторного аналізу	135
РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	140
ВИСНОВКИ.....	153
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	157
ДАТОК Б.....	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AdoMetDC	S-аденозилметіоніндекарбоксилаза
Akt	протеїнкіназа B
AZIN1	інгібітор антизиму 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2) — це антиапоптотичний білок
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large) — це антиапоптотичний білок,
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region
BCR-ABL	онкоген вірусу лейкемії Абельсона мишей
CDK2	циклін-залежна кіназа 2
CDK4/6	циклін-залежні кінази 4/6
dcSAM	декарбоксильований S-аденозилметіонін
Dnmt	метилтрансфераза
EGFR	рецептор епідермального фактора росту
eIF5A	еукаріотичний фактор ініціації трансляції 5A
ERK	екстрацелюлярно-регульована кіназа
HIF-1 α	індукований гіпоксією фактор 1-альфа
iNOS	індуцибельна форма ферменту NO-синтази
JAK	янус-кіназа (сімейство тирозинових протеїнкіназ)
MAPK	мітоген-активована протеїнкіназа
MeCP1	метил-CpG-зв'язуючий білок 1
mTOR	мішень рапаміцину у ссавців
МГБГ	метилгліоксаль біс(гуанілгідрозон)
NEMO	модулятор NF- κ B
NF- κ B	ядерний фактор — енхансер каппа-легкого ланцюга активованих В-лімфоцитів
NOHA	L-N ω -гідроксил-L-аргінін
NRE	негативний регуляторний елемент
OAZ	антизим ОДК

ОДК	орнітиндекарбоксилаза
PI3K	фосфатидилінозитол-3-кіназа
PLP	піридоксаль-5'-фосфатом
REV-T	онкоген вірусу ретикулоендотеліозу птахів
ROS	активні форми кисню
SOD	супероксиддисмутаза
STAT	трансдуктор та активатор транскрипції
TET	білки Ten-Eleven Translocation
W-256	Уокер-256 (лінія клітин карциносаркоми)
Wnt	сигнальний шлях клітини
ДФМО	α -дифторметилорнітин
ПА	поліаміни
ПМГ	полігексаметиленгуанідин

ВСТУП

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 [1], [2].

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 [3]. 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 [3], [4]. 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 [5], [6].

В рамках сучасних підходів у лікуванні онкологічних хворих активно вивчаються сполуки, здатні пригнічувати активність ОДК – як прямі інгібітори (наприклад, α -диформетилорнітин (ДФМО), так і непрямі (нораргінін, полігексаметиленгуанідин (ПМГ), метилглюксаль-біс-гуанілгідрозон (МГБГ)), що впливають на метаболізм аргінін, епігенетичну регуляцію або сигнальні шляхи. ДФМО вже продемонстрував протипухлинну активність на моделях колоректального раку, нейробластоми та гліобластоми [7], [8], 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 [9]. 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 [10]. Зокрема, нові препарати-інгібітори ОДК демонструють високу потужність пригнічення ферменту *in vitro* та *in vivo* [11], а методи метаболічного обмеження (наприклад, дієтичне зменшення споживання аргініну та прийом аспірину) вже використовуються у клінічних дослідженнях *in vivo* [12].

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 і темами.

Дисертаційна робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у відповідності з планом науково-дослідної роботи 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-Мус, 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-Мус, 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 Стюдента, кореляційний аналіз та багатофакторний регресійний аналіз.

Наукова новизна отриманих 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 -дифторметилорнітину (ДФМО), полігексаметиленгуанідину (ПМГ) та метилгліоксаль-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-Мус, 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 СДГ (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 робіт, з яких 8 статей, 5 з яких у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН

України (у тому числі 4 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), 1 патент України на корисну модель та 8 тез у збірках наукових конференцій та з'їздів.

Обсяг та структура 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 посилання, з них 9 кирилицею. Роботу ілюстровано 37 рисунками та 17 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Орнітиндекарбоксилаза: структура та біологічні функції.

1.1.1 Структура

Орнітиндекарбоксилаза (ODC, EC 4.1.1.17) є ключовим ферментом у метаболізмі ПА і каталізує перетворення орнітину на путресцин, яке є першим етапом їхнього біосинтезу. Цей процес має фундаментальне значення для клітинної проліферації, стабільності хроматину, транскрипції, трансляції та диференціювання клітин [2], [13], [14].

Ген *odc1* локалізований на короткому плечі хромосоми 2 (2p25) і кодує білок, що функціонує як гомодимер, з масою приблизно 52 кДа. Активний центр ферменту містить залишок лізину (Lys69), який утворює ковалентний зв'язок з коферментом – піридоксаль-5'-фосфатом (PLP). Просторова структура ферменту представлена α/β -бочкоподібною конфігурацією, характерною для декарбоксилаз [15].

1.1.2 Біологічні функції і роль у клітині

Біологічні функції ОДК наведено на рисунку 1. Як показано, ОДК, будучи ключовим ферментом обміну ПА, опосередковано підтримує стабільність хроматину шляхом синтезу ПА – біогенних катіонів (путресцину, спермідину, сперміну) Ці молекули зв'язуються з негативно зарядженими фосфатами ДНК та сприяють її конденсації, захисту від фрагментації та регуляції транскрипційної активності [16]. Крім того, ОДК через синтез ПА стабілізує структуру ДНК, підтримує транскрипційно активну конформацію хроматину та забезпечує функціональну активність рибосом. Зокрема, ПА беруть участь у посттрансляційній модифікації фактора трансляції eIF5A, який є критичним для ефективного елонгаційного етапу трансляції [17].

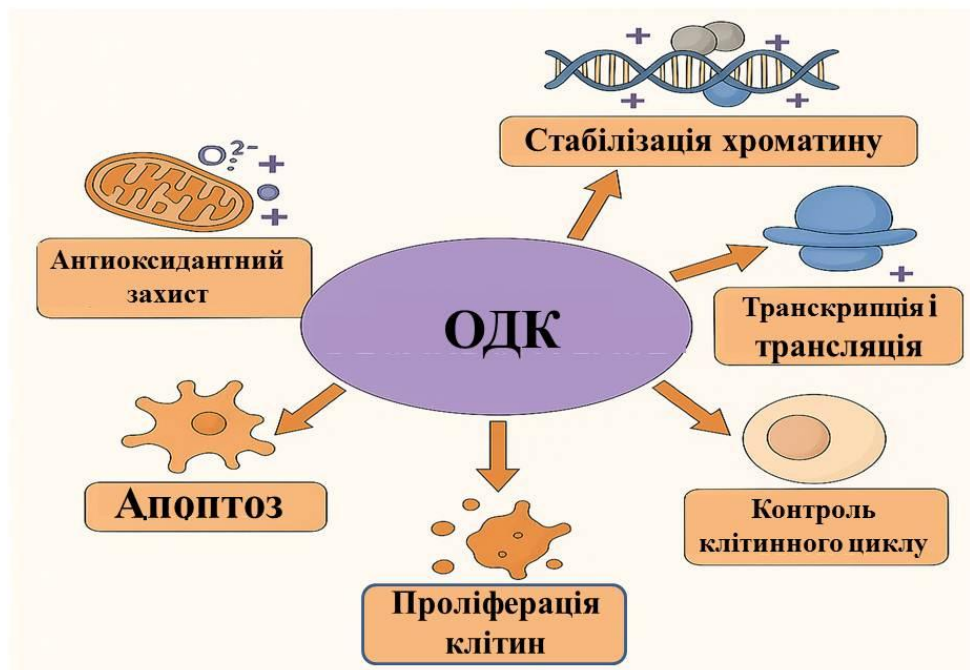


Рисунок 1.1 – Біологічні функції ОДК в клітині

Також ОДК опосередковано бере участь у регуляції клітинного циклу – через продукцію ПА, які індукують експресію циклінів (Cyclin D, E) та активність циклічних кіназ (CDK2, CDK4/6), що сприяє переходу клітини з фази G1 у фазу S. Високий рівень ПА асоціюється з проліферативною активністю та активацією транскрипційних програм, характерних для пухлинного росту [17].

ОДК опосередковано бере участь в антиоксидантному захисті клітини – через ПА, синтез яких вона ініціює. ПА (путресцин, спермідин, спермин) здатні зв'язувати активні форми кисню (ROS), знижуючи рівень окисного стресу в клітині [18]. ПА взаємодіють із аніонними групами нуклеїнових кислот та білків, стабілізуючи їх та попереджаючи ушкодження.

Крім прямої дії як знешкоджувачів реактивних форм кисню, ПА також сприяють активації антиоксидантних ферментів, зокрема супероксиддисмутази (SOD), каталази та глутатіонпероксидази [19]. Було показано, що дефіцит ПА, зумовлений інгібуванням ОДК (наприклад,

ДФМО), підвищує чутливість клітин до H_2O_2 -індукованого апоптозу та знижує відновлювальний потенціал клітин.

ОДК опосередковано бере участь у регуляції апоптозу шляхом продукції ПА – біогенних катіонів, які стабілізують мембрани мітохондрій, знижують рівень активних форм кисню та гальмують активацію каспаз. ПА здатні індукувати експресію антиапоптичних білків (Bcl-2, Bcl-xL) і пригнічувати експресію або активність проапоптичних факторів (Bax, p53, каспаза-3), що забезпечує виживання клітин у стресових умовах [20].

1.1.3 Механізми регуляції ОДК

Регуляція ОДК включає декілька рівнів:

транскрипційний рівень, де ген *odc1* активується під дією онкогенів (наприклад, c-Мус), факторів росту та умов гіпоксії [3], [21], [22];

посттранскрипційний рівень, при якому мікроРНК, такі як miR-145, пригнічують експресію *odc1*; однак у пухлинах відзначається порушення їхнього функціонування [23];

посттрансляційний рівень. Деградація ОДК здійснюється за участю білка-інгібітора OAZ (ОДК антизим), який індукується високими рівнями ПА [5]. OAZ зв'язується з ОДК і спрямовує її на убіквітин-незалежний протеасомний розпад. Інгібітор OAZ – білок AZIN1 (інгібітор антизиму 1) – стабілізує ОДК, створюючи позитивний зворотний зв'язок [6];

епігенетичний рівень. Метилування промотору *odc1* є механізмом його глушення у нормальних тканинах, але у багатьох пухлинах, зокрема карциномі Ерліха, відбувається деметилування й активація експресії [24];

стрес-індукована регуляція. За умов гострого стресу (наприклад, імунно-або емоційного), в експериментальних моделях спостерігається транзиторне підвищення активності ОДК, що може сприяти адаптації клітини або ж запуску стрес-асоційованого пухлинного росту [25], [26], [27].

У нормі активність ОДК підлягає тонкій регуляції для забезпечення фізіологічного рівня ПА, що беруть участь у регуляції експресії генів,

модифікації хроматину, утворенні рибосом, іонному транспорті та сигнальних шляхах. Унаслідок цього ОДК розглядається як один із найважливіших ферментів для підтримки проліферативного потенціалу клітини.

Враховуючи ключову роль ОДК у біосинтезі ПА, які, у свою чергу, виступають критично важливими молекулами для підтримки проліферативного потенціалу клітин, логічним припустити, що ОДК залучена до патологічних процесів, пов'язаних із надмірним ростом і виживанням клітин, зокрема до онкогенезу.

Дослідження останніх десятиліть підтвердили, що ODC1 не лише відіграє важливу роль у підтриманні клітинної життєздатності, але і є онкогеном, активність якого корелює з прогресією різних типів пухлин.

Наступний розділ присвячено аналізу ролі ОДК у пухлинному процесі, включно з механізмами її патологічної активації, впливом дисбалансу ПА на клітинний метаболізм та клінічними наслідками підвищеної експресії гена *odc1*.

1.2. Роль орнітиндекарбоксилази у пухлинному процесі

ОДК каталізує декарбоксилювання орнітину з утворенням путресцину, першого кроку на шляху біосинтезу ПА, який зрештою призводить до утворення спермідину та сперміну. Ці ПА мають вирішальне значення для стабілізації ДНК, транскрипції (модуляції експресії генів), трансляції, функції мембранних білків, фолдингу білків і підтримки швидкого поділу клітин [28], [29], [30], [31], [32], [33], [34]. Багато видів пухлин демонструють підвищену активність ОДК, що призводить до надмірного синтезу, які підтримують неконтрольоване розмноження пухлинних клітин [35]. Рівень ПА сильно змінюється в ході фізіологічних і патологічних процесів – ембріогенезу, старіння [36], [37], [38], регенерації, інфікування, злоякісної трансформації [39], [40]. Підвищений рівень ПА при пухлинному рості

використовується як маркер для моніторингу перебігу захворювання та ефективності терапії [41], [42], [43].

Нові дані встановили значний зв'язок ОДК із запаленням та прогресуванням пухлини, значною мірою опосередкованою через метилювання ДНК та ядерний фактор транскрипції NF- κ B (NF- κ B) [44].

Взаємозв'язок ОДК з апоптозом. Апоптоз є запрограмованою клітинною смертю, яка підтримує гомеостаз тканин. ПА можуть як стимулювати, так і інгібувати апоптоз залежно від клітинного контексту [45]. Висока активність ОДК може інгібувати апоптоз через стабілізацію ДНК і клітинних мембран та модулювання активності каспаз, дозволяючи раковим клітинам довше виживати та накопичувати мутації [46], [47]. Однак надмірна експресія ОДК також може сенсibiliзувати клітини до стресових умов, що запускають апоптотичні шляхи. ОДК впливає на баланс між проапоптотичними (Бах, p53) та антиапоптотичними (Bcl-2) білками. Підвищення рівня ПА часто зміщує баланс у бік виживання клітин. Було показано, що ПА перешкоджають активації каспази, зменшуючи апоптоз і сприяючи виживанню пухлинних клітин.

Висока експресія *odc1* була зафіксована в клітинах колоректального раку, гліобластоми, нейробластоми, раку простати, легенів та молочної залози [2], [3], [4]. Надлишкові ПА підтримують пухлинний ріст через активацію циклічних кіназ, стабілізацію ДНК, зниження рівня апоптозу та створення імунодепресивного мікрооточення [16], [48].

Функціональні дослідження на тваринних моделях підтверджують онкогенний потенціал *odc1*. Так, у трансгенних мишей, що експресують *odc1* у клітинах шкіри, відмічали спонтанний розвиток папілом навіть без впливу канцерогенів [49]. Більш того, коекспресія *odc1* та *c-Myc* або *ras* значно прискорює пухлинну трансформацію [21].

Підвищення активності ОДК також сприяє резистентності пухлин до терапії. Зокрема, ПА пригнічують апоптоз через активацію антиапоптотичних білків (Bcl-2, Bcl-xL) та інгібування каспаз, а також підсилюють експресію

генів виживання шляхом активації NF- κ B [20]. Ці механізми ускладнюють ефективність традиційної хіміотерапії та променевої терапії [19].

Крім того, ПА, що продукуються за участі ОДК, стабілізують мембрани мітохондрій, нейтралізують вільні радикали та зменшують рівень окисного стресу, що посилює стійкість клітин до дії цитотоксичних агентів [24]. Підвищена активність ОДК та накопичення ПА сприяють виживанню пухлинних клітин навіть в умовах гіпоксії, запалення або впливу хіміопрепаратів [27].

Інгібування активності ОДК (наприклад, ДФМО) супроводжується виснаженням пулу ПА і сенсибілізацією клітин до апоптозу, зокрема під впливом хіміотерапевтичних агентів або окисного стресу [16]. Ці функції підтверджені численними експериментами: застосування ДФМО призводить до сенсибілізації клітин до апоптозу, збільшення рівня γ H2AX, активації p53, зупинки клітинного циклу на G2/M та індукції клітинної смерті як у неонатальних, так і у пухлинних моделях [19], [20].

Таким чином, ОДК бере участь у багатьох критичних для прогресування пухлини процесах, що обґрунтовує доцільність її розгляду як молекулярної мішені для таргетної протипухлинної терапії.

1.3. Орнітиндекарбоксилаза як молекула-мішень протипухлинної терапії

Важливість підвищення ефективності лікування онкологічних хворих зумовлює інтенсивний розвиток новітніх підходів у протипухлинній терапії, зокрема молекулярно-орієнтованої (таргетної) терапії [16].

Таргетна терапія – це підхід до лікування онкологічних захворювань, що полягає у вибіркового впливі на специфічні молекули, залучені до росту, виживання, ангіогенезу або метастазування пухлинних клітин. На відміну від традиційної хіміотерапії, яка вражає як пухлинні, так і здорові клітини, таргетні препарати мають вибірккову дію, що знижує загальну токсичність та підвищує ефективність лікування [50], [51].

У сучасній онкології молекулярно-орієнтована терапія стала одним із основних напрямів лікування онкологічних хворих завдяки своїй здатності долати хіміорезистентність, впливати на критичні сигнальні каскади, зменшувати ризик рецидиву та покращувати виживаність пацієнтів. Її ефективність вже доведена при багатьох солідних пухлинах (наприклад, HER2-позитивний рак молочної залози, EGFR-позитивний недрібноклітинний рак легень, BCR-ABL-позитивна хронічна мієлоїдна лейкемія) [52], [53].

Однак значна частина злоякісних новоутворень залишається резистентною до стандартних цитостатиків, і для них відсутні ефективні мішені. З цієї причини актуальним є пошук нових молекул-мішеней, що забезпечують підтримку пухлинного фенотипу – зокрема, таких як ОДК.

Однією з досліджуваних молекул-мішеней є ОДК – ензим, що регулює синтез ПА, критично важливих для проліферації, виживання та міграції пухлинних клітин [54]. Відомо, що підвищена активність ОДК асоційована з агресивним перебігом багатьох пухлин [6]. Блокада ОДК, як на рівні синтезу, так і на рівні активності, розглядається як один із перспективних напрямків у створенні препаратів для таргетної терапії [55], [56], [57], [58]. Серед засобів екзогенної регуляції активності ОДК – низка синтетичних інгібіторів ензиму, які відрізняються за механізмами дії. Попри те, що на сьогодні існує значна кількість робіт щодо вивчення ролі ОДК та пов'язаних з нею сигнальних шляхів в пухлинній прогресії [13], [25], [58], [59], [60], залишається актуальною необхідність розширення розуміння механізмів дії її інгібіторів, зокрема на рівні епігеному. Наразі виявлено, що підвищена експресія гену *odc1*, який кодує ОДК, та зниження експресії білка-антизиму OAZ1 (продукту гена *oaz1*) асоційовані з агресивним фенотипом низки пухлин [6]. Доведено, що гіперметилування промотору *odc1* пригнічує експресію гена і сприяє порушенню обміну ПА [61]. Прямі докази щодо метилування промотору *oaz1* на тепер недостатні, але відомо, що антизим OAZ1 істотно знижує рівень глобального метилування ДНК [61]. Відомо також, що ген

odc1 є прямою транскрипційною мішенню онкобілка c-Мус, що зумовлює тісний зв'язок між активацією цього онкогену та посиленням метаболізму ПА [13], [62].

Блокування активності ОДК, ключового ферменту синтезу путресцину, із подальшим пригніченням рівня ПА – один із найперспективніших напрямків у розвитку нових підходів до лікування раку, прогресування якого регулюється на різних рівнях комплексною системою ферментів, якими є, насамперед, ферменти синтезу та трансформації ПА, недостатньо вивчені.

Зважаючи на це, дослідження метилування промоторних ділянок генів *odc1* і *oaz1* за впливу інгібіторів ОДК може стати підґрунтям для розширення досліджень в цьому напрямку.

1.4. Механізми ендогенної регуляції орнітиндекарбоксилази при пухлинному рості

Експресія ОДК суворо регулюється як у нормальних, так і в пухлинних клітинах. У процесі злоякісної трансформації клітин ендогенні механізми регуляції ОДК зазнають значних змін, що сприяє підтримці їхнього високого проліферативного потенціалу, пригніченню апоптозу та розвитку хіміорезистентності.

1.4.1 Транскрипційна регуляція

Основним механізмом активації гена *odc1* у пухлинах є транскрипційна активація онкогенами. Зокрема, добре відомо, що c-Мус безпосередньо зв'язується з E-box елементами промотору *odc1* і стимулює його експресію [63]. У багатьох типах пухлин, включно з колоректальним раком, нейробластою, раком простати, експресія c-Мус позитивно корелює з рівнем *odc1* [3], [58], [64]. Крім того, інші транскрипційні фактори, такі як HIF-1 α при гіпоксії, NF- κ B за умов запалення, також здатні опосередковано активувати експресію *odc1*, підтримуючи виживання пухлинних клітин у несприятливих умовах [60], [65].

1.4.2 Посттранскрипційна регуляція (мікроРНК)

МікроРНК (miRNA) – ще один важливий механізм ендogenousного контролю *odc1*. Наприклад, у клітинах колоректального раку miRNA -378a інгібував експресію *odc1* (зменшення активності ферменту та зниження проліферації) [66]. Проте у злоякісних новоутвореннях часто спостерігається гіпоекспресія цих miRNA, що призводить до зняття гальмівного контролю і підвищення рівня ОДК. Крім того, порушення процесингу пре-miRNA та дефіцит рибонуклеаз – Drosha або Dicer можуть сприяти загальному дисбалансу miRNA у пухлинах.

1.4.3 Посттрансляційна регуляція: роль OAZ і AZIN1

Особливістю регуляції ОДК є її нестабільність – білок швидко деградує, зазвичай без участі убіквітину. Цей процес опосередковується білком-антизимом (OAZ1), який зв'язується з ОДК і направляє її на деградацію через 26S протеасому [67].

AZIN1 (antizyme inhibitor 1) – ендogenousний білок, що блокує активність OAZ, зв'язуючись з ним із вищою афінністю, ніж сама ОДК. Унаслідок цього AZIN1 стабілізує ОДК і сприяє накопиченню ПА. У багатьох типах пухлин спостерігається гіперекспресія *azin1*, яка корелює з агресивним перебігом захворювання [68].

1.4.4 Модуляція активності ОДК через сигнальні шляхи

Регуляція *odc1* та пов'язаних з ним генів (*oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*) тісно інтегрована в сигнальні каскади, що визначають проліферацію, виживання та стрес-відповідь пухлинних клітин. Відомо, що сигнальні шляхи PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK, Wnt/ β -catenin, JAK/STAT та NF- κ B беруть участь у транскрипційній та посттрансляційній регуляції не лише *odc1*, але й генів-супресорів та активаторів обміну ПА [16], [22].

Активация шляху PI3K/Akt/mTOR веде до посиленого синтезу білка ОДК через mTOR-залежну активацію ініціації трансляції та стабілізацію транскрипційного фактора с-Мус [69]. Підвищена активність с-Мус, своєю чергою, індукує експресію *odc1*, а також може пригнічувати експресію антагоніста *oaz1* [60]. Крім того, активність с-Мус асоціюється зі зниженням

рівня *smox* та *sat1*, що обмежує деградацію ПА і сприяє їхньому накопиченню в пухлинних клітинах [70].

Сигнальний шлях MAPK/ERK, активований факторами росту (наприклад, EGF), посилює експресію *odc1* через фосфорилування Мус і запуск експресії ОДК. Це створює умови для проліферативного фенотипу пухлинних клітин. У той же час ERK-активація може пригнічувати експресію *sat1*, сприяючи блокаді катаболізму ПА [71].

Каскад Wnt/ β -catenin активно функціонує в гепатоцелюлярній карциномі та нейробластомі, де стабілізований β -catenin транслокується в ядро і, спільно з TCF/LEF, активує експресію *c-мус*, *odc1* та супресує *smox* [72]. Одночасно відзначено гіперекспресію *azin1* – антагоніста OAZ – що сприяє стабілізації ОДК.

У відповідь на цитокінові сигнали, шлях JAK/STAT3 активує експресію *bcl-xl*, *sox-2* та *odc1*, забезпечуючи стійкість клітин до апоптозу та протизапальну адаптацію. В експериментах на моделях раку молочної залози та легень доведено, що блокада JAK/STAT знижує рівень ОДК і рівні ПА [73], [74].

Шлях NF- κ B (p50/p65). Одним з найважливіших регуляторів експресії генів, продукти яких відіграють ключову роль як у розвитку серцево-судинних патологій, запальних процесів, вірусних захворювань, так і при канцерогенезі, є ядерний фактор транскрипції карпа В (NF- κ B), який належить до Rel-родини факторів транскрипції [69–71]. Шлях NF- κ B – є одним із ключових у контексті запальної відповіді та стрес-резистентності [78]. Активація NF- κ B (через I κ B α -фосфорилування) призводить до індукції *odc1*, *iNOS*, *bcl-xl*, *sox-2*, з одночасним пригніченням *sat1* та *smox* – що зменшує деградацію ПА [79]. При інгібуванні ОДК, навпаки, спостерігається зниження p65/p50, *bcl-xl*, *sox-2*, що підвищує чутливість до апоптозу та цитостатиків [80].

Показано, що NF- κ B та сигнальні шляхи, пов'язані з його активацією і функціонуванням, відіграють важливу роль у розвитку пухлин [81], [82], [83],

[84]. Сайт зв'язування з NF-κB був ідентифікований у промоторних та енхансерних регіонах великої кількості генів, задіяних зокрема у процесах запалення та імунної відповіді, а також генів, що беруть участь у стимуляції клітинної проліферації, запобіганні апоптозу, процесах метастазування та ангиогенезу [85], [86], [87].

NF-κB – багатофункціональний білок, який синтезується у багатьох типах клітин. Вперше NF-κB був виділений з лімфоцитів як гетеродимерний комплекс, що містить дві субодиниці – p50 і p65 [88]. Зараз вже відомо, що фактор NF-κB може бути як гомо- так і гетеродимером, до складу яких входять близькоспоріднені білки 2 класів (RELA (p65), RELB, c-REL та NF-κB1 і NF-κB2 (p50 і p52)), що зв'язують спільну послідовність ДНК, яку називають сайт карраВ, або відповідні послідовності ДНК (NRE – sequences) [89], [90], [91], [92]. Дані про те, що білок p50 належить до родини ретикулоендотеліальних білків (REL), стали першим доказом зв'язку NF-κB зі злоякісним ростом, оскільки v-REL є одним з онкопротейнів ретровірусу REL (REV-T) [89]. У нестимульованих клітинах білки NF-κB локалізуються у цитоплазмі, де вони зв'язані зі специфічними інгібіторами, відомими як інгібіторні білки карраВ (IκB) [93], [94].

На рисунку 1.2.5, як приклад, представлено шлях активації NF-κB (гетеродимера RelA/p50).

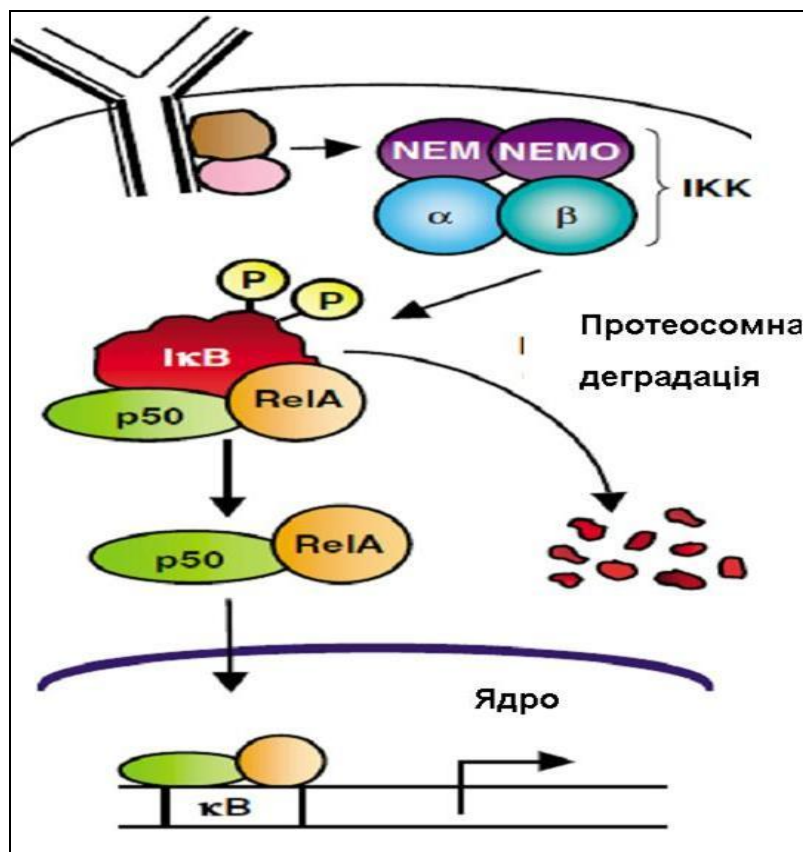


Рисунок 1.2.5 – Активації фактора NF-κB у клітині [92]

Як видно з рисунка 1.2.2, NF-κB знаходиться у неактивному стані у цитоплазмі у вигляді комплексу з його інгібіторним білком IκBα. Необхідним етапом для активації NF-κB є активація кіназного комплексу (ІКК), що складається з каталітичних субодиниць ІКК α /ІКК β , регуляторного, каркасного білка NEMO (модулятор NF-κB) та NEM (N-етилмалеїмід, інгібітор формування комплексів ДНК-білок).

Широкий спектр стимулюючих чинників, таких як фактори росту, цитокіни, окисний стрес, бактеріальні і вірусні агенти, активують комплекс ІκВ кінази (ІКК), що призводить до деградації ІκВ. ІКК фосфорилує зв'язаний з NF-κB інгібіторний білок у межах його N-кінцевого регуляторного домену, у подальшому ІκВ деградує убіквітин-залежним шляхом. Наслідком цього є звільнення NF-κB від інгібіторного білка і переміщення його у ядро. Показано, що комплекс ІКК складається, як

мінімум, з трьох субодиниць – ІКК α , ІКК β та ІКК γ (також відомої як NEMO) [95].

Як було зазначено вище, різні позаклітинні сигнали здатні активувати ІКК, що, у свою чергу, призводить до фосфорилування інгібіторного білка ІкВ α , його відокремлення від фактора NF-кВ та деградації у протеасомі. Після відокремлення від ІкВ α , NF-кВ переміщується в ядро (тобто, відбувається його активація), де зв'язується з відповідними елементами на ДНК (короткі послідовності ДНК у межах промоторної ділянки гена, які здатні зв'язуватись з конкретними факторами транскрипції) і, таким чином, впливає на транскрипцію певного гена.

Необхідно зазначити, що зв'язуванню NF-кВ зі специфічними послідовностями ДНК з загальною формулою GGGRNNYYCC (де N - будь-який нуклеотид, R - пури́н, Y - піри́мідин) притаманна дуже висока афінність ($K_d=10^{-12}$ M) [96], [97].

Гени, у регуляцію яких залучений NF-кВ (а це більше ніж 400 генів), належать до різних функціональних груп [82]. Відомо, що гени, які регулюються NF-кВ, беруть участь у різних ключових клітинних процесах. Так, NF-кВ регулює експресію генів циклооксигенази і індукцибельної синтази азоту (COX-2 і iNOS), цитокінів (TNF, IL-1, IL-6, IL-8) і хемокінів, молекул адгезії, регуляторів клітинного циклу і ангіогенних факторів.

У багатьох роботах показано, що NF-кВ конститутивно активований у різних типах ракових пухлин і відіграє ключову роль у процесах проліферації, росту і виживання злоякісних клітин та у прогресії пухлин [98].

В той же час, доведено, що інгібування NF-кВ у пухлинних клітинах пригнічує їх проліферацію, викликає зупинку клітинного циклу і призводить до апоптозу, що свідчить про вирішальну роль NF-кВ у цих процесах [99], [100].

Таким чином, ОДК та асоційовані з ним білки (с-Мус, p65, p50, Bcl-xL) функціонують у широкій мережі сигнальних взаємодій, що координують

експресію генів обміну ПА. Ці взаємозв'язки відіграють вирішальну роль у збереженні проліферативного потенціалу пухлин, пригніченні апоптозу та формуванні імунорезистентності.

1.4.6 Епігенетичні механізми

Метилування промоторної ділянки *odc1* є ендегенним механізмом блокування транскрипції гена в нормальних тканинах. Проте в умовах пухлинного росту часто спостерігається деметилування цих ділянок, що сприяє реактивації експресії гена. Показано, що в деяких пухлинах — зокрема, в уротеліальній карциномі — гіперметилування промотору *odc1* знижує його експресію на початку пухлинного росту, але водночас стимулює глобальні епігенетичні порушення через деметилування повторюваних елементів типу LINE-1, створюючи епігенетичний каскад [101].

Таким чином, ендегенна регуляція ОДК у пухлинному процесі є багаторівневою і включає транскрипційні, посттранскрипційні, посттрансляційні, сигнальні та епігенетичні механізми. Дисбаланс у цих регуляторних системах сприяє гіперекспресії *odc1*, накопиченню ПА і прогресії пухлини, що робить ОДК перспективною мішенню для терапії.

1.5. Інгібітори ОДК

Інгібування ОДК пригнічує ріст деяких пухлин (наприклад, колоректального [102], простати [103], [104], нейробластоми [105]). У контексті таргетної протипухлинної терапії ОДК розглядається як перспективна мішень. Клітини пухлин мають підвищену залежність від ПА, тому інгібування ОДК призводить до порушення їх проліферації та життєздатності.

Синтетичні інгібітори ОДК можна класифікувати на прямі та непрямі інгібітори.

1.5.1 Прямі інгібітори

Конкурентні/необоротні інгібітори: 1) α -дифторметилорнітин (ДФМО, Ефлорнітин) – незворотний інгібітор, який ковалентно зв'язується з ОДК блокуючи активний центр ферменту через ковалентну взаємодію із залишком Cys360 [106]; 2) аналоги орнітину – структурні аналоги, такі як метилорнітин або гідроксиорнітин, можуть діяти як конкурентні інгібітори; 3) борна кислота – утворює комплекси з ферментом, пригнічуючи його активність.

Найбільш вивченим інгібітором є α -дифторметилорнітин (ДФМО). ДФМО інактивує фермент, що призводить до виснаження ПА, які необхідні для синтезу ДНК, РНК і білка, перешкоджаючи росту та проліферації клітин. ДФМО демонструє протипухлинну ефективність у передклінічних моделях раку товстої кишки [8], простати [103], нейробластоми [107] та гліобластоми [7]. У клінічних дослідженнях встановлено, що ДФМО у достовірно знижує частоту рецидивів у пацієнтів із колоректальним раком [108]. Крім того, ДФМО підвищує чутливість до темозоломіду при гліобластомі, інгібуючи резистентні клітини [7]. Наприклад, дослідження на трьох гліобластомних клітинних лініях (U87, U251, T98G) показало, що комбінація ДФМО, темозоломіду та радіації суттєво знижує життєздатність клітин [7]. Інше дослідження виявило, що ДФМО зменшує частоту мутацій, викликаних темозоломідом (U87MG лінія) [109].

Альтернативні підходи до блокування обміну ПА включають таргетинг білків AZIN (інгібіторів антизимів), що стабілізують ОДК, та індукцію експресії антизимів (AZ1, AZ2), які сприяють деградації ферменту. Досліджуються також комбіновані схеми з використанням ДФМО разом з інгібіторами HDAC, BET або транспортерів ПА (AMXT-1501).

Значну увагу приділено дослідженню поліморфізмів у промоторній ділянці гена *odc1*, які впливають на ефективність інгібіторів. Наприклад, алель rs2302615 асоціюється з вищою чутливістю до ДФМО та нижчим ризиком рецидиву пухлин у пацієнтів із колоректальними аденомами [8].

1.5.2 Непрямі інгібітори

Нораргінін (nor-NOHA) - це структурний аналог аргініну, який може інгібувати ОДК. Існує низка сполук, які пригнічують клітинну проліферацію шляхом інгібування активності ферментів, необхідних для забезпечення клітинної проліферації. Однією з таких сполук є L-N ω -гідроксил-L-аргінін (NOHA), що утворюється як побічний продукт в синтезі монооксиду азоту (NO) [110]. В реакції перетворення аргініну на орнітин NOHA не може виступати як замітник аргініну через наявність додаткової гідроксильної групи біля ω -атому азоту, внаслідок цього реакція утворення орнітину блокується. Наразі існує синтетичний аналог NOHA, а саме L-N ω -гідроксинор-аргінін (nor-NOHA), який має в сорок разів вищу афінність до аргінази [111]. nor-NOHA імітує структуру аргініну та діє як інгібітор аргінази, запобігаючи перетворенню аргініну в орнітин. Оскільки орнітин є субстратом для ОДК, зниження доступності орнітину призводить до вторинного (непрямого) інгібування активності ОДК. nor-NOHA знижує рівень ПА, що уповільнює зростання клітин (використовується у дослідженнях протипухлинних стратегій).

Метилгліоксаль біс(гуанілгідрозон) (МГБГ). МГБГ є відомим інгібітором S-аденозилметіоніндекарбоксилази (AdoMetDC) [112], але не є прямим інгібітором ОДК [113]. S-аденозилметіоніндекарбоксилаза (AdoMetDC) може опосередковано впливати на активність ОДК через регуляцію ПА. AdoMetDC каталізує утворення декарбоксильованого S-аденозилметіоніну (dcSAM), ключового донора для синтезу спермідину та сперміну [114]. Більш високі рівні спермідину та сперміну посилюють експресію антизиму, який, у свою чергу, зв'язується з ОДК і сприяє його деградації. ОДК та AdoMetDC часто регулюються спільно, тобто зміни рівнів AdoMetDC можуть опосередковано впливати на активність ОДК, але це не пригнічує ОДК безпосередньо. МГБГ діє як конкурентний інгібітор

AdoMetDC, імітуючи природний субстрат, тим самим знижуючи внутрішньоклітинні рівні ПА.

Полігексаметиленгуанідин (ПМГ). ПМГ в першу чергу відомий як антимікробний агент, але зважаючи на його структуру та механізм дії, можна припустити, що ПМГ може інгібувати ОДК наступними способами: 1) електростатична взаємодія з активним центром - ПМГ є полігуанідиноювою сполукою, тобто містить кілька позитивно заряджених гуанідинових груп. Оскільки ОДК має негативно заряджений активний центр, який взаємодіє з орнітином, ПМГ може конкурентно або неконкурентно зв'язуватися з ОДК і блокувати доступ до субстрату; 2) порушення гомеостазу ПА. ПМГ може взаємодіяти з клітинними мембранами та білками, потенційно змінюючи внутрішньоклітинний баланс ПА. Оскільки ПА (путресцин, спермідин, спермін) регулюють ОДК через антизим, ПМГ може опосередковано пригнічувати ОДК, запускаючи опосередковану антизимом деградацію; 3) порушення конформації ферменту. Було показано, що ПМГ взаємодіє з білками таким чином, що денатурує або неправильно згортає їх. Якщо ПМГ зв'язується з ОДК, це може змінити його третинну структуру, що призведе до втрати ферментативної активності.

1.6. Епігенетичні механізми регуляції ОДК

Епігенетичні механізми, зокрема метилування ДНК та модифікації гістонів, мають значний вплив на експресію генів обміну ПА.

Метилування ДНК – це одна з найбільш загальних епігенетичних подій в геномі ссавців. Цей процес слугує для регуляції експресії генів та регуляції росту і диференціації клітин [115], [116], [117], [118]. Реакція метилування оборотна, причому процес метилування частіше активується за участі ферментів, тоді як деметилування може відбуватися як за допомогою ферментів, так і пасивно [119]. Метилування здійснюється за допомогою метилтрансфераз (Dnmt) Dnmt1, Dnmt3a та Dnmt3b, які переносять метильну групу з S-аденозил-L-метіоніну (SAM) до цитозину [120]. Dnmt1 забезпечує

конститутивне метилування, Dnmt3a та Dnmt3b – метилування *de novo*, причому Dnmt3b, головним чином, відповідає за метилування мікро- та мінісателітних повторів [120]. Як відбувається деметилування і які ферменти беруть участь в цьому процесі у ссавців, досі не відомо. Є кілька гіпотез щодо деметилування: пряме видалення 5-метилцитозину та видалення 5-метилцитозину шляхом модифікації основи цитозину.

Метилування забезпечує зберігання стабільності хромосом та структури хроматину, „заглушення” послідовностей ДНК, що повторюються, та захищає від реплікації вбудованої чужорідної ДНК [115], [121], [122]. У зв'язку з цим в геномах ссавців найбільш метиловані ті послідовності, що повторюються (сателіти, LINE, SINE, Alu та ін.), транспозони, провірусні копії та інші послідовності, що характерні для гетерохроматину. Також з метилуванням пов'язано формування профілю експресії деяких генів, характерного для певного виду клітин. Так, у нормі промоторні ділянки транскрипційно неактивних генів, онкогенів та імпрінтінгових генів гіперметиловані [123], [124].

Гіперметилування ДНК є одним з ключових епігеномних механізмів пригнічення експресії багатьох генів, у тому числі, генів – регуляторів клітинного циклу, репарації ДНК, апоптозу і ін. [125], [126], [127].

Метиловані динуклеотиди, головним чином, сконцентровані у CpG ділянках. У ссавців такі ділянки знаходяться більш ніж в 60% генів. Як правило, такі ділянки містять послідовність CCGCCC (сайт зв'язування для транскрипційного фактора SP1) [128]. Метилування ДНК може інгібувати експресію генів за допомогою двох незалежних механізмів: *перший* пов'язаний з фізичним блокуванням місць зв'язування транскрипційного фактора метильними групами; *другий* механізм забезпечується зв'язуванням метилованої ДНК з репресорами транскрипції MeCP1 та MeCP2 (метил-CpG зв'язуючими білками) і білковими комплексами на хроматині, які включають гістони, а також шляхом залучення HDAC та регулятора транскрипції Sin3A (Sin3A білок амфіпатичної спіралі, який містить важливі для білок-білкових

взаємодій домени і може бути посередником Mad-Max- репресії) і утворенням “закритої структури” хроматину [129], [130], [131], [132].

Механізм метилування ДНК представлений на рис. 1.2.2 [122].

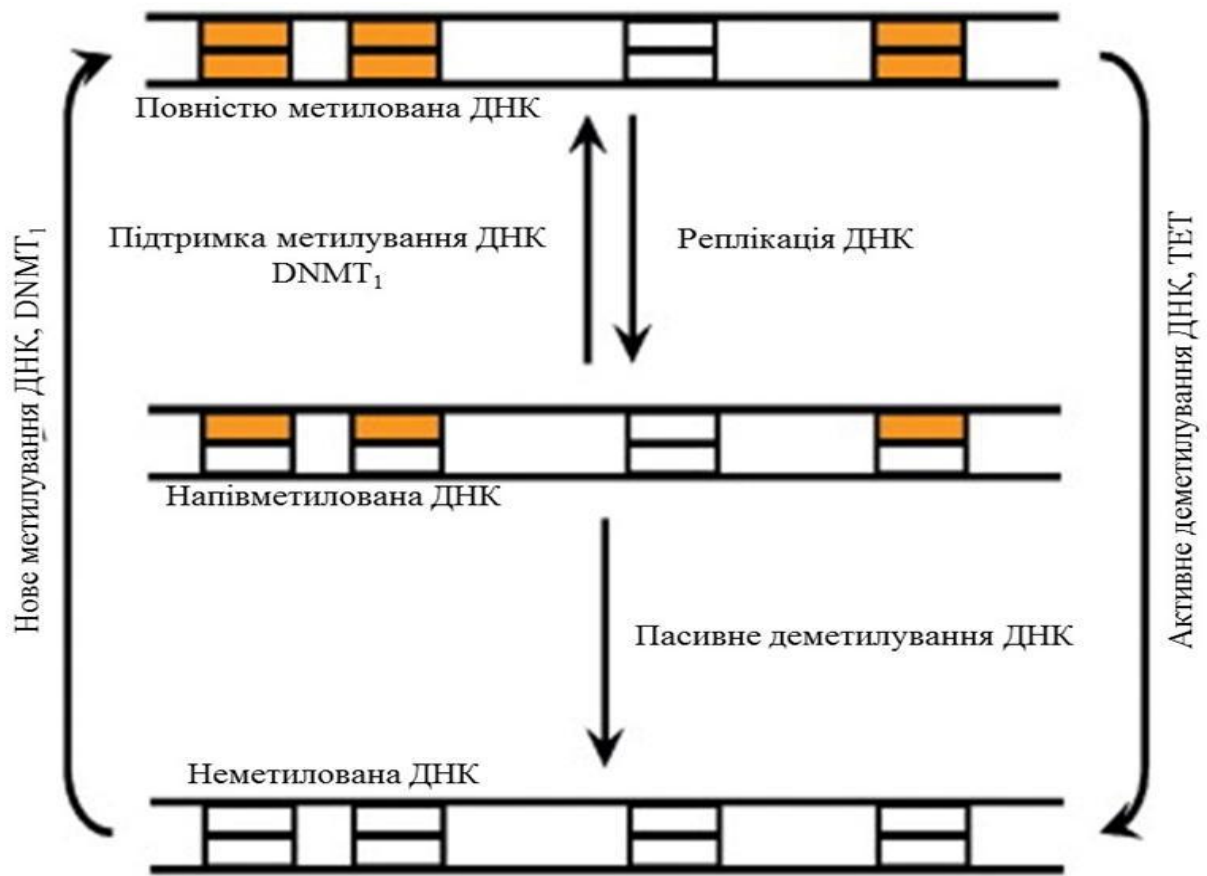


Рисунок 1.2.2 – Схема метилування ДНК (фермент метилтрансфераза (DNMT₁)) [121]

Метилування ДНК, яка містить неметиловані і повністю метиловані CpG-острівці, підтримується ферментом DNMT₁. Надалі рівень метилування підтримується під час реплікації ДНК.

Деметилування може бути пасивним або активним за участі фермента TET (ten eleven translocation enzyme).

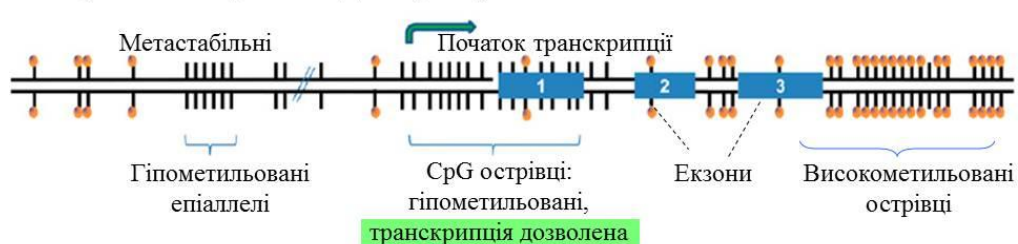
Вивченню процесу метилування ДНК, його значенню для активації генів, впливу на метилування режиму харчування, оточуючого середовища і зв'язку метилування з розвитком різних захворювань у людини присвячені численні роботи [133].

Відомо, що загальний рівень метилування генома знижується при пухлинній трансформації і, у той же час, по-різному змінюється рівень метилування окремих генів, які залучені до процесів проліферації, росту, диференціювання та апоптозу клітини [125], [126], [127], [132], [133], [134]. Механізм аберантного метилування при злоякісній трансформації досі остаточно не в'яснений. Ймовірно, що, поряд з активацією протоонкогенів і онкогенів, відбувається пригнічення експресії генів-супресорів пухлин, деметилування послідовностей, що повторюються, та транспозонів, що призводить до високої частоти рекомбінацій та порушення сегрегації хромосом [133], [134].

Схеми патернів метилування ДНК у різних типах генетичних локусів при нормальному стані і при пухлинній трансформації представлені на рис. 1.2.3 [134].

В нормальних тканинах CpG-острівці часто пов'язані з промоторними ділянками генів і вони, щоб забезпечити відповідне регулювання транскрипції, як правило, захищені від метилування. При злоякісній трансформації спостерігається дисрегуляція метилування ДНК і спотворені патерни. При цьому загальний рівень метилування ДНК знижується, але кількість певних генетичних центрів стає гіперметильованою. Специфічні локуси гіпометильованих і гіперметильованих зон можуть змінюватися у залежності від типу пухлин [132].

Патерни метилування ДНК у нормі



Патерни метилування ДНК у пухлинних клітинах



Рисунок 1.2.3 – Патерни метилування ДНК у різних типах генетичних локусів у нормі і у пухлинних клітинах. Примітки. Показана одна з секцій дволанцюгової ДНК. Кожна мітка представляє послідовність 5'-CpG-3'. Метиловані CpG позначені стовпчиками з кульками на кінці. Зелена стрілка вказує на початок активної транскрипції. Червоний хрестик відповідає гену, експресія якого пригнічена. Пронумеровані сині прямокутники відповідають екзонам (ділянки ДНК, копії яких складають зрілу РНК у процесі транскрипції і сплайсингу). Екзони розділені сегментами некодуючої ДНК (інтронами), які видаляються під час сплайсингу [134].

Нині інтенсивно вивчаються можливості регулювання процесів метилування/деметилування ДНК [135]. Метилування ДНК можна зменшити або заблокувати шляхом інгібування ферменту DNMT₁, який контролює цей процес. Блокування DNMT₁ може призводити до відновлення експресії «заглушених» генів [136], [137], [138]. При дослідженні метилування у злоякісних пухлинах мишей в якості інгібіторів DNMT₁ були застосовані децитабін (decitabine) і зебуларін (zebularine) [139]. Пригнічення DNMT₁

цими сполуками супроводжувалось гальмуванням росту пухлинних клітин, індукцією апоптозу, що призводило до зменшення об'єму пухлин [140], [141], [142], [143].

Регуляція активності ОДК відбувається як на посттрансляційному, так і на транскрипційному рівнях, у тому числі шляхом метилування промоторів генів, які кодують саму ОДК або її регулятори, гени прямої регуляції активності ОДК – *odc1*, *oaz1*, *azin1* та гени, які опосередковано впливають на активність ОДК через обмін ПА – *sat1*, *smox*, *amd1*.

Група генів прямої регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*). Ці гени безпосередньо контролюють рівень і стабільність ОДК – ферменту, що каталізує перетворення орнітину на путресцин – початковий етап синтезу ПА. Ген *odc1* (ornithine decarboxylase 1) – кодує сам фермент ОДК. Підвищена експресія *odc1* призводить до накопичення ПА, активації проліферації, інвазії та ангіогенезу в пухлинних клітинах. Гіпометилування промоторної ділянки гена зазвичай асоціюється з його надмірною транскрипцією. Ген *oaz1* (ornithine decarboxylase antizyme 1) – кодує антизим-1 (OAZ1), який є природним інгібітором ОДК. OAZ1 не лише пригнічує активність ферменту, але й сприяє його деградації через убіквітин-незалежний механізм. Підвищення експресії *oaz1* веде до зниження біосинтезу ПА. Ген *azin1* (antizyme inhibitor 1) – кодує білок, який структурно подібний до ОДК, але позбавлений каталізаторної активності. AZIN1 блокує дію антизиму OAZ1, стабілізуючи ОДК і відновлюючи її активність. Таким чином, експресія *azin1* опосередковано підвищує синтез ПА. Зміни метилування у промоторних ділянках цих генів можуть зумовити зсув рівноваги між інгібуванням та активацією ОДК, що критично впливає на темпи росту пухлини та її чутливість до терапії.

Група генів непрямої (опосередкованої) регуляції ОДК (*sat1*, *smox*, *amd1*) бере участь у катаболізмі ПА, регуляції рівня донорів метильних груп, а також у зворотному метаболічному контролі пулу ПА. Через зміну

внутрішньоклітинного рівня ПА ці гени здатні опосередковано впливати на активність ОДК, ключового ферменту у біосинтезі ПА.

Ген *sat1* (spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1) кодує фермент, що каталізує ацетилювання сперміну та спермідину, сприяючи їх подальшій екскреції або окисненню. Підвищення експресії *sat1* призводить до зниження рівня ПА. Це, в свою чергу, знімає зворотне інгібування ОДК, що в нормі гальмується високим рівнем ПА за принципом негативного зворотного зв'язку. Таким чином, при активації *sat1* можливе компенсаторне підвищення активності ОДК.

Ген *smox* (spermine oxidase) кодує фермент, що окиснює спермін до спермідину з утворенням перекису водню (H_2O_2) та інших реактивних форм кисню (ROS). Цей процес не тільки знижує рівень сперміну, але й викликає окислювальний стрес і ДНК-пошкодження, які можуть ініціювати сигнальні шляхи, пов'язані з апоптозом або зупинкою клітинного циклу. Зменшення рівня ПА унаслідок активності SMOX також сприяє активації ОДК як компенсаторної відповіді. Однак надмірна продукція ROS може викликати інгібування ферменту через окислювальні модифікації білків, що зменшує вплив SMOX.

Ген *amd1* (adenosylmethionine decarboxylase 1) забезпечує синтез декарбоксільованого S-аденозилметіоніну (dcSAM), який є донором амінопропільних груп для синтезу ПА. При зниженні активності AMD1 зменшується утворення сперміну та спермідину, що порушує баланс ПА. Як наслідок, через зниження ПА зменшується зворотне інгібування ОДК, і може спостерігатися компенсаторне підвищення активності ОДК. Водночас, недостатнє утворення dcSAM у разі зниження активності AMD1 ускладнює синтез ПА, оскільки порушується постачання ключового донору амінопропільних груп. Це призводить до загального пригнічення обміну ПА. Таким чином, *sat1*, *smox* і *amd1* регулюють активність ОДК через концентрації ПА (спермін, спермідин), які виконують функцію зворотного інгібітора ОДК. Зниження їхнього рівня знімає цей контроль, сприяючи

підвищенню активності ОДК, тоді як накопичення ПА, навпаки, гальмує транскрипцію й активність ферменту.

Таким чином, перша група генів (*odc1*, *oaz1*, *azin1*) формує основну вісь прямих регуляторних впливів на рівень та стабільність ОДК, тоді як друга група (*sat1*, *smox*, *amd1*) модулює обмін ПА через зміну концентрацій або деградацію ПА. Аналіз метилування цих генів дозволяє оцінити складну багаторівневу епігенетичну регуляцію гомеостазу ПА в умовах експериментальної терапії інгібіторами ОДК.

Також встановлено, що у ряді злоякісних новоутворень промоторна ділянка гена *odc1* демонструє гіпометилування, що корелює з його надекспресією. Гіперметилування гена *oaz1*, який кодує білок-антизим, призводить до втрати негативної регуляції ОДК. Інгібітори ОДК можуть впливати на епігенетичний статус клітини. ДФМО знижує рівень ПА і опосередковано впливає на метаболізм S-аденозилметіоніну, змінюючи донорський потенціал метильних груп для метилтрансфераз. МГБГ, як інгібітор AMD1, також змінює баланс SAM/dcSAM, що може впливати на глобальне метилування ДНК.

Деякі дослідження свідчать про взаємозв'язок обміну ПА з рівнем ацетилювання гістонів [144]. Це дозволяє припускати, що комбінована терапія з використанням інгібіторів ОДК та HDAC-інгібіторів потенційно може мати синергічну дію.

Багато досліджень спрямовані на краще розуміння механізмів, що сприяють епігеномним змінам, на вивчення змін епігеному, що сприяють злоякісній трансформації. Також досліджуються питання застосування епігенетичної терапії у онкологічних пацієнтів [118].

РЕЗЮМЕ

Орнітиндекарбоксилаза (ОДК, ЕС 4.1.1.17) є ключовим ферментом метаболізму ПА, що каталізує перетворення орнітину на путресцин – перший етап їх біосинтезу. ПА (путресцин, спермідин, спермін) забезпечують стабільність хроматину, регуляцію транскрипції та трансляції, проліферацію клітин, а також відіграють вагомую роль у регуляції апоптозу та антиоксидантного захисту. Підвищена активність ОДК є характерною ознакою багатьох злоякісних новоутворень і асоційована з агресивним перебігом пухлин, активацією ангиогенезу, формуванням імунодепресивного мікрооточення та розвитком резистентності до терапії, що робить цей фермент важливою мішенню для протипухлинного впливу.

Активність ОДК жорстко регулюється на кількох рівнях, зокрема транскрипційному через ключові фактори c-Мус, HIF-1 α і NF- κ B, посттранскрипційному за участю miRNA, посттрансляційному завдяки впливу антизиму OAZ1 та інгібітора антизиму AZIN1, сигнальному за участю шляхів PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK, Wnt/ β -catenin, JAK/STAT і NF- κ B, а також епігенетичному, що включає метилування промоторів генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox* і *amd1*.

Епігенетична регуляція, яка охоплює зміни метилування промоторних ділянок *odc1*, *oaz1*, *azin1* та генів обміну ПА (*sat1*, *smox*, *amd1*), є одним із ключових механізмів контролю активності ОДК при пухлинному рості. При цьому гіпометилування *odc1* та гіперметилування *oaz1* часто асоційовані з підвищеною активністю ОДК і агресивним фенотипом пухлин. Залучення епігенетичних механізмів у регуляцію ОДК та супутніх генів відкриває нові можливості для комбінованого лікування і персоналізованих схем терапії злоякісних пухлин.

Інгібітори ОДК, зокрема ДФМО, знижують пул ПА та сенсibiliзують пухлинні клітини до апоптозу, цитостатиків і променевої терапії, тоді як інші синтетичні інгібітори, такі як нораргінін, МГБГ і ПМГ, впливають на ОДК прямим або непрямим шляхом, модифікуючи метаболізм ПА, активність

регуляторних білків та епігенетичний статус генів. Перспективними є також нові агенти, зокрема AMXT-1501 та BENSpm, що демонструють обнадійливі результати в пре- та клінічних дослідженнях. Сучасні дані вказують на доцільність використання комбінованих схем інгібування ОДК з урахуванням епігенетичних особливостей пухлин, що може підвищити ефективність таргетної терапії та зменшити ризик розвитку адаптивної резистентності.

Таким чином, ОДК є важливою мішенню для протипухлинної терапії завдяки своїй ролі в синтезі ПА, які підтримують життєздатність та проліферацію пухлинних клітин, а інгібітори ОДК і стратегії, що націлені на регуляцію обміну ПА, особливо в поєднанні з епігенетичною модифікацією, відкривають широкі можливості для підвищення ефективності та персоналізації лікування злоякісних новоутворень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Експериментальні тварини

У дослідах використовували 60 білих нелінійних щурів лінії Wistar масою 100-120 г та 340 мишей (лінії C57Bl/6 і гібриди CDF1 і BDF1) розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Піддослідні тварини утримувались в віварії в пластикових клітках (не більше 10 тварин/клітку) на стандартній дієті з вільним доступом до води. Всі дослідження проводили згідно Міжнародних правил проведення робіт з експериментальними тваринами [145].

Дослідження проводили на тваринах з перещепленими модельними пухлинами – карциносаркомою Уокер щурів (W-256), карциномою легені Льюїс (КЛЛ) або лімфолейкозами L1210 і P388 (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1

Характер та об'єм проведених досліджень

Назва етапу дослідження	Лінія та стать експериментальних тварин	Характеристика групи	Кількість тварин в групі, n
1	2	3	4
Оцінка протипухлинної активності інгібіторів ОДК на моделі W-256	щури нелінійні	з перещепленим штамом W-256 (підшкірно суспензією окремих клітин 2×10^6 клітин/тварину), неліковані	Самиці – 9
		з перещепленим штамом W-256 5 разове введення: ПМГ (в/ч, по 5 мг/кг маси тіла, сумарна доза 25 мг/кг) через 2 дні після перещеплення.	Самиці – 8

Продовження таблиці 2.1.1

1	2	3	4
Оцінка протипухлинної активності інгібіторів ОДК на моделі КЛЛ	миші лінії C57Bl/6	з перещепленим штамом КЛЛ (в/м, в стегно, 3×10^5 клітин/мишу в об'ємі 0,2 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію), нелаковані.	Самиці – 12
		з перещепленим штамом КЛЛ 5 разове введення: нораргініну (в черевну порожнину (ч/п), по 60 мг/кг маси тіла, сумарна доза 300 мг/кг) починаючи з 7 дня після перещеплення, через день.	Самиці – 8
		з перещепленим штамом КЛЛ 5 разове введення: ДФМО (в/ч, по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза ДФМО – 4000 мг/кг) починаючи з 7 дня після перещеплення, через день.	Самиці – 8
		з перещепленим штамом КЛЛ 5 разове введення: ДФМО (в/ч, по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза 4000 мг/кг)+ нораргініну (в/ч, 60 мг/кг маси тіла, сумарна доза 300 мг/кг), починаючи з 7 дня після перещеплення, через день.	Самиці – 8

Продовження таблиці 2.1.1

1	2	3	4
		з перещепленим штамом КЛЛ 5 разово введення: ДФМО (в/ч, по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза 4000 мг/кг)+ нораргініну (в/ч, 60 мг/кг маси тіла, сумарна доза 300 мг/кг)+ МГБГ (в/ч, по 10 мг/кг маси тіла, сумарна доза 50 мг/кг), починаючи з 7 дня після перещеплення, через день.	Самиці – 8
Оцінка протипухлинної активності інгібіторів ОДК на моделі L1210	миши гібриди BDF1	з перещепленим штамом L1210 (в/ч, 5×10^5 клітин/мишу в об'ємі 0,2 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію), неліковані	Самці – 9
		з перещепленими клітинами L1210 6 разово введення: нораргініну (в/ч, по 40 мг/кг маси тіла, сумарна доза 240 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення, через день.	Самці – 8
		з перещепленими клітинами L1210 6 раз. введення: ДФМО (в/ч, по 800мг/кг маси тіла, сумарна доза 4800 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення пухлини, через день.	Самці – 8

Продовження таблиці 2.1.1

1	2	3	4
		з перещепленими клітинами L1210 6 разово введення: ДФМО (в/ч), по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза 4800 мг/кг)+ нораргінін (в/ч, 40 мг/кг маси тіла, сумарна доза 240 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення пухлини, через день.	Самці – 8
		з перещепленими клітинами L1210 6 разово введення: ДФМО (в/ч, по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза 4800 мг/кг)+ МГБГ (в/ч, по 10 мг/кг маси тіла, сумарна доза 60 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення пухлини, через день.	Самці – 8
		з перещепленими клітинами L1210 6 – разове введення: ДФМО (в/ч, по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза 4800 мг/кг)+ нораргініну (в/ч, 60 мг/кг маси тіла, сумарна доза 360 мг/кг)+ МГБГ (в/ч, по 10 мг/кг маси тіла, сумарна доза 60 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення пухлини, через день.	Самці – 8

Продовження таблиці 2.1.1

1	2	3	4
Оцінка протипухлинної активності інгібіторів ОДК на моделі L1210	миши гібриди BDF1	з перещепленими клітинами L1210 5 разове введення: ПМГ (в/ч, по 2 мг/кг маси тіла, сумарна доза 10 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення, через день.	Самці – 8
Оцінка протипухлинної активності інгібіторів ОДК на моделі P388	миши гібриди CDF1	з перещепленим штамом P388(в/ч, 5×10^5 клітин/мишу в об'ємі 0,2 мл стер. ізотонічного роз-ну хлориду натрію), нелаковані.	Самиці – 12
		з перещепленими штамом P388 5 разове введення: ДФМО (в/ч, по 800 мг/кг маси тіла, сумарна доза 4000 мг/кг)+ МГБГ (в/ч, по 10 мг/кг маси тіла, сумарна доза 50 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення, через день.	Самиці – 8
		з перещепленими клітинами P388 5 разове введення: ПМГ (в/ч, по 2 мг/кг маси тіла, сумарна доза 10 мг/кг), починаючи з 2 дня після перещеплення, через день.	Самиці – 8

2.2. Моделі пухлинного росту

У роботі було використано 3 експериментальні моделі пухлинного росту: КЛЛ, лімфолейкози L1210 та P388. Штами пухлинних клітин були одержані з Клітинного Банку ліній з тканин людини і тварин ІЄПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Карциносаркома Уокер 256 (W-256). Вперше цю пухлину виявив американський дослідник Джордж Уокер (George Walker) у 1928 році. Він спостерігав, як вона спонтанно виникла в ділянці молочної залози у вагітного щура-альбіноса. Для перещеплення пухлин, клітини W-256 вводили нелінійним щурам підшкірно суспензією окремих клітин 2×10^6 клітин/тварину в об'ємі 0,2 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію.

Карцинома легені Льюїс (КЛЛ) виникла спонтанно як карцинома легені у миші лінії C57Bl/6J у 1951 р. Перещеплюється внутрішньом'язево на 12-14 доби пухлинного росту. Метастазує гематогенно в легені практично в 100% випадків [146], [147]. Для перещеплення пухлин, клітини КЛЛ вводили мишам лінії C57Bl/6 внутрішньом'язево у стегно в кількості 4×10^5 клітин/мишу в об'ємі 0,2 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію.

Клітинні лінії P388 та L1210 були вперше створені шляхом індукції пухлини у самок мишей штаму DBA/2 за допомогою канцерогену 3-метилхолантрону. У 1954 році доктор L. Law із NCI виділив клітинну лінію L1210 [148]. У 1955 році NCI (через програму DTP) L1210 і модель P388 стали одними з перших стандартизованих *in vivo* моделей для широкомасштабного скринінгу потенційних протипухлинних агентів. Клітини лейкозу L1210 і P388 перещеплювали мишам в черевну порожнину по $4-5 \times 10^5$ клітин в 0,2 мл фізіологічного розчину.

Введення інгібіторів ОДК. Нораргінін – інгібітор аргінази – нораргінін (nor-NOHA - Nω-hydroxy-nor-Arginine, Cayman Chemical, USA)

вводили у дозі 60 мг/кг маси, сумарна доза 300 мг/кг маси (для мишей з КЛЛ) та у дозі 40 мг/кг маси, сумарна доза 240 мг/кг маси (для мишей з L1210), **α -дифторметилорнітин (ДФМО)** – в дозі 800 мг/кг маси, сумарна доза 4000 мг/кг маси для (мишей з КЛЛ та P388) та сумарна доза 4800 мг/кг маси (для мишей з L1210). **Метилглюксаль(біс)гуанілгідразон (МГБГ)** в дозі 10 мг/кг маси, сумарна доза 50 мг/кг маси (для мишей з КЛЛ та P388) та сумарна доза 60 мг/кг маси (для мишей з L1210). **Полігексаметиленгуанідин (ПМГ)** в дозі 2 мг/кг маси, сумарна доза 10 мг/кг маси (для мишей з L1210 та P388). Перед кожною ін'єкцією кожную тварину зважували і вираховували індивідуальну дозу препарату. Усі інгібітори готували безпосередньо перед використанням і одночасно вводили мишам в черевну порожнину починаючи з 7 доби після перещеплення КЛЛ (5-разово через добу) та з 2-ої доби після прещеплення L1210 і P388 (6-разово через добу). Контрольним тваринам вводили по 0,2 мл ізотонічного стерильного розчину натрію хлориду.

2.1. Методи експериментальної онкології

В кінці досліду тваринам проводили декапітацію під ефірним наркозом, вилучали пухлину через 26 діб (КЛЛ), видаляли макроскопічно видимі ділянки некрозу та геморагій, а решту пухлинної тканини використовували для біохімічних та імуноферментних досліджень. Для оцінки протипухлинної дії досліджуваних агентів проводили вимірювання розмірів пухлини по формулі Шрека [149]. У тварин з асцитними пухлинами клітини вимивали з черевної порожнини фізіологічним розчином і підраховували кількість пухлинних клітин в камері Горяєва через 10 діб у мишей з L1210 та через 7 діб у мишей з P388. Для кожної тварини визначали об'єм асциту та загальну кількість клітин в асциті.

Оцінка росту перещеплюваних пухлин.

Розміри пухлин у дослідних та контрольних тварин з КЛЛ вимірювали на 15-, 20-, 26-ту доби росту пухлин за допомогою штангенциркулю за найбільшим діаметрами пухлини. Об'єм пухлин (V , см^3) вираховували по

формулі Шрека [149]:

$$V = \pi abc / 6, \text{ мм}^3$$

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

Кількість та об'єм метастатичного ураження у тварин з КЛЛ визначали після умертвіння тварин за допомогою етилового ефіру на 26-й день після прищеплення пухлини. Тушку препарували, легені видаляли й поміщали в розчин фіксатору Буена (насичений водний розчин пікринової кислоти, нерозведений формалін, льодова оцтова кислота у співвідношенні 15:5:1. Далі підраховували кількість метастатичних вузлів в легенях та їх розміри за допомогою спеціальної лінійки під бінокулярною лупою. Об'єм метастатичного ураження (ОМУ) оцінювали за формулою:

$$V = \sum_{i=1}^n \frac{\pi d_i^3}{6}$$

де n_i – кількість метастазів діаметром d_i .

Критеріями оцінки протипухлинного ефекту були відсоток гальмування росту пухлин по об'єму пухлин у тварин з КЛЛ, або по кількості пухлинних клітин в асцитній рідині у тварин з асцитними формами пухлин (L1210 с Р388) на кінцеву добу досліджу.

2.3. Отримання зразків

Приготування зразків тканин/клітин.

Тканину/клітини гомогенізували у буферному розчині Гронова (для визначення активності РНказ методом зимограм), та в 50 мМ трис-фосфатном буфері (рН 7,5) (для визначення активності ОДК спектрофотометричним методом) 1:5 (вага/об'єм), гомогенат центрифугували при 1500 об/хв (5 хв). Усі процедури одержання екстрактів проводили на льоду. Концентрацію білка в отриманих екстрактах визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США).

Приготування клітинних екстрактів.

Для приготування клітинних екстрактів були використані розчини:

буфер TBS (10мМ Трис-НCl, рН 8,0, 150мМ NaCl); буфер PBS (9.1мМ двозаміщеного фосфату натрію, 1,7мМ однозаміщеного фосфату натрію, 150мМ NaCl, рН 7,4); буфер RIPA (буфер PBS, 1% детергенту „Нонідет Р-40” (Sigma-Aldrich, USA), 0,5% дезоксихолату натрію, 0,1% SDS (Sigma-Aldrich, USA)). До буферних розчинів безпосередньо перед використанням додавали інгібітори протеїназ: на 1г тканини – 30 мкл розчину PMSF (Sigma-Aldrich, USA) (вихідна концентрація 10 мг/мл); на 1 мл буферу RIPA – 10 мкл розчину ортованадату натрію (Sigma-Aldrich, USA), вихідна концентрація 100мМ. Всі маніпуляції виконували при температурі 40С. Для лізису клітин, тканину розморожували в буферному розчині, який містив інгібітори протеїназ (на 1 г тканини додавали 3 мл охолодженого буферу RIPA). Тканину розрізали на маленькі шматочки і гомогенізували у ножовому гомогенізаторі. Гомогенат інкубували при температурі – 40С протягом 30 хв. Надалі його центрифугували 10 хв. з прискоренням 10000g. Одержаний супернатант знову центрифугували за аналогічних умов. Супернатант, одержаний при останньому центрифугуванні, використовували як загальний клітинний лізат. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда при довжині хвилі 595нм при використанні спектрофотометра «Agilent Cary 8454 UV-Visible» (Agilent Technologies, USA).

Виділення ядер та приготування ядерних екстрактів.

Ядра виділяли з пухлинних клітин, як описано [150]. Клітини двічі промивали охолодженим буфером PBS (без іонів кальцію та магнію), який містив інгібітори протеїназ (0,5мМ дитіотрейтол, 0,5мМ PMSF, 10мкМ лейпептин (Sigma-Aldrich, USA). Надалі клітини ресуспендували в 1мл холодного гіпотонічного буферу RSB (10мМ NaCl, 3мМ MgCl₂, 10мМ трис, рН 7,4), який містив 0,5 % детергента NP-40 (Sigma-Aldrich, USA) та вищевказані інгібітори протеїназ. Після 15 хв. інкубації на льоду, клітини гомогенізували до їх лізису. Суміш центрифугували при 3000 об./хв. На протязі 5 хвилин. Осад промивали охолодженим розчином RSB та повторно

центрифугували. Чистоту одержаних ядер контролювали візуально під мікроскопом. Ядра ресуспендували у двох об'ємах буфера для екстракції (420мМ KCl, 20мМ MgCl₂, 0,2мМ EDTA (Sigma-Aldrich, USA), 20% гліцерину, 0,5мМ PMSF, 10мкМ лейпептин) і інкубували протягом 30 хв. на льоду.

2.4. Методи дослідження отриманих зразків

Визначення активності ОДК

Активність ОДК в пухлинних клітинах визначали за методикою [151] та оцінювали на багатофункціональному рідері для мікропланшета Synergy HT, модель SIAFRTD, (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) при довжині хвилі 426 нм.

Визначення активності РНКаз

Метод зимограм. Одержані екстракти досліджували методом ензимограм з застосуванням електрофорезу в 20% поліакриламідному гелі у системі Laemmli [152]. 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-НСl протягом 60 хв при 37° С та промивали 0,01 М трис-НСl протягом 10 хв і фарбували 0,2% розчином толуїдинового синього (Sigma-Aldrich, США) в 0,01 М трис-НСl протягом 20 хв. Гелі сканували за допомогою HP Scanjet 5590. Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

2.5. Визначення вмісту загального білка методом Бредфорда

Вміст загального білка в ядерних, клітинних екстрактах та гомогенатах визначали за методом Бредфорда [153]. Приготування реагента: 100 мг кумасі блакитного G-250 (Fluka, UK) розчиняли в 50 мл 95% етанолу, надалі додавали 100 мл 85% (маса/об'єм) розчину фосфорної кислоти; до одержаної суміші додавали дистильовану воду до кінцевого об'єму 1 л. До 100 мкл

зразка додавали 5 мл реагента, перемішували та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв.; надалі вимірювали оптичну густину зразка в 1-см кварцевій кюветі при довжині хвилі 595 нм. Вміст білка в зразках визначали за калібрувальним графіком, побудованим з використанням лізоциму (Sigma, USA) [153].

2.6. Визначення вмісту білків методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР)

Метод ППР було застосовано для вивчення вмісту білків p50, p65, rh-p65, ІкВ- α в ядрах та Bcl-xL, c-Мус, iNOS, Cox-2 в екстрактах клітин. Метод ППР застосовують у прецизійному аналізі сполук у хімічній, фармацевтичній, біотехнологічній і харчовій промисловості [154]. Необхідною умовою застосування методу ППР є іммобілізація одного з компонентів біоспецифічної взаємодії на платівці, покритій тонким шаром золота, експонованій у досліджуваній розчин. Аналіз відгуку біосенсора в динаміці (так званий «сенсограм») дозволяє кількісно вивчати специфічні взаємодії макромолекул без застосування будь-яких міток, що істотно спрощує проведення експериментів. Встановлено, що відгук біосенсора ППР прямо пропорційний поверхневій концентрації молекул, вираженої в одиницях маси на одиницю площі [155], [156]. Була використана нова модифікація, яка забезпечує ковалентну іммобілізацію білків на поверхні чіпів до вітчизняного спектрометра «Plasmon-5». Використаний підхід полягає у створенні на поверхні золота шару стабільного і незначного за молекулярною масою білка та наступній модифікації його глутаровим альдегідом - добре відомим крослінкером. Він легко утворює ковалентні зв'язки з первинними аміногрупами білків. А цим вимогам відповідає соєвий інгібітор трипсину.

Дослідження, в яких застосовували метод поверхневого плазмонного резонансу, проводили на спектрометрі ППР «Plasmon SPR-05», розробленому в Інституті фізики напівпровідників НАН України під керівництвом Ю.М.

Ширшова та використовували сенсорні платівки, виготовлені з кварцевого скла з напиленням на них близько 45 нм завтовшки шаром полікристалічного золота. Експерименти здійснювали в циліндричній кюветі з площею дна 19 мм² та висотою менше 0,5 мм. Дно кювети є сенсорною поверхнею з тонкою золотою плівкою, в якій відбувається явище поверхневого плазмонного резонансу. Всі експерименти було проведено за кімнатної температури та постійної швидкості руху розчину через кювету SPR-спектрометра (2,5 мл/год) з використанням буферного розчину «У» (10мМ Hepes (Sigma-Aldrich, USA), 150 mM NaCl, Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA), pH 7,2); 0,1М та 0,01М натрій ацетатних буферних розчинів (pH 5,5); 0,05М натрій-фосфатного буферного розчину (pH 7,2) та 15% глутарового альдегіду (Sigma-Aldrich, USA).

Перед імобілізацією білків поверхню сенсорних чіпів спектрометра SPR піддавали спеціальній модифікації, що складалась з наступних етапів:

1) формування мономолекулярного шару соєвий інгібітор трипсину SIT (Sigma-Aldrich, USA) на золотій плівці шляхом адсорбції цього білка з 0,5 мг/мл розчину в 0,1 М натрій-ацетатному буфері, pH 5,5 (тривалість 50-60 хв.); надалі кювету промивали цим же буфером протягом 10 хв.;

2) модифікація сформованого шару SIT 10% розчином глутарового альдегіду в 0,05 М натрій-фосфатному буфері, pH 7,3, протягом 30 хв. (рис. 2.3), з наступним промиванням кювети 0,01 М натрій-ацетатним буфером, pH 5,5, протягом 0,5-3,0 хв. до видалення глутарового альдегіду з кювети, яке контролювали за відгуком спектрометра SPR. Надалі проводили імобілізацію білка. Між першим та другим етапами, за необхідності, модифікацію золотої плівки переривали. Було продемонстровано, що зберігання сенсорних платівок із сформованим на них шаром SIT при кімнатній температурі, у фосфатному буферному розчині (pH 7,3, 0,02% азиду натрію (SA) (Sigma-Aldrich, USA), протягом 260 годин суттєво не погіршує ефективність наступної імобілізації білка. Бажаною є присутність SIT в буфері для зберігання платівок з адсорбованим SIT для запобігання можливій десорбції адсорбованого білка.

Для вивчення рівня експресії білків ОДК, p50, p65, ІкВ- α , Bcl-xL, c-Myc, iNOS і Cox-2 в екстрактах клітин нами була застосована наступна процедура:

1) на проміжний шар (див. попередній розділ) імобілізували моноклональні антитіла мишей проти досліджуваного білка (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 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 SPR вводили 0,1М розчин етанол аміну (Sigma-Aldrich, USA) в 0,05 М натрій-фосфатному буфері, pH 7,3 протягом 30 хв;

3) в кювету вводили ядерний (або клітинний) екстракт, який містив 50 мкг загального білка в буфері 10мМ HEPES (Sigma-Aldrich, USA), 150мМ NaCl, 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA).

При інтерпретації даних, одержаних методом ППР, вважали, що зміна величини кута SPR (відгук SPR) прямо пропорційна масовій поверхневій концентрації білка [155], [156]. Поверхневу концентрацію білків на поверхні сенсорних чіпів (нг/мм²) визначали за формулою:

$$\Gamma = \frac{\Delta\theta}{K(dn_s/dc)},$$

де $\Delta\theta$ - зміна кута SPR (у кутових секундах), K - константа перетворення (для спектрометра «Plasmon-5» було прийнято $K = 5300$), dn_s/dc - підвищення показника заломлення, який для різних білків можна вважати постійним - 0,188 см³/г [154], [156], [157], [158].

Дані ППР було обраховано за допомогою програми Origin 8.51 (OriginLab Corporation, USA) для чисельного аналізу даних і наукової графіки.

2.7. Аналітичний гель-електрофорез

Аналітичний гель-електрофорез білкових препаратів (ядерних та клітинних екстрактів), денатурованих за допомогою детергента SDS,

проводили за модифікованою методикою Laemmli [152]. Використовували такі буферні розчини: анодний буфер - 0,2М трис-HCl, pH 8,9; катодний буфер - 0,1М трис, 0,1М гліцин, pH 8,25; буфер для концентруючого гелю - 0,71М трис-HCl pH 6,45; буфер для розділяючого гелю - 1М трис-HCl pH 8,45, SDS 0,1%. Акриламід (12,5%) та метилен-біс-акриламід (0,6%) готували з запасного розчину Acril/Bis: solution 30% (Anachem, USA) (37,5:1). Смути білків забарвлювали Кумасі блакитним R-250 (Sigma-Aldrich, USA). Маркери молекулярної маси, min. 14,000 – max. 97,000 «LMW-SDS Marker Kit (GTE Healthcare Bio-Sciences, USA).

2.8. Вестерн-блот аналіз (імуноблотаналіз)

Для вивчення експресії білків ОДК, p50, p65, ph-p65, ІкВ- α , Bcl-xL, с-Мус, iNOS, Cox-2 було застосовано метод імуноблотінгу (Western blot), який проводили за раніше описаною методикою [159]. Після електрофорезу здійснювали електроперенос з поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану, Amersham Hybond PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) у наступній буферній системі: 48мМ трис; 39мМ гліцин; 0,037% SDS; 20% метанол (Sigma-Aldrich, USA). Електроперенос проводили протягом 2 годин при силі струму 0,8 мА на 1см² нітроцелюлозної мембрани. Після електропереносу мембрани переносили на 15 годин у PBS з 4% знежиреного сухого молока (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) при 22-24°C для блокування вільних місць зв'язування. Далі мембрани тричі промивали (по 5-7 хвилин) у 15-20 мл PBS з 0,05% Tween-20 і переносили на 4 години при 37°C у розчин моноклональних антитіл миші (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) проти досліджуваних білків, концентрація антитіл у PBS з 0,05% Tween-20 становила 0,2 мкг/мл. Після цього мембрани тричі відмивали у PBS з 0,05% Tween-20 і поміщали у розчин вторинних IgG кози проти антитіл миші, кон'югованих з пероксидазою хрину (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Реакція тривала 1,5 години. Після відмивання у PBS з 0,05% Tween-20 мембрану інкубували в системі детекції ECL (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,

USA) (0,125 мл кожного реагенту ECL на 1см мембрани). Після 2-хвилинної інкубації рентгенівську плівку («Foton», Ukraine) прикладали до мембрани. Експозиція тривала 2 хв. при кімнатній температурі. Після експонування плівку проявляли стандартним проявником та фіксували фіксажем. Отримані дані Вестерн-блотінгу були математично оброблені за допомогою програми для аналізу зображень високої якості TotalLab [160].

2.9. Виділення ДНК та аналіз метилювання генів ферментів регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox*, *amd1*) методом ПЛР в реальному часі (RT-PCR)

Виділення ДНК.

Геномна ДНК була виділена з зразків пухлин КЛЛ та клітин L1210 і P388 з використанням набору GenJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), згідно протоколу виробника. Отримані зразки ДНК були інкубовані з РНКазою А (Sigma-Aldrich, USA) (конц. 20 мкг/мл) протягом 30 хв. при 37°C та преципітовані двома об'ємами ізо-пропанолу з додаванням 0,1 об'єму ацетату натрію (3М, рН 6,8). Зразки інкубували при – 20°C протягом 20 хв. Центрифугували при швидкості 5000 об./хв. 15 хв. Тричі промивали 70% етанолом та розчиняли в деіонізованій H₂O. Концентрацію і чистоту ДНК вимірювали при поглинанні 260 и 280 нм за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). 8 мкл (2 – 5 мкг) ДНК денатурували при 100°C протягом 5 хв., потім інкубували 5 хв. на льоду. Додавали 2 мкл (1U/мкл) нуклеази P1 (Sigma-Aldrich, USA) та інкубували 16 год. при 37°C.

Рестрикція зразків ДНК.

Виділену ДНК обробляли з використанням набору EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Кожний зразок геномної ДНК був розділений на 4 проби. Кожна проба містила реакційний буфер (Sigma-Aldrich, USA). В першу пробу ферменти не вносили, друга містила метил-чутливу рестриктазу, третя – метил-залежну, а четверта комбінацію

обох ферментів. Кожна реакція проводилася в 25 мкл і містила 1 відносну одиницю активності ферменту. Реакційна суміш інкубувалася протягом 6 год. при 37°C, а потім 20 хв. при 65°C для інактивації ферменту рестрикції. Всі процедури виконувались згідно протоколу виробника.

Застосування методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR) у реальному часі.

Для визначення відносних кількостей метилованих ДНК 1 мкл кожної реакційної суміші після інкубації використовували для подальшої ампліфікації з відповідним праймером. Ампліфікацію проводили в 25 мкл в приладі Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR з використанням наборів EpiTect Метил qPCR (Qiagen, Valencia, CA, USA) для генів: *odc1* (CpG island location was Chr12: 17551379 – 17552234), *oaz1* (CpG island location was Chr10: 80288999 – 80289982), *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*, (CpG island location was Chr3: 135353847 – 135354599. Метод $\Delta\Delta C_t$ використовували для обчислення рівня метилування) [161].

Кожна проба, що була отримана на попередньому етапі, була проаналізована за допомогою методу кількісної PCR. Рестрикційна суміш містила SYBR® Green PCR Master Mix PCR (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) (13,75 мкл), зразок ДНК, одну з чотирьох проб, що були оброблені відповідними ферментами рестрикції (5 мкл), суміш праймерів для аналізу відповідного гену (1,1 мкл). Реакційна суміш доводилася до кінцевого об'єму 25 мкл.

PCR аналіз проводився за таких умов: 95°C – 10 хв., далі 40 циклів – 95°C – 15 с; 72°C – 1 хв. Крива плавлення для кожного амплікона була розрахована при температурному градієнті від 60 до 95°C з зростанням температури на 1°C кожні 10 с. Всі процедури виконувались згідно протоколу виробника [161].

Аналіз рівня метилування.

Для визначення рівня метилування обчислювали різницю між номером

циклу, в якому крива ампліфікації необробленого ферментами зразка (M_0) та номером циклу, в якому крива ампліфікації зразка, що оброблявся метил-залежною рестриктазою (M_d), перетинає порогове значення флуоресценції (ΔC_{td}). Метил-залежна рестриктаза розрізає тільки такі фрагменти ДНК, які містять метиловані цитозинові залишки (5mC), і, таким чином, кількість копій ДНК, що ампліфікується, зменшується, тобто зростання величини ΔC_{td} відображає зростання рівня метилування окремого локусу. Різниця між номером циклу, в якому крива ампліфікації необробленого ферментами зразка та номером циклу, в якому крива ампліфікації зразка, що оброблявся метил-чутливою рестриктазою (M_s), перетинає порогове значення флуоресценції (ΔC_{ts}) показує кількість неметилованих цитозинових залишків в промоторній ділянці гена, що аналізується. Враховують ще кількість ДНК, яка резистентна до дії ферментів рестрикції і залишається нерозрізаною після обробки двома ферментами (C_{sd}). Таким чином, величина ΔC_{td} демонструє рівень гіперметилованої ДНК, а величина ΔC_{ts} – неметилованої.

Копійованість ДНК пов'язана зі значенням порогового циклу, оскільки на кожному циклі кількість ДНК подвоюється. Таким чином можна розрахувати кількість ДНК, що була взята в реакцію:

$$C_{M_0} = 2^{-C_t(M_0)}, C_{M_s} = 2^{-C_t(M_s)}, C_{M_d} = 2^{-C_t(M_d)}, C_{M_{sd}} = 2^{-C_t(M_{sd})}$$

Відсоток гіперметилованої ДНК (НМ) розраховується по формулі:

$$F_{HM} = \frac{C_{M_s}}{C_{M_0} - C_{M_{sd}}}.$$

Відповідно, відсоток неметилованої фракції дорівнює:

$$F_{UM} = \frac{C_{M_d}}{C_{M_0} - C_{M_{sd}}}.$$

Оскільки сума метилованої та неметилованої ДНК менше 100%, існуює ще помірно метилована ДНК:

$$F_{IM} = 1 - F_{HM} - F_{UM}.$$

(Згідно протоколу SABiosciences MethylProfiler DNA Methylation qPCR Assay) [161].

2.10. Математична та статистична обробка результатів

Математичну обробку результатів ($M \pm m$) проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Розрахунки середнього значення досліджуваних показників (M) та середньої помилки середньої арифметичної (m) виконані за допомогою програмного забезпечення Prism Версії 8.0. Для оцінки рівнів значимості відмінностей середніх значень між групами застосовували t-критерій Ст'юдента [162].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою непараметричного U-критерію Mann-Whitney, а кореляційний аналіз (кореляція Спірмена) проводили за допомогою програмного забезпечення Prism Версії 8.0. Достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p < 0,05$) [163].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ОДК НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНЗИМУ В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ТА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН

3.1. Активність та вміст ОДК у клітинах експериментальних пухлин за дії синтетичних інгібіторів ензиму

Блокування активності ОДК як ключового ферменту синтезу путресцину з подальшим пригніченням біосинтезу ПА розглядається одним із перспективних напрямків у розробці нових підходів до лікування раку. На сьогодні з цією метою використовують сполуки-інгібітори ОДК, зокрема синтетичного походження. У нашій роботі використано ДФМО, нораргінін, МГБГ та ПМГ, які досліджувалися як при окремому введенні, так і в комбінаціях. Поєднане застосування інгібіторів визначалося особливостями їхніх механізмів дії: ДФМО, МГБГ та ПМГ належать до інгібіторів прямої дії, тоді як нораргінін опосередковано впливає на активність ОДК [59], [164]. У проведених дослідженнях проаналізовано вплив зазначених інгібіторів на рівні активності та вмісту ОДК у пухлинних клітинах W-256, КЛЛ, а також лімфолейкозів L1210 та P388.

Застосування ПМГ у монорежимі зумовило статистично значуще зниження вмісту ОДК в пухлинних клітинах W-256 у 1,4 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$) (рис. 3.1.1).

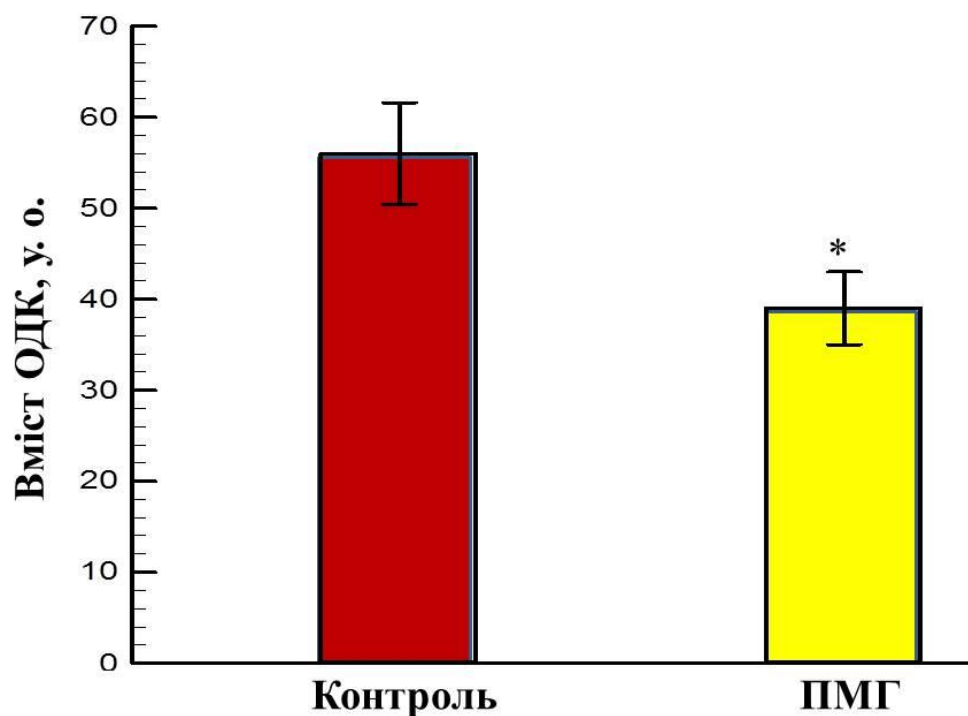


Рисунок 3.1.1 – Вміст ОДК в клітинах карциносаркоми Уокер щурів за дії інгібітору ензиму – ПМГ. Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Визначено, що у контрольній групі мишей з КЛЛ, які не отримували ін'єкцій, активність ОДК у пухлині становила $0,578 \pm 0,070$ у. о. (рис. 3.1.2). Під впливом нораргініну, специфічного інгібітора аргінази, що знижує утворення L-орнітину – основного субстрату ОДК, спостерігалися знижені показники активності ферменту – $0,508 \pm 0,046$ у. о., що відповідало 76% від контрольних значень, однак відмінність не досягала статичної достовірності. При застосуванні ДФМО, відомого як необоротний інгібітор ОДК, активність ферменту зменшувалася до $0,325 \pm 0,060$ у. о. ($p < 0,05$), що становило 60% від контрольних значень ($p < 0,05$). Найбільш виражений ефект спостерігався при поєднаному застосуванні ДФМО та нораргініну: активність ОДК знижувалася до $0,154 \pm 0,023$ у. о. ($p < 0,05$), або 27% від контрольних показників, що перевищувало сумарний ефект інгібіторів, введених окремо.

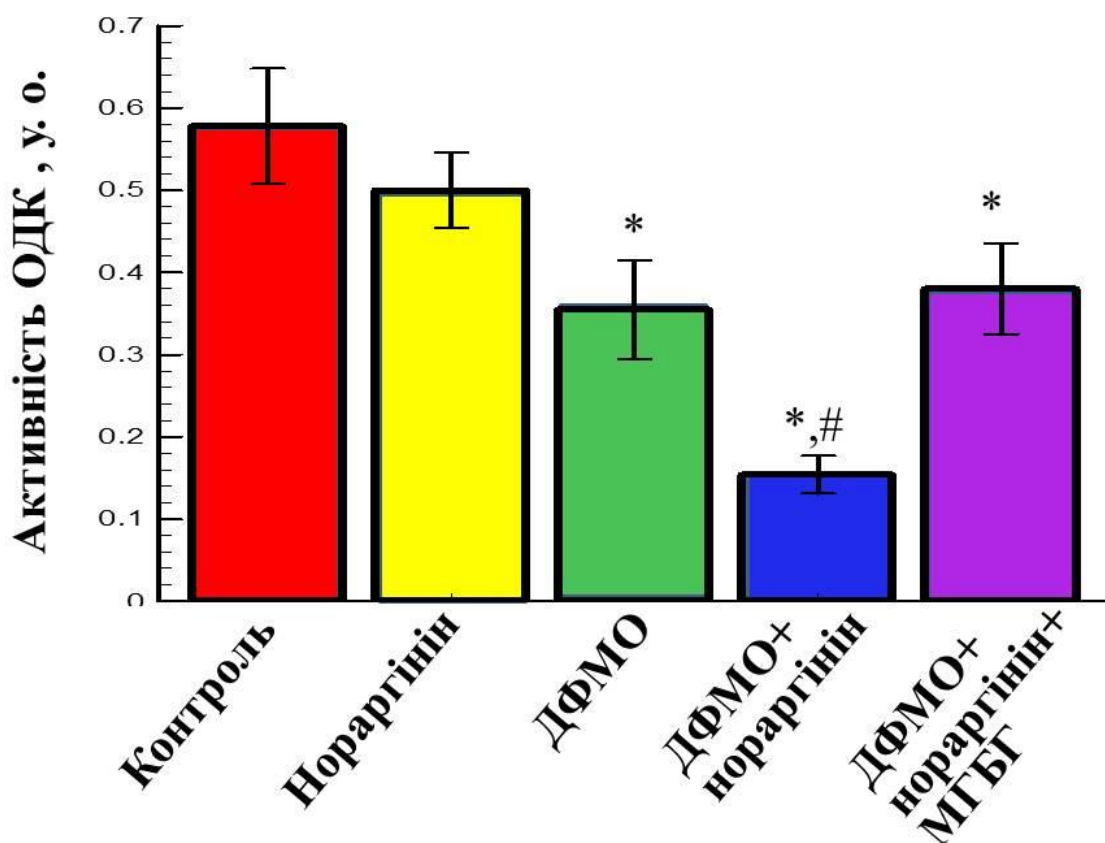


Рисунок 3.1.2 – Активність ОДК у клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ензиму. Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, # – $p < 0,05$ порівняно з іншими інгібіторами

Таким чином, дія обох інгібіторів взаємно підсилюється, що свідчить про синергічний ефект, який, імовірно, зумовлений відмінністю механізмів їхньої дії: норагінін та ДФМО впливають на різні ланки метаболізму ПА, взаємодоповнюючи один одного.

Додавання МГБГ до зазначених інгібіторів не призводило до додаткового посилення їхнього впливу на активність ОДК, яка становила $0,380 \pm 0,055$ у. о., або 66% від контрольних значень ($p < 0,05$). Такий результат, імовірно, зумовлений складною взаємодією між застосованими сполуками, зокрема впливом МГБГ на компенсаторні механізми клітин чи на рівень експресії інших ферментів, залучених до метаболізму ПА.

Загалом, найефективніше пригнічення активності ОДК у клітинах КЛЛ відзначалося при застосуванні ДФМО, а особливо – його комбінації з нораргініном. Додавання МГБГ до цієї схеми дещо знижувало ефективність інгібування ОДК, що вказує на необхідність подальших досліджень його впливу на регуляторні механізми метаболізму ПА.

Відомо, що регуляція активності ОДК здійснюється як на рівні синтезу, так і на рівні активації білка. У проведеному дослідженні було проаналізовано вміст ензиму в клітинах L1210 за дії синтетичних інгібіторів (рис. 3.1.3).

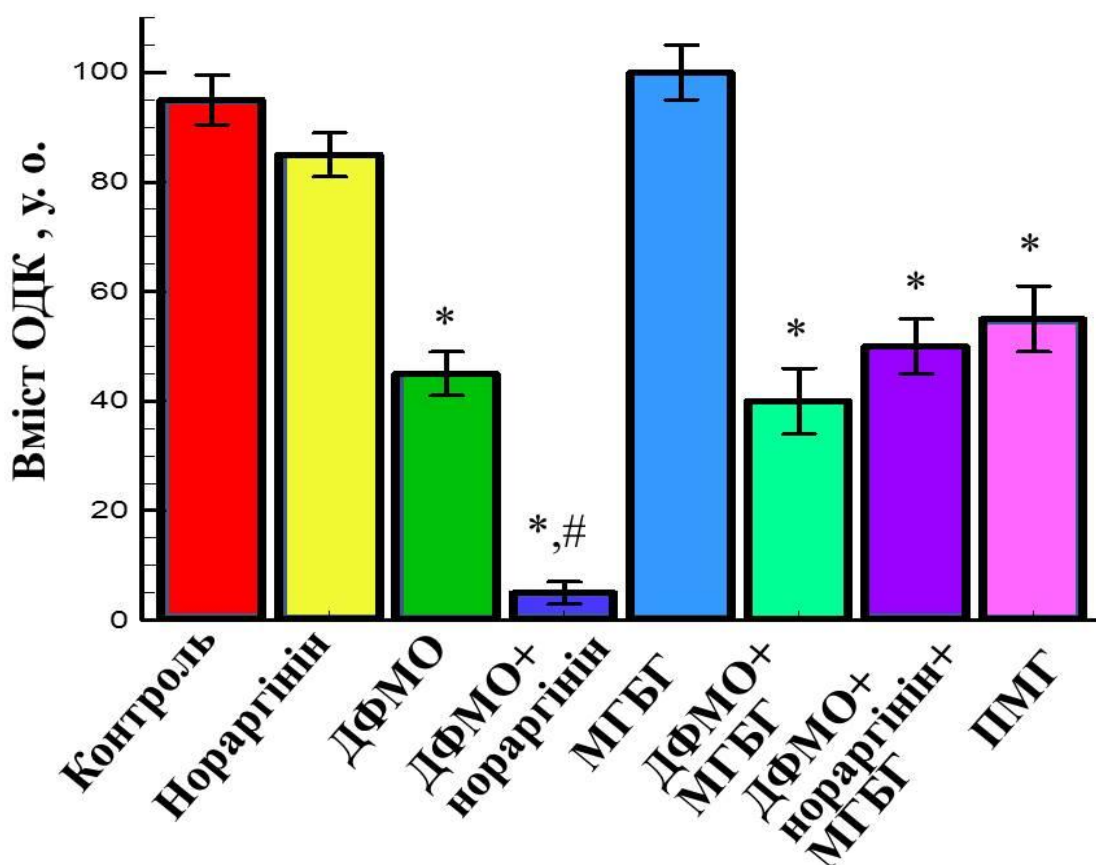


Рисунок 3.1.3 – Вміст ОДК у клітинах L1210 за дії інгібіторів ензиму. Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, # – $p < 0,05$ порівняно з іншими інгібіторами

У контрольній групі рівень ОДК становив $95 \pm 7,9$ у. о. Значно нижчі порівняно з контролем рівні вмісту білка у клітинах L1210 відмічено в усіх

експериментальних групах, окрім мишей, яким вводили нораргінін або МГБГ. При застосуванні ДФМО цей показник знижувався у 2 рази ($45,0 \pm 4,7$ у. о.; $p < 0,05$), при комбінованому введенні ДФМО з нораргініном – у 10 разів ($5,0 \pm 1,6$ у. о.; $p < 0,05$). Додавання МГБГ до цієї комбінації послаблювало ефект, і рівень ОДК становив $50,0 \pm 6,2$ у. о. Застосування ПМГ супроводжувалося зменшенням вмісту ензиму у 1,7 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$). Подібно до результатів, отриманих у КЛЛ щодо активності ОДК, у клітинах L1210 щодо вмісту ензиму, найвираженіший ефект спостерігався при поєднаному застосуванні ДФМО та нораргініну, що свідчить про синергічну дію цих сполук.

Досліджено рівні вмісту ОДК у клітинах лімфолейкозу P388, який, за даними літератури, характеризується високим ступенем агресивності, за умов дії інгібіторів ензиму (рис. 3.1.4).

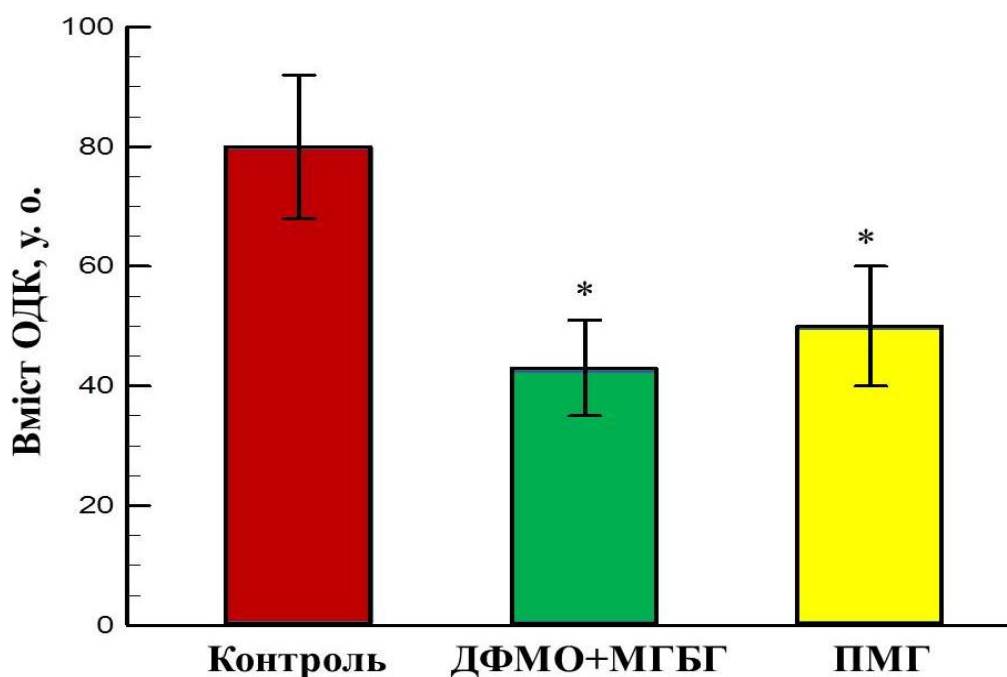


Рисунок 3.1.4 – Вміст ОДК в клітинах P388 за дії інгібіторів ензиму.

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

Показано, що у групі тварин, яким вводили ДФМО та МГБГ, рівень вмісту білка ОДК був знижений у 1,6 разу ($p < 0,05$), а в групі, яка отримувала ПМГ, – у 1,86 разу ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Таким чином, визначено, що найбільш ефективними щодо зменшення рівнів активності та вмісту ОДК у пухлинних клітинах виявилися наступні поєднання синтетичних інгібіторів ензиму: ДФМО та нораргініну, а також ДФМО у комбінації з нораргініном і МГБГ. За їх дії показники функціонального стану ензиму знижувалися у 2,5 – 10 разів відносно контролю ($p < 0,05$), тоді як за окремого застосування інгібіторів – лише у 0,15 – 2,2 разу ($p < 0,05$). Серед зазначених комбінацій найвищу ефективність щодо зниження активності та вмісту ОДК у пухлинних клітинах продемонстрував поєднаний вплив ДФМО та нораргініну ($p < 0,05$).

Поєднане застосування синтетичних інгібіторів ОДК забезпечує взаємне підсилення їхнього ефекту, тоді як окреме застосування не досягає подібного рівня пригнічення. Отримані результати свідчать про доцільність впровадження комбінованих схем інгібування ОДК, спрямованих на блокування метаболізму ПА, як перспективного підходу у таргетній терапії злоякісних новоутворень.

3.2. Вплив інгібіторів ОДК на ріст та прогресію солідних та асцитних експериментальних пухлин різного гістогенезу

Відомо, що високі рівні активності та вмісту ОДК пов'язані з прогресуванням пухлинного процесу, тоді як їх зниження за допомогою екзогенних інгібіторів може суттєво гальмувати ріст та метастазування пухлин. У зв'язку з цим у нашій роботі вивчено вплив синтетичних інгібіторів ОДК на ріст та метастазування експериментальних пухлин.

Зокрема, встановлено, що під впливом ПМГ маса пухлини W-256 знижувалася у 2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що свідчить про виражене гальмування пухлинного росту (рис. 3.2.1).

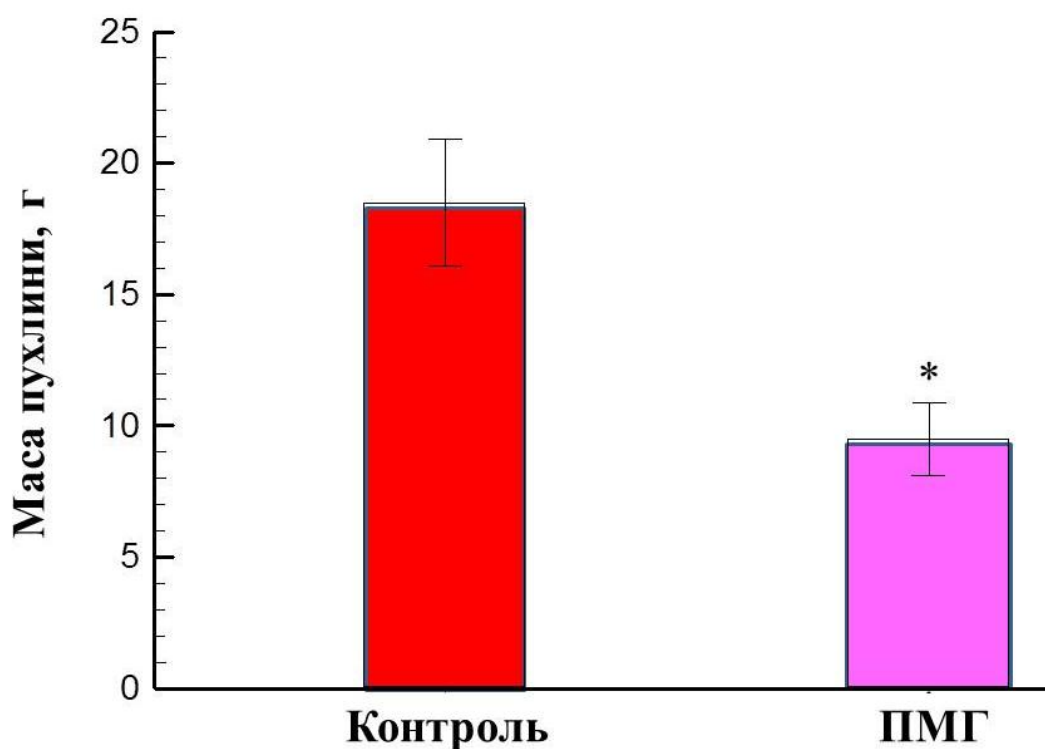


Рисунок 3.2.1 – Маса пухлини карциносаркоми Уокер у щурів за дії інгібітору ензиму ПМГ. Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Досліджено показники перебігу КЛЛ за умов діїДФМО, нораргініну, МГБГ та їхніх комбінацій. Результати наведені на рисунках 3.2.2, 3.2.3 та у таблицях 3.2.1, 3.2.2.

Виявлено, що всі досліджувані інгібітори, як у моновпливі, так і при поєднаному застосуванні, зумовлювали достовірне гальмування росту пухлин, яке проявлялося вже з 11-ї доби експерименту. При цьому, комбіноване введенняДФМО, нораргініну та МГБГ, хоча й поступалося за ефективністю окремим комбінаціям на 15 добу, демонструвало стабільний інгібуючий ефект, що зберігався до завершення досліду - 26-ї доби після щеплення пухлинними клітинами (рис. 3.2.2).

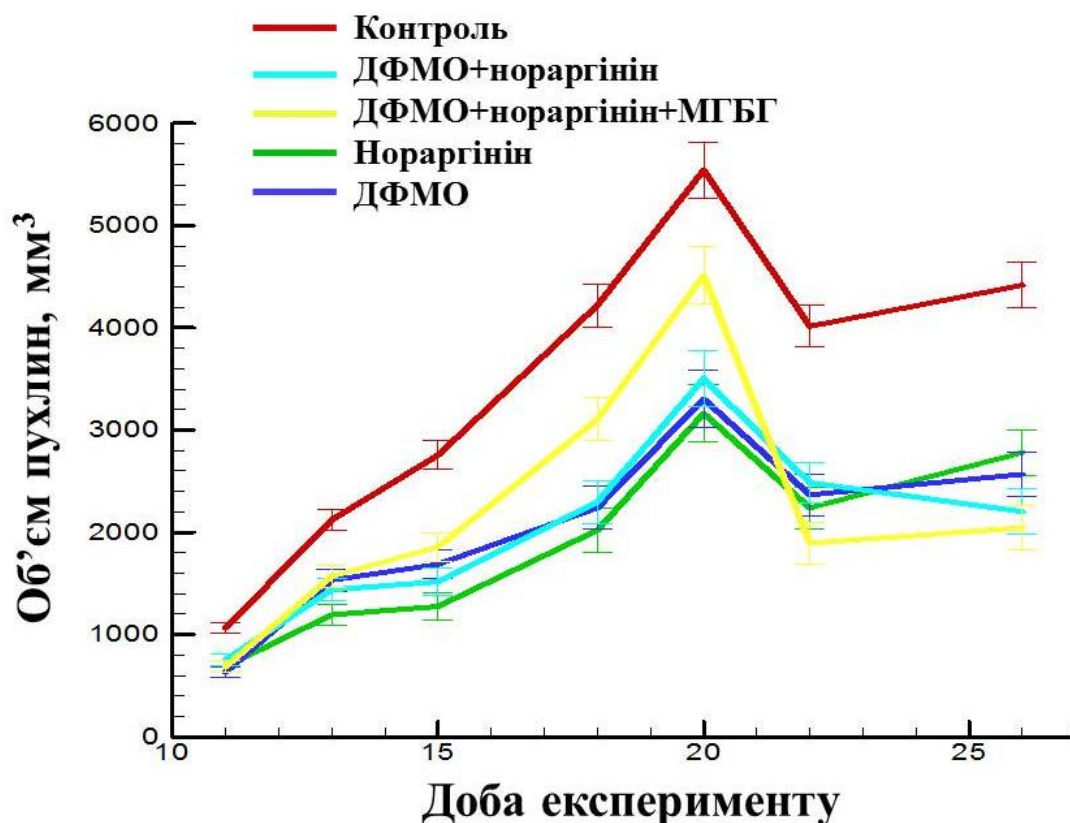


Рисунок 3.2.2 – Динаміка об'єму пухлини карциноми легені Льюїс у мишей за дії інгібіторів ОДК (ДФМО, нораргінін, комбінація ДФМО з нораргініном та ДФМО з нораргініном і МГБГ) у порівнянні з контролем.

На рисунку 3.2.3 показано, що на 15-у та 20-у добу після перещеплення пухлини найвищий протипухлинний ефект відзначався за дії нораргініну. У групі тварин, які отримували ДФМО, протягом усього періоду спостереження рівень гальмування росту КЛЛ залишався стабільним у межах 39-42%. На 26-ту добу експерименту максимальне пригнічення росту пухлин зафіксовано у групах комбінованого застосування інгібіторів: ДФМО з нораргініном (50%) та ДФМО з нораргініном і МГБГ (54%). Таким чином, ефект нораргініну знижувався від 15-ї до 26-ї доби, дія ДФМО залишалася сталою, тоді як поєднання ДФМО з нораргініном або з нораргініном та МГБГ забезпечувало найвираженіше гальмування росту КЛЛ на момент завершення експерименту (26 доба).

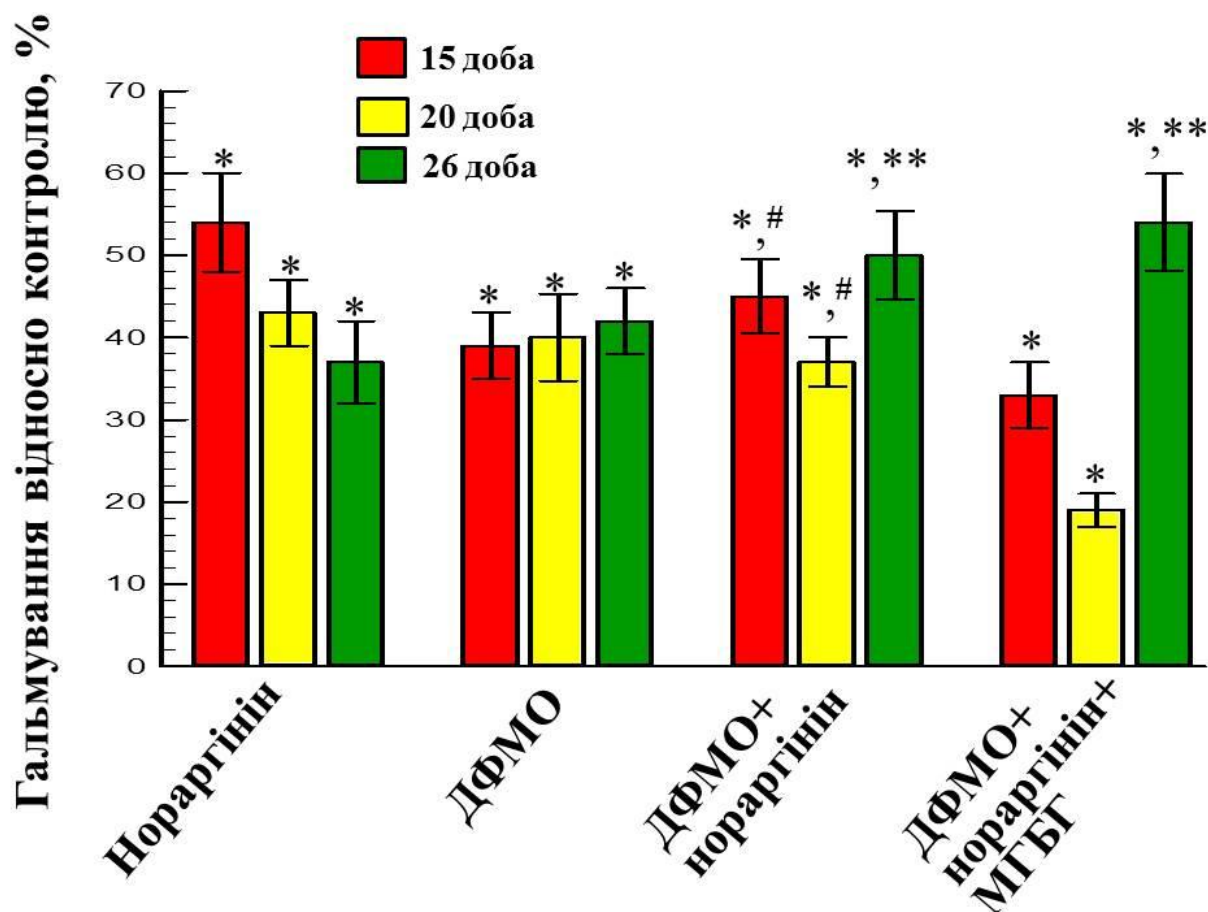


Рисунок 3.2.3 – Гальмування росту КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
 Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з іншими інгібіторами; # – $p < 0,05$ порівняно з ДФМО з нораргініном та МГБГ

Однак, як видно з таблиці 3.2.1, лише за умови поєднаного застосування ДФМО з нораргініном відмічалася достовірне зменшення об'єму пухлин порівняно з контролем на кожному етапі спостереження. Це свідчить про стабільний протипухлинний ефект даної комбінації, який корелює з високоефективним пригніченням активності ОДК у клітинах КЛЛ (див. підрозділ 3.1).

Таблиця 3.2.1

Об'єм карциноми легені Льюїс за дії інгібіторів ОДК

Групи	Об'єм пухлин, мм ³			Гальмування росту пухлини, %		
	Доба			Доба		
	15	20	26	15	20	26
Контроль	2756±308	5542±439	4418±1689	-	-	-
Нораргінін	1276±227*	3163±662*	2781±864	54	43	37
ДФМО	1688±178*	3305±461*	2569±988	39	40	42
ДФМО+нораргінін	1517±149*	3504±281*	2103±598*	45	37	50
ДФМО+нораргінін +МГБГ	1858±292	4514±329	2045±1342	33	19	54

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

Ймовірно, за поєднаного впливу ДФМО та нораргініну реалізується подвійний механізм блокади обміну ПА: з одного боку – шляхом зменшення утворення орнітину як субстрату, з іншого – через пригнічення декарбоксилювання залишкового орнітину. Враховуючи роль МГБГ як інгібітора S-аденозилметіонтрансферази, можна припустити, що його додатковий ефект опосередковується через зміни у метилуванні промоторних ділянок генів, залучених до пухлинної прогресії. Важливо відмітити, що реалізація кількох механізмів дії на функціональний стан ОДК може мати часову динаміку, результатом чого стає максимальне гальмування росту КЛЛ при поєднаному застосуванні ДФМО з нораргініном, а також ДФМО з нораргініном та МГБГ на 26 добу експерименту порівняно з 15-ю та 20-ю добами.

Досліджено вплив застосованих інгібіторів ОДК на кількість та об'єм метастазів у легенях мишей із перещепленою КЛЛ (табл. 3.2.2).

Таблиця 3.2.2

Метастазування карциноми легені Льюїс за дії інгібіторів ОДК**

Групи	Середня кількість метастазів, п	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*

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем. ** – показники на 26-ту добу росту пухлини

Як видно, ані окреме, ані комбіноване застосування інгібіторів не вплинуло на кількість метастазів у мишей з КЛЛ. Нораргінін не виявив дії також і на об'єм метастазів. Натомість при застосуванні ДФМО окремо, у поєднанні з нораргініном, а також комбінації ДФМО з нораргініном та МГБГ спостерігається достовірне й багаторазове зменшення об'ємів метастазів. 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'ємів метастазів КЛЛ.

Визначено протипухлинний вплив досліджуваних інгібіторів на моделях лімфолейкозів L1210 та P388. Як показник перебігу пухлинного

процесу використано кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей (табл. 3.2.3).

Моновплив нораргініну, ДФМО та МГБГ супроводжувався зменшенням кількості пухлинних клітин у мишей з L1210 у 1,12; 1,8 та 1,5 разу, відповідно ($p < 0,05$), що відповідало гальмуванню росту на 11%, 45% та 33% (табл. 3.2.3 та рис. 3.2.3).

Таблиця 3.2.3

Кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з лімфолейкозом L1210 за дії синтетичних інгібіторів ОДК**

Групи	Кількість клітин L1210, $\times 10^8$	Гальмування (%)
Контроль	$11,94 \pm 1,0$	-
Нораргінін	$10,67 \pm 1,0$	11
ДФМО	$6,6 \pm 1,2^{*,\#}$	45
ДФМО+ нораргінін	$6,13 \pm 0,6^{*,\#}$	49
МГБГ	$8,04 \pm 1,7^*$	33
ДФМО+МГБГ	$5,3 \pm 1,2^{*,\#}$	55
ДФМО+нораргінін+МГБГ	$7,13 \pm 0,8^*$	40
ПМГ	$8,45 \pm 1,1^*$	32

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, $^{\#}$ – $p < 0,05$, ** – показники на 10-ту добу після перещеплення)

Комбіноване застосування інгібіторів достовірно посилювало їхній протипухлинний ефект. Так, поєднане застосування ДФМО з нораргініном призводило до зменшення кількості пухлинних клітин у 2 рази ($p < 0,05$), що відповідає 49% гальмування росту. Найбільш виражене пригнічення пухлинного процесу спостерігалось при застосуванні ДФМО, його комбінації з нораргініном та поєднанні ДФМО з МГБГ. В останньому випадку кількість

клітин L1210 зменшувалася у 2,3 разу ($p<0,05$), що відповідає 55% гальмування пухлинного росту – найвищому показнику серед досліджених інгібіторів (рис. 3.2.4).

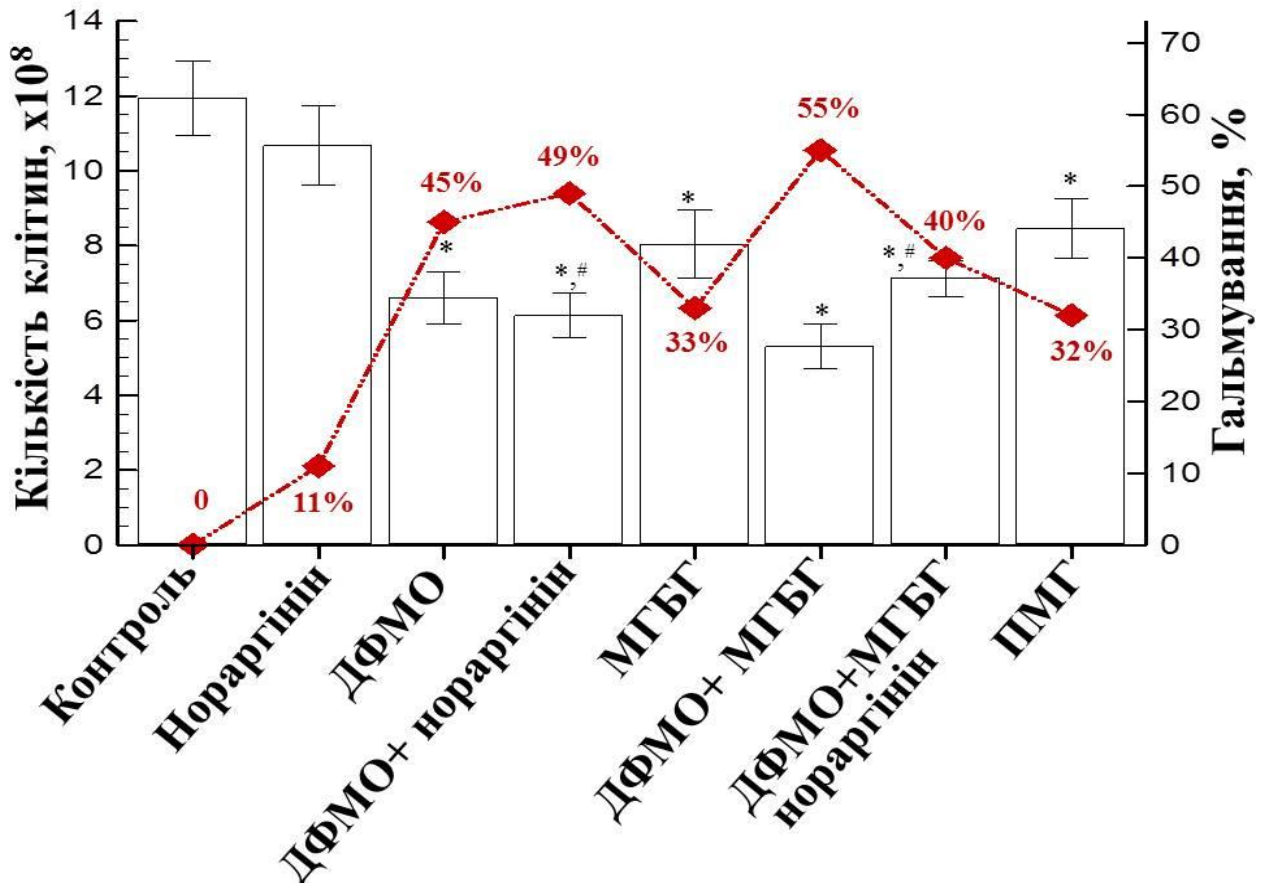


Рисунок 3.2.4 – Кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з лімфолейкозом L1210 за дії синтетичних інгібіторів ОДК. Примітки. * – $p<0,05$ порівняно з контролем; # – $p<0,05$ порівняно з нораргініном, МГБГ та ПМГ

У мишей з лімфолейкозом Р388 за дії комбінації ДФМО з МГБГ, а також при окремому застосуванні ПМГ було відзначено зниження кількості пухлинних клітин порівняно з контролем – відповідно у 1,3 та у 1,2 разу ($p<0,05$), що відповідало 27% і 18% гальмування пухлинного росту (рис. 3.2.5).

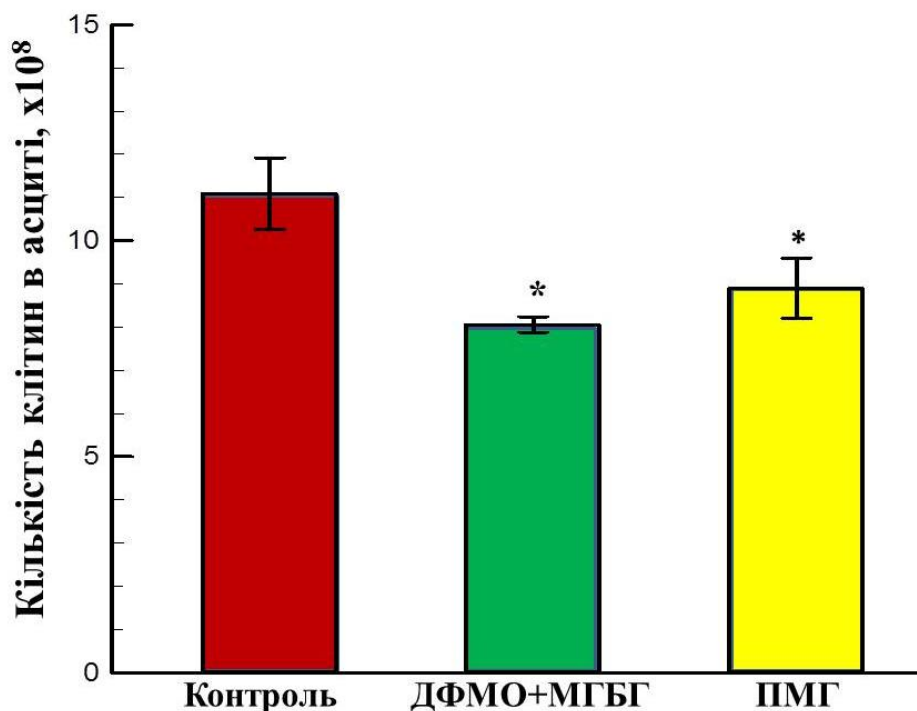


Рисунок 3.2.5 – Кількість пухлинних клітин в асцитній рідині у мишей з лімфолейкозом Р388 за дії синтетичних інгібіторів ОДК. Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Імовірно, механізм поєднаної дії ДФМО (прямого інгібітора ОДК) та МГБГ (інгібітора S-аденозилметіоніндекарбоксилази) реалізується не лише через безпосереднє пригнічення біосинтезу ПА, а й шляхом впливу на епігенетичну регуляцію промоторів онкогенних генів, пов'язаних із проліферацією. Як видно з рисунків 3.1.3. та 3.2.4, незначний вплив застосованих інгібіторів на вміст ОДК в клітинах Р388 асоційований із їхнім незначним протипухлинним ефектом (порівняно з дією комплексу інгібіторів ДФМО та нораргініну на КЛЛ та L1210 ($p < 0,05$)).

Таким чином, найвищою протипухлинною ефективністю відзначалися такі комбінації досліджуваних інгібіторів ОДК, зокрема сумісне застосування ДФМО з нораргініном, ДФМО з МГБГ. За їх дії показники прогресування КЛЛ та лімфолейкозів L1210 і Р388 знижувалися у 2 – 18 разів порівняно з контролем ($p < 0,05$), тоді як при застосуванні інгібіторів окремо – лише у 1,4

– 1,8 разу. При цьому низькі рівні активності ОДК у пухлинних клітинах асоціювалися з уповільненим прогресуванням пухлинного процесу ($p < 0,05$).

Кореляційний аналіз показав наявність тісних прямих позитивних залежностей між активністю та вмістом ОДК і показниками пухлинної прогресії за дії синтетичних інгібіторів ензиму (рис. 3.2.6 – 3.2.10).

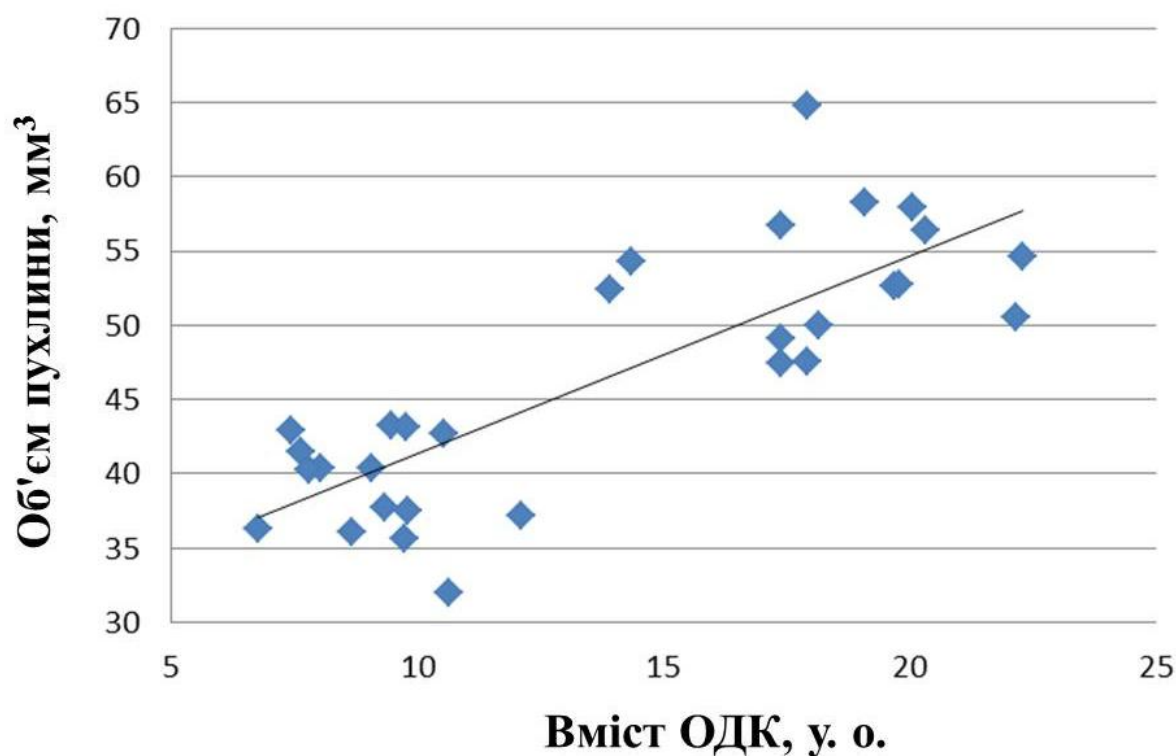


Рисунок 3.2.6 – Вміст ОДК в клітинах W-256 та об'єм пухлини W-256 за дії ПМГ ($r=0,82$; $p < 0,05$)

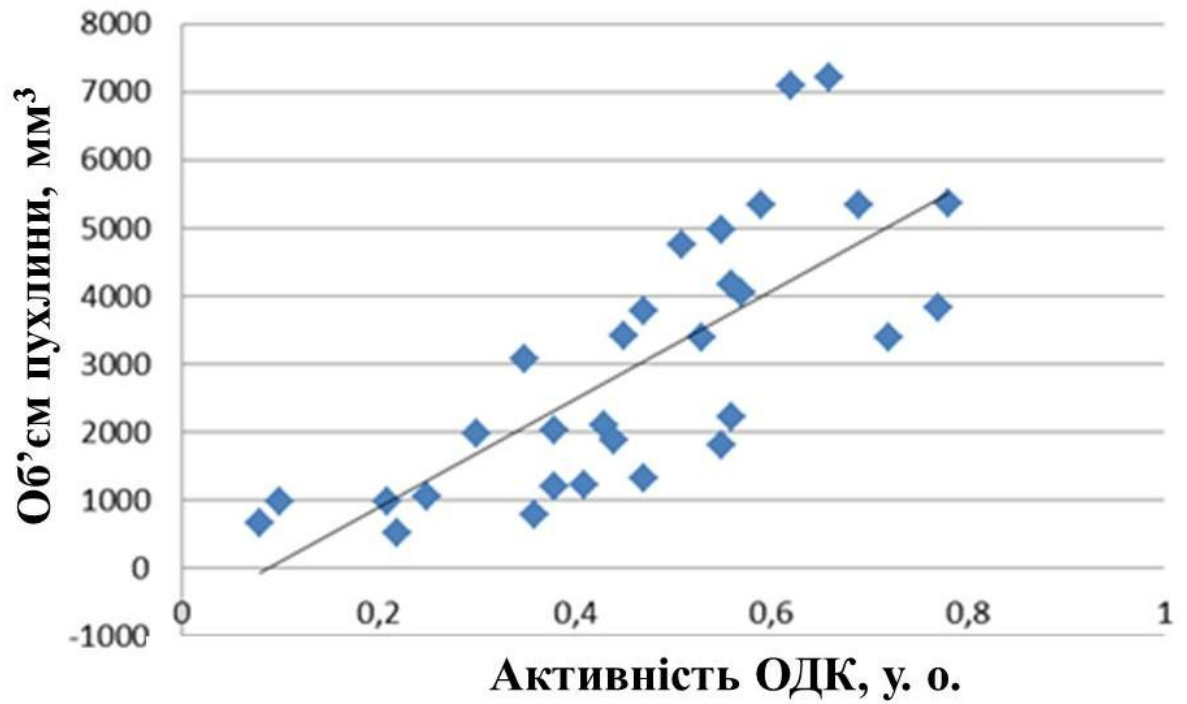


Рисунок 3.2.7 – Активність ОДК в КЛЛ та об'єм пухлин за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,76$; $p<0,05$)

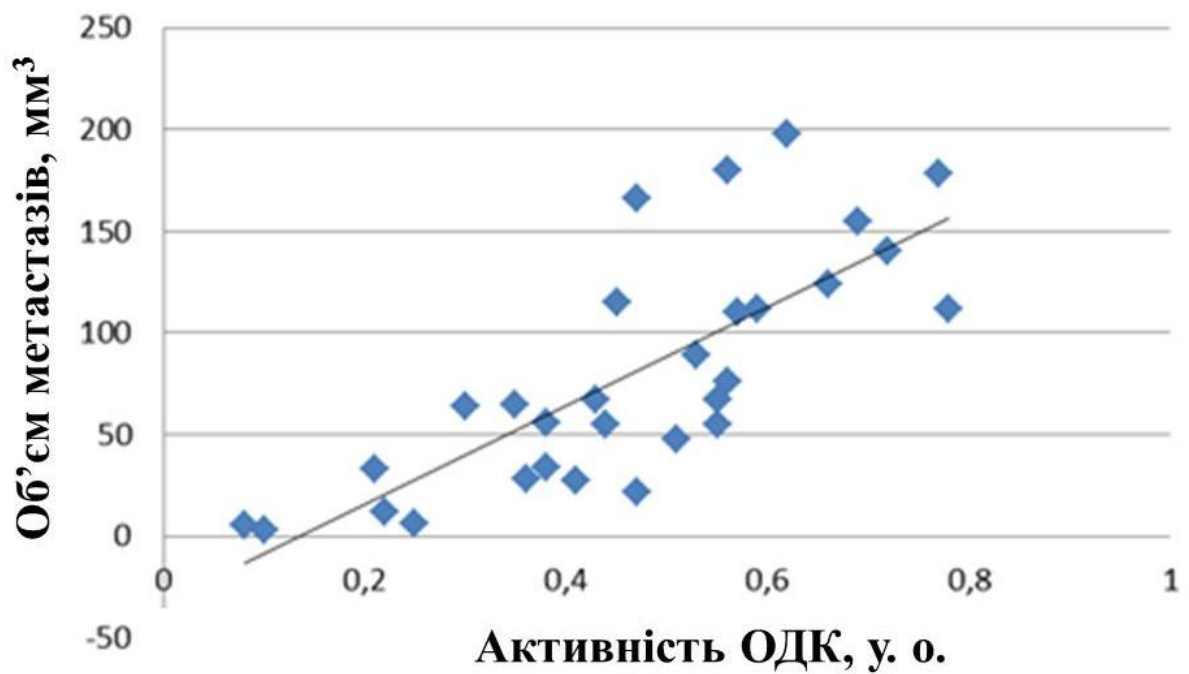


Рисунок 3.2.8 – Активність ОДК в КЛЛ та об'єм метастазів за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,77$; $p<0,05$)

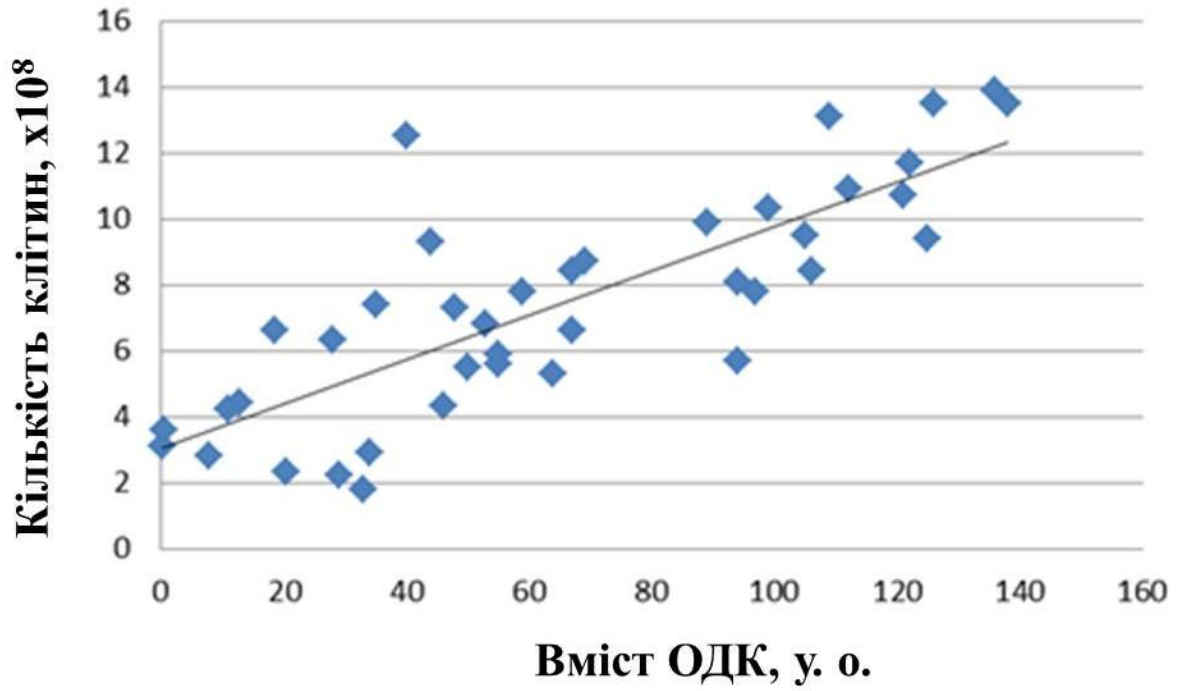


Рисунок 3.2.9 – Вміст ОДК в клітинах L1210 та кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,81$; $p<0,05$)

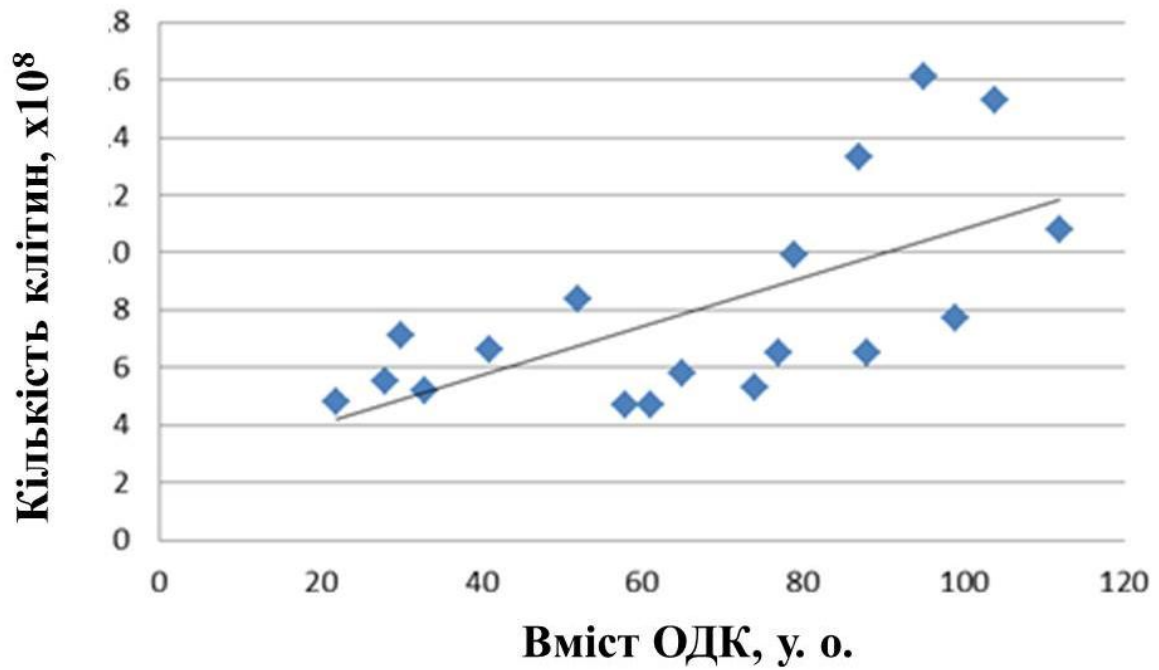


Рисунок 3.2.10 – Вміст ОДК в клітинах P388 та кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей за дії синтетичних інгібіторів ензиму ($r=0,65$; $p<0,05$)

Показано, що за дії синтетичних інгібіторів ензиму об'єм пухлини та метастазів достовірно корелює з активністю ОДК у клітинах КЛЛ (відповідно $r=0,76$ та $r=0,77$; $p<0,05$). Водночас об'єм пухлини (W-256) та кількість пухлинних клітин в асцитній рідині (L1210 і P388) вірогідно корелюють із вмістом ОДК у пухлинних клітинах (відповідно $r=0,82$, $r=0,81$ та $r=0,65$; $p<0,05$).

Отримані результати свідчать, що протипухлинний ефект застосованих інгібіторів ОДК реалізується через механізми, пов'язані зі зниженням функціонального стану ензиму, зокрема його активності та вмісту в пухлинних клітинах.

Підсумки. Синтетичні інгібітори ОДК ефективно знижують активність і вміст ензиму в пухлинних клітинах, що супроводжується гальмуванням росту та метастазування експериментальних пухлин. Найбільш виражений ефект спостерігався за сумісної дії ДФМО та нораргініну, де активність ОДК у клітинах карциноми легені Льюїс зменшувалася до 27% від контролю, а вміст білка в клітинах L1210 – у 10 разів ($p<0,05$).

Поєднане застосування інгібіторів демонструє синергічну дію: подвійні та потрійні комбінації (ДФМО з нораргініном, ДФМО з нораргініном та МГБГ) знижували показники функціонального стану ОДК у 2,5–10 разів, тоді як окреме введення препаратів – у 0,15–2,2 рази ($p<0,05$).

Протипухлинний ефект інгібіторів ОДК на моделях W-256, КЛЛ, L1210 і P388 підтверджує роль ОДК як ключової терапевтичної мішені. Поєднання ДФМО з нораргініном та ДФМО з МГБГ забезпечувало гальмування росту пухлин у 2–18 разів ($p<0,05$) та супроводжувалося зниженням кількості пухлинних клітин у асциті на 45–55% ($p<0,05$).

Антиметастатична дія інгібіторів ОДК зумовлена зменшенням об'єму, але не кількості метастазів. ДФМО, окремо та в комбінаціях, зменшував середній об'єм метастазів КЛЛ у легенях у 13–22 рази ($p<0,05$), що вказує на його вплив переважно на проліферацію пухлинних клітин, а не на процеси дисемінації.

Кореляційний аналіз виявив тісний позитивний зв'язок між функціональним станом ОДК та показниками пухлинної прогресії – об'єм пухлини (W-256, КЛЛ) та метастазів (КЛЛ), кількість пухлинних клітин в асциті (L1210 і P388) корелювала з активністю та вмістом ОДК в пухлинних клітинах (відповідно $r=0,82$, $r=0,76$, $r=0,77$, $r=0,81$ та $r=0,65$; $p<0,05$).

Результати досліджень, що описані в розділі 3, опубліковані у [165], [166], [167], [168], [169].

РОЗДІЛ 4

ВМІСТ БІЛКІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ ОДК, У ТКАНИНІ СОЛІДНИХ ТА АСЦИТНИХ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ ПУХЛИН ЗА УМОВ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ ОДК

Як було зазначено в підрозділі 1.4.4 огляду літератури, ОДК є не лише ключовим ферментом біосинтезу ПА, а й важливою ланкою сигнальних каскадів, що координують такі критичні для пухлинного процесу явища, як проліферація, апоптоз, стресова відповідь і трансформація клітини. Її функціональний стан визначається не лише рівнем транскрипції *odc1*, а й стабільністю молекулярної структури ОДК, що, в свою чергу, контролюється через активність низки сигнальних білків і транскрипційних факторів. У межах цього дослідження особливу увагу було приділено таким складовим шляхів регуляції ОДК, як білки фактора транскрипції NF-κB (p50/p65) – універсального медіатора сигнальної відповіді, що прямо або опосередковано впливає на функціональність *odc1*, а також сприяє виживанню пухлинних клітин; c-Myc – основний регулятор транскрипції *odc1* [16]; Bcl-xL – антиапоптотичний білок, що функціонує в одному сигнальному модулі з NF-κB та ПА; p53 – фактор стресової відповіді, здатний пригнічувати обмін ПА і опосередковувати деградацію молекули ОДК, а також РНКазі, які здійснюють посттранскрипційний контроль і виступають кінцевими ефекторами деградаційних каскадів, активація яких відображає глибину стресової відповіді клітини на метаболічні порушення, включно із деривацією ПА [54]. Вибір для дослідження саме цих сигнальних білків зумовлений їхньою доведеною участю в модуляції активності ОДК та експресії гена *odc1*. З цією метою спочатку було досліджено вміст білків фактора транскрипції NF-κB у клітинах W-256 під впливом ПМГ. Для оцінки як універсальних, так і модель-специфічних механізмів екзогенної регуляції ОДК за поєднаної дії інгібіторів ДФМО та МГБГ було обрано дві добре охарактеризовані експериментальні моделі лімфолейкозів – L1210 і P388,

оскільки у попередніх дослідженнях саме за застосування комплексу цих інгібіторів у клітинах зазначених моделей спостерігався найбільш значущий протипухлинний ефект, що супроводжувався зниженням вмісту ОДК (див. розділ 3). Отже, наступний етап дослідження полягає у вивченні змін вмісту білків (p50 і p65) у клітинах W-256, наведених сигнальних білків і активності РНКаз у клітинах двох моделей лімфолейкозу – L1210 та P388 – за умов модуляції активності ОДК при поєднаному застосуванні ДФМО та МГБГ з метою виявлення особливостей сигнальної відповіді та потенційних чинників модуляції функціонального стану ОДК.

4.1. Вміст білків фактору транскрипції NF-κB у клітинах W-256 за дії ПМГ

Аналіз змін у сигнальному каскаді NF-κB показав, що вміст субодиниці p50 залишався практично незмінним ($12,0 \pm 1,2$ у контролі проти $13,0 \pm 1,6$ у групі ПМГ), тоді як рівень білка p65 достовірно знижувався у 1,6 разу ($p < 0,05$) – з $22,0 \pm 2,5$ до $14,0 \pm 1,2$ у. о. порівняно з контролем (рис. 4.1.1).

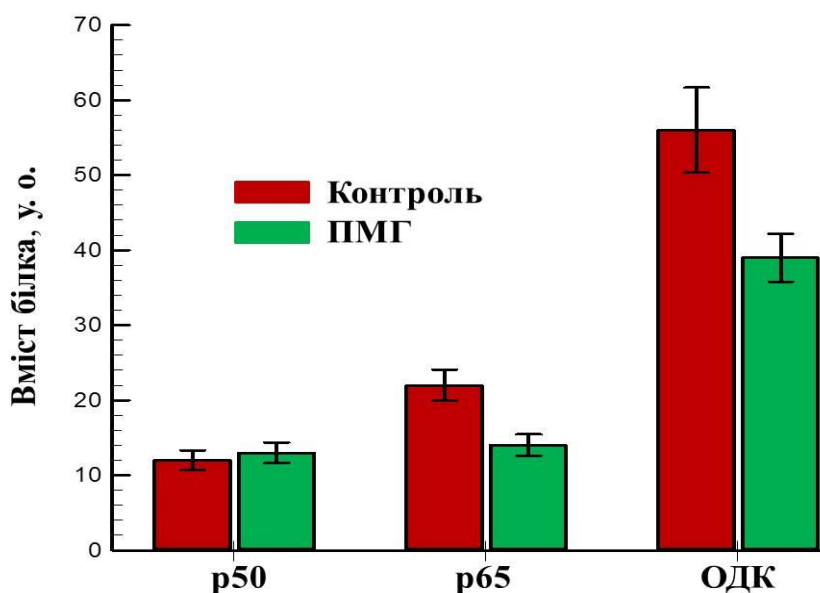


Рисунок 4.1.1 – Вміст ОДК та білків фактора транскрипції NF-κB (p50 і p65) за дії інгібітору ензиму ПМГ. Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Зменшення вмісту p65, який визначає транскрипційну активність NF- κ B, свідчить про послаблення транскрипційної активації генів, залучених до процесів проліферації та виживання пухлинних клітин.

4.2. Вміст білків, залучених до регуляції ОДК, у клітинах L1210 за дії ДФМО та МГБГ

У клітинах L1210 за умов комбінованої дії ДФМО та МГБГ зниження вмісту ОДК асоційоване зі достовірним зменшенням вмісту p50 (на 63%) і p65 (на 33%) порівняно з контролем, що свідчить про суттєве пригнічення активності транскрипційного комплексу NF- κ B, який є одним із ключових позитивних регуляторів експресії *odc*. У клітинах L1210 за дії ДФМО та МГБГ також встановлено пригнічення експресії білків, залучених до регуляції ОДК – c-Мус (на 67%) і антиапоптичного білка Bcl-xL (на 69%), а також зростання експресії p53 на 35% порівняно з контролем ($p < 0,05$) (табл. 4.2.1 та рис. 4.2.1).

Таблиця 4.2.1

Вміст білків-учасників регуляції ОДК у клітинах L1210 за дії ДФМО та МГБГ

Білки	Вміст білка, у. о.		Різниця порівняно з контролем, рази [#]
	Контроль	ДФМО+МГБГ	
p50	15,5±1,2	5,8±0,6*	↓ 2,7
p65	75±6,5	50±4,2*	↓ 1,5
p53	15±1,1	23±2,0*	↑ 1,5
Bcl-xL	16±1,3	5±0,5*	↓ 3,2
c-Мус	110±9,0	36±3,0*	↓ 3,1

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; [#] – підвищення вмісту білка (↑), зниження вмісту білка (↓)

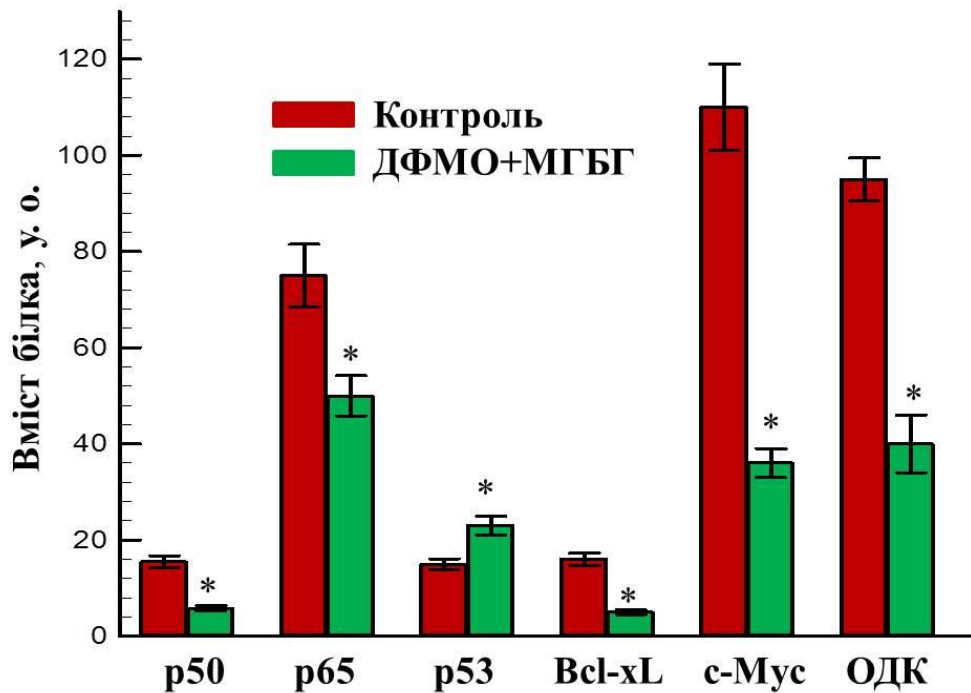


Рисунок 4.2.1 – Вміст ОДК та білків, залучених у регуляцію її функціональності, в клітинах L1210 за дії інгібіторів ензиму ДФМО+МГБГ.

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

Оскільки p53 здатен пригнічувати транскрипцію *odc1* шляхом активації або підвищення рівня специфічних miRNA, які сприяють розщепленню матричної РНК (mRNA) або блокують її зчитування рибосомами, такі зміни можуть сприяти зниженню рівня ОДК у клітині. Важливо зазначити, що, як відомо, активація p53 асоційована не лише з гальмуванням обміну ПА, а й із запуском механізмів апоптозу в пухлинних клітинах.

Виявлено, що вміст антиапоптотичного білка Bcl-xL за дії інгібіторів у 3,2 разу ($p < 0,05$) нижчий порівняно з контролем, що узгоджується з активацією програмованої клітинної смерті та потенційно посилює протипухлинний ефект за рахунок зниження виживаності пухлинних клітин. Крім того, вміст c-Myc, одного з найважливіших транскрипційних активаторів *odc1*, за впливу ДФМО з МГБГ менший у 3,1 раза ($p < 0,05$)

порівняно з контролем, що є критичним чинником зниження рівня синтезу ОДК, оскільки с-Мус безпосередньо стимулює експресію гена *odc1*.

Наведені зміни асоційовані з низьким вмістом ОДК в пухлинних клітинах (у 1,8 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем), що є результатом сукупного зменшення впливу позитивних регуляторів ОДК (NF-κB, с-Мус) та активації p53, який виступає як транскрипційний супресор проліферації та опосередковано гальмує експресію гена *odc1*. Свою чергою, низький вміст ОДК співвідноситься із низькою кількістю клітин L1210 (45% від контрольних значень ($p < 0,05$)), що свідчить про ефективну модуляцію функціональної активності ОДК через сигнальні шляхи, залучені у контроль клітинної проліферації та апоптозу, які забезпечили вагомий протипухлинний ефект застосованих інгібіторів ензиму.

4.3. Вміст білків, задіяних у регуляції ОДК, в клітинах P388 за дії ДФМО+МГБГ

У клітинах лейкозу P388 за дії інгібіторів ДФМО та МГБГ виявлено вищий порівняно з контрольними значеннями вміст кількох сигнальних білків, що беруть участь у регуляції ОДК (див. табл. 4.3.1 та рис. 4.3.1).

Таблиця 4.3.1

Вміст білків-учасників регуляції ОДК у клітинах P388 за дії ДФМО та МГБГ

Білки	Вміст білка, у. о.		Різниця порівняно з контролем, рази*
	Контроль	ДФМО+МГБГ	
p50	5,46±0,32	6,7±0,38*	↑ 1,2×
p65	4,4±0,25	8,2±0,45*	↑ 1,9×
p53	14,9±6,8	22,5±9,2*	↑ 1,5×
Bcl-xL	8,9±4,1	7,1±3,7*	↓ 1,3×
с-Мус	11,6±5,5	10,1±4,9*	↓ 1,2×

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – підвищення вмісту білка (↑), зниження вмісту білка (↓)

Виявлено, що вміст білка p50 – субодиниці транскрипційного комплексу NF- κ B, за дії ДФМО та МГБГ зростав на 23%, а p65 – на 86% порівняно з контролем ($p < 0,05$), що потенційно може сприяти активації транскрипції гена *odc1* та підтримці синтезу ОДК навіть за умов дії її інгібіторів. Тобто, на відміну від моделі L1210, де NF- κ B суттєво пригнічений (табл. 4.3.1 та рис 4.3.1), у клітинах P388 спостерігаються протилежні зміни.

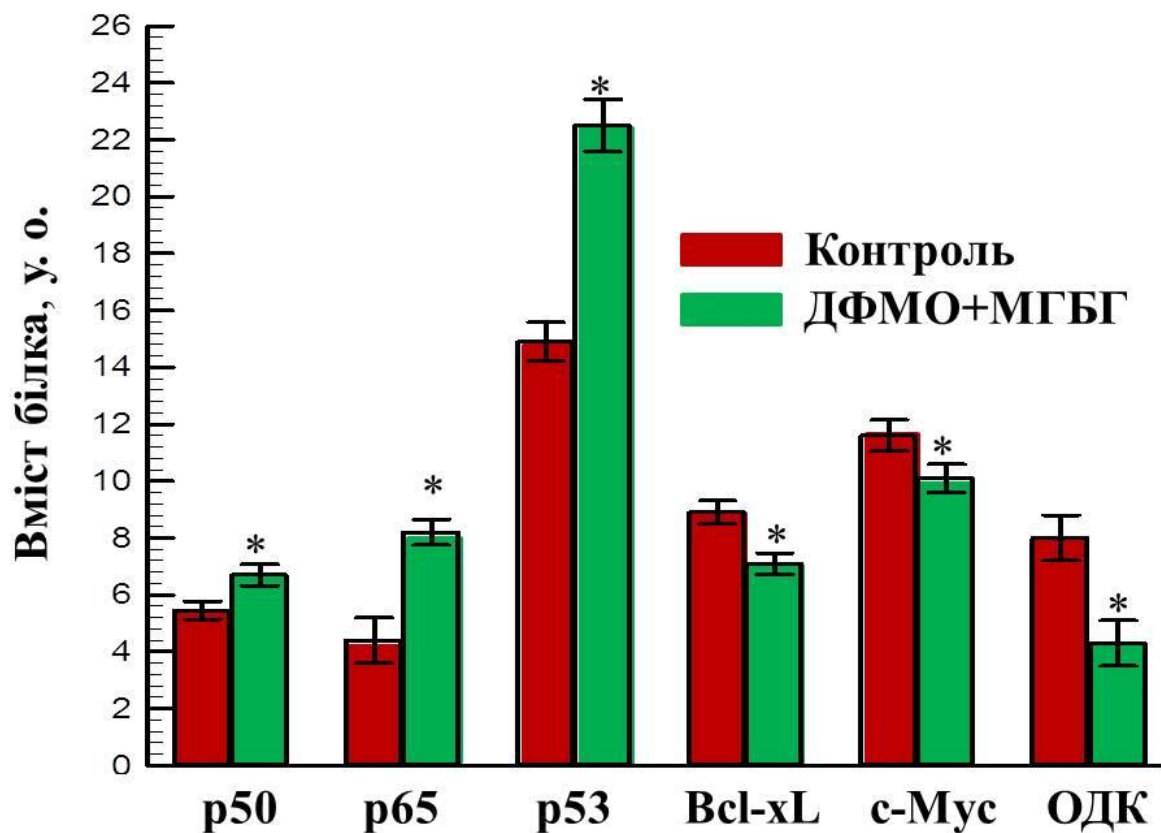


Рисунок 4.3.1 – Вміст ОДК та білків, залучених у регуляцію її функціональності, в клітинах P388 за дії інгібіторів ензиму ДФМО та МГБГ. Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рівень p53, відомого інгібітора проліферації та транскрипційного супресора *odc1*, під впливом ДФМО та МГБГ був вищим від контрольних значень на 51% ($p < 0,05$), що може свідчити про активацію стрес-

асоційованих шляхів. Водночас збереження високої NF-κB-активності може нівелювати гальмівну дію p53 щодо експресії ОДК.

Вміст антиапоптотичного білка Bcl-xL у клітинах P388 за дії ДФМО та МГБГ знижувався лише на 20% порівняно з контролем ($p < 0,05$), що може сприяти виживаності пухлинних клітин. Помірне зниження рівня білка Bcl-xL може вказувати на часткову резистентність клітин P388 до індукованої загибелі. Низький рівень c-Мус – одного з головних активаторів *odc1* – на 13% порівняно з контролем ($p < 0,05$) свідчить про обмежену ефективність інгібіторів щодо цього шляху регуляції ОДК. Вочевидь, результатом зазначених змін під впливом ДФМО та МГБГ, є знижений вміст ОДК у клітинах P388 – на 50% ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що асоціювався зі зменшенням кількості пухлинних клітин до 54% від контрольних значень ($p < 0,05$) (див. розділ 3). Отримані дані свідчать про часткове пригнічення впливу позитивних регуляторів *odc1* (c-Мус, Bcl-xL) на тлі збереженої активності NF-κB та посилення дії p53, що загалом визначає складну й потенційно суперечливу транскрипційну відповідь у клітинах P388.

Порівняльний аналіз вмісту білків, що беруть участь у сигнальній регуляції ОДК, у клітинах двох моделей лімфолейкозу – L1210 та P388 – показав модель-специфічну відмінність у відповіді на комбіновану дію інгібіторів ОДК (ДФМО та МГБГ).

У клітинах L1210 спостерігається низький вміст білків NF-κB (p50 та p65), онкобілка c-Мус, а також антиапоптотичного білка Bcl-xL, поряд із високим вмістом p53 порівняно з контролем (табл. 4.2.1 та рис. 4.2.1). Така координаційна зміна – з одночасною репресією активаторів *odc1* і посиленням дії його транскрипційного супресора – забезпечує суттєве зниження вмісту ОДК, що асоційоване із значним рівнем гальмування прогресування L1210. Тож виявлені особливості узгодженості між сигнальними шляхами є ключовою складовою механізмів екзогенної регуляції ОДК та, відповідно, протипухлинного ефекту за дії застосованих інгібіторів. На відміну від L1210, у клітинах P388 виявлено підвищений

порівняно з контролем вміст білків комплексу NF- κ B (p50, p65) та p53 і помірно низький вміст c-Myc і Bcl-xL (табл. 4.3.1 та рис. 4.3.1).

Наведений профіль змін є неоднозначним і потенційно конфліктним з точки зору регуляції *odc1*, оскільки активатори й інгібітори діють одночасно. Це може знижувати загальну ефективність впливу на рівень ОДК, що відображається у нижчій результативності застосованих інгібіторів як у зменшенні вмісту ОДК, так і в гальмуванні росту P388 порівняно з L1210 (див. розділ 3). Модель L1210 демонструє узгоджену сигнальну відповідь, яка сприяє ефективній модуляції функціонального стану ОДК, тоді як у клітинах P388 спостерігаються суперечливі сигнали, що знижують чутливість до регуляції ОДК, незважаючи на активацію p53.

У результаті дослідження виявлено, що за дії інгібітора ОДК ПМГ низький вміст ензиму асоціювався з низьким рівнем білка-регулятора p65. За поєднаної дії інгібіторів ОДК ДФМО та МГБГ низький вміст ОДК асоціював із низьким рівнем білків-регуляторів p50, p65, Bcl-xL і c-Myc та високим вмістом проапоптичного білка p53 у клітинах L1210. Тоді ж у клітинах P388 відзначався високий вміст усіх досліджуваних білків порівняно з контролем ($p < 0,05$). При цьому кількість пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з L1210 за впливу інгібіторів була достовірно меншою, ніж у мишей із P388. Це свідчить про те, що узгоджена сигнальна відповідь, характерна для моделі L1210, сприяє ефективній модуляції функціонального стану ОДК на рівні білкового вмісту та, як наслідок, посиленню протипухлинної дії застосованих інгібіторів.

Порівняльний аналіз відповіді клітин L1210 та P388 на комбіновану дію інгібіторів ДФМО і МГБГ дозволив не лише ідентифікувати спільні для обох систем механізми регуляції ОДК, а й виявити модель-специфічні особливості чутливості або резистентності клітин до впливу на ключовий фермент обміну ПА. Такий підхід дає можливість оцінити реакцію на екзогенну модуляцію функціонального стану ОДК на різних рівнях реалізації сигнальних шляхів, що, своєю чергою, розкриває нові аспекти взаємозв'язку

між метаболічним станом клітини та ефективністю регуляторного втручання. Отримані результати можуть стати основою для розробки диференційованих і персоналізованих підходів до цілеспрямованого впливу на ОДК у контексті експериментальної онкології.

Таким чином, виявлені відмінності у регуляції функціонального стану ОДК, реалізовані через вплив на фактори сигнальних шляхів і, ймовірно, зумовлені генетичними особливостями досліджуваних моделей лімфолейкозів (агресивність, чутливість до інгібіторів), становлять підґрунтя для визначення перспективних напрямків і методологічних підходів у дослідженнях екзогенних впливів на функціональність ОДК з метою створення молекулярно-спрямованих схем протипухлинної терапії.

4.4. Активність РНКаз у клітинах L1210 та P388 за дії ДФМО у поєднанні з МГБГ

У попередніх розділах ми проаналізували вміст білків, що беруть участь у сигнальній регуляції ОДК, ключового ферменту обміну ПА. Оскільки ПА здатні стабілізувати РНК, у тому числі мРНК протоонкогенів, важливим є дослідження змін активності РНКаз – ферментів, що беруть участь у деградації РНК. Зниження рівнів ПА унаслідок інгібування ОДК може призводити до дестабілізації РНК-пулу, ініціації апоптичних програм і підвищення активності РНКаз як компенсаторного механізму. Тому наступним етапом стало дослідження активності РНКаз у клітинах L1210 та P388 за дії інгібіторів ОДК – ДФМО та МГБГ.

На рисунку 4.3.1 представлено зміни активності РНКаз у клітинах L1210 за дії інгібіторів ОДК. Отримані результати демонструють різноспрямовані адаптивні реакції обох моделей на модуляцію активності ОДК застосованих інгібіторів. У контрольній групі тварин із лімфолейкозом L1210 спостерігали вищу активність РНКаз (150 ± 17 у. од.), ніж у групі з P388 (122 ± 11 у. од.) ($p < 0,05$).

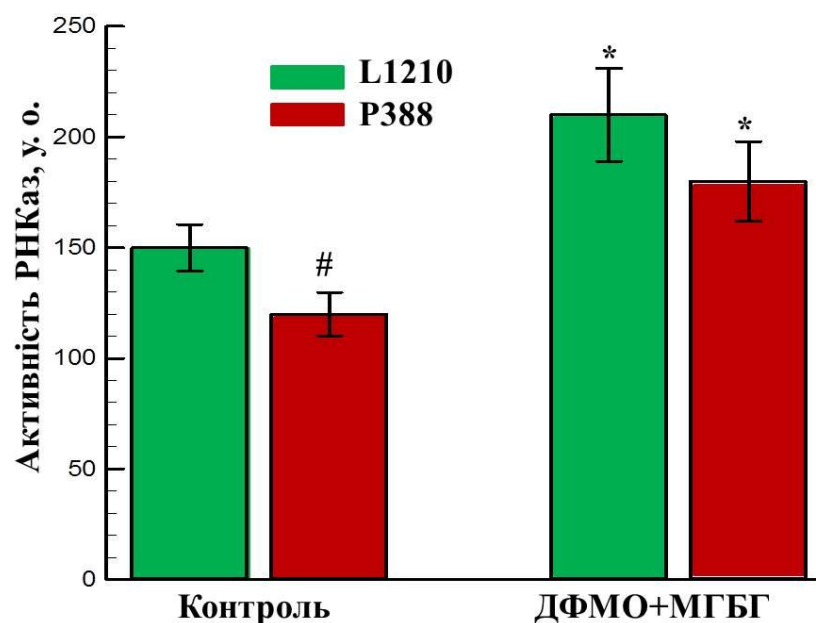


Рисунок 4.3.1 – Активність РНКаз у клітинах L1210 та P388 за дії інгібіторів ОДК (ДФМО та МГБГ). Примітки: * – $p < 0,05$ у порівнянні досліджу з контролем, # – $p < 0,05$ у порівняння двох контролів

Визначена різниця може свідчити про вищу транскрипційну активність або меншу стабільність РНК у клітинах L1210. Такий фенотип характерний для високопроліферативних злоякісних клітин, які інтенсивно синтезують мРНК і потребують ефективного механізму контролю якості транскриптів через деградацію дефектних або нестабільних РНК [16].

На відміну від цього, клітини P388 демонструють нижчий вихідний рівень активності РНКаз, що може вказувати на кращу стабілізацію РНК або меншу залежність від ПА у підтриманні транскрипційного гомеостазу. Це, у свою чергу, свідчить про потенційно нижчу чутливість клітин P388 до модуляції активності ОДК.

Застосування ДФМО та МГБГ призвело до достовірного зростання активності РНКаз у клітинах обох моделей. У клітинах L1210 активність РНКаз зросла на 40% ($p < 0,05$) і становила $212,5 \pm 20,7$ у. о., тоді як у клітинах P388 підвищилася на 50% ($p < 0,05$) і становила $180,2 \pm 16,5$ у. о. порівняно з контролем. Незважаючи на те, що базова активність РНКаз у клітинах L1210

була вищою, відносно підвищення цього показника після впливу на функціональний стан ОДК було більш вираженим у клітинах P388. Це може свідчити про включення компенсаторних механізмів посттранскрипційного контролю у відповідь на депривацію ПА [54], [58].

Таким чином, встановлено, що в обох моделях активація РНКаз виступає складовою механізмів пригнічення функціонального стану ОДК, що узгоджується з максимальним протипухлинним ефектом цієї комбінації інгібіторів.

Виявлені відмінності в активності РНКаз мають важливе значення для розуміння чутливості та резистентності пухлинних клітин до модуляції активності ОДК і можуть розглядатися у перспективі як потенційний прогностичний маркер при виборі комбінованої терапії. Крім того, врахування вихідного рівня активності РНКаз дозволяє комплексно оцінювати функціональний стан пухлинних клітин та їхню залежність від ПА у підтриманні транскрипційного гомеостазу, що відкриває нові можливості для розробки персоналізованих стратегій модуляції активності ОДК, зокрема, з урахуванням особливостей пухлини, які пов'язані з її чутливістю до терапії.

Підсумки. Зміни у вмісті білків фактору транскрипції NF-κB (p50, p65) становлять важливий механізм регуляції ОДК за дії інгібіторів ензиму. У клітинах W-256 за впливу ПМГ відзначалося достовірне зниження вмісту p65 (в 1,6 разу, $p < 0,05$) при стабільному рівні p50, що вказує на послаблення транскрипційної активності комплексу NF-κB та потенційне пригнічення експресії *odc1*.

У клітинах лімфолейкозу L1210 за дії ДФМО та МГБГ зафіксовано узгоджені зміни регуляторних білків, спрямовані на пригнічення експресії ОДК. Вміст p50 та p65 знижувався в 2,7 і 1,5 разу відповідно ($p < 0,05$), рівень c-Мус – в 3,1 разу ($p < 0,05$), Bcl-xL – в 3,2 разу ($p < 0,05$) при одночасному підвищенні рівня p53 в 1,5 разу ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Така

координація зменшення активаторів *odc1* (NF- κ B, c-Мус, Bcl-xL) та активації p53 супроводжувалася істотним зниженням вмісту ОДК і кількості пухлинних клітин (до 45% від контролю, $p < 0,05$).

У клітинах P388 за тих же умов виявлено інший профіль сигнальної відповіді, що характеризувався підвищенням вмісту p50 (в 1,2 разу, $p < 0,05$), p65 (в 1,9 разу, $p < 0,05$) і p53 (в 1,5 разу, $p < 0,05$) при незначному зниженні c-Мус і Bcl-xL (в 1,2 і 1,3 разу відповідно ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Така комбінація антагоністичних сигналів (активація NF- κ B одночасно з підвищенням p53) свідчить про менш узгоджену регуляцію *odc1*, що корелює з нижчою ефективністю інгібіторів щодо зменшення вмісту ОДК та гальмування росту пухлини порівняно з L1210.

Аналіз активності РНКаз показав, що їх підвищення є універсальним механізмом обмеження функціонального стану ОДК за діїДФМО та МГБГ в обох моделях лімфолейкозів. У клітинах L1210 активність РНКаз зростала на 40% ($p < 0,05$), у P388 — на 50% ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що свідчить про включення компенсаторних посттранскрипційних механізмів деградації мРНК протоонкогенів у відповідь на зниження рівня ПА.

Порівняльний аналіз виявив модель-специфічні відмінності сигнальної відповіді. У L1210 спостерігається узгоджена регуляція (зменшення активаторів та активація супресора p53), яка забезпечує більш ефективне зниження вмісту ОДК і гальмування росту пухлини. У P388 сигнальна відповідь є менш узгодженою, що знижує чутливість до інгібіторів, попри активацію p53.

Отримані результати свідчать, що узгоджена сигнальна відповідь — пригнічення NF- κ B, c-Мус і Bcl-xL при одночасній активації p53 — визначає ефективність модуляції функціонального стану ОДК. Модель L1210 є більш чутливою до екзогенної регуляції, тоді як у P388 виявляється часткова резистентність, що, ймовірно, зумовлено особливостями NF- κ B-залежної регуляції *odc1*. Ці дані мають важливе значення для розуміння механізмів

протипухлинної дії інгібіторів ОДК та можуть слугувати основою для прогнозування чутливості різних типів пухлин до комбінованої терапії.

Результати досліджень, описані в розділі 5, опубліковані у [170].

РОЗДІЛ 5

СТАТУС МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ ОДК, У КЛІТИНАХ СОЛІДНИХ ТА АСЦИТНИХ ЕКСПРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН ПІСЛЯ ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ЕНЗИМУ

5.1. Статус метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1* та *amd1* в клітинах КЛЛ після дії синтетичних інгібіторів ОДК

Регуляція синтезу та активності ОДК відбувається як на посттрансляційному, так і на транскрипційному рівнях, у тому числі шляхом метилування промоторів генів, які кодують саму ОДК або її регулятори. З огляду на це, у клітинах КЛЛ було проаналізовано рівень метилування шести генів: *odc1*, *oaz1*, *azin1* – генів прямої регуляції активності ОДК та *sat1*, *smox*, *amd1* – генів, що опосередковано впливають на функціонування ОДК через обмін ПА. До групи генів прямої регуляції активності ОДК належать *odc1*, *oaz1*, *azin1*, які безпосередньо контролюють рівень і стабільність ферменту, що каталізує перетворення орнітину на путресцин – перший етап біосинтезу ПА. Ген *odc1* (ornithine decarboxylase 1) – кодує сам фермент ОДК. Підвищена експресія цього гена призводить до накопичення ПА, стимуляції проліферації, інвазії та ангіогенезу пухлинних клітинах. Гіпометилування промоторної ділянки *odc1*, як правило, асоціюється з його надмірною транскрипцією. Ген *oaz1* (ornithine decarboxylase antizyme 1) – кодує антизим-1 (OAZ1), який є природним інгібітором ОДК. OAZ1 не лише пригнічує активність ферменту, але й сприяє його деградації за убіквітин-незалежним механізмом. Підвищення експресії *oaz1* супроводжується зниженням біосинтезу ПА. Ген *azin1* (antizyme inhibitor 1) – кодує білок, який структурно подібний до ОДК, але позбавлений каталізаторної активності. AZIN1 блокує дію антизиму OAZ1, стабілізуючи ОДК та відновлюючи її активність. Таким чином, експресія *azin1* опосередковано сприяє підвищенню синтезу ПА. Епігенетичні зміни, зокрема зміни рівня метилування у промоторних ділянках відповідних генів, можуть зумовлювати зсув рівноваги між

інгібуванням та активацією ОДК, що критично впливає на темпи росту пухлини та її чутливість до терапії. До групи генів непрямої (опосередкованої) регуляції обміну ПА належать *sat1*, *smox*, *amd1*) бере участь у катаболізмі ПА, регуляції рівня донорів метильних груп, а також у зворотному метаболічному контролі ПА пулу. Через зміну внутрішньоклітинного рівня ПА ці гени здатні опосередковано впливати на активність ОДК, ключового ферменту у біосинтезі ПА.

Ген *sat1* (spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1) кодує фермент, що каталізує ацетилювання сперміну та спермідину, сприяючи їх подальшій екскреції або окисненню. Підвищення експресії *sat1* призводить до зниження рівня ПА. Це, в свою чергу, нівелює зворотне інгібування ОДК, що в нормі гальмується високим рівнем ПА за принципом негативного зворотного зв'язку. Таким чином, при активації *sat1* можливе компенсаторне підвищення активності ОДК.

Ген *smox* (spermine oxidase) кодує фермент, який каталізує окиснення сперміну до спермідину з утворенням перекису водню (H₂O₂) та інших реактивних форм кисню (ROS). Цей процес не тільки знижує рівень сперміну, але й викликає окислювальний стрес і ДНК-пошкодження, що може активувати шляхи, пов'язані з апоптозом або зупинкою клітинного циклу. Зниження вмісту ПА унаслідок активності *smox* також стимулює активацію ОДК як компенсаторної відповіді. Водночас надмірна продукція ROS може призводити до окислювальних модифікацій білків і вторинного інгібування ферменту, що ускладнює регуляторний ефект *smox*.

Ген *amd1* (adenosylmethionine decarboxylase 1) кодує фермент, що забезпечує синтез декарбоксильованого S-аденозилметіоніну (dcSAM) – основного донора амінопропільних груп для синтезу ПА. Зниження активності AMD1 призводить до зменшення утворення сперміну та спермідину, що порушує баланс ПА. Як наслідок, зменшення їх рівня послаблює негативний зворотний зв'язок і може супроводжуватися компенсаторним підвищенням активності ОДК. Водночас, дефіцит dcSAM у

разі зниження активності *amd1* обмежує синтез ПА через недостатнє постачання амінопропільних груп, що зрештою веде до загального пригнічення обміну ПА. Таким чином, *sat1*, *smox* і *amd1* регулюють активність ОДК опосередковано – через зміни концентрацій сперміну та спермідину. Зниження рівня цих ПА знімає інгібіторний контроль, стимулюючи активність ОДК, тоді як їх накопичення, навпаки, гальмує транскрипцію та функціонування ферменту.

Загалом, перша група генів (*odc1*, *oaz1*, *azin1*) формує головну вісь прямої регуляції рівня та стабільності ОДК, тоді як друга група (*sat1*, *smox*, *amd1*) модулює функціональний стан ферменту через зміну концентрацій або катаболізм ПА. Аналіз метилування цих генів дає змогу оцінити складну багаторівневу епігенетичну регуляцію ПА в умовах експериментальної терапії інгібіторами ОДК.

Мета наступного етапу роботи є дослідження змін метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox*, *amd1* у пухлинних клітинах як можливого епігенетичного механізму дії досліджуваних синтетичних інгібіторів ОДК у зв'язку з перебігом пухлинного процесу.

На рис. 5.1.1 – 5.1.6 наведено рівні метилування промоторних ділянок генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox* і *amd1* у клітинах КЛЛ під впливом досліджуваних інгібіторів як при їх окремому застосуванні, так і в комбінації. Встановлено, що характер змін у метилуванні промоторів зазначених генів істотно залежить від типу інгібітора та його поєднаної дії з іншими інгібіторами.

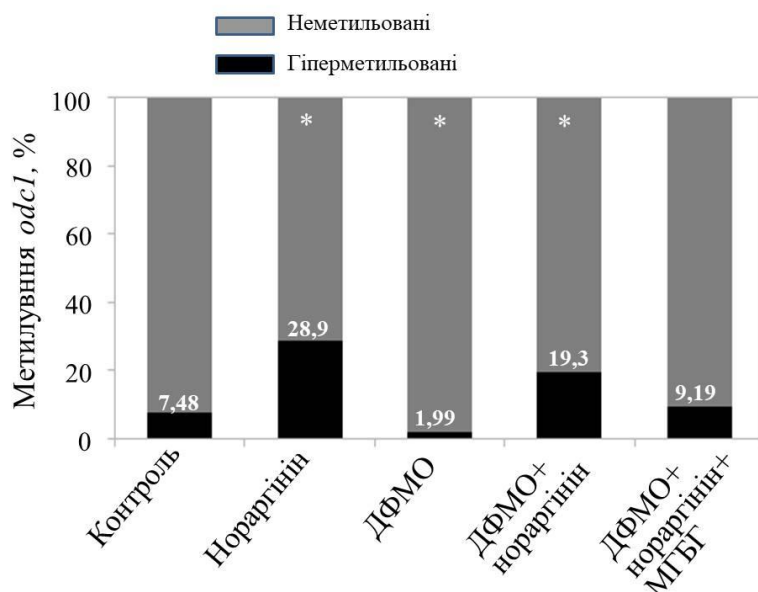


Рисунок 5.1.1 – Співвідношення гіперметильованих та неметильованих ділянок промотору гена *odc1* в клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

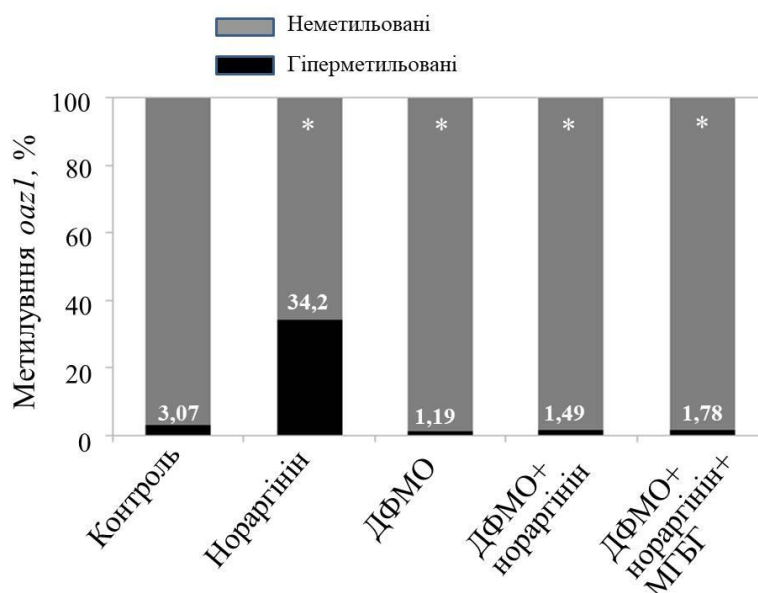


Рисунок 5.1.2 – Співвідношення гіперметильованих та неметильованих ділянок промотору гена *oaz1* в клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

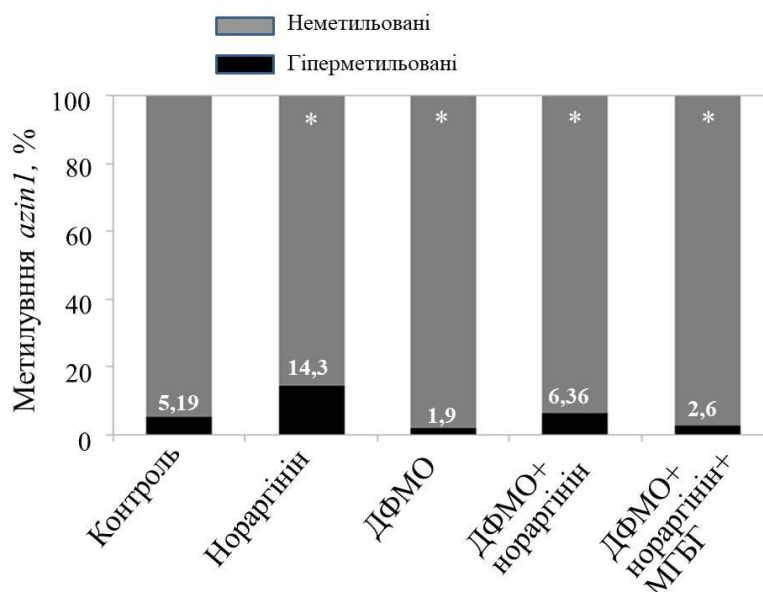


Рисунок 5.1.3 – Співвідношення гіперметильованих та неметильованих ділянок промотору гена *azin1* в клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

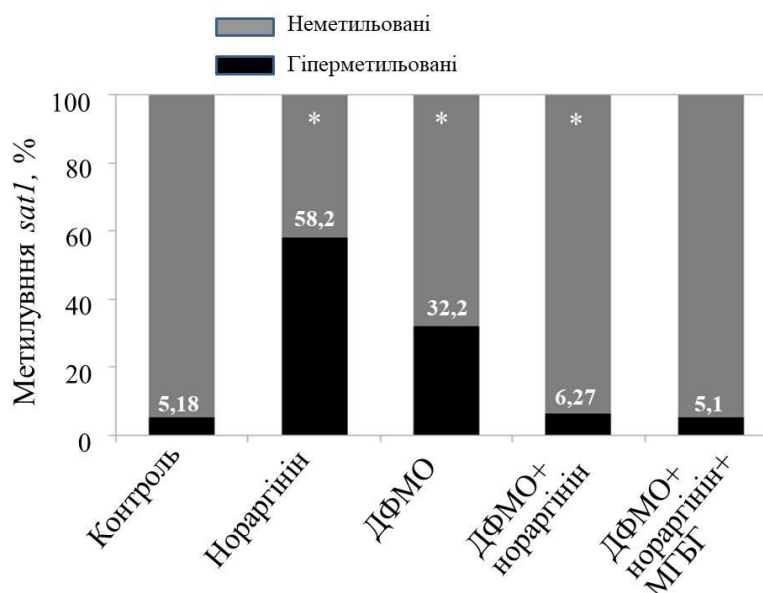


Рисунок 5.1.4 – Співвідношення гіперметильованих та неметильованих ділянок промотору гена *sat1* в клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

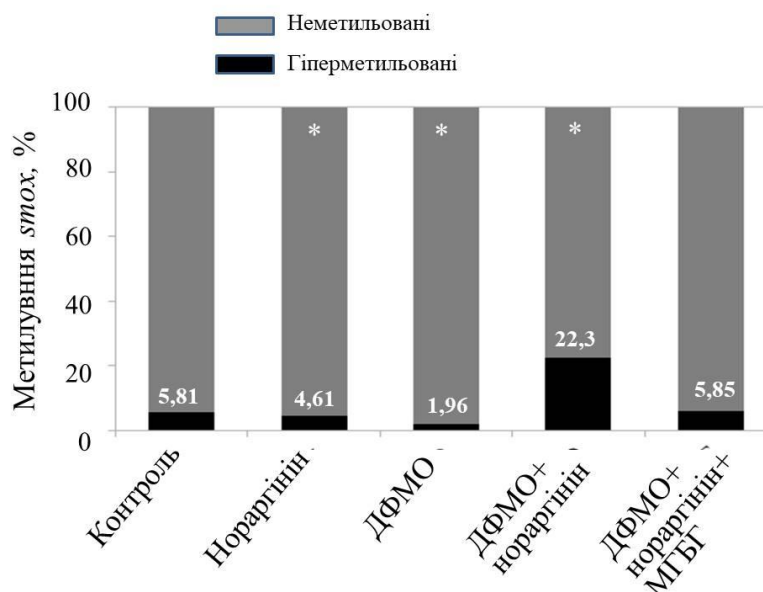


Рисунок 5.1.5 – Співвідношення гіперметильованих та неметильованих ділянок промотору гена *stox* в клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

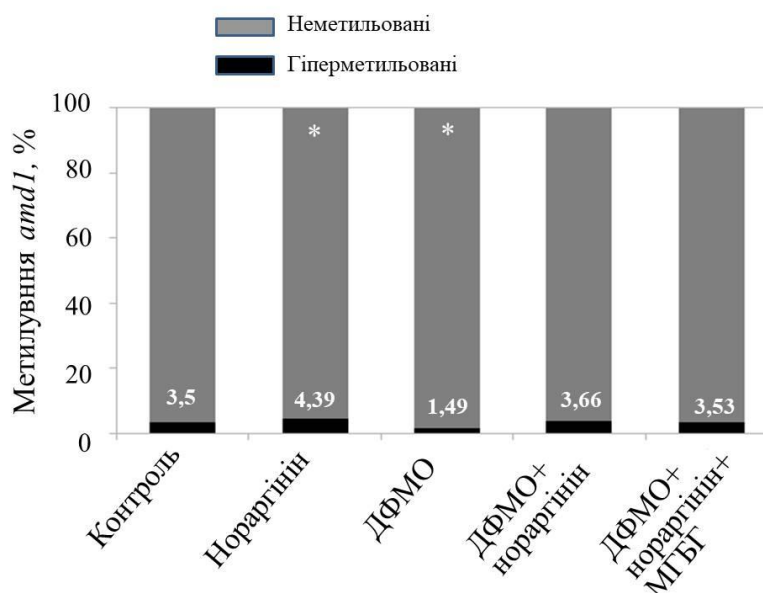


Рисунок 5.1.6 – Співвідношення гіперметильованих та неметильованих ділянок промотору гена *amd1* в клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК.
Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Показано, що за дії нораргініну рівень метилування гена *odc1*, який кодує саму ОДК, перевищував контрольні значення у 3,9 разу ($p < 0,05$), що свідчить про істотне посилення епігенетичної репресії його транскрипції (рис. 5.1.1).

Таблиця 5.1.1

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану ОДК в клітинах карциноми легені Льюїс за впливу **нораргініну**

Ген	Контроль , %	Нораргінін , %	Різниця порівняно з контролем , рази	Вектор впливу на функціональ- ний стан ОДК**	Об'єм пухлин , % [#]	Об'єм метастазів , % [#]
<i>odc1</i>	7,48±0,7	28,86±2,1*	3,9*	↓	63	87
<i>oaz1</i>	3,07±0,3	34,24±2,5*	11,2*	↑		
<i>azin1</i>	5,19±0,4	14,27±1,2*	2,7*	↑		
<i>sat1</i>	5,18±0,5	58,24±3,5*	11,2*	↓		
<i>smox</i>	5,81±0,6	4,61±0,4*	1,3*	↑		
<i>amd1</i>	3,5±0,4	4,39±0,2*	1,3*	↑		

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); # – показники наведено відносно контролю (100%)

Ще більш виражене підвищення метилування виявлено для гена *oaz1* – у 11,2 рази порівняно з контролем, $p < 0,05$ (рис. 5.1.2), що вказує на значне пригнічення синтезу антизиму – природного інгібітора ОДК, який у нормі зв'язується з ферментом і сприяє його деградації (табл. 5.1.1).

Підвищення метилування гена *oaz1* може знижувати утворення білка OAZ, який у нормі пригнічує ОДК (рис. 5.1.2). Це, своєю чергою, здатне сприяти підвищенню ферментативної активності. Однак в умовах дії нораргініну вирішальне значення, імовірно, має пряме епігенетичне пригнічення гена *odc1*, що переважає над іншими механізмами і зумовлює загальне зниження активності ферменту.

Для гена *azin1* (рис. 5.1.3), який кодує антиантизим AZIN1 – стабілізатор ОДК, що конкурує з антизимом, відзначено підвищення

метилування у 2,7 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$). Хоча цей ефект менш виражений, ніж у випадку з *odc1* та *oaz1*, його внесок у регуляцію стабільності ОДК залишається суттєвим. Загалом, найвищий ступінь гіперметилування зафіксовано для *oaz1*, що вказує на переважне епігенетичне пригнічення цього ланцюга регуляції. Водночас гіперметилування *odc1* і *azin1* дозволяє припустити, що дія нораргініну викликає комплексну перебудову регуляторної осі, спрямовану на багатофакторне зниження функціональної активності ОДК.

Таким чином, нораргінін викликає комплексне епігенетичне пригнічення експресії генів, що безпосередньо регулюють рівень та стабільність ОДК, що узгоджується зі зниженням її активності в пухлинній тканині (див. розділ 3).

Гіперметилування гена *sat1* (у 11,2 рази порівняно з контролем, $p < 0,05$) також має важливе значення, оскільки цей ген кодує фермент, залучений до деградації ПА (рис. 5.1.4). Його репресія може зменшувати катаболізм ПА, створюючи компенсаторний механізм збереження їх рівня в умовах інгібування ОДК.

Натомість гени *smox* та *amd1* відзначено лише незначні зміни метилування (у 1,3 разу порівняно з контролем, $p < 0,05$), що може свідчити про активацію альтернативних шляхів підтримки ПА пулу (рис. 5.1.5–5.1.6). Зокрема, *smox* кодує сперміноксидазу, яка бере участь в оксидативній деградації ПА, а *amd1* – аденозилметіоназдекарбоксилазу, що забезпечує утворення dcSAM, ключового донора амінопропільних груп для біосинтезу ПА.

Таким чином, дія нораргініну супроводжується значними змінами у метилуванні промоторних ділянок генів, що регулюють обмін ПА, із переважною тенденцією до гіперметилування генів прямої регуляції (*odc1*, *oaz1*, *azin1*) (рис. 5.1.1), що узгоджується зі зниженням рівнем активності ОДК (див. розділ 3). Це підтверджує наявність епігенетичного механізму дії нораргініну як регулятора ОДК-залежного метаболізму пухлинних клітин.

Одним із неочікуваних, проте концептуально важливих результатів стало виявлення низького рівня метилування промоторної ділянки гена *odc1* у клітинах карциноми легені Льюїс за дії ДФМО – незворотного інгібітора ОДК (рис. 5.1.2, табл. 5.1.2).

Таблиця 5.1.2

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану

ОДК в клітинах карциноми легені Льюїс за впливу ДФМО

Ген	Контроль, %	ДФМО, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Об'єм пухлин, % [#]	Об'єм метастазів, % [#]
<i>odc1</i>	7,48±0,7	1,99±0,18*	3,8*	↑	58	6
<i>oaz1</i>	3,07±0,3	1,19±0,10*	2,6*	↓		
<i>azin1</i>	5,19±0,4	1,9±0,17*	2,7*	↑		
<i>sat1</i>	5,18±0,5	32,15±2,1*	6,2*	↓		
<i>smox</i>	5,81±0,6	1,96±0,15*	3*	↑		
<i>amd1</i>	3,5±0,4	1,49±0,13*	2,4*	↓		

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Хоча ДФМО ефективно інгібує каталітичну активність ОДК, він не пригнічує транскрипцію гена *odc1*. Це підтверджується зниженням рівня метилування його промоторної ділянки у 3,8 разу порівняно з контролем, $p < 0,05$, що може свідчити про активацію транскрипції (рис. 5.1.2, табл. 5.1.2). Подібна динаміка виявлена і для гена *oaz1* (у 2,6 разу нижче за контрольні значення, $p < 0,05$) (табл. 5.1.2). Метилування гена *azin1*, який кодує конкурент OAZ1 за зв'язування з ОДК, також було нижчим у 2,7 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$). Водночас високий рівень метилування гена *sat1* (у 6,2 разу порівняно з контролем, $p < 0,05$) вказує на його епігенетичну репресію (табл. 5.1.2). Оскільки SAT1 каталізує ацетилювання спермідину/сперміну, що сприяє їх катаболізму, його інактивація може призводити до накопичення ПА і порушення клітинного гомеостазу. Інші

гени катаболізму ПА, *smox* та *amd1*, навпаки, виявили знижені показники метилювання (у 3,0 і 2,4 разу, відповідно порівняно з контролем, $p < 0,05$), що може відображати компенсаторний механізм на фоні пригнічення *sat1* (табл. 5.1.2). На тлі таких епігенетичних зрушень активність ОДК у пухлинних клітинах була достовірно нижчою: $0,355 \pm 0,060$ у. о. за дії ДФМО проти $0,578 \pm 0,070$ у. о. у контролі. Ці дані узгоджуються з прямим інгібуючим ефектом ДФМО на ферментативну активність ОДК. Водночас зниження метилювання *odc1* може свідчити про активацію його транскрипції як зворотного компенсаторного механізму, що частково нівелює дію інгібітора на рівні білка. Загалом, дія ДФМО супроводжується складною перебудовою епігенетичного ландшафту генів обміну ПА, що поєднує пряме пригнічення активності ОДК із компенсаторними змінами експресії регуляторних генів.

Показано також, що комбіноване застосування ДФМО та нораргініну призводить до суттєвих змін метилювання генів, залучених до регуляції ОДК (табл. 5.1.3).

Таблиця 5.1.3

Метилювання промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану ОДК в клітинах карциноми легені Льюїс за впливу **нораргініну з ДФМО**

Ген	Контроль , %	Нораргінін + ДФМО, %	Різниця порівняно з контролем , рази	Вектор впливу на функціональ- ний стан ОДК**	Об'єм пухлин , % [#]	Об'єм метастазів , % [#]
<i>odc1</i>	$7,48 \pm 0,7$	$19,3 \pm 1,8^*$	$2,6^*$	↓	50	7
<i>oaz1</i>	$3,07 \pm 0,3$	$1,49 \pm 0,15^*$	$2,1^*$	↓		
<i>azin1</i>	$5,19 \pm 0,4$	$6,36 \pm 0,55^*$	$1,2^*$	↓		
<i>sat1</i>	$5,18 \pm 0,5$	$6,27 \pm 0,6^*$	$1,2^*$	↓		
<i>smox</i>	$5,81 \pm 0,6$	$22,34 \pm 2,1^*$	$3,8^*$	↓		
<i>amd1</i>	$3,5 \pm 0,4$	$3,66 \pm 0,35$	~ 1	-		

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Зокрема, рівень метилування промоторної ділянки гена *odc1* перевищував контроль у 2,6 разу ($p < 0,05$), що свідчить про епігенетичну репресію його транскрипції (табл. 5.1.3). Оскільки цей ген кодує безпосередньо ОДК, такі зміни можуть відігравати ключову роль у пригніченні біосинтезу ПА. Водночас, для гена *oaz1* відмічено знижений рівень метилування – у 2,1 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$), що потенційно сприяє підвищенню його експресії (табл. 5.1.3). Оскільки білок OAZ1 є негативним регулятором ОДК, його активація додатково обмежує синтез ПА. Метилування гена *azin1*, навпаки, дещо перевищувало контрольні значення (у 1,2 разу, $p < 0,05$), що може вказувати на помірне зниження експресії білка AZIN1 – антагоніста OAZ1.

Таким чином, сукупні епігенетичні зміни в цій групі генів вказують на скоординовану транскрипційну регуляцію, спрямовану на зниження функціональної активності ОДК. Визначено, що метилування гена *sat1*, який кодує фермент деградації ПА – спермідин/спермін- N^1 -ацетилтрансферазу, за комбінованої дії нораргініну з ДФМО було у 1,2 разу вище за контроль ($p < 0,05$), що може свідчити про зниження його експресії та, відповідно, зменшення катаболізму ПА (рис. 5.1.4). Ще більш виражене підвищення метилування спостерігалось для гена *smox* (у 3,8 разу вище за контроль, $p < 0,05$), який відповідає за окиснення ПА. Це свідчить про значне пригнічення його транскрипції та уповільнення процесів деградації ПА. Метилування гена *amd1*, який забезпечує утворення декарбоксильованого S-аденозилметіоніну (dcSAM) – ключового донора амінопропільних груп для біосинтезу ПА, залишалося на рівні контролю, що вказує на стабільність його експресії (табл. 5.1.3). Таким чином, комбінована дія ДФМО та нораргініну супроводжується репресією синтетичних шляхів ПА (через *odc1*), зменшенням катаболізму ПА (*sat1*, *smox*), та активацією білкових інгібіторів ОДК (*oaz1*). Такий подвійний ефект – обмеження синтезу і уповільнення деградації ПА – створює дисбаланс ПА, несприятливий для проліферації пухлинних клітин, що може пояснювати виявлений протипухлинний ефект.

Загалом, інгібітори ОДК не лише безпосередньо блокують фермент, а й опосередковано впливають на експресію генів, що регулюють обмін ПА, шляхом епігенетичних змін. Найбільш виражені зміни метилування спостерігалися за дії нораргініну, що підтверджує його епігенетичну активність. Для ДФМО характерним є зниження метилування *odc1*, що може розглядатися як компенсаторна відповідь клітин на інгібування ферментативної активності ОДК.

Таблиця 5.1.4

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану ОДК в клітинах карциноми легені Льюїс за впливу **нораргініну з ДФМО та МГБГ**

Ген	Контроль, %	Нораргінін + ДФМО+ МГБГ, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Об'єм пухлин, % [#]	Об'єм метастазів, % [#]
<i>odc1</i>	7,48±0,7	9,19±1,74*	1,2	↓	46	5
<i>oaz1</i>	3,07±0,3	1,78±0,01*	1,7*	↓		
<i>azin1</i>	5,19±0,4	2,6±0,01*	2*	↑		
<i>sat1</i>	5,18±0,5	5,1±0,05	~	-		
<i>smox</i>	5,81±0,6	5,85±0,06	~	-		
<i>amd1</i>	3,5±0,4	3,53±0,04	~	-		

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Комбіноване застосування ДФМО, нораргініну та МГБГ насамперед впливає на гени прямої регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*), що підтверджує доцільність комплексної терапії з метою ефективного зниження функціональної активності ферменту (табл. 5.1.4).

Метилування генів *sat1*, *smox*, *amd1* за дії комплексу інгібіторів ДФМО, нораргініну та МГБГ практично не відрізнялося від контрольних значень, що свідчить про відсутність суттєвого впливу комбінації інгібіторів на шляхи

деградації ПА і забезпечення клітини донорами метильних груп (dcSAM) (табл. 5.1.4). На діаграмах (рис. 5.1.7 та рис. 5.1.8) відображено рівні метилювання генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*, *smox* та *amd1*, що беруть участь у регуляції метаболізму ПА, у клітинах КЛЛ за дії різних інгібіторів ОДК – ДФМО, нораргініну, а також їхніх комбінацій із МГБГ.

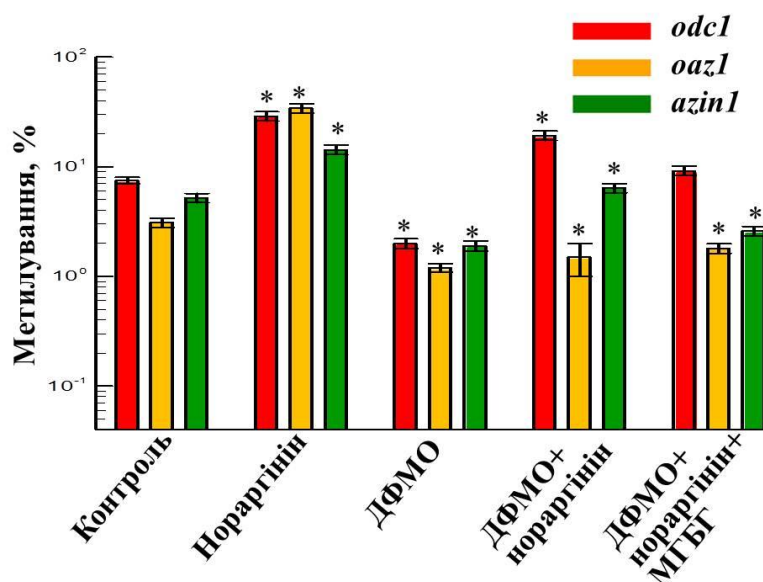


Рисунок 5.1.7 – Метилювання генів *odc1*, *oaz1*, *azin1* у клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК**. Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** – результати представлені у логарифмічній шкалі

Проведений аналіз показує, що зміни у метилюванні цих ключових генів за дії інгібіторів відображають демонструє суттєву роль епігенетичних механізмів у регуляції функціонального стану ОДК. У контрольній групі рівень метилювання промоторних ділянок усіх шести генів залишався відносно низьким, що свідчить про активну транскрипцію ферментів біосинтезу ПА (зокрема, ОДК) та одночасну супресію генів катаболізму ПА (*sat1*, *smox*). Такий профіль сприяє накопиченню ПА і, відповідно, прогресії пухлинного процесу. Нораргінін, як інгібітор аргінази, знижує утворення орнітину – попередника ПА. Це, у свою чергу, супроводжується епігенетичною відповіддю у вигляді гіперметилювання промоторів гена *odc1* (3,9 разу), *oaz1* (у 11,2 рази), *azin1* (майже в 3 рази) порівняно з контролем.

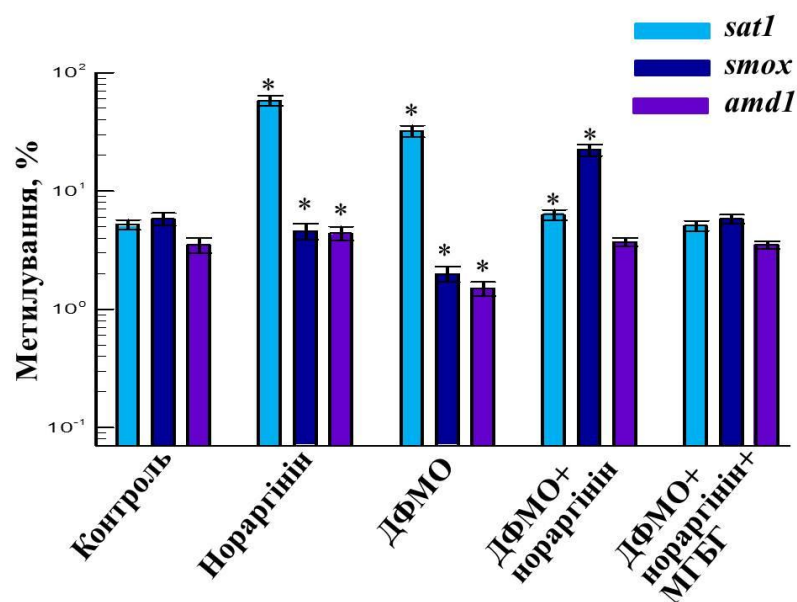


Рисунок 5.1.8 – Метилювання генів *sat1*, *smox*, *amd1* у клітинах КЛЛ за дії інгібіторів ОДК**. Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** – результати представлені у логарифмічній шкалі

Такі зміни можна інтерпретувати як компенсаторну епігенетичну репресію генів, що забезпечують синтез або стабільність ОДК, з метою обмеження надлишкового утворення ПА.

Виявлено також гіперметилювання гена *sat1* (у 11,2 рази), що може гальмувати деградацію ПА, знижуючи рівень цитотоксичного стресу для пухлинних клітин – потенційний механізм зворотного впливу (рис. 3.1.8).

ДФМО є прямим необоротний інгібітором ОДК, і його дія проявляється у зниженні ферментативної активності. Проте цікаво, що метилювання гена *odc1* виявилось нижчим за контроль у 3,7 разу (до 1,99%), що може бути наслідком негативного зворотного зв'язку: клітина намагається відновити транскрипцію *odc1* у відповідь на інгібування активності ферменту. Подібна деметилююча тенденція простежується й для генів *oaz1* та *azin1*. Отже, дія ДФМО супроводжується епігенетичною компенсацією, яка потенційно може обмежувати ефективність його тривалого застосування.

Як показано, поєднане застосування інгібіторів призводить до складної взаємодії. Так, у разі комбінації ДФМО з нораргініном рівень метилування *odc1* зростає порівняно з контролем, що частково нейтралізує деметилуючий ефект ДФМО. Останній спричиняє деметилування *odc1*, що може знижувати його ефективність у режимі монотерапії, тоді як нораргінін викликає гіперметилування ключових регуляторів (*odc1*, *oaz1*, *sat1*), транскрипційно пригнічуючи активність ОДК. Таким чином комбінація цих інгібіторів забезпечує синергічний епігенетичний вплив – узгоджений вплив на метилування регуляторних генів (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox* тощо), що підсилює дію кожного компонента та сприяє стабілізації гомеостазу ПА. Такий профіль метилування створює підґрунтя для стійкого пригнічення метаболізму ПА на рівні транскрипційної регуляції, без надмірної активації катаболічних шляхів, що може розглядатися як перспективна стратегія довготривалого терапевтичного контролю за активністю ОДК.

5.2. Статус метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat*, *amd1* в клітинах L1210 після дії синтетичних інгібіторів ОДК

Оскільки експериментальні лімфолейкози є поширеними моделями для дослідження пухлинного процесу та оцінки протипухлинних впливів, у даній роботі проаналізовано метилування промоторних ділянок генів, залучених до регуляції синтезу активності ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*) у клітинах лімфолейкозу L1210 за дії інгібіторів ферменту. Визначено рівні метилування для ключових генів, що безпосередньо (*odc1*, *oaz1*, *azin1*) або опосередковано (*smox*, *sat1*, *amd1*) регулюють функціональний стан ОДК (табл. 5.2.1-5.2.6). У таблиці наведено показники метилування промоторних ділянок досліджуваних генів, що беруть участь у регуляції функціонального стану ОДК, у пухлинних клітинах L1210 у співвідношенні з кількістю пухлинних клітин у мишей з експериментальним лімфолейкозом за дії нораргініну (табл. 5.2.1).

Таблиця 5.2.1

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану
ОДК в клітинах лімфолейкозу L1210 за дії **нораргініну**

Ген	Контроль , %	Нораргінін, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Кількість клітин L1210, % [#]
<i>odc1</i>	1,58±0,12	13,52±0,94*	8,5*	↓	89
<i>oaz1</i>	0,3±0,02	0,74±0,05*	2,5*	↑	
<i>azin1</i>	0,68±0,04	1,12±0,06*	1,7*	↓	
<i>sat1</i>	0,29±0,03	1,2±0,09*	4*	↓	
<i>smox</i>	0,57±0,05	0,86±0,07*	1,5*	↓	
<i>amd1</i>	0,18±0,02	0,69±0,05*	3,8*	↑	

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Нораргінін спричиняє суттєве підвищення рівня метилування генів: *odc1* – у 8,5 рази, *oaz1* – у 2,5 разу, *sat1* – у 4 рази та *amd1* – у 3,8 разу порівняно з контролем ($p < 0,05$), що супроводжується зменшенням кількості пухлинних клітин до 58% від контрольного рівня ($p < 0,05$). Водночас нижчий у 1,6 разу ($p < 0,05$) рівень метилування гена *azin1* свідчить про можливу епігенетичну активацію його експресії як компенсаторного механізму, спрямованого на підтримку залишкової активності ОДК. Дія ДФМО на клітини лімфолейкозу L1210 реалізується через поєднання прямого інгібування ОДК та епігенетичних змін. Цей інгібітор індукує помірне підвищення метилування *odc1* (у 2,4 разу), *sat1* (у 3,2 разу) та *smox* (у 1,7 разу) ($p < 0,05$), практично не впливаючи рівень метилування *amd1*, але при цьому забезпечує виражене зменшення кількості клітин L1210 – до 55% від контролю ($p < 0,05$). Підвищені відносно контрольних значень рівні метилування промоторів генів *smox* і *sat1*, що опосередковано регулюють обмін ПА, можуть свідчити про обмеження деградації ПА, що частково компенсує їх дефіцит, зумовлений блокадою активності ОДК (табл. 5.2.2).

Таблиця 5.2.2

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану
ОДК в клітинах лімфолейкозу L1210 за дії ДФМО

Ген	Контроль , %	ДФМО, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Кількість клітин L1210, % [#]
<i>odc1</i>	1,58±0,12	3,78±0,25*	2,4*	↓	55
<i>oaz1</i>	0,3±0,02	0,29±0,03	~	-	
<i>azin1</i>	0,68±0,04	0,42±0,03*	1,6*	↑	
<i>sat1</i>	0,29±0,03	0,09±0,01*	3,2*	↑	
<i>smox</i>	0,57±0,05	0,98±0,07*	1,7*	↓	
<i>amd1</i>	0,18±0,02	0,12±0,01*	1,5*	-	

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Таблиця 5.2.3

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану
ОДК в клітинах лімфолейкозу L1210 за дії ДФМО та нораргініну

Ген	Контроль, %	ДФМО+ нораргінін, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Кількість клітин L1210, % [#]
<i>odc1</i>	1,58±0,12	9,66±0,45*	6*	↓	51
<i>oaz1</i>	0,3±0,02	0,9±0,04*	3*	↑	
<i>azin1</i>	0,68±0,04	1,38±0,05*	2*	↓	
<i>sat1</i>	0,29±0,03	0,94±0,05	3,2*	↓	
<i>smox</i>	0,57±0,05	0,77±0,03*	1,4*	↓	
<i>amd1</i>	0,18±0,02	1,18±0,06*	6,6*	↑	

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Комбіноване введення ДФМО та нораргініну супроводжується достовірно вищими рівнями метилування досліджуваних генів порівняно з їхнім окремим застосуванням ($p < 0,05$) та демонструє виражений протипухлинний ефект – зменшення кількості пухлинних клітин до 51% від контрольних значеннями, $p < 0,05$ (табл. 5.2.3).

Застосування МГБГ як самостійного засобу призводило до підвищення метилювання генів, що регулюють активність ОДК (*odc1* – у 2 рази, *oaz1* – у 1,7 разу, *azin1* – у 1,4 разу, *sat1* – у 2 рази та *amd1* – у 1,4 разу порівняно з контролем ($p<0,05$) (табл. 5.2.4).

Таблиця 5.2.4

Метилювання промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану ОДК в клітинах лімфолейкозу L1210 за дії МГБГ

Ген	Контроль, %	МГБГ, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Кількість клітин L1210, % [#]
<i>odc1</i>	1,58±0,12	3,11±0,14*	2*	↓	67
<i>oaz1</i>	0,3±0,02	0,51±0,03*	1,7*	↑	
<i>azin1</i>	0,68±0,04	0,93±0,05*	1,4*	↓	
<i>sat1</i>	0,29±0,03	0,58±0,04*	2*	↓	
<i>smox</i>	0,57±0,05	0,56±0,06	~ 1	-	
<i>amd1</i>	0,18±0,02	0,25±0,03*	1,4*	↑	

Примітки: * – $p<0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Це свідчить про часткову участь МГБГ в епігенетичній регуляції функціонального стану ОДК і супроводжується зменшенням кількості пухлинних клітин до 67% ($p<0,05$)

Як показано вище (розділ 3) найвищу протипухлинну ефективність щодо лімфолейкозу L1210 забезпечує комбіноване застосування ДФМО та МГБГ. Скоординоване епігенетичне пригнічення генів прямої (*odc1*) та опосередкованої (*sat1*, *amd1*) регуляції ОДК супроводжується зменшенням кількості пухлинних клітин до 45% від контрольного рівня ($p<0,05$) за умов комбінованої дії ДФМО та МГБГ. Це асоціюється з достовірно підвищеним рівнем метилюванням: *odc1* – у 1,9 разу, *oaz1* – у 3,4 разу, *azin1* – у 2,2 разу, *sat1* – у 4 рази, *smox* – у 1,9 разу та *amd1* – у 5,5 рази порівняно з контролем, $p<0,05$ (табл. 5.2.5).

Таблиця 5.2.5

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану
ОДК в клітинах лімфолейкозу L1210 за дії ДФМО та МГБГ

Ген	Контроль , %	ДФМО+ МГБГ, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональний стан ОДК**	Кількість клітин L1210, % [#]
<i>odc1</i>	1,58±0,12	3,01±0,18*	1,9*	↓	45
<i>oaz1</i>	0,3±0,02	1,02±0,07*	3,4*	↑	
<i>azin1</i>	0,68±0,04	1,5±0,06*	2,2*	↓	
<i>sat1</i>	0,29±0,03	1,16±0,05*	4*	↓	
<i>smox</i>	0,57±0,05	1,08±0,06*	1,9*	↑	
<i>amd1</i>	0,18±0,02	0,99±0,04*	5,5*	↑	

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Поєднаний вплив ДФМО, нораргініну та МГБГ демонструє достовірно вищі порівняно з контрольними рівні метилування генів (табл. 5.2.6).

Таблиця 5.2.6

Метилування промоторних ділянок генів-регуляторів функціонального стану
ОДК в клітинах лімфолейкозу L1210 за дії ДФМО, нораргініну та МГБГ

Ген	Контроль, %	ДФМО+ нораргінін+ МГБГ, %	Різниця порівняно з контролем, рази	Вектор впливу на функціональ ний стан ОДК**	Кількість клітин L1210, % [#]
<i>odc1</i>	1,58±0,12	3,07±0,18*	2*	↓	60
<i>oaz1</i>	0,3±0,02	100±4,0*	333*	↑	
<i>azin1</i>	0,68±0,04	1,37±0,08*	2*	↓	
<i>sat1</i>	0,29±0,03	0,3±0,02*	~ 1	-	
<i>smox</i>	0,57±0,05	1,64±0,09*	2,9*	↑	
<i>amd1</i>	0,18±0,02	0,83±0,06*	4,6*	↑	

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – потенційне підвищення активності ОДК (↑), потенційне пригнічення активності ОДК (↓); [#] – показники наведено відносно контролю (100%)

Так рівні метилювання *odc1*, *azin1* та *smox* достовірно підвищуються у 2 рази, виражену гіперметилюваність має *oaz1* (у 3,33 разу) та *amd1* (у 4,6 разу) ($p < 0,05$), що асоційоване зі зниженням кількості пухлинних клітин до 60% від контрольних значень, $p < 0,05$ (табл. 5.2.6).

Таким чином, застосування інгібіторів ОДК зумовлює суттєві епігенетичні перебудови у низці генів, що призводить до пригнічення експресії та активності ОДК і стабілізації обміну ПА. Найвищі рівні гіперметилювання *odc1* спостерігалися за дії нораргініну та його комбінації з ДФМО, тоді як різке підвищення метилювання *oaz1* за умов поєднаного застосування ДФМО, нораргініну та МГБГ може свідчити про порушення контрольних механізмів регуляції функціонального стану ОДК.

Отримані результати дозволили встановити зв'язок між рівнями метилювання ключових генів-регуляторів ОДК, функціональною активністю ензиму в пухлинних клітинах та протипухлинним ефектом застосованих інгібіторів і їхніх комбінацій. Проведений аналіз підтверджує доцільність подальших досліджень, спрямованих на розробку молекулярно-спрямованих стратегій протипухлинної терапії, що базуються як на прямих, так і на опосередкованих механізмах регуляції обміну ПА за участю ОДК.

5.3. Статус метилювання генів *odc1* та *oaz1* в клітинах L1210 та P388 після дії інгібіторів ОДК

Проведене порівняльне дослідження рівнів метилювання генів *odc1* та *oaz1*, вміст білків ОДК та с-Мус в клітинах L1210 та P388 за дії комплексу синтетичних інгібіторів ОДК.

Досліджено протипухлинний вплив інгібіторів ОДК – ДФМО та МГБГ при їхньому комбінованому застосуванні. У мишей з лімфолейкозом L1210 на 10-ту добу після перещеплення кількість пухлинних клітин в асцитній рідині була майже у 2 рази меншою порівняно з контрольною групою ($7,8 \pm 0,5 \times 10^6$ /мл проти $15,5 \pm 1,4 \times 10^6$ /мл клітин, відповідно) ($p < 0,05$); гальмування росту L1210 склало 49,7% (рис. 5.3.1). У мишей з

лімфолейкозом Р388 на 12-ту добу після перещеплення комбіноване застосування ДФМО та МГБГ демонструвало менш виражений протипухлинний ефект порівняно з моделлю L1210: кількість пухлинних клітин в асцитній рідині становила $8,6 \pm 0,18 \times 10^6$ /мл клітин, що лише у 1, 3 разу нижче від контрольної групи ($11,09 \pm 0,83 \times 10^6$ /мл клітин ($p < 0,05$) за показника гальмування росту 27,7% (рис. 5.3.1).

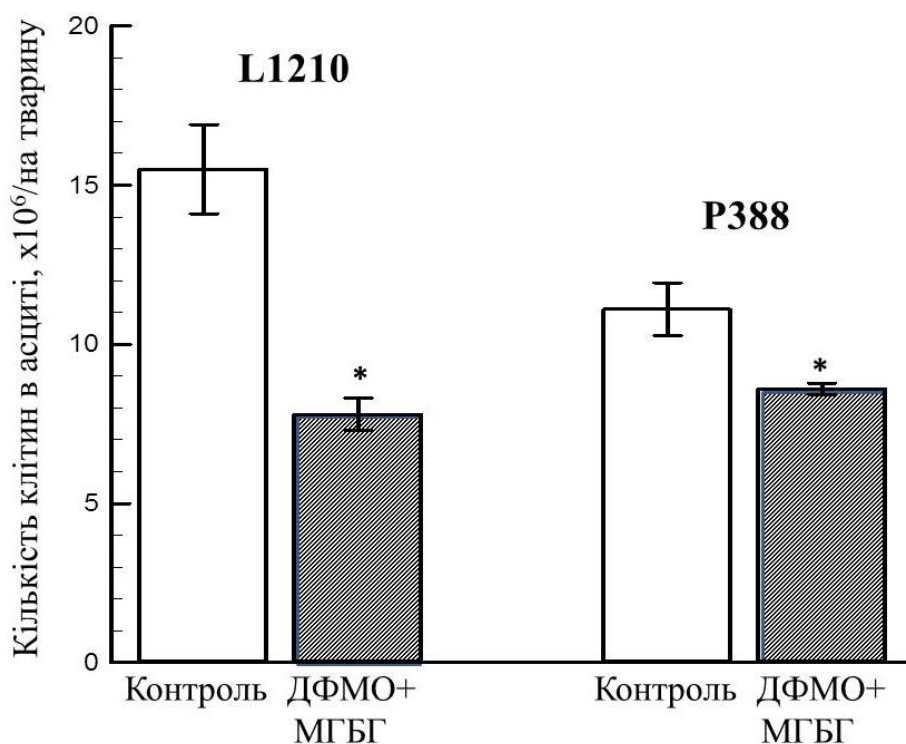


Рисунок 5.3.1 – Кількість асцитних клітин у моделях L1210 та P388.

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

Отримані результати свідчать про більш виражений протипухлинний ефект комбінованої дії ДФМО та МГБГ на моделі L1210, де показник гальмування пухлинного росту був майже у 2 рази вищим, ніж на моделі P388 (рис. 5.3.1). Це може бути пов'язано з відомою вищою чутливістю клітин L1210 до терапії, тоді як клітини P388 характеризуються високою агресивністю та стійкістю до низки цитостатиків [171].

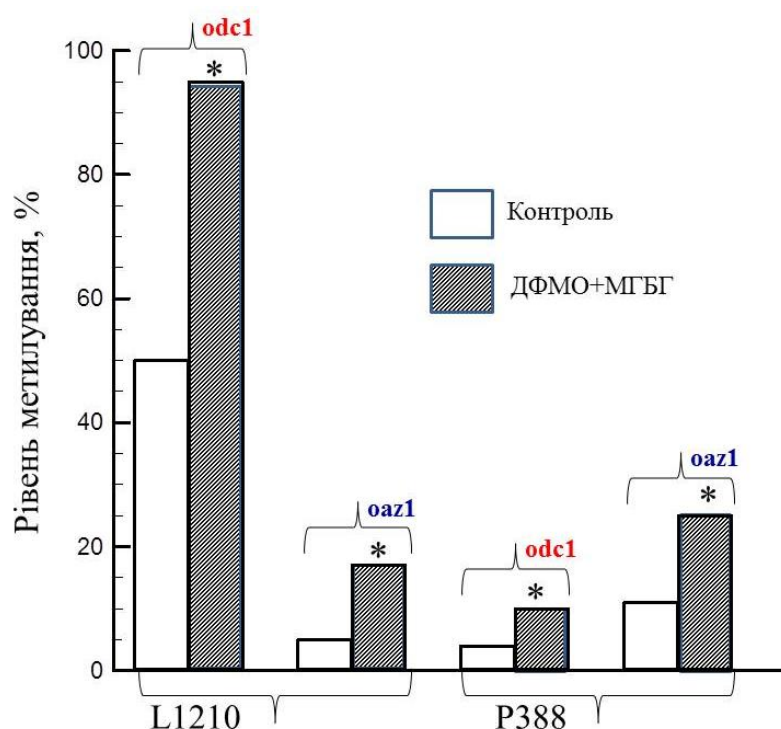


Рисунок 5.3.2 – Рівень метилювання генів *odc1* та *oaz1* у клітинах L1210 та P388. Примітка. * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Дослідження рівнів метилювання генів-регуляторів ОДК у клітинах L1210 виявило суттєве підвищення метилювання промоторів *odc1* та *oaz1* під впливом ДФМО і МГБГ порівняно з контролем – 95% проти 50% та 17% проти 5%, відповідно (у 1,9 і 3,4 разу), $p < 0,05$. У клітинах P388 метилювання *odc1* та *oaz1* також було достовірно вищим – 2,5 та у 2,3 разу відповідно ($p < 0,05$).

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 Р388.

Отже, різниця у співвідношенні рівнів метилування є ключовим показником чутливості клітин до інгібіторів. Клітини L1210 виявляють більшу схильність до зниження активності ОДК під впливом інгібіторів, тоді як Р388 зберігає відносну резистентність.

У клітинах L1210 за дії ДФМО та МГБГ вміст ОДК та вміст онкобілка с-Мус був у 1,8 та 3,1 разу нижчим, ніж у контрольних мишей, $p < 0,05$ (рис. 5.3.3). У клітинах Р388 ці відмінності були менш вираженими: вміст ОДК був у 1,5 разу, а с-Мус – лише у 1,2 разу меншим за такі показники в контрольній групі тварин, $p < 0,05$.

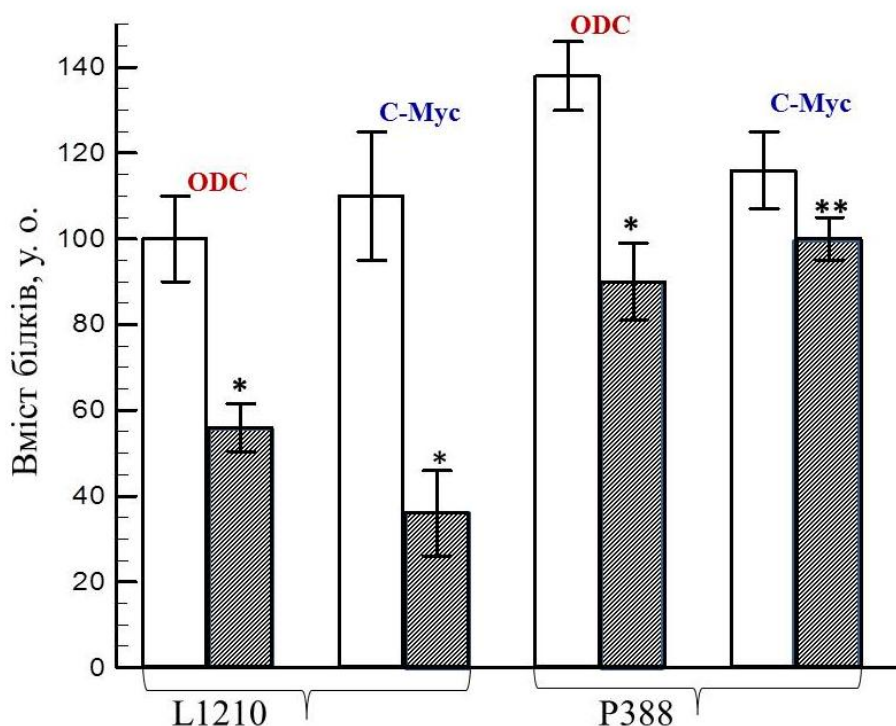


Рисунок 5.3.3 – Вміст білків ОДК та с-Мус у клітинах L1210 та Р388.

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

Кореляційний аналіз виявив виражену обернену залежність між рівнем вмісту ОДК та ступенем метилування генів *odc1* і *oaz1* у клітинах L1210 за

дії ДФМО та МГБГ (коефіцієнти кореляції $-0,55$ та $-0,49$ відповідно; $p < 0,05$) (рис. 5.3.4, 5.3.5). У клітинах Р388 подібний зв'язок був значно слабшим (коефіцієнти кореляції $-0,41$ та $-0,37$ відповідно; $p < 0,05$). Базовий епігенетичний стан клітин, вочевидь, визначає їхню чутливість до інгібіторів. Така відмінність може пояснюватися, зокрема, виявленими відмінностями у вихідних (контрольних) рівнях метилювання генів-регуляторів ОДК (рис. 5.3.2).

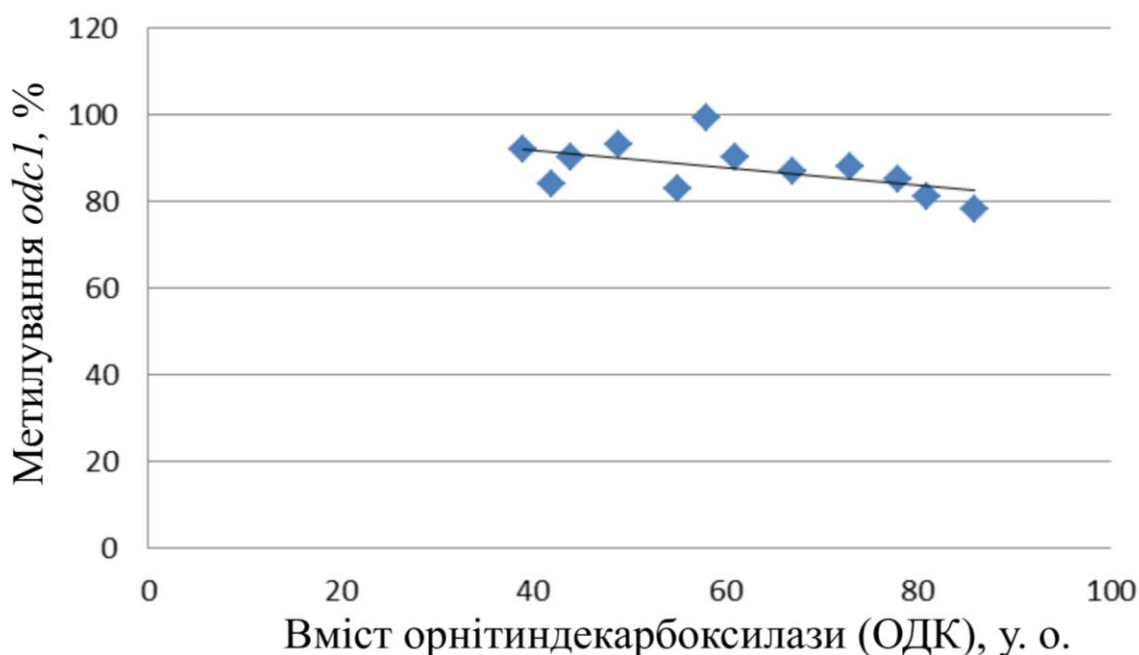


Рисунок 5.3.4 – Вміст ОДК та метилювання гена *odc1*

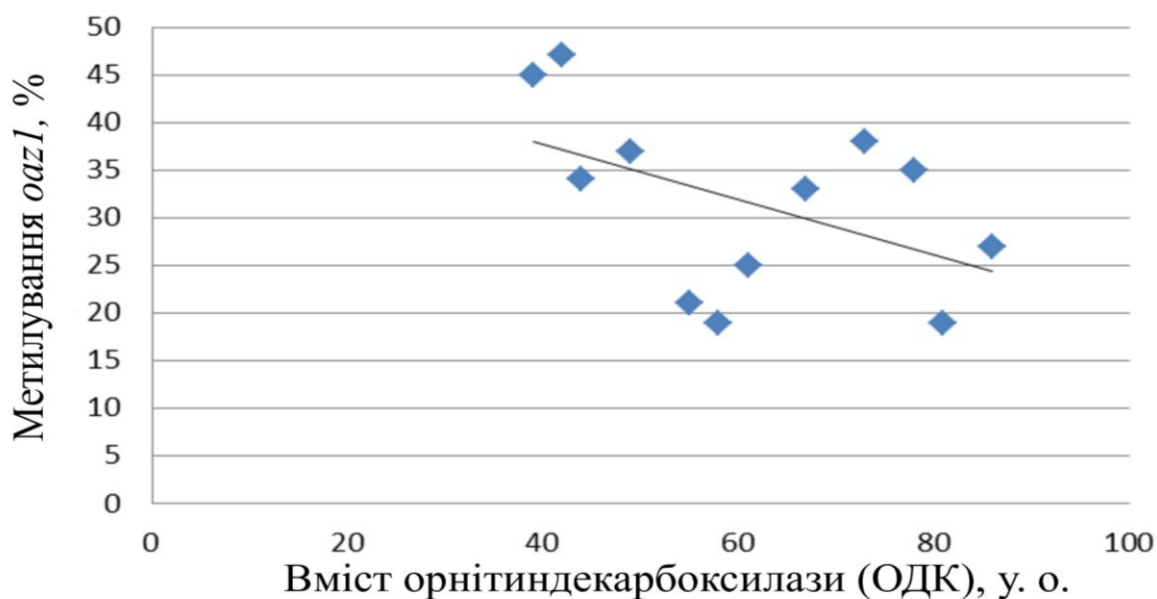


Рисунок 5.3.5 – Вміст ОДК та метилування гена *oaz1*

Гострі експериментальні лімфолейкози L1210 та P388 є поширеними моделями для дослідження протипухлинних стратегій [171], [172]. Водночас, як показали наші результати, вони суттєво різняться за характером змін досліджуваних показників під впливом ДФМО та МГБГ. Аналіз рівнів метилування генів, що регулюють ОДК, продемонстрував, що у клітинах L1210 метилування *oaz1*, відповідального за зниження активності ОДК, зросло у 2,3 разу, тоді як метилування *odc1*, який кодує фермент, – лише у 1,9 разу. Це вказує на домінування епігенетичних факторів, пов'язаних із пригніченням активності ОДК. У клітинах P388, навпаки, метилування *odc1* підвищувалося більш виражено (у 2,5 разу), ніж *oaz1* (у 2,3 разу), що може свідчити про перевагу епігенетичних механізмів, асоційованих із підтриманням синтезу ОДК. Крім того, у клітинах P388 рівень білка с-Мус змінювався під впливом ДФМО та МГБГ значно слабше, ніж у клітинах L1210. Відомо, що с-Мус безпосередньо регулює транскрипцію *odc1* [62], а також впливає на експресію DNMTs та ТЕТ-ферментів [58]. Менш виражена реактивність цього шляху у клітинах P388 може пояснювати епігенетичні зміни у цій моделі.

Високі рівні метилювання промоторів *odc1* та *oaz1* у поєднанні з низьким рівнем білка с-Мус асоціювалися зі зниженою експресією ОДК в обох моделях, що, своєю чергою, корелювало з вираженим протипухлинним ефектом комплексного застосування інгібіторів (рис. 5.3.1-5.3.3). Однакова спрямованість епігенетичних змін та протипухлинної дії ДФМО та МГБГ на моделях, які відрізняються за чутливістю до інгібіторів, свідчить про спільні механізми екзогенної епігенетичної регуляції ОДК. Отримані результати узгоджуються з даними Soda et al. [173], де було показано, що гіперметилювання *odc1* призводить до пригнічення його транскрипції. Вони також опосередковано підтверджують дані щодо ролі метилювання *odc1* у регуляції ПА шляху [55] та участі білка OAZ1 у модуляції епігенетичного профілю клітин [61], [174]. Водночас виявлені нами відмінності у рівнях метилювання між моделями L1210 та P388 визначають додаткові напрями для подальших досліджень.

Таким чином, для повного розуміння механізмів реалізації протипухлинної дії синтетичних інгібіторів ОДК необхідним є ретельний комплексний аналіз не лише змін рівнів метилювання генів-регуляторів, але й спрямованості та інтенсивності цих змін у взаємозв'язку з активністю ОДК та рівнем білків-учасників сигнальних шляхів обміну ПА у пухлинних клітинах.

Підсумки. Встановлено як спільні риси епігенетичної дії різних інгібіторів на гени-регулятори ОДК, так і відмінності у механізмах реалізації їхнього ефекту. У клітинах КЛЛ за дії нораргініну рівні метилювання генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1* зростали у 2,7 - 11,2 разів; *sat1* – у 6,2 рази при застосуванні ДФМО; *odc1* та *smox* – у 2,5 і 3,8 разу відповідно при поєднаній дії ДФМО та нораргініну ($p < 0,05$). У клітинах L1210 за дії нораргініну рівень метилювання *odc1* зростав у 8,5 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$); за дії ДФМО спостерігалось підвищення метилювання *odc1* і *smox* (у 2,4 та 1,7 разу відповідно) при одночасному зниженні метилювання *azin1* і *sat1* (у 1,6 та 3,2 разу відповідно; $p < 0,05$). Поєднана дія ДФМО та нораргініну викликала

шестикратне підвищення метилювання гена *odc1*, що більш ніж у 2,5 разу перевищувало ефект ДФМО окремого. Також встановлено достовірне підвищення метилювання *azin1*, *sat1* та *amd1* (у 2,0; 3,3 та 6,6 рази відповідно; $p < 0,05$), що сприяло пригніченню синтезу ОДК, активації її деградації та блокуванню обхідних шляхів метаболізму ПА. У клітинах L1210 встановлено сильну обернену залежність між вмістом ОДК та рівнем метилювання генів *odc1* і *oaz1* за дії комбінації ДФМО та МГБГ ($r = -0,55$ та $r = -0,49$; $p < 0,05$), тоді як у клітинах P388 цей зв'язок був значно слабшим ($r = -0,41$ та $r = -0,37$; $p < 0,05$).

Результати досліджень, що описані в розділі 3, опубліковані у [165], [167], [169].

РОЗДІЛ 6

КЛЮЧОВІ ЕПІГЕНЕТИЧНІ ЧИННИКИ ЕКЗОГЕННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ У ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ. БАГАТОФАКТОРНИЙ АНАЛІЗ

6.1. Вплив метилування генів-регуляторів ОДК на активність та вміст ензиму в пухлинних клітинах та перебіг експериментальних пухлин. Кореляційний аналіз

У результаті попередніх досліджень (розділ 5) виявлено значні різноспрямовані зміни метилування генів-регуляторів функціонального стану ОДК, характер яких залежав як від застосованого інгібітора, так і від експериментальної моделі пухлини.

З огляду на це, з метою виявлення 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.

У підсумку, виявлено низку обернених залежностей різної сили між рівнями метилування окремих генів, зокрема *odc1*, *smox* і *sat1*, та активністю й вмістом ОДК у пухлинних клітинах, а також показниками прогресування КЛЛ і L1210 (табл. 6.1.1).

Таблиця 6.1.1

Кореляційний аналіз зв'язків між метилуванням генів-регуляторів ОДК та активністю, вмістом ОДК, показниками 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 $p < 0,05$

Показано, що за умов комбінованої дії ДФМО та нораргініну метилування *odc1* достовірно обернено корелює з активністю ($r = -0,64$) та вмістом ОДК ($r = -0,55$), а також із показниками прогресування КЛЛ ($r = -0,44$; $r = -0,39$) та L1210 ($r = -0,35$). На відміну від цього, для *sat1* встановлено зв'язки лише з активністю ОДК у пухлинах, об'ємом метастазування КЛЛ та вмістом ОДК у клітинах L1210 ($r = -0,53$; $r = -0,47$; $r = -0,43$; $p < 0,05$). Рівень метилування гена *smox* обернено корелює з активністю ОДК у тканині КЛЛ ($r = -0,33$; $p < 0,05$).

Очевидно, що отримані результати відображають лише часткове уявлення про вплив застосованих інгібіторів на досліджувані показники, оскільки монофакторний кореляційний аналіз визначає зв'язки лише між двома змінними і не враховує вплив інших чинників. На відміну від цього, багатфакторний 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). Це забезпечує вищий рівень

точності та коректності у визначенні статистичних взаємозв'язків. У біомедичних дослідженнях *multivariable regression* широко застосовується для виявлення факторів, незалежно пов'язаних із результативними показниками (наприклад, прогресією пухлини або активністю ензиму), навіть за умов наявності перекриваючих змінних [175], [176]. Зокрема, цей підхід дає можливість оцінити внесок кожного окремо чинника при фіксованому рівні інших змінних, мінімізуючи вплив прихованих *confounders* і забезпечуючи більш достовірну інтерпретацію результатів [177], [178].

6.2. Ідентифікація ключових епігенетичних факторів екзогенної регуляції ОДК у клітинах карциноми легені Льюїс з використанням багатофакторного аналізу

Відомо, що КЛЛ є метастазуючою експериментальною пухлиною, яка характеризується високою проліферативною активністю та інвазивним потенціалом, що робить її зручною моделлю для аналізу ефектів інгібіторів ОДК. Як було показано нами раніше (розділ 3), серед досліджуваних інгібіторів найбільш виражений ефект щодо зниження активності ензиму та протипухлинної дії виявлено у ДФМО та нораргініну при їхньому поєднаному застосуванні. Аналіз рівнів метилування генів, залучених дорегуляції ОДК, показав, що вплив цих сполук спричиняє системні епігенетичні зміни, які суттєво модифікують функціональний стан ензиму та фенотипові прояви пухлинного процесу. У тварин за дії синтетичних інгібіторів ОДК відзначалося достовірне зниження активності ензиму, що супроводжувалося зменшенням об'єму пухлини та пригніченням метастазування.

Застосування багатофакторного регресійного аналізу дало змогу оцінити внесок змін метилування шести ключових генів обміну ПА (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*) у регуляцію функціонального стану ОДК за умов комбінованої дії ДФМО та нораргініну (рис. 6.2.1, *a*).

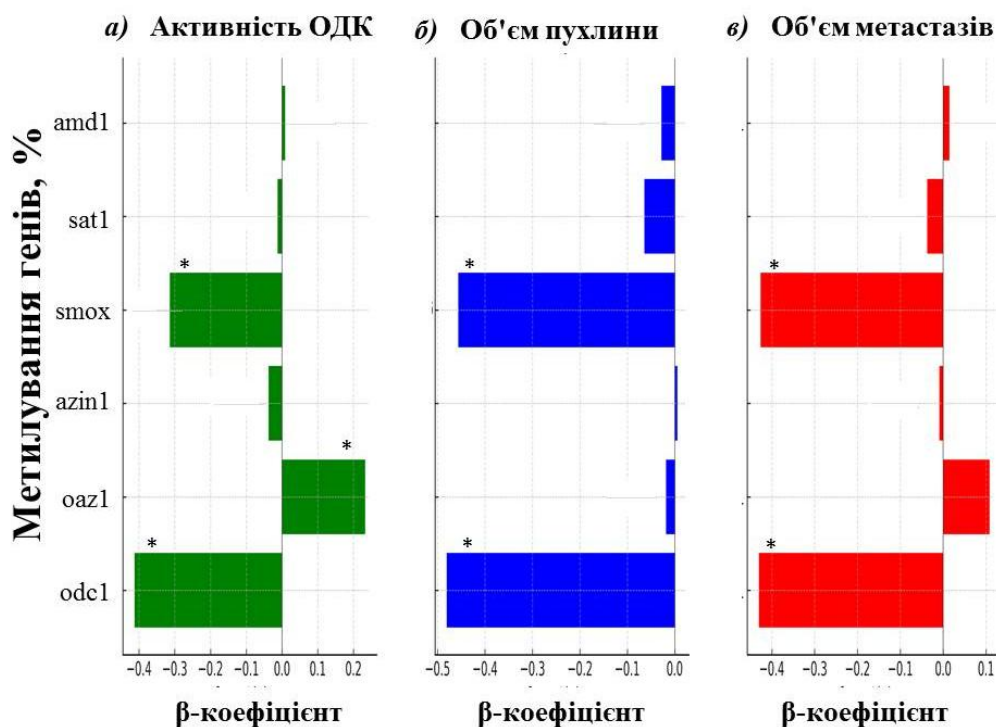


Рисунок 6.2.1 – Зв'язок між рівнем метилювання генів та активністю ОДК в клітинах КЛЛ, об'ємом пухлини та метастазів. Примітка. * – $p < 0,05$

Під впливом ДФМО та нораргініну гіперметилювання гена *odc1* ($\beta = -0,41$, $p = 0,00016$), ймовірно, призводить до зниження його експресії, що безпосередньо пригнічує синтез ОДК та супроводжується зменшенням активності ферменту. Таким чином, реалізується механізм епігенетичної супресії як вторинний шлях інгібування. Цікаво, що за умов дії лише ДФМО, навпаки, спостерігалось гіпометилювання *odc1*, яке можна розглядати як компенсаторну реакцію клітини на блокування ферменту на білковому рівні. Це підтверджує різницю механізмів дії двох інгібіторів: ДФМО переважно впливає посттрансляційно, тоді як нораргінін реалізує ефект через ДНК-модифікацію.

Підвищення рівня метилювання гена *smox* ($\beta = -0,31$, $p = 0,004$), імовірно, блокує катаболізм ПА, зменшуючи утворення спермідину та сперміну, які зазвичай стимулюють синтез ОДК. Це створює другий, метаболічно опосередкований шлях зниження активності ферменту.

Попри гіперметилування гена *oaz1*, асоційоване зі зростанням активності ОДК ($\beta = +0,23$, $p = 0,0085$), сумарний ефект комбінованої дії ДФМО та нораргініну призводив до пригнічення ферменту, зменшення об'єму пухлини та гальмування метастазування. Метилування *oaz1* знизює здатність клітини запускати компенсаторну відповідь на інгібування ОДК, що пояснює цей, на перший погляд, парадоксальний результат.

Метилування генів *sat1* та *amd1* не мало достовірного впливу на активність ОДК або протипухлинну дію інгібіторів, що свідчить про їхню вторинну або компенсаторну роль у регуляції обміну ПА (рис. 6.1.1).

За комбінованої дії ДФМО та нораргініну гіперметилування генів *odc1* ($\beta = -0,48$, $p = 0,002$) та *smox* ($\beta = -0,45$, $p = 0,013$) достовірно асоціювалося зі зменшенням об'єму пухлини у моделі КЛЛ. Воно також корелювало зі зниженням метастатичного потенціалу (*odc1*: $\beta = -0,43$, $p = 0,0041$; *smox*: $\beta = -0,42$, $p = 0,016$), що супроводжувалося обмеженням продукції H_2O_2 – важливого стимулятора ангіогенезу, клітинної міграції та епітеліально-мезенхімального переходу (рис. 6.2.1 б, в).

Отже, комбінована дія ДФМО та нораргініну створює подвійний епігенетичний бар'єр для пухлинного росту: зниження біосинтезу ПА через гальмування їхнього метаболізму через інгібування *smox*.

6.3. Ідентифікація ключових епігенетичних факторів екзогенної регуляції ОДК у клітинах L1210 з використанням багатофакторного аналізу

З метою виявлення ключових епігенетичних регуляторів функціонального стану ОДК у клітинах експериментального лімфолейкозу L1210 проведено багатофакторний регресійний аналіз на основі стандартизованих даних щодо метилування шести генів ПА каскаду (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*), вмісту ОДК та кількості пухлинних клітин в асцитній рідині. Дослідження здійснювалося за умов поєднаного застосування синтетичних інгібіторів ОДК – ДФМО та нораргініну, які

проявили високий ефект зниження рівня ензиму в пухлинних клітинах і виражену протипухлинну дію.

Отримані результати засвідчили наявність сильного оберненого зв'язку між вмістом ОДК у пухлинних клітинах та рівнем метилювання гена *odc1* ($\beta = -0,52$; $p = 0,0008$), що цілком узгоджується з його прямою функціональною роллю як структурного гена ОДК (рис. 6.3.1).

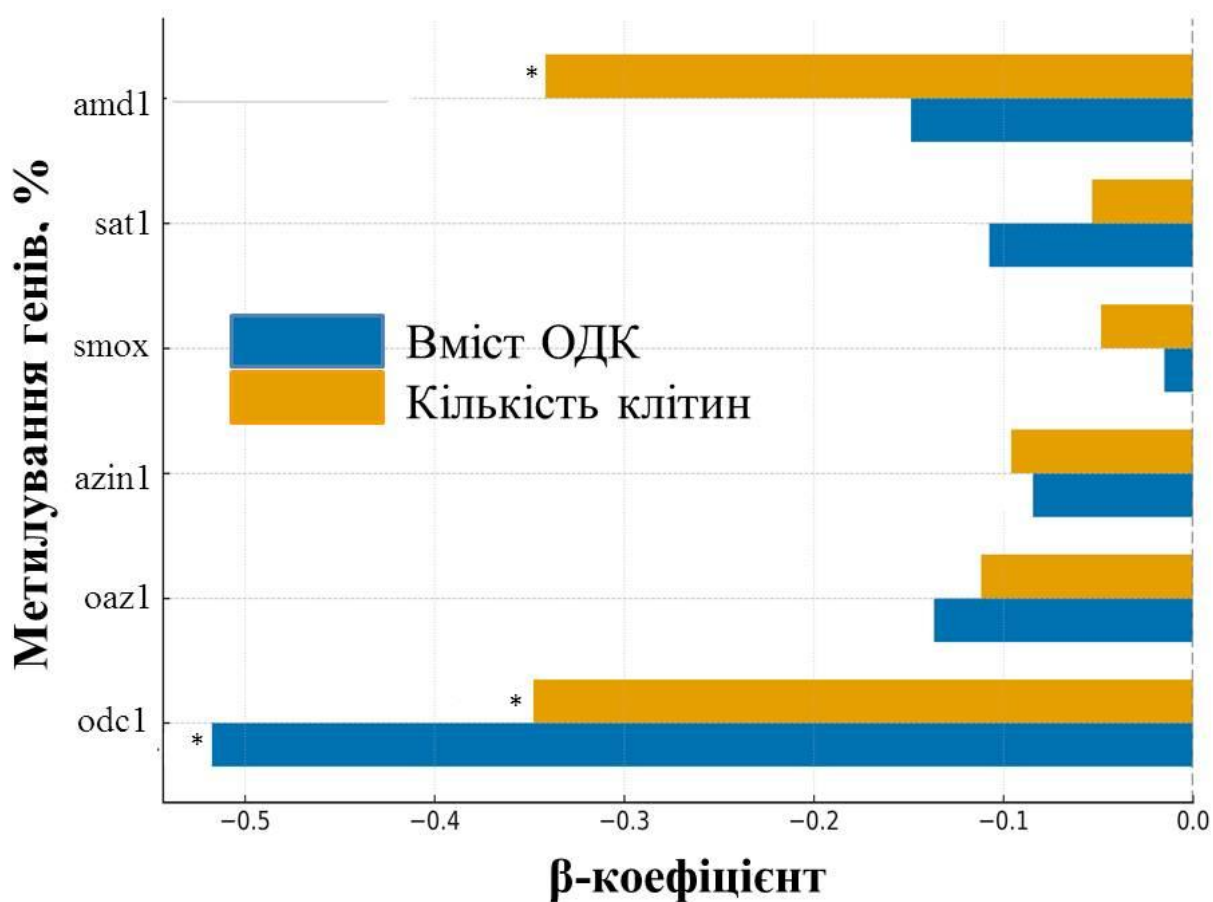


Рисунок 6.3.1 – Зв'язок між рівнем метилювання генів та вмістом ОДК і кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині мишей з лімфолейкозом L1210.

Примітка. * – $p < 0,05$

Серед досліджених генів виявлено групу генів, які діють узгоджено, хоча індивідуальний внесок кожного з них є відносно невеликим. Йдеться про *amd1*, *oaz1*, *azin1* і *sat1*, які демонструють обернений зв'язок із вмістом ОДК і кількістю пухлинних клітин в асцитній рідині. Метилювання цих генів

мало тенденцію до зниження вмісту ОДК, хоча статистично значущого ефекту не зафіксовано. Метилування гена *amd1* ($\beta = -0,15$; $p = 0,0190$), що кодує S-аденозилметіоніндекарбоксилазу – фермент, відповідальний за регуляцію біодоступності S-аденозилметіоніну, ключового метаболіту для реакцій метилування, виявило обернений зв'язок із рівнем ОДК у клітинах L1210, метилування гена *oaz1* мало тенденцію до зниження вмісту ОДК ($\beta = -0,14$, $p = 0,203$), що узгоджується з відомою функцією білка OAZ1 як природного інгібітора ОДК. Подібно, метилування *azin1* також пов'язане зі зниженням вмісту ОДК ($\beta = -0,08$, $p = 0,138$), що, з огляду на його конкурентну взаємодію з OAZ1, може свідчити про спільний механізм модуляції обміну ПА. Метилування гена *sat1* продемонструвало обернений зв'язок із вмістом ОДК ($\beta = -0,11$, $p = 0,202$), і хоча статистичної значущості не досягнуто, напрям ефекту відповідає біологічній ролі цього гена як супресора ПА каскаду через деградацію спермідину та сперміну.

Щодо проліферативної активності, багатофакторний аналіз показав, що значний вплив на кількість пухлинних клітин чинить метилування *odc1* ($\beta = -0,35$; $p = 0,017$) та *amd1* ($\beta = -0,34$; $p = 0,019$), статистично достовірно. Хоча для *oaz1* ($\beta = -0,11$; $p = 0,475$), *azin1* ($\beta = -0,10$; $p = 0,248$) і *sat1* ($\beta = -0,05$; $p = 0,665$) статична значущість не досягнута, ці гени демонструють узгоджений обернений напрям впливу на проліферативну активність пухлинних клітин, що дозволяє розглядати їх як модульну групу супресорного типу, потенційно залучену до комплексного епігенетичного контролю ПА-залежного росту пухлин.

Таким чином, у моделі лімфолейкозу L1210 за умов поєднаної дії ДФМО та нораргініну ідентифіковано ключові гени сильного індивідуального впливу – *odc1* та *amd1*, а також групу спільної дії (*oaz1*, *azin1*, *sat1*), яка, незважаючи на менший внесок, демонструє системну узгодженість у пригніченні ОДК-залежної активації пухлинного росту.

Порівняльний аналіз двох моделей – L1210 та карциноми легені Льюїс – показав, що в обох випадках метилування *odc1*, який кодує саму ОДК,

справляє потужний обернений вплив на активність ензиму ($\beta = -0,52$ для L1210; $\beta = -0,41$ для КЛЛ), що свідчить про його універсальну роль як головної епігенетичної мішені терапевтичного втручання та підтверджує наявність консервативного ПА-залежного механізму пригнічення пухлинного росту.

У КЛЛ додатковий незалежний внесок продемонструвало також метилювання *stox*, яке асоціювалося зі зниженням активності ОДК ($\beta = -0,31$, $p = 0,004$), зменшенням об'єму пухлини ($\beta = -0,45$, $p = 0,013$) та метастазування ($\beta = -0,42$, $p = 0,016$). У L1210 окрім *odc1*, ключовим чинником виявився *amd1*, тоді як *oaz1*, *azin1* і *sat1* формують допоміжний супресорний модуль.

Підсумки. Метилювання *odc1* є провідним епігенетичним фактором регуляції активності ОДК як у клітинах КЛЛ, так і в L1210. За умов поєднаної дії ДФМО та нораргініну метилювання *odc1* обернено корелює з активністю та вмістом ОДК ($\beta = -0,41..-0,52$; $p < 0,001$) і асоціюється зі зменшенням об'єму пухлини та метастазів у КЛЛ, а також зменшенням кількості пухлинних клітин у L1210.

Метилювання гена *stox* у клітинах КЛЛ виступає другим ключовим епігенетичним механізмом протипухлинної дії інгібіторів, знижуючи катаболізм ПА та утворення сигнальних метаболітів (зокрема H_2O_2), що зменшує проліферативний та інвазивний потенціал пухлини ($\beta = -0,27..-0,31$; $p < 0,05$).

У клітинах L1210 другорядну, але узгоджену дію демонструють гени *amd1*, *oaz1*, *azin1*, *sat1*. Вони формують модуль супресорного типу, який обернено впливає на вміст ОДК та кількість пухлинних клітин, хоча статистично значущим є лише вплив *amd1* на кількість пухлинних клітин ($\beta = -0,34$; $p < 0,019$).

Багатофакторний регресійний аналіз підтвердив, що комбінована дія ДФМО та нораргініну реалізує подвійний епігенетичний блок, а саме – пригнічення *odc1* знижує біосинтез ПА, метилювання *stox* обмежує їхній

катаболізм та утворення сигнальних метаболітів. Це створює “подвійний бар’єр” для проліферації, ангиогенезу та метастазування.

Отже, метилування *odc1* і *smox* у клітинах КЛЛ та *odc1* і *amd1* у клітинах L1210 є ключовими незалежними епігенетичними факторами, що визначають активність та вміст ОДК і ступінь пухлинної прогресії за умов комбінованої дії інгібіторів.

Результати досліджень, що описані в розділі 3, опубліковані у [165], [166], [167], [169]

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сучасні дослідження показали, що однією з біологічних ознак раку є «метаболічне перепрограмування», коли пухлинні клітини перебудовують свої метаболічні мережі для максимального забезпечення енергією неконтрольованої проліферації клітин [179]. У більшості випадків це супроводжується підвищенням експресії певних ключових білків [180]. Тому загальною стратегією розробки лікарських засобів є безпосереднє порушення сигнальних осей синтезу та активації білків із підвищеною експресією за допомогою специфічних інгібіторів. Проте, оскільки такі білки залучені до складних сигнальних мереж, зворотні компенсаторні механізми цих мереж можуть знижувати ефективність інгібування. Важливість підвищення ефективності лікування онкологічних хворих зумовлює інтенсивний розвиток новітніх підходів у протипухлинній терапії, зокрема молекулярно-орієнтованої (таргетної) терапії [16]. Однією з досліджуваних молекул-мішеней є ОДК – ензим, що регулює синтез ПА, критично важливих для проліферації, виживання та міграції пухлинних клітин [54]. Відомо, що підвищена активність ОДК асоційована з агресивним перебігом багатьох пухлин [6]. Попередні дослідження показали, що функціонально активна форма ОДК – це гомодимер, який перебуває у динамічній рівновазі між активною димерною та неактивною мономерною формами [181], [182]. Активність ОДК регулюється білковим інгібітором – антизимою ОДК (OAZ1), який зв'язується з мономерами ОДК і індукує убіквітин-незалежну деградацію ферменту за участі 26S протеасоми [183]. OAZ1, у свою чергу, блокується інгібітором антизиму ОДК (AZIN1), який вивільняє ОДК зі зв'язаного з OAZ1 стану. Як специфічний інгібітор ОДК, DFMO (α -дифлуорометилорнітин) має перспективи клінічного використання, зокрема при лікуванні раку шкіри, профілактиці аденокарциноми простати та відновленні пам'яті. Однак ковалентне зв'язування DFMO з ОДК

несподівано підвищує спорідненість комплексу ОДК–OAZ1, що прискорює кліренс інактивованої ОДК та підвищує компенсаторну експресію ферменту [182]. Тому створення нових інгібіторів ОДК з іншими механізмами дії може мати високу цінність. Блокада ОДК, як на рівні синтезу, так і на рівні активності, розглядається як один із перспективних напрямків у створенні препаратів для таргетної терапії [55], [56], [57], [58]. Серед засобів екзогенної регуляції активності ОДК – низка синтетичних інгібіторів ензиму, які відрізняються за механізмами дії. Попри те, що на сьогодні існує значна кількість робіт щодо вивчення ролі ОДК та пов'язаних з нею сигнальних шляхів в пухлинній прогресії [13], [25], [58], [59], [60], залишається актуальною необхідність розширення розуміння механізмів дії її інгібіторів, зокрема на рівні епігеному. Наразі виявлено, що підвищена експресія гену *odc1*, який кодує ОДК, та зниження експресії білка-антизиму OAZ1 (продукту гена *oaz1*) асоційовані з агресивним фенотипом низки пухлин [6]. Доведено, що гіперметилування промотору *odc1* пригнічує експресію гена і сприяє порушенню обміну поліамінів [61]. Прямі дані щодо метилування промотору *oaz1* на тепер обмежені, але відомо, що антизим OAZ1 істотно знижує рівень глобального метилування ДНК [61]. Відомо також, що ген *odc1* є прямою транскрипційною мішенню онкобілка c-Мус, що зумовлює тісний зв'язок між активацією цього онкогену та посиленням поліамінового метаболізму [13], [62].

Зважаючи на це, дослідження метилування промоторних ділянок генів, що беруть участь у прямій (*odc1*, *oaz1*, *azin1*) та опосередкованій (*sat1*, *smox*, *amd1*) регуляції активності ОДК, за дії її інгібіторів, є обґрунтованим і може слугувати підґрунтям для подальшого розширення досліджень у цьому напрямі. Тож нами поставлено за мету дослідити рівні метилування генів *odc1*, *oaz1*, *sat1*, *smox*, *amd1* вміст білків регуляції ОДК при пухлинному рості клітина W-256, КЛЛ, L1210 та P388 за дії синтетичних інгібіторів ОДК.

Важливим для блокування ОДК та виснаження рівня поліамінів є вплив на метаболізм аргініну. Пригнічення аргінази перешкоджає синтезу орнітину

та інгібує клітинну проліферацію [184]. L-N ω -гідроксил-L-аргінін (NOHA), побічний продукт синтезу NO, блокує утворення орнітину через додаткову гідроксильну групу біля ω -атому азоту. Його синтетичний аналог — L-N ω -гідрокси-нораргінін (нораргінін) – має у 40 разів вищу афінність до аргінази та ефективно пригнічує ріст злоякісних клітин [185], [186], [187]. Механізм дії нораргініну включає метаболічну блокаду та імунне модулювання, посилюючи комбіновані протипухлинні стратегії. У наших дослідженнях він знижував активність ОДК і гальмував ріст КЛЛ на 54%, тоді як у L1210 вплив на ОДК був відсутній, а зменшення кількості пухлинних клітин становило ~11%, що може свідчити про неспецифічний метаболічний стрес.

ДФМО – синтетичний аналог орнітину, інгібітор активності ОДК. Водночас, механізми протипухлинної дії ДФМО на сьогодні недостатньо вивчені. Зокрема, досі немає відповіді на корінне питання щодо молекулярних механізмів динамічної стійкості ефекту інгібування активності ОДК в клітинах, особливо *in vivo*. Справді, хоча для кожної окремої молекули ОДК зв'язування з ДФМО необоротне, сумарний ефект зменшення активності ОДК в клітині, на перший погляд, мав би бути короткотривалим та нестабільним, транзиторним, і тривати щонайбільше кілька годин після кожного введення ДФМО в організм. Така нестійкість мала б спричинятися досить швидким виведенням ДФМО з організму [188], високою швидкістю біосинтезу та катаболізму ПА в клітині [189] та наявністю метаболічного регуляторного комплексу з високоефективними зворотними зв'язками, який забезпечує компенсаторну регуляцію активності ОДК у відповідь на зміни концентрації ПА в клітині і складається з самої ОДС, її антизиму (природного білка-інгібітора) OAZ та природного інгібітору антизиму – білка AZIN [182]. Отже, стратегії монотерапії досі не дали задовільних клінічних результатів. Проте комбіновані методи лікування можуть мати більший потенціал для клінічного застосування. Метою комбінованих стратегій є зменшення дози кожного препарату, необхідної для досягнення ефекту, тим самим знижуючи токсичність.

У нашому дослідженні на трьох різних моделях пухлинного росту встановлено, що найефективнішими схемами були комбінації ДФМО з нораргініном, які зумовлювали зниження активності ОДК у клітинах КЛЛ та у клітинах P388 у 2,5 і 2,0 рази відповідно порівняно з контролем, а вмісту ферменту в клітинах лімфолейкозу L1210 – у 10 разів. Імовірно, подвійний механізм дії таких поєднань реалізується через зменшення утворення субстрату (L-орнітину) і пряме інгібування активного центру ОДК, що відповідає літературним уявленням про багаторівневу регуляцію обміну ПА [39], [59], [164], [169]. Це підтверджує ключову роль ОДК як регулятора проліферації пухлинних клітин, що також відображено в інших дослідженнях при раку передміхурової залози, на моделях раку товстої кишки та нейроblastоми [190], [191].

ПМГ (у формі фосфату) чинить протипухлинну дію, індукуючи оксидативний стрес, ДНК-пошкодження, зупинку клітинного циклу та апоптоз [192]. У наших дослідженнях на моделях W-256, L1210 та P388 застосування ПМГ зменшує об'єм пухлин у 2 рази та знижує експресію ОДК у 1,4–1,9 разу, що узгоджується з його роллю як ключового ферменту обміну ПА. Метаболомний аналіз [193] підтверджує вплив ПМГ на амінокислотний та енергетичний метаболізм, потенційно змінюючи поліаміновий гомеостаз. Відомі дані про протипухлинну, імуномодулюючу дію гуанідинових сполук [194] підтримують наш висновок, що ПМГ може інгібувати ОДК як через стрес-індуковані, так і епігенетичні механізми [173], [195].

Кореляційний аналіз (коефіцієнт Спірмена) виявив тісний позитивний зв'язок між активністю ОДК і об'ємом пухлини на 26-ту добу ($r = 0,90$; $p = 0,037$), що підкреслює провідну роль ферменту у проліферації пухлинних клітин. Натомість зв'язок із кількістю метастазів був відсутній ($r = 0,00$; $p = 1,0$), хоча при дії ДФМО та його комбінацій об'єм метастазів зменшувався у 10–20 разів. Це свідчить, що інгібітори ОДК переважно гальмують локальний ріст пухлини, а пригнічення метастазування, ймовірно, реалізується через інші механізми – зміни адгезії, мікрооточення чи імунної відповіді. Подібно

до цього, за даними Soda [196], високий рівень ПА може стимулювати метастазування незалежно від активності ОДК. Отже, ОДК є надійним предиктором локального росту, а для контролю метастазування потрібне комбіноване таргетування додаткових молекулярних мішеней.

Наші дослідження показали, що регуляція ОДК через сигнальні білки NF-κB, c-Мус, p53 та Bcl-xL узгоджується з сучасними літературними даними. Ми встановили, що зниження рівнів p65 у клітинах W-256 та p50/p65 у клітинах L1210 асоціюється зі зменшенням вмісту ОДК. Це підтверджує механізми, описані в огляді Casero Jr et al. [16], де NF-κB визначається як ключовий транскрипційний фактор, що сприяє виживанню пухлинних клітин і позитивно регулює експресію гена *odc1*. Примітно, що у клітинах P388 ми спостерігали протилежний ефект – підвищення рівня NF-κB, що може свідчити про механізм резистентності.

Ми також встановили, що вміст c-Мус – одного з головних транскрипційних активаторів *odc1* – значно знижується в клітинах L1210 під дією інгібіторів, що узгоджується з даними Dong et al. [35] і підтверджує критичну роль цього білка в регуляції синтезу ОДК.

Комбінована діяДФМО та МГБГ спричинює підвищення рівня p53 у клітинах L1210 та P388. Це спостереження узгоджується з літературними даними про зв'язок між p53 і метаболізмом поліамінів. Зокрема, Holbert et al. [54] показали, що p53 може опосередковувати деградацію ОДК. Крім того, p53 відіграє ключову роль у регуляції фероптозу – залізо залежного типу клітинної смерті, що реалізується через активацію гена SAT1 (Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1). Білок SAT1 ініціює деградацію спермідину та сперміну, і виснаження поліамінів стає критичним сигналом для запуску фероптозу. Таким чином, p53 діє як «диригент», що через SAT1 змінює метаболізм ПА і переводить клітину на шлях загибелі. Наші результати підтверджують, що інгібування ОДК підсилює цей p53-залежний механізм клітинної смерті, що також узгоджується з даними про роль p53 в індукції апоптозу в лейкозних клітинах [197].

Активация p53 супроводжувалася зниженням рівня антиапоптотичного білка Bcl-xL, що ми зафіксували у клітинах L1210. Це свідчить про активацію мітохондріального шляху апоптозу як наслідок ефективної інгібіції ОДК. Огляди, зокрема Casero Jr et al. [16], підтверджують, що пригнічення ПА шляху часто призводить до індукції апоптозу через модифікацію білків родини Bcl-2 та Bcl-xL.

У межах нашого дослідження проаналізовано сукупний вплив інгібіторів ОДК на вміст ферменту у клітинах двох моделей – L1210 та P388, які відрізняються біологічними характеристиками. L1210 є високоагресивною та чутливою до цитостатиків, тоді як P388 демонструє вищу резистентність і стабільний проліферативний профіль [198], що зумовлює різний характер відповіді на інгібітори.

У клітинах L1210 ми виявили узгоджені зміни регуляторних білків: одночасне зниження позитивних регуляторів (NF-κB, c-Myc, Bcl-xL) та підвищення негативного регулятора (p53). Така скоординована відповідь зумовила ефективне пригнічення ОДК і високий індекс гальмування росту пухлини (55%). У P388 відповідь була суперечливою – підвищення NF-κB поєднувалося з активацією p53, що, ймовірно, знижує ефективність інгібіторів і пояснює нижчий індекс гальмування (46%).

Важливу роль у цій відмінності відіграє базовий епігенетичний стан клітин. Ми виявили відмінності у вихідних рівнях метилування промоторів *odc1* та *oaz1*, які, ймовірно, визначають чутливість до інгібіторів: у L1210 переважають епігенетичні фактори, що сприяють зменшенню вмісту ОДК, тоді як у P388 – з механізмами, що підтримують його високий рівень. Це узгоджується з даними Soda [173], де гіперметилування *odc1* розглядається як механізм пригнічення його транскрипції.

Таким чином, наші результати співвідносяться з концепцією, викладеною Casero & Pegg [16], згідно з якою інгібування ОДК інтегрується у складні сигнальні мережі, що визначають долю клітини – проліферацію або загибель. Приклад L1210 і P388 демонструє, що ефективність інгібіторів

ОДК залежить від модель-специфічної узгодженості сигнальної відповіді та епігенетичного профілю: L1210 реагує скоординованим пригніченням ОДК, тоді як у P388 суперечливі сигнали обмежують терапевтичний ефект, незважаючи на активацію p53.

ПА стабілізують РНК, і їхнє виснаження може призвести до її деградації [54]. Тому ми досліджували активність РНКаз, що здійснюють посттранскрипційний контроль. Наші дані показали, що активація РНКаз є спільним механізмом пригнічення ОДК в обох моделях. Застосування ДФМО та МГБГ достовірно підвищувало активність РНКаз у L1210 – на 40%, у P388 – на 50%. Це свідчить про включення компенсаторних посттранскрипційних механізмів у відповідь на депривацію ПА. Виявлені нами відмінності у вихідній активності та відносному зростанні РНКаз між L1210 і P388 можуть слугувати прогностичним маркером чутливості до терапії.

Водночас, отримані нами дані свідчать, що сигнальна відповідь пухлинних клітин на інгібітори ОДК тісно пов'язана з їхнім епігенетичним станом, зокрема з рівнем метилування генів-регуляторів функціонального стану ферменту. У моделі L1210 глибоке зменшення вмісту ОДК супроводжувалося стабільними змінами метилування *odc1*, *oaz1* та *azin1*, що узгоджується зі зниженням експресії ферменту. Натомість у P388, попри активацію p53, спостерігалось збереження або навіть зниження метилування окремих регуляторних генів, що, вірогідно, зумовлює компенсаційне відновлення активності ОДК та зменшення чутливості до терапії. Така взаємодія сигнальних і епігенетичних механізмів підкреслює важливість комплексного підходу до оцінки ефективності інгібіторів ОДК на різних пухлинних моделях.

Результати аналізу метилування генів *odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1* у клітинах КЛЛ під дією синтетичних інгібіторів ОДК переконливо демонструють, що нораргінін, ДФМО та їхні комбінації (у тому числі з МГБГ) викликають глибокі та диференційовані епігенетичні зрушення у промоторних ділянках генів, які прямо або опосередковано регулюють

функціональний стан ОДК. Такі зміни мають як специфічні риси, притаманні кожному інгібітору, так і синергічний характер при комбінованому застосуванні, що вказує на багатофакторну природу епігенетичної відповіді пухлинних клітин.

Нораргінін спричиняв значне гіперметилування генів прямої регуляції ОДК – *odc1* (у 3,9 разу), *oaz1* (у 11,2 разу) та *azin1* (у 2,7 разу), що узгоджується з літературними даними про асоціацію гіперметилування промоторів цих генів зі зниженням транскрипції та активності ОДК (Nowotarski et al., 2013). Це відповідає загальновідомому механізму епігенетичної регуляції, за яким гіперметилування промоторних ділянок стабільно пригнічує транскрипцію генів. Особливо показовим є гіперметилування *oaz1*, оскільки OAZ1 – природний інгібітор ОДК, який сприяє її убіквітин-незалежній деградації. Репресія *oaz1* теоретично могла б послаблювати інгібіцію ОДК, однак паралельне гіперметилування *odc1*, яке безпосередньо знижує транскрипцію ферменту, має домінуючий вплив, формуючи загальний інгібуючий ефект. Гіперметилування *sat1* (у 11,2 разу) за дії нораргініну, описане також як механізм зниження катаболізму ПА при обмеженні їх синтезу [16], відображає складну адаптивну реакцію пухлинних клітин на блокаду утворення орнітину. Зміни у метилуванні *smox* та *amd1* були мінімальними (1,3 разу), що свідчить про відносну стабільність цих шляхів при дії нораргініну.

ДФМО, незворотний інгібітор ОДК, очікувано знижує активність ферменту на біохімічному рівні, але має протилежний до нораргініну епігенетичний профіль. Виявлено суттєве зниження метилування *odc1* (у 3,8 рази), *oaz1* (у 2,6 рази) та *azin1* (у 2,7 рази) порівняно з контролем, що вказує на потенційну активацію їхньої транскрипції. Така деметилуюча реакція може бути компенсаторним механізмом, спрямованим на відновлення синтезу ОДК та регуляторних білків у відповідь на втрату активного ферменту. Водночас ДФМО індукував гіперметилування *sat1* (у 6,2 рази) та зниження метилування *smox* (у 3 разу) і *amd1* (у 2,4 разу), що могло сприяти

підтриманню пулу ПА альтернативними шляхами. Сукупність цих змін вказує на глибоку перебудову епігенетичного ландшафту при дії ДФМО, яка поєднує пряме інгібування ферменту з активацією генів синтетичної осі та частковим обмеженням катаболізму ПА.

Стратегії монотерапії ОДК-інгібіторами не продемонстрували задовільних результатів, проте комбіновані підходи мають більший потенціал [57]. Мета таких стратегій – зменшити дозу кожного препарату, знизивши токсичність, і водночас підвищити ефективність.

Поєднання ДФМО та нораргініну спричинило гіперметилування *odc1* (у 2,6 разу), що частково нівелює деметилуючу дію ДФМО у монотерапії, вказуючи на здатність нораргініну «повертати» регуляцію у бік транскрипційного пригнічення ферменту. Одночасно відзначено зниження метилування *oaz1* (у 2,1 разу), що могло посилювати інгібуючий вплив OAZ1 на ОДК. Помірні зміни *azin1*, *sat1* і значне гіперметилування *smox* (у 3,8 рази) свідчать про зниження катаболізму ПА через окиснення сперміну. Таким чином, комбінація формує подвійний ефект – обмеження синтезу ПА (гіперметилування *odc1*) і пригнічення їх деградації (через *smox* і *sat1*), що створює дисбаланс у гомеостазі ПА та знижує адаптивний потенціал пухлинних клітин.

Додавання МГБГ до комбінації ДФМО та нораргініну зберегло спрямований вплив на гени прямої регуляції ОДК (*odc1*, *oaz1*, *azin1*), тоді як метилування генів катаболізму (*sat1*, *smox*, *amd1*) практично не змінилося. Це вказує на специфічну дію на синтетичну гілку обміну ПА, що може бути корисним для тривалого зниження проліферативного потенціалу пухлин без надмірної активації стресових реакцій.

Таким чином, ми виявили два принципово різні типи епігенетичної відповіді. Це – гіперметилування прямої регуляторної осі (характерне для нораргініну та його комбінацій), що призводить до транскрипційного пригнічення ОДК і зниження ферментної активності. І це – деметилування

ключових генів синтезу (характерне для ДФМО), що запускає компенсаторну активацію транскрипції та знижує ефективність монотерапії.

Комбіновані стратегії (ДФМО та нораргініну) вирівнюють ці протилежні ефекти та забезпечують стабільне зниження активності та вмісту ОДК, обмежуючи можливості для компенсації через метаболізм ПА, що узгоджується з даними про переваги комбінованого інгібування синтетичних і катаболічних шляхів [16], [39]. Додавання МГБГ переважно впливає на прямі регулятори ферменту, зберігаючи стабільність катаболічних шляхів. Отримані дані свідчать, що епігенетична регуляція є ключовим компонентом відповіді пухлинних клітин на інгібітори ОДК, а комбіновані підходи можуть мати вищу терапевтичну ефективність, що узгоджується з концепцією молекулярно-біологічних механізмів модифікації функціонального стану ОДК при пухлинному процесі.

Наші спостереження чітко демонструють, що базовий епігенетичний стан клітин визначає чутливість до інгібіторів ОДК. Це – важливий висновок, який відповідає концепції персоналізованої терапії, що враховує не лише фармакодинаміку, а й епігенетичні особливості пухлин.

Натепер не відомо про дослідження, де одночасно визначали метилування всієї цієї шістки генів (*odc1*, *oaz1*, *azin1*, *smox*, *sat1*, *amd1*) і досліджували його в рамках багатофакторних зв'язків із активністю та вмістом ОДК та пухлинними кінцевими точками (об'єм/метастази/кількість клітин) у експериментальних моделях під дією ДФМО та нораргініном (або ДФМО та МГБГ). У літературі є дані щодо одного локус/механізму або прогностичних панелей за експресією, але не інтегрований мультигенний, метилома-орієнтований регресійний аналіз, прив'язаний до функціонального стану ОДК і показників пухлинної прогресії, тож нами застосовано новаторський підхід, який дозволив визначити ключові епігенетичні предиктори активності та вмісту ОДК, побудувати інтегровані моделі зв'язку метилування шести ОДК-зв'язаних генів із показниками пухлинної прогресії (об'ємом, метастазуванням, кількістю клітин), а також сформулювати

метиломний предиктор ОДК як узагальнений показник, що відображає чутливість пухлинної системи до інгібіторів ОДК (ДФМО, нораргінін, МГБГ).

У літературі показано, що пригнічення ОДК епігенетичним шляхом, зокрема через гіперметилування промоторної ділянки гена, є ранньою подією у розвитку деяких пухлин, таких як уротеліальний рак. Це підтверджує центральне значення *odc1* у нашому аналізі та узгоджується з виявленими нами сильними оберненими зв'язками між рівнем метилування цього гена та активністю та вмістом ОДК, а також показниками прогресування пухлинного процесу [101].

Класичні дослідження демонструють, що виснаження пулу ПА, зокрема за дії ДФМО, змінює баланс між S-аденозилметіоніном (SAM) та його декарбоксильованою формою (dcSAM), а також впливає на активність ДНК-метилтрансфераз (DNMT). Це, у свою чергу, може призводити як до локального деметилування, так і до інших варіантів зміни метилування залежно від конкретної модельної системи. Наприклад, у клітинах Jurkat при дії ДФМО спостерігалось деметилування промоторної ділянки гена ITGAL, яке частково усувалось після додавання сперміну. Наш висновок про модель-специфічність ефекту (коли ДФМО в одних випадках асоціюється з гіперметилуванням, а в інших – з деметилуванням) співвідноситься з цими літературними даними [199], [200].

Роль SMOX у генерації H_2O_2 та підтримці інвазивних властивостей пухлинних клітин широко описана в оглядах, присвячених взаємозв'язку ROS-сигналіngu та розвитку легеневого раку. Наші результати, що демонструють «подвійний бар'єр» у вигляді гіперметилування *odc1* та *smox*, узгоджуються з зазначеним механізмом, коли зниження синтезу ПА через інгібування активності ОДК супроводжується зменшенням ROS-сигналіngu, який генерується катаболічною гілкою обміну ПА, зокрема за участю SMOX [201].

Сучасні дослідження свідчать, що цілеспрямовані корекції експресії або активності *amd1* змінюють метаболічно-епігенетичний фенотип клітин і можуть мати терапевтичне значення, зокрема у випадку недрібноклітинного раку легені (НДРЛ). Отриманий нами результат, який демонструє значимий обернений вплив рівня метилювання *amd1* на показники росту пухлинних клітин та вміст ОДК у моделі L1210, узгоджується з концепцією, згідно з якою *amd1* здійснює контроль над перерозподілом пулів SAM/dcSAM і, таким чином, визначає метаболічну спроможність клітини до метилювання [202].

Функції OAZ1 (інгібітор ОДК, епігенетичні взаємодії), AZIN1 (антагоніст OAZ1) і SAT1 (катаболізм ПА) добре описані; наш висновок про спільний, але другорядний ефект цієї трійки відповідає даним, наведеним в оглядах, де підкреслюється мережевий, а не моногенний контроль ПА каскаду [1].

Сучасні дослідження, у яких застосовуються ПА-релевантні генні панелі для прогнозування перебігу захворювання (наприклад, раку молочної залози), здебільшого базуються на індексах експресії, орієнтованих на оцінку прогнозу та імунореактивності пухлин. Водночас, вони не охоплюють багатофакторне моделювання рівнів метилювання саме регуляторів ОДК у поєднанні з аналізом активності ферменту та показників метастазування, що підкреслює новизну та унікальність застосованого нами дослідницького дизайну [203]. Останні огляди прямо вказують, що метаболізм ПА перетинається з одновуглецевим обміном і епігенетичними модифікаціями, впливаючи на стан хроматину, імунітет тощо. Наші результати – це практично молекулярний «зріз» цієї загальної концепції з чітким доказом через регресійні моделі [204], [205]. Сучасні дослідження відзначають наявність опису епігенетичної регуляції окремих локусів *odc1* у сечовому міхурі, а також ефекти інгібітора ОДК (ДФМО) на епігенетичному рівні у лімфоцитарних моделях (наприклад, деметилювання ITGAL у

Jurkat-клітинах) [101]. Існують огляди щодо панелей експресії генів, пов'язаних з ПА, які використовуються для прогнозування, зокрема у випадках раку молочної залози. Однак це – здебільшого індекси експресії, орієнтовані на прогноз чи імунореактивність, та вони не підтверджені багатофакторним моделюванням рівнів метилування регуляторів ОДК, поєднаним з аналізом функціональної активності ферменту та показників пухлинної прогресії на *in vivo* моделях, таких як КЛЛ чи L1210, особливо в умовах комбінованої дії ДФМО, нораргініну та МГБГ [204], [205], що також підкреслює новизну застосованого нами підходу.

Проведене дослідження показало, що ефективність інгібіторів ОДК залежить від комплексного впливу на сигнальні каскади та епігенетичний профіль пухлинних клітин. Комбінована терапія ДФМО з нораргініном демонструє синергічний ефект, стабільно знижуючи активність, або вміст ферменту та коригуючи протилежні епігенетичні реакції, що спостерігаються при монотерапії. Ці результати підтверджують перспективність таргетної терапії, що враховує епігенетичні особливості пухлин.

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 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 разу ($p < 0,05$). Встановлено, що при дії ПМГ вміст ОДК у клітинах P388 та W-256 знижувався відповідно у 1,6 та 1,4 разу, 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 та 20 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 раз відповідно). Натомість жоден з 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 та МГБГ (у 2,3 разу) та дещо менше при застосуванні одного лише ДФМО та 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 P388 достовірно зменшувалася лише у 1,3 разу. Під впливом ПМГ маса пухлини W-256 знижувалася у 2 рази, а кількість клітин P388 – у 1,2 разу 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 P388 (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 P388 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, відміченні 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 P388 - 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 разів) при застосуванні нораргініну; гена *sat1* – у 6,2 разів при застосуванні ДФМО; генів *odc1* та *smox* – відповідно у 2,5 та у 3,8 разу при поєднаній дії ДФМО та нораргініну ($p < 0,05$). Встановлено, що у клітинах L1210 інгібітори ОДК та їхня комбінація по-різному модифікують метилування генів-регуляторів ензиму. Якщо під впливом ДФМО метилування *odc1* підвищується у 2,4 разу, 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 дії комбінації ДФМО та МГБГ у клітинах L1210 ($r = -0,55$ та $r = -0,49$, відповідно ($p < 0,05$)) та у клітинах P388 ($r = -0,41$ та $r = -0,37$, відповідно ($p < 0,05$)).

5. З'ясовано значення низки епігенетичних чинників у забезпеченні функціональної активності ОДК та протипухлинній дії інгібіторів ензиму. 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 $r = -0,55$, $-0,35$; $p < 0,05$). Рівень метилування гена *sat1* обернено залежить від рівня активності ОДК в пухлині і об'ємом метастазів у мишей з КЛЛ (відповідно $r = -0,53$, $r = -0,47$; $p < 0,05$) та з вмістом ОДК в клітинах L1210 ($r = -0,43$; $p < 0,05$). Рівень метилування 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 застосування ДФМО та нораргініну рівні метилювання генів *odc1*, *smox* та *oaz1* незалежно корелюють з рівнями активності ОДК у клітинах КЛЛ ($\beta = -0,41$, $p=0,00016$; $\beta = -0,31$, $p=0,004$, $\beta = +0,23$, $p=0,0085$, 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 *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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. R. A. Casero and L. J. Marton, "Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 18, no. 11, pp. 681–695, 2018, doi: 10.1038/s41568-018-0050-3.
2. B. C. Mounce and G. J. Olsen, "Polyamines and Their Role in Virus Infection," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 84, no. 3, pp. e00029–20, 2020, doi: 10.1128/MMBR.00029-20.
3. Y. Chen et al., "c-MYC-driven polyamine metabolism in ovarian cancer: from pathogenesis to early detection and therapy," *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 3, p. 623, 2023, doi: 10.3390/cancers15030623.
4. L. Zhang and M. Wu, "c-Myc-driven metabolic reprogramming through ODC1 in cancer progression," *Cancer Lett.*, vol. 570, p. 216278, 2024, doi: 10.1016/j.canlet.2023.216278.
5. J. Eroles and P. Coffino, "Ubiquitin-independent proteasomal degradation," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.*, vol. 1843, no. 1, pp. 216–221, 2014.
6. V. Tulluri and V. V. Nemmara, "Role of antizyme inhibitor proteins in cancers and beyond," *Onco. Targets. Ther.*, pp. 667–682, 2021.
7. X. Chen, J. Smith, and A. et al. Lee, "Combination treatment with DFMO, temozolomide and radiation reduces glioblastoma cell viability in vitro," *J. Neurooncol.*, vol. 145, pp. 397–405, 2019, doi: 10.1007/s11060-019-03123-4.
8. E. W. Gerner and F. L. Meyskens, "Polyamines and cancer: old molecules, new understanding," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, pp. 928–937, 2009, doi: 10.1038/nrc2763.
9. T. Liu and L. Ma, "NF- κ B-dependent regulation of polyamine metabolism in inflammation-associated cancers," *Front. Immunol.*, vol. 14, p. 1123314, 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1123314.
10. A. E. Pegg, "Regulation of ornithine decarboxylase," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 21, pp. 14529–14532, 2006.

11. C. R. Schultz et al., “Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Ornithine Decarboxylase (ODC) Inhibitors,” *J. Med. Chem.*, vol. 68, no. 5, pp. 5760–5773, 2025.
12. J. A. Zell et al., “Phase IIa clinical biomarker trial of dietary arginine restriction and aspirin in colorectal cancer patients,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 7, p. 2103, 2023.
13. A. E. Pegg, “Functions of polyamines in mammals,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 29, pp. 14904–14912, 2016, doi: 10.1074/jbc.R116.731661.
14. A. Alexandrova and I. Podlipnik, “ODC1 transcriptional control and oncogenic signaling,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 5, p. 1251, 2023, doi: 10.3390/cancers15051251.
15. J. U. Tran and B. L. Brown, “Structural basis for allostery in PLP-dependent enzymes,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 9, p. 884281, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.884281.
16. R. A. Casero Jr, T. Murray Stewart, and A. E. Pegg, “Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 18, no. 11, pp. 681–695, 2018.
17. L. et al. Miller-Fleming, “Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell,” *J. Mol. Biol.*, vol. 427, no. 21, pp. 3389–3406, 2015, doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.020.
18. T. M. Stewart, T. T. Dunston, P. M. Woster, and R. A. Casero Jr, “Polyamine catabolism and oxidative damage,” *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 48, pp. 18736–18745, 2018, doi: 10.1074/jbc.TM118.003337.
19. A. Haider and S. Haghdoost, “Polyamines and oxidative stress: molecular mechanisms and disease relevance,” *Free Radic. Res.*, vol. 54, no. 7, pp. 583–595, 2020, doi: 10.1080/10715762.2020.1792019.
20. S. Zahedi and H. Maleki, “Polyamine metabolism and apoptosis: molecular interplay and therapeutic perspectives,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 146, p. 112557, 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.112557.

21. R. Alexandrova and Č. Podlipnik, “MYC oncogenes as potential anticancer targets,” *Oncog. viruses*, pp. 191–219, 2023.
22. H. Zhang et al., “Elevated expression of HIGD1A drives hepatocellular carcinoma progression by regulating polyamine metabolism through c-Myc--ODC1 nexus,” *Cancer Metab.*, vol. 12, no. 1, p. 7, 2024.
23. F. Anagnostakis, M. Kokkorakis, M. Markouli, and C. Piperi, “Impact of solute carrier transporters in glioma pathology: a comprehensive review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 11, p. 9393, 2023.
24. Y. Miao and J. Liu, “Epigenetic regulation of ornithine decarboxylase and its link to cancer,” *Epigenomics*, vol. 12, no. 3, pp. 217–229, 2020, doi: 10.2217/epi-2019-0314.
25. A. E. Pegg, “Mammalian polyamine metabolism and function,” *IUBMB Life*, vol. 61, no. 9, pp. 880–894, 2009, doi: 10.1002/iub.230.
26. E. V Yang et al., “Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 21, pp. 10357–10364, 2006.
27. Y. Matsui and K. Tsuji, “Stress-induced ODC1 expression and its implication in tumorigenesis,” *Oncol. Rep.*, vol. 42, no. 4, pp. 1587–1594, 2019, doi: 10.3892/or.2019.7289.
28. R. S. Schibalski, A. S. Shulha, B. P. Tsao, O. Palygin, and D. V Ilatovskaya, “The role of polyamine metabolism in cellular function and physiology,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 327, no. 2, pp. C341–C356, 2024.
29. K. Igarashi and K. Kashiwagi, “Protein-conjugated acrolein as a biochemical marker of brain infarction,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 55, no. 9, pp. 1332–1341, 2011.
30. A. N. Lopatin, E. N. Makhina, and C. G. Nichols, “Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification,” *Nature*, vol. 372, no. 6504, pp. 366–369, 1994.

31. K. Williams, "Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines," *Cell. Signal.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, 1997.
32. H. C. Ha, N. S. Sirisoma, P. Kuppusamy, J. L. Zweier, P. M. Woster, and R. A. Casero Jr, "The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 19, pp. 11140–11145, 1998.
33. H. T. Kurata, L. J. Marton, and C. G. Nichols, "The polyamine binding site in inward rectifier K⁺ channels," *J. Gen. Physiol.*, vol. 127, no. 5, pp. 467–480, 2006.
34. E. Agostinelli et al., "Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology," *Amino Acids*, vol. 38, pp. 393–403, 2010.
35. Y. Dong, R. Tu, H. Liu, and G. Qing, "Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, p. 124, 2020.
36. P. Liu, N. Gupta, Y. Jing, and H. Zhang, "Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats," *Neuroscience*, vol. 155, no. 3, pp. 789–796, 2008.
37. V. K. Gupta et al., "Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner," *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1453–1460, 2013.
38. N. Minois, D. Carmona-Gutierrez, and F. Madeo, "Polyamines in aging and disease," *Aging (alban NY)*, vol. 3, no. 8, p. 716, 2011.
39. R. A. Casero Jr and L. J. Marton, "Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 5, pp. 373–390, 2007.
40. A. E. Pegg and R. A. Casero, "Current status of the polyamine research field," *Polyam. Methods Protoc.*, pp. 3–35, 2011.
41. M. H. Park and K. Igarashi, "Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases," *Biomol. Ther. (Seoul)*, vol. 21, no. 1, p. 1, 2013.

42. M. Kawakita and K. Hiramatsu, "Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers," *J. Biochem.*, vol. 139, no. 3, pp. 315–322, 2006.
43. K. Hiramatsu et al., "N 1, N 12-diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early-and late-stage colorectal and breast cancers," *Clin. cancer Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 2986–2990, 2005.
44. T. Hussain et al., "Polyamines: therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases," *Amino Acids*, vol. 49, pp. 1457–1468, 2017.
45. N. Seiler and F. Raul, "Polyamines and apoptosis," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 9, no. 3, pp. 623–642, 2005.
46. M.-F. Wang et al., "Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells," *Exp. Mol. Med.*, vol. 43, no. 4, pp. 189–196, 2011.
47. A. Haimovici et al., "Spontaneous activity of the mitochondrial apoptosis pathway drives chromosomal defects, the appearance of micronuclei and cancer metastasis through the Caspase-Activated DNase," *Cell Death Dis.*, vol. 13, no. 4, p. 315, 2022.
48. L. Miller-Fleming and S. Olin-Sandoval, "Maintaining Dynamic Metabolism in Quiescent Cells," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 44, no. 9, pp. 731–743, 2019, doi: 10.1016/j.tibs.2019.03.011.
49. A. E. Pegg, "Functions of polyamines in mammals and the use of DFMO to inhibit ornithine decarboxylase," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 29, pp. 14904–14912, 2016, doi: 10.1074/jbc.R116.731661.
50. S. Yoda, I. Dagogo-Jack, and A. N. Hata, "Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities," *Pharmacol. Ther.*, vol. 193, pp. 20–30, 2019.
51. Y.-H. Xie, Y.-X. Chen, and J.-Y. Fang, "Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, p. 22, 2020.

52. A. Upadhyaya, K. S. Yadav, and A. Misra, “Targeted drug therapy in non-small cell lung cancer: clinical significance and possible solutions-part I,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 18, no. 1, pp. 73–102, 2021.
53. H. Lee, I. N. Basso, and D. D. H. Kim, “Target spectrum of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia,” *Int. J. Hematol.*, vol. 113, no. 5, pp. 632–641, 2021.
54. C. E. Holbert, M. T. Cullen, R. A. Casero Jr, and T. M. Stewart, “Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 22, no. 8, pp. 467–480, 2022, doi: 10.1038/s41568-022-00473-2.
55. L. Erichsen et al., “Aberrant methylated key genes of methyl group metabolism within the molecular etiology of urothelial carcinogenesis,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 3477, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21932-7.
56. T. Ge et al., “Crosstalk between metabolic reprogramming and epigenetics in cancer: updates on mechanisms and therapeutic opportunities,” *Cancer Commun.*, vol. 42, no. 11, pp. 1049–1082, 2022, doi: 10.1002/cac2.12374.
57. T.-A. Liu, T. M. Stewart, and R. A. Casero Jr, “The Synergistic Benefit of Combination Strategies Targeting Tumor Cell Polyamine Homeostasis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 15, p. 8173, 2024, doi: 10.3390/ijms25158173.
58. A. Islam, Z. Shaukat, R. Hussain, and S. L. Gregory, “One-carbon and polyamine metabolism as cancer therapy targets,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 12, p. 1902, 2022, doi: 10.3390/biom12121902.
59. E. W. Gerner and F. L. Meyskens Jr, “Polyamines and cancer: old molecules, new understanding,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 10, pp. 781–792, 2004, doi: 10.1038/nrc1454.
60. J. Li, Y. Meng, X. Wu, and Y. Sun, “Polyamines and related signaling pathways in cancer,” *Cancer Cell Int.*, vol. 20, no. 1, p. 539, 2020, doi: 10.1186/s12935-020-01545-9.
61. D. Yamamoto et al., “Ornithine decarboxylase antizyme induces hypomethylation of genome DNA and histone H3 lysine 9 dimethylation

- (H3K9me2) in human oral cancer cell line,” PLoS One, vol. 5, no. 9, p. e12554, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0012554.
62. R. C. Geck, J. R. Foley, T. M. Stewart, J. M. Asara, R. A. Casero Jr, and A. Toker, “Inhibition of the polyamine synthesis enzyme ornithine decarboxylase sensitizes triple-negative breast cancer cells to cytotoxic chemotherapy,” J. Biol. Chem., vol. 295, no. 19, pp. 6263–6277, 2020, doi: 10.1074/jbc.RA119.012376.
 63. L. D. Gamble et al., “A G316A polymorphism in the ornithine decarboxylase gene promoter modulates MYCN-driven childhood neuroblastoma,” Cancers (Basel), vol. 13, no. 8, p. 1807, 2021.
 64. N. F. Evageliou et al., “Polyamine antagonist therapies inhibit neuroblastoma initiation and progression,” Clin. Cancer Res., vol. 22, no. 17, pp. 4391–4404, 2016.
 65. D. Shakir, M. Batie, C.-S. Kwok, S. J. Cook, N. S. Kenneth, and S. Rocha, “NF-κB is a Central Regulator of Hypoxia-Induced Gene Expression,” bioRxiv, pp. 2001–2025, 2025.
 66. N. Liu, T. Zhang, C. J. Steer, and G. Song, “MicroRNA-378a-3p prevents initiation and growth of colorectal cancer by fine tuning polyamine synthesis,” Cell Biosci., vol. 12, no. 1, p. 192, 2022.
 67. E. S. Canellakis and S. Hayashi, “The role of antizyme in the regulation of ornithine decarboxylase activity in eukaryotic cells,” in The Physiology of Polyamines, Volume I, CRC Press, 2021, pp. 315–330.
 68. J. Sesen et al., “AZIN1 level is increased in medulloblastoma and correlates with c-Myc activity and tumor phenotype,” J. Exp. Clin. Cancer Res., vol. 44, no. 1, p. 56, 2025.
 69. D. Kumar and M. I. Hassan, “Recent advances in the therapeutic development of ERK inhibitors,” Protein Kinase Inhib., pp. 129–178, 2022.
 70. A. V. Snezhkina et al., “The Dysregulation of Polyamine Metabolism in Colorectal Cancer Is Associated with Overexpression of c-Myc and C/EBPβ rather than Enterotoxigenic Bacteroides fragilis Infection,” Oxid. Med. Cell. Longev., vol. 2016, no. 1, p. 2353560, 2016.

71. C. Velasquez, O. Gutierrez, M. Carcelen, and J. L. Fernandez-Luna, "The Invasion Factor ODZ1 Is Upregulated through an Epidermal Growth Factor Receptor-Induced Pathway in Primary Glioblastoma Cells," *Cells*, vol. 13, no. 9, p. 766, 2024.
72. J. Pan, Z. Lin, Q. Pan, and T. Zhu, "Heterogeneity in polyamine metabolism dictates prognosis and immune checkpoint blockade response in hepatocellular carcinoma," *Front. Immunol.*, vol. 16, p. 1516332, 2025.
73. M. D. Reece, C. Song, S. C. Hancock, S. Pereira Ribeiro, D. A. Kulpa, and C. Gavegnano, "Repurposing BCL-2 and Jak 1/2 inhibitors: cure and treatment of HIV-1 and other viral infections," *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 1033672, 2022.
74. A. Coker-Gurkan, K. Koyuncu, P. O. Yerlikaya, and E. D. Arisan, "miR27a, a fine-tuning molecule, interacts with growth hormone (GH) signaling and ornithine decarboxylase (ODC) via targeting STAT5," *Amino Acids*, vol. 54, no. 1, pp. 71–84, 2022.
75. S. C. Gupta, J. H. Kim, S. Prasad, and B. B. Aggarwal, "Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 3, pp. 405–434, 2010.
76. S. Shishodia, H. M. Amin, R. Lai, and B. B. Aggarwal, "Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 70, no. 5, pp. 700–713, 2005.
77. S.-C. Sun, "The noncanonical NF-kappaB pathway," *Immunol. Rev.*, vol. 246, no. 1, pp. 125–140, 2012.
78. J. Guo et al., "Inhibition of the NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway in colorectal cancer by tyrosol: a gut microbiota-derived metabolite," *J. Immunother. cancer*, vol. 12, no. 9, p. e008831, 2024.
79. J. Guo et al., "Inhibition of the NF-kappaB/HIF-1alpha signaling pathway in colorectal cancer by tyrosol: a gut microbiota-derived metabolite," *J. Immunother. cancer*, vol. 12, no. 9, p. e008831, 2024.

80. Y. Li, A. Cheng, and F. He, "Metabolism of Polyamine in Vascular Diseases: An Prospective Therapeutic Target," *Bratislava Med. J.*, pp. 1–19, 2025.
81. E. Dejardin et al., "Regulation of NF- κ B activity by I κ B-related proteins in adenocarcinoma cells," *Oncogene*, vol. 18, no. 16, pp. 2567–2578, 1999.
82. M. Karin, Y. Cao, F. R. Greten, and Z.-W. Li, "NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit," *Nat. Rev. cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 301–310, 2002.
83. N. Shah, T. Thomas, A. Shirahata, L. H. Sigal, and T. J. Thomas, "Activation of nuclear factor κ B by polyamines in breast cancer cells," *Biochemistry*, vol. 38, no. 45, pp. 14763–14774, 1999.
84. R. C. Bargou et al., "Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells.," *J. Clin. Invest.*, vol. 100, no. 12, p. 2961, 1997.
85. P. A. Baeuerle and T. Henkel, "Function and activation of NF- κ B in the immune system," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 141–179, 1994.
86. C. W. Müller, F. A. Rey, M. Sodeoka, G. L. Verdine, and S. C. Harrison, "Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA," *Nature*, vol. 373 (6512), pp. 311–317, 1995.
87. H. L. Pahl, "Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors," *Oncogene*, vol. 18, no. 49, pp. 6853–6866, 1999.
88. J. J. Haddad and N. E. Abdel-Karim, "NF- κ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: therapeutic pattern or pseudoregulation?," *Cell. Immunol.*, vol. 271, no. 1, pp. 5–14, 2011.
89. T. D. Gilmore, "Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel.," *Oncogene*, vol. 18, no. 49, 1999.
90. J. Kuriyan and D. Thanos, "Structure of the NF- κ B transcription factor: a holistic interaction with DNA," *Structure*, vol. 3, no. 2, pp. 135–141, 1995.
91. S. Ghosh, M. J. May, and E. B. Kopp, "NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 225–260, 1998.

92. T. D. Gilmore, "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives," *Oncogene*, vol. 25, no. 51, pp. 6680–6684, 2006.
93. P. A. Baeuerle and D. Baltimore, "NF-κB: ten years after," *Cell*, vol. 87, no. 1, pp. 13–20, 1996.
94. S. Malek, T. Huxford, and G. Ghosh, "IκBα functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-κB," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 39, pp. 25427–25435, 1998.
95. E. Zandi and M. Karin, "Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IκB kinase complex," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 7, pp. 4547–4551, 1999.
96. S. K. Burley, "DNA-binding motifs from eukaryotic transcription factors," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. 3–11, 1994.
97. C. O. Pabo and R. T. Sauer, "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, no. 1, pp. 1053–1095, 1992.
98. M. Serasanambati and S. R. Chilakapati, "Function of Nuclear Factor kappa B (NF-κB) in human diseases-A Review," *South Indian J. Biol. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 368–387, 2016.
99. N. Shah et al., "Regulation of estrogenic and nuclear factor B functions by polyamines and their role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells," *Oncogene*, vol. 20, pp. 1715–1729, 2001.
100. L. M. Pfeffer et al., "Polyamine depletion induces rapid NF-kappaB activation in IEC-6 cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 49, pp. 45909–45913, 2001.
101. L. Erichsen et al., "Basic hallmarks of urothelial cancer unleashed in primary uroepithelium by interference with the epigenetic master regulator ODC1," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 3808, 2020.
102. S. Coni et al., "Combined inhibition of polyamine metabolism and eIF5A hypusination suppresses colorectal cancer growth through a converging effect on MYC translation," *Cancer Lett.*, vol. 559, p. 216120, 2023.

103. S. Gupta, N. Ahmad, S. R. Marengo, G. T. MacLennan, N. M. Greenberg, and H. Mukhtar, "Chemoprevention of prostate carcinogenesis by α -difluoromethylornithine in TRAMP mice," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 18, pp. 5125–5133, 2000.
104. H. C. Affronti et al., "Pharmacological polyamine catabolism upregulation with methionine salvage pathway inhibition as an effective prostate cancer therapy," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 52, 2020.
105. L. D. Gamble et al., "Inhibition of polyamine synthesis and uptake reduces tumor progression and prolongs survival in mouse models of neuroblastoma," *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, no. 477, p. eaau1099, 2019.
106. J. Yang, "Approval of DFMO for high-risk neuroblastoma patients demonstrates a step of success to target MYC pathway," *Br. J. Cancer*, vol. 130, no. 4, pp. 513–516, 2024.
107. H. et al. Bassiri, "A phase I study of DFMO in relapsed/refractory neuroblastoma," *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 62, no. 9, pp. 1581–1589, 2015, doi: 10.1002/pbc.25558.
108. F. L. et al. Meyskens, "DFMO and sulindac reduce colon adenoma recurrence," *Cancer Prev. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 32–38, 2008, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0038.
109. P. Ivanova, S. Petrov, and D. et al. Dimitrov, "Effect of DFMO on mutation frequency in temozolomide-treated U87MG glioblastoma cells," *Oncotarget*, vol. 11, no. 17, pp. 1523–1534, 2020, doi: 10.18632/oncotarget.27782.
110. C.-I. Chang, J. C. Liao, and L. Kuo, "Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages," *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 274, no. 1, pp. H342–H348, 1998.
111. J.-P. Tenu, M. Lepoivre, C. Moali, M. Brollo, D. Mansuy, and J.-L. Boucher, "Effects of the new arginase inhibitor N ω -hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages," *Nitric oxide*, vol. 3, no. 6, pp. 427–438, 1999.

112. H. G. Williams-Ashman and J. Seidenfeld, "Aspects of the biochemical pharmacology of methyl glyoxal bis (guanylhyazone)," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 35, no. 8, pp. 1217–1225, 1986.
113. A. E. Pegg, "Inhibitors of ornithine and S-adenosylmethionine decarboxylases," in *The Physiology of Polyamines, Volume I*, CRC Press, 2021, pp. 303–314.
114. V. Pardali et al., "Lipophilic guanylhyazone analogues as promising trypanocidal agents: an extended SAR study," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 26, no. 8, pp. 838–866, 2020.
115. R. Holliday and J. E. Pugh, "DNA modification mechanisms and gene activity during development," *Science* (80-.), vol. 187, pp. 226–232, 1975.
116. Z. D. Smith and A. Meissner, "DNA methylation: roles in mammalian development," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 14, no. 3, pp. 204–220, 2013.
117. M. J. Ziller et al., "Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome," *Nature*, vol. 500, no. 7463, pp. 477–481, 2013.
118. A. D. Kelly and J.-P. J. Issa, "Epigenetics and Cancer," in *Epigenetics, Energy Balance, and Cancer*, Springer, 2016, pp. 1–28.
119. Z. Chen and A. D. Riggs, "DNA methylation and demethylation in mammals," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 21, pp. 18347–18353, 2011.
120. M. Frommer et al., "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, no. 5, pp. 1827–1831, 1992.
121. A. Jeltsch and R. Z. Jurkowska, "New concepts in DNA methylation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, no. 7, pp. 310–318, 2014.
122. P. A. Jones, "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 7, pp. 484–492, 2012.
123. S. Misri, S. Pandita, R. Kumar, and T. K. Pandita, "Telomeres, histone code, and DNA damage response," *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 122, no. 3–4, pp. 297–307, 2009.

124. R. Jaenisch and A. Bird, "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals," *Nat. Genet.*, vol. 33, pp. 245–254, 2003.
125. M. Esteller, "CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, p. 5427, 2002.
126. P. A. Jones and D. Takai, "The role of DNA methylation in mammalian epigenetics," *Science (80-.)*, vol. 293, no. 5532, pp. 1068–1070, 2001.
127. A. V Lichtenstein and N. P. Kisseljova, "DNA methylation and carcinogenesis," *Biochem.*, vol. 66, no. 3, pp. 235–255, 2001.
128. S. Xiang et al., "Methylation status of individual CpG sites within Alu elements in the human genome and Alu hypomethylation in gastric carcinomas," *BMC Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2010.
129. A. M. Deaton and A. Bird, "CpG islands and the regulation of transcription," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 10, pp. 1010–1022, 2011.
130. Q. Feng and Y. Zhang, "The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 7, pp. 827–832, 2001.
131. G. Kelsey and R. Feil, "New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals," *Phil. Trans. R. Soc. B*, vol. 368, no. 1609, p. 20110336, 2013.
132. E. Daura-Oller, M. Cabre, M. A. Montero, J. L. Paternain, and A. Romeu, "Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends," *Bioinformation*, vol. 3, no. 8, pp. 340–343, 2009.
133. M. Neidhart, *DNA Methylation and Complex Human Disease*, 1st ed. Academic Press, Elsevier, 2016. Online. Available: <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=1DB8C451FF69439692E4B6F5CF9FDE59>
134. K. S. Crider, T. P. Yang, R. J. Berry, and L. B. Bailey, "Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role," *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.*, vol. 3, no. 1, pp. 21–38, 2012.

135. H. Wu and Y. Zhang, "Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions," *Cell*, vol. 156, no. 1, pp. 45–68, 2014.
136. M. R. Rountree, K. E. Bachman, and S. B. Baylin, "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci," *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 3, pp. 269–277, 2000.
137. K. D. Robertson, S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones, and A. P. Wolffe, "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters," *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 3, pp. 338–342, 2000.
138. S. J. Clark and J. Melki, "DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, p. 5380, 2002.
139. R. Kunwor and J. Russo, "Present status of epigenetic drugs in cancer treatment," *DNA*, vol. 3, p. 5, 2015.
140. C. M. Bender, M. M. Pao, and P. A. Jones, "Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 1, pp. 95–101, 1998.
141. J. C. Cheng et al., "Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 95, no. 5, pp. 399–409, 2003.
142. J. K. Christman, "5-Azacytidine and 5-aza-2 variant prime-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, p. 5483, 2002.
143. L. Zhou, X. Cheng, B. A. Connolly, M. J. Dickman, P. J. Hurd, and D. P. Hornby, "Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases," *J. Mol. Biol.*, vol. 321, no. 4, pp. 591–599, 2002.
144. A. Sakamoto, Y. Terui, T. Uemura, K. Igarashi, and K. Kashiwagi, "Polyamines regulate gene expression by stimulating translation of histone acetyltransferase mRNAs," *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 26, pp. 8736–8745, 2020.

145. C. Directive, "On the protection of animals used for scientific purposes," Off. J. Eur. Union, vol. L 276/33, pp. 33–79, 2010.
146. О. В. Стефанов, "Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації," 2001, Авіцена.
147. З. П. Софьина, А. Б. Сыркин, А. Голдин, and А. Кляйн, "Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США," Медицина, vol. 9, 1980.
148. L. W. Law, "The phenomena of resistance and dependence in leukaemic cells," in Ciba Foundation symposium on leukemia Research, 1954, pp. 105–129.
149. Н. Н. Эммануэль, Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. Москва: Наука, 416 с., 1977.
150. M. A. Sovak et al., "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer," J. Clin. Invest., vol. 100, pp. 2952–2960., 1997.
151. S. Luqman, N. Masood, S. Srivastava, and V. Dubey, "A modified spectrophotometric and methodical approach to find novel inhibitors of ornithine decarboxylase enzyme: A path through the maze," 2013.
152. U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," Nature, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
153. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," Anal. Biochem., vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
154. Y. Wang, W. Qian, Y. Tan, and S. Ding, "A label-free biosensor based on gold nanoshell monolayers for monitoring biomolecular interactions in diluted whole blood," Biosens. Bioelectron., vol. 23, no. 7, pp. 1166–1170, 2008.
155. B. Catimel *et al.*, "Recent applications of instrumental biosensors for protein and peptide structure-function studies," *Protein Pept. Lett.*, vol. 6, pp. 319–340, 1999.
156. S. Lofaas, B. Johnsson, K. Tegendal, and I. Ronnberg, "Dextran modified gold surfaces for surface plasmon resonance sensors: immunoreactivity of immobilized antibodies and antibody-surface interaction studies," *Colloids*

Surfaces B Biointerfaces, vol. 1, no. 2, pp. 83–89, 1993.

157. R. L. Rich and D. G. Myszka, “Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 13, no. 6, pp. 388–407, 2000.

158. B. A. Snopok, K. V Kostyukevych, and O. V Rengevych, “A biosensor approach to study structure and function of adsorbed proteins: fibrinogen on the gold surface,” *Semicond. Physics, Quantum Electron. Optoelectron.*, vol. 1, no. 121, p. 34, 1999.

159. V. C. W. Tsang, J. M. Peralta, and A. R. Simons, “[29] Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis,” in *Methods in enzymology*, vol. 92, Elsevier, 1983, pp. 377–391.

160. TotalLab, “CLIQS 1D Pro, TotalLab,” 2017, *Newcastle upon Tyne, England*. [Online]. Available: <http://totallab.com/contact/>

161. QIAGEN, “EpiTect Methyl II PCR Primer Assay for Mouse Odc1 (CpG Island 102395): EPMM102395-1A,” 2012, *19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA*. [Online]. Available: <http://www.sabiosciences.com>

162. М. І. Бургаз, “Статистичні методи в біологічних дослідженнях: конспект лекцій. Одеса: ОДЕКУ, 2024. 114с.,” 2024.

163. Г. Корн and Т. Корн, *Справочник по математике для научных работников и инженеров*. Москва: Наука, 1973.

164. T. Thomas and T. J. Thomas, “Polyamine metabolism and cancer,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 113–126, 2003.

165. О. А. Самойленко and І. І. Ганусевич, “Епігенетичні механізми регуляції орнітиндекарбоксилази при лейкемії,” *Онкологія*, 2025.

166. О. А. Samoilenko, О. А. Milinevska, О. V Karnaushenko, V. A. Shlyakhovenko, and S. P. Zaletok, “Effect of polyamine metabolism inhibitors on Lewis lung carcinoma growth and metastasis,” *Exp. Oncol.*, vol. 37, no. 2, pp. 151–153, 2015.

167. О. Samoylenko, S. Zaletok, О. Orlovskiy, and S. Gogol, “Additive antitumor

effect of plant polyphenols and synthetic inhibitors of polyamines biosynthesis,” *Exp. Oncol.*, vol. 33, no. 3, pp. 186–189, 2011.

168. О. А. Самойленко *et al.*, “Роль метилування генів ферментів метаболізму поліамінів в забезпеченні тривалості протипухлинної дії α -Дифторметилорнітину,” *Збірник «Актуальні Проблеми Розвитку Світової Науки»*, vol. 1, pp. 9–16, 2017.

169. С. П. Залєток *et al.*, “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»*, vol. 1, pp. 16–23, 2017.

170. О. А. Самойленко, І. І. Ганусевич, and А. В. Вербиненко, “Епігенетичні механізми регуляції орнітиндекарбоксилази при лейкемії,” *Онкологія*, vol. 27, no. 1, pp. 95–102, 2025, doi: 10.15407/oncology.2025.02.095.

171. W. R. Waud, “Murine L1210 and P388 leukemias,” in *Tumor models in cancer research*, Springer, 2010, pp. 23–41. doi: 10.1007/978-1-60761-968-0_2.

172. Z. Zhang, Y. Sun, Y. Li, X. Song, R. Wang, and D. Zhang, “The potential of marine-derived piperazine alkaloids: Sources, structures and bioactivities,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 265, p. 116081, 2024, doi: 10.1016/j.ejmech.2023.116081.

173. K. Soda, “Polyamine metabolism and gene methylation in conjunction with one-carbon metabolism,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, p. 3106, 2018, doi: 10.3390/ijms19103106.

174. X. Wang and L. Jiang, “Effects of ornithine decarboxylase antizyme 1 on the proliferation and differentiation of human oral cancer cells,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, no. 6, pp. 1606–1612, 2014, doi: 10.3892/ijmm.2014.1961.

175. S. Bzovsky *et al.*, “The clinician’s guide to interpreting a regression analysis,” *Eye*, vol. 36, no. 9, pp. 1715–1717, 2022.

176. N. Valveny and S. Gilliver, “How to interpret and report the results from multivariable analyses,” *Med Writ*, vol. 25, no. 3, pp. 37–42, 2016.

177. S. W. Grant, G. L. Hickey, and S. J. Head, “Statistical primer: multivariable regression considerations and pitfalls,” *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 55, no.

2, pp. 179–185, 2019.

178. M. H. Katz, “Multivariable analysis: a primer for readers of medical research,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 138, no. 8, pp. 644–650, 2003.

179. J. Yang, C. Shay, N. F. Saba, and Y. Teng, “Cancer metabolism and carcinogenesis,” *Exp. Hematol. Oncol.*, vol. 13, no. 1, p. 10, 2024.

180. Y. Mao, Z. Xia, W. Xia, and P. Jiang, “Metabolic reprogramming, sensing, and cancer therapy,” *Cell Rep.*, vol. 43, no. 12, 2024.

181. L. W. Tinoco, B. M. da Silva Santos, J. M. da S. Soares, and F. G. Finelli, “Analytical assays to evaluate enzymatic activity and screening of inhibitors for ornithine decarboxylase,” *Front. Anal. Sci.*, vol. 2, p. 1018080, 2022.

182. X. Chai *et al.*, “The rational discovery of multipurpose inhibitors of the ornithine decarboxylase,” *FASEB J.*, vol. 34, no. 9, pp. 10907–12921, 2020.

183. M. Zhang, C. M. Pickart, and P. Coffino, “Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate,” *EMBO J.*, 2003.

184. F. Niu *et al.*, “Arginase: An emerging and promising therapeutic target for cancer treatment,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 149, p. 112840, 2022.

185. E. Markova *et al.*, “Liposomal N ω -hydroxy-L-norarginine, a proof-of-concept: Arginase inhibitors can be incorporated in liposomes while retaining their therapeutic activity *ex vivo*,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 204, p. 106959, 2025.

186. X. Wang *et al.*, “Arginase-1 inhibition reduces migration ability and metastatic colonization of colon cancer cells,” *Cancer Metab.*, vol. 11, no. 1, p. 1, 2023.

187. M. M. Grzybowski *et al.*, “Metabolomic reprogramming of the tumor microenvironment by dual arginase inhibitor OATD-02 boosts anticancer immunity,” *Sci. Rep.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–16, 2025.

188. K. D. Haegle, R. G. Alken, J. Grove, P. J. Schechter, and J. Koch-Weser, “Kinetics of α -difluoromethylornithine: An irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 30, no. 2, pp. 210–217, 1981.

189. J. G. Filisola-Villaseñor, B. I. Arroyo-Sánchez, L. J. Navarro-González, E.

- Morales-Ríos, and V. Olin-Sandoval, “Ornithine decarboxylase and its role in cancer,” *Arch. Biochem. Biophys.*, p. 110321, 2025.
190. O. A. Samoylenko, E. O. Stakhovsky, Y. V Vitruk, and V. O. Shlyakhovenko, “Ornithine decarboxylase activity in prostate cancer,” *Exp. Oncol.*, vol. 43, no. 1, pp. 46–51, 2021.
 191. I. N. Sari, T. Setiawan, K. S. Kim, Y. T. Wijaya, K. W. Cho, and H. Y. Kwon, “Metabolism and function of polyamines in cancer progression,” *Cancer Lett.*, vol. 519, pp. 91–104, 2021.
 192. J. S. Park, Y. J. Park, H. R. Kim, and K. H. Chung, “Polyhexamethylene guanidine phosphate-induced ROS-mediated DNA damage caused cell cycle arrest and apoptosis in lung epithelial cells,” *J. Toxicol. Sci.*, vol. 44, no. 6, pp. 415–424, 2019.
 193. C. Seo *et al.*, “Metabolomic study on bleomycin and polyhexamethylene guanidine phosphate-induced pulmonary fibrosis mice models,” *Metabolomics*, vol. 15, no. 8, p. 111, 2019.
 194. F. Saczewski and \Lukasz Balewski, “Biological activities of guanidine compounds,” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 19, no. 10, pp. 1417–1448, 2009.
 195. H. M. Wallace, A. V Fraser, and A. Hughes, “A perspective of polyamine metabolism,” *Biochem. J.*, vol. 376, no. 1, pp. 1–14, 2003.
 196. K. Soda, “The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 30, pp. 1–9, 2011.
 197. M. Minto *et al.*, “A rohitukine derivative IIIM-290 induces p53 dependent mitochondrial apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells,” *Mol. Carcinog.*, vol. 60, no. 10, pp. 671–683, 2021.
 198. H. E. Skipper, F. M. Schabel Jr, M. W. Trader, and J. R. Thomson, “Experimental evaluation of potential anticancer agents VI. Anatomical distribution of leukemic cells and failure of chemotherapy,” *Cancer Res.*, vol. 21, no. 9, pp. 1154–1164, 1961.
 199. Y. Kano, K. Soda, and F. Konishi, “Suppression of LFA-1 expression by spermine is associated with enhanced methylation of ITGAL, the LFA-1 promoter

- area,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56056, 2013.
200. L. Frostesjö, I. Holm, B. Grahn, A. W. Page, T. H. Bestor, and O. Heby, “Interference with DNA methyltransferase activity and genome methylation during F9 teratocarcinoma stem cell differentiation induced by polyamine depletion,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 7, pp. 4359–4366, 1997.
201. G. Vilema-Enriquez, A. Arroyo, M. Grijalva, R. I. Amador-Zafra, and J. Camacho, “Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells: potential therapeutic implications,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, no. 1, p. 1908164, 2016.
202. M. Muñoz-Urbe *et al.*, “SAM486A-induced inhibition of AMD1: metabolic and epigenetic implications in non-small cell lung cancer cells,” *Metabolomics*, vol. 21, no. 4, p. 82, 2025.
203. R. Wang *et al.*, “Polyamine metabolism related gene index prediction of prognosis and immunotherapy response in breast cancer,” *Front. Oncol.*, vol. Volume 15–2025, 2025, doi: 10.3389/fonc.2025.1613458.
204. F. Pirini *et al.*, “Polyamines at the crossroad between cell metabolism and epigenetic regulation in acute leukemias,” *Cell Death Discov.*, vol. 11, no. 1, p. 301, 2025.
205. J.-Y. Wu, Y. Zeng, Y.-Y. You, and Q.-Y. Chen, “Polyamine metabolism and anti-tumor immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 16, p. 1529337, 2025, doi: 10.3389/fimmu.2025.1529337.

Список публікацій здобувача

1. Самойленко, & Ганусевич, І. І. Епігенетичні механізми регуляції орнітиндекарбоксилази при лейкемії. Онкологія. 2025. Т. 27. № 1. С. 62–66. *(Дисертантом проведено дослідження вмісту білка с-Мус, рівень метилування 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. Samoylenko, 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 OA, O. 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., & Залєток, 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. Залєток, 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. Міжнародній конференції «Пухлина та організм: сучасні аспекти старої проблеми» (Київ, 21-24 вересня 2010).

11. Ukrainian-Swedish Workshop «New approaches in diagnostics and treatment of cancer» (Київ, 13-14 червня 2011)

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.

13. O. Samoylenko, S. Zaletok, O. Zhuravel, S. Gogol and L. Gulua. 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.

14. Е. Самойленко, С. Залеток, С. Гоголь, А. Орловский, Ю. Ушенин, Г. Бекетов, А. Самойлов, Р. Христосенко, Г. Дорожинский, Л. Гулуа. 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.

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 СДГ, Астана, 5-7 вересня 2012 р.

16. S.P. Zaletok, O.A. Samoylenko, O.V Zhuravel, O.A. Orlovsky. 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.

17. S. Zaletok, O. Samoylenko, O. Zhuravel, L. Gulua, V. Chekhun. 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.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Міжнародній конференції «Пухлина та організм: сучасні аспекти старої проблеми» (Київ, 2010) – постерна доповідь.
2. Ukrainian-Swedish Workshop «New approaches in diagnostics and treatment of cancer» (Київ, 2011) – усна доповідь.
3. VII з'їзді онкологів і радіологів країн СДГ (Астана, 2012) – постерна доповідь.
4. International Conference and Exhibition on Nutritional Science & Therapy (Філадельфія, 2012) – постерна доповідь.
5. 5-й Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» "СЕМСТ-5" (Одеса, 2012) – постерна доповідь.
6. Міжнародному конгресі «Polyamines Biological and Clinical Perspectives» (Стамбул, 2012) – постерна доповідь.
7. 11th International Congress on Targeted Anticancer Therapies (Париж, 2013) – постерна доповідь.