

О.А. Самойленко<sup>1</sup>,  
Ю.М. Самченко<sup>2</sup>,  
Л.О. Керносенко<sup>2</sup>,  
А.В. Верби́нко<sup>1</sup>,  
О.О. Соловійова<sup>2</sup>,  
А.М. Галєєва<sup>1</sup>,  
І.І. Ганусевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,

<sup>2</sup> Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** лапоніт, протипухлинний препарат, наночастинки, окисно-відновний стан, рибонуклеази, матриксні металопротеїнази, орнітиндекарбоксилаза.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.02.125>

## ВПЛИВ LAPONITE НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ТА РЕДОКС-СТАН ПУХЛИНИ І ОРГАНІВ СИСТЕМИ ДЕТОКСИКАЦІЇ МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ ЕРЛІХА

Лапоніт (Laponite, Lap) — синтетичний глинистий мінерал, представлений дископодібними нанопластинками. Lap (нативний або кислотно-активований) можна використовувати для інкорпорації медичних сполук, зокрема протипухлинних препаратів. **Мета:** дослідження рівнів швидкості генерування супероксидних радикалів (СР), активності рибонуклеаз (РНКаЗ), желатинази і орнітиндекарбоксилази (ОДК) в асцитній рідині, пухлинній тканині, печінці, нирках інтактних мишей і мишей з карциномою Ерліха під дією Lap. **Об'єкт і методи:** використовували очищений гелеутворюючий Lap класу XLG з емпіричною формулою  $\text{Si}_8\text{Mg}_{5.45}\text{Li}_{0.4}\text{H}_4\text{O}_{24}\text{Na}_{0.7}$ . Кислотну активацію Lap (зразки кLap) проводили з використанням сірчаної кислоти. Лабораторні дослідження проводили на безпородних мишах з перещепленою карциномою Ерліха в асцитній та солідній формах. Проведено визначення швидкості утворення СР методом електронного парамагнітного резонансу, активність РНКаЗ і матриксних металопротеїназ визначали зимографією в поліакриламідному гелі, активність ОДК визначали спектрофотометрично, статистичну обробку результатів проводили за t-критерієм Стьюдента. **Результати:** порівняльний аналіз даних щодо швидкості генерування СР та активності желатиназ в тканинах печінки, нирок, пухлинних клітинах тварин з солідною або асцитною формами карциноми Ерліха показав, що введення нативного Lap призводило до помітного зниження швидкості генерування СР у тканині печінки (в 1,7 раза) та в асцитній рідині (в 1,5 раза) порівняно з показниками групи мишей, яким сполуки не вводили. Крім того, введення нативного Lap призводило до зниження активності желатиназ в пухлинних клітинах: у мишей з асцитною карциномою Ерліха в 2,4 раза, з солідною — в 1,9 раза порівняно з контрольними тваринами. Менш значущі ефекти спостерігали при введенні кLap. Не виявлено достовірної різниці між показниками активності РНКаЗ та ОДК під впливом Lap та кLap порівняно з інтактними мишами та мишами-пухлиноносіями. **Висновки:** в модельному експерименті на безпородних мишах з карциномою Ерліха встановлено, що нативний Lap та кLap суттєво не впливають на показники окисно-відновного стану, активність РНКаЗ, желатинази і ОДК в пухлинних клітинах, печінці та нирках. Це свідчить про безпеку їх використання для сприяння доставці протипухлинних препаратів.

Сучасні способи використання інтелектуальних біоматеріалів на основі функціоналізованих наночастинок, які характеризуються високою біосумісністю, пористістю, сорбційною здатністю, хімічною і термічною стійкістю, дозволяють поєднувати адресну доставку ліків та їх пролонговане вивільнення, насамперед при хімотерапії, а також є перспективними для діагностики онкологічних захворювань [1–4]. Такими інтелектуальними біоматеріалами є полімерні композити і гідрогелі, створені на основі функціоналізованих наночас-

тинок [5, 6]. Laponite (Lap) — це синтетичний глинистий мінерал, що являє собою дископодібні кристали (нанопластинки) товщиною  $h \approx 1$  нм (0,92 нм), діаметром  $d \approx 25$  нм, які мають тришарову структуру триоктаедричного внутрішнього магнієвого шару, затиснутого двома тетраедричними шарами кремнезему [7]. Lap використовується в гірничодобувній та нафтопереробній промисловостях, для домашньої та особистої гігієни, в фармацевтичній і медичній галузях [8, 9]. Кислотна активація дозволяє регулювати (моди-

фікувати) його властивості, зокрема дисперсність, поверхневий заряд, колоїдну стабільність тощо. Широко застосовується Lar для модифікування гідрогелів. Гідрогелеві наноконізати, що містять Lar (як нативний, так і модифікований) можуть бути платформою для інкорпорування різноманітних біопрепаратів, зокрема протипухлинних лікарських засобів. Важливо, що гідрогель з Lar має тенденцію фазових переходів при зміні (в фізіологічно-прийнятному діапазоні) температури та рН середовища, внаслідок чого відбувається кероване вивільнення інкорпорованої сполуки, що є підґрунтям для створення ліків з адресною пролонгованою дією [10].

Порівняльна оцінка дії Lar на окисно-відновний стан та активність низки ферментів, критичних для пухлинної прогресії (рибонуклеаз (РНКаз), матриксних металопротеїназ (ММП), орнітин-декарбоксілази (ОДК), в тканинах і органах інтактних тварин та тварин з пухлинами важлива для розуміння його можливого впливу на ріст пухлини, і є компонентом вивчення токсичності створеного на його основі гідрогелю.

Супероксидні радикали (СР) є первинним продуктом окисно-відновних процесів, спряжених з утворенням гідроксильного радикалу ( $\cdot\text{OH}$ ), гідропероксидного радикалу та ін. СР відіграють роль сигнальних молекул і беруть участь у регуляції різних систем життєзабезпечення, в тому числі імунних процесів. Особливої функціональної спрямованості набуває генерування СР та їхніх похідних при запальних процесах і при розвитку злоякісних новоутворень. В нормі рівні продукування СР пов'язані з регуляторними функціями у фізіологічних процесах. За підвищених рівнів генерування СР виконують роль месенджерів в сигнальних шляхах, що задіяні в патологічних змінах. При надвисоких рівнях СР відбувається дисбаланс окисно-відновного стану організму, формується системний окисний стрес, відбувається критичне окиснення клітинних структур, біологічних молекул, порушуються сигнальні шляхи та функціонування органів і систем. Високі рівні СР асоційовані з пухлинною прогресією, а також з процесами запалення та токсичними впливами [11–13].

ММП є представниками родини цинк-вмісних ендопептидаз, які забезпечують протеоліз позаклітинного матриксу (ПМ) в процесах фізіологічної (у тканинному морфогенезі, репарації, ембріогенезі, ангиогенезі) та патологічної (при ревматоїдному артриті, остеоартриті, періодонтиті, виразковій хворобі, аутоімунних захворюваннях, цукровому діабеті, гіпертонії) реорганізації тканин організму. Серед останніх і онкологічні захворювання, що також пов'язані із порушенням регуляції деградації ПМ, і, відповідно, із функціональною участю ММП. Метастазування пухлини

являє собою багатоступеневий процес, протягом якого пухлинні клітини дисемінують із первинної пухлини до віддалених органів і тканин. Пухлинні клітини реалізують свій метастатичний потенціал після набуття ними характеристик, які дозволяють відриватися від первинної пухлини, мігрувати в оточуючі тканини та судини, циркулювати в судинному руслі та досягати вторинних сайтів, екстравазувати та стабілізуватися в метастатичний центр. На сьогодні ММП розглядають як ключові молекули, які “асистують” пухлинним клітинам протягом всього процесу метастазування. З точки зору дослідження пухлинної прогресії, найбільш інформативним є визначення рівнів експресії або активності ММП-2 та ММП-9 (желатинази), позаяк їхня участь в інвазії пухлини та кожному з етапів метастазування вважається доведеною. Визначення показників активності ферментів має важливу перевагу тому, що дозволяє оцінити їхній функціональний стан, а значить, і реальний вплив на пухлинну прогресію. Окрім того, желатинази задіяні як у фізіологічних перебудовах, так і у патологічній деструкції тканин, яка відбувається, наприклад, при запаленні або токсичній дії екзо- та ендогенних факторів [14–16].

РНКазі є ключовими гравцями імунітету, які сприяють підтримці гомеостазу тканин, стерильності рідин організму тощо. Вони продукуються підчас токсичних впливів будь-якої природи, наслідком яких є клітинні травми; опосередковують процеси “тривожної сигналізації”. РНКазі беруть участь в адаптації імунної системи до стресових умов при пухлинній прогресії, безпосередньо модифікуючи молекули РНК та приймаючи участь в міжклітинному сигналіngu, причому навіть у каталітично незалежному режимі [17–21].

ОДК приймає участь у біосинтезі поліамінів (ПА), які пов'язані з багатьма процесами, що мають вирішальне значення для росту, поділу та диференціювання клітин. ОДК відіграє важливу роль у процесі канцерогенезу. Показано, що цей фермент пов'язаний з проліферацією, диференціюванням, трансформацією клітин та ангиогенезом. Підвищений рівень ПА та/або активності ОДК асоціюється з раком молочної залози, товстої кишки, передміхурової залози та шкіри, а також супроводжує пригнічення апоптозу та активацію експресії генів білків, що беруть участь у інвазії та метастазуванні. З іншого боку, активність ОДК пов'язана з токсичними впливами. Зокрема, існують дані щодо її значного зниження при розвитку доксорубіцин-індукованого ураження печінки шурів [22–24].

**Мета роботи:** дослідження рівнів швидкості генерування СР та активності РНКаз, желатиназ і ОДК в пухлині, асцитній рідині, печінці та нирках інтактних мишей і мишей з карциномою Ерліха під дією Lar.

**ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

В роботі використано гелеутворюючий Lap для засобів особистої гігієни класу XLG з емпіричною формулою  $\text{Si}_8\text{Mg}_{5,45}\text{Li}_{0,4}\text{H}_4\text{O}_{24}\text{Na}_{0,7}$  (Rockwood Additives Ltd., Великобританія). Сорт XLG є високоочищеним сертифікованим сортом із низьким вмістом важких металів та інших домішок. Нанопластинки Lap мають діаметр  $\approx 25$  нм, товщину  $\approx 1$  нм, їх катіонообмінна ємність становить 0,7 ммоль/г.

**Синтез кислотно-активованого лапоніту.** Попередньо Lap диспергували у воді з використанням ультразвукового диспергатора BANDELIN SONOPULS (Німеччина) протягом 5 хв. Потім повільно додавали водний розчин сульфатної кислоти, суміш перемішували протягом 5 год при кімнатній температурі,  $t = 25^\circ\text{C}$ . Концентрація Lap у кінцевому розчині складала 2%, а концентрацію кислоти змінювали в межах  $C_{\text{ка}} = 0\text{--}14,58\%$  ( $0\text{--}3,21$  N). Після завершення кислотного активування, модифікований зразок промивали дистильованою водою від залишків кислоти, до нейтральної величини рН (близько 7,0).

**Характеристика експериментальних тварин та моделей пухлинного росту.** Дослідження проведено на 60 самках безпородних мишей віком 2–2,5 міс масою 20–21 г, розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАНУ (Київ, Україна). Всі експериментальні дослідження були виконані із дотриманням основних вимог щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами і положень, викладених у Європейській конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [25].

Для отримання асцитної форми карциноми Ерліха пухлинні клітини вводили у черевну порожнину по  $4\text{--}5 \times 10^5$  клітин/мишу в 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину NaCl. Для отримання солідної форми карциноми Ерліха пухлинні клітини перещеплювали внутрішньом'язево по  $5 \times 10^6$  клітин/мишу в праву задню лапу.

**Введення сполук та отримання зразків.** Для введення експериментальним тваринам (інтактним та з карциною Ерліха) були використані дві форми нанопластинок Lap — нативна (Lap) та кислотно-активована ( $\kappa\text{Lap}$ ). Обидві сполуки вводили на 7-му добу після перещеплення пухлинних клітин мишам з асцитною (Er/ac) або солідною (Er/c) формами карциноми Ерліха за однаковими схемами: одноразово, внутрішньочеревно, у дозі 2 г/кг ваги при розведенні 1 г/л. Тваринам експериментальних груп (Er/ac +  $\kappa\text{Lap}$  та Er/c +  $\kappa\text{Lap}$ ) вводили кислотно-активовану форму Lap; тваринам груп порівняння (Er/ac + Lap та Er/c + Lap) вводили нативну форму Lap; тваринам контрольних груп (Er/ac та Er/c) — сполуки не вводили. Інтактним мишам наночастинки Lap вводили аналогічним чином, були сформовані наступні групи:

+ $\kappa\text{Lap}$  — тварини без пухлин, яким вводили кислотно-активованій Lap; +Lap — тварини без пухлин, яким вводили нативний Lap; інтактний Kt — тварини без пухлин, без введення сполук.

Тварин з асцитною карциною Ерліха вводили з експерименту на 9-ту добу, з солідною карциною Ерліха — на 14-ту добу шляхом еваназії. В зразках тканин (асцитній рідині, тканинах солідної пухлини, печінки, нирок) визначали рівні швидкості генерування CP, рівень яких визначає окисно-відновний стан тканин та клітин, а також активність і молекулярну гетерогенність РНКаз, активність ММП-2 та ММП-9 і ОДК.

**Метод ЕПР-спектроскопії.** Отриманий матеріал (пухлинні клітини, тканини печінки, нирок інтактних мишей та тварин-пухлиноносіїв.) безпосередньо після забору заморожували в спеціальних прес-формах в рідкому азоті ( $T = 77$  K). Швидкість генерування CP визначали методом електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР) на комп'ютеризованому радіоспектрометрі PE1307 в парамагнітно чистому кварцовому д'юарі із використанням спінового уловлювача 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine hydrochloride (TEMPONE-H) і технології SpinTraps [26]. За у.о. прийнято контрольний сигнал рубінового кристалу.

**Визначення активності РНКаз.** Одержані екстракти досліджували методом зимограм з застосуванням електрофорезу в 20% поліакриламідному гелі (ПААГ), до якого в якості субстрату вводили 2,5 мг/мл високополімерної РНК дріжджів *Torula* (*Torulopsis utilis*) (Sigma-Aldrich, США). Гелі інкубували в 0,1 М Трис-НСІ протягом 60 хв при  $37^\circ\text{C}$ . Після інкубації гелі промивали 0,01 М Трис-НСІ і забарвлювали 0,2% розчином толуїдинового синього (Sigma-Aldrich, США) в 0,01 М Трис-НСІ. Після остаточного промивання 10% розчином гліцерину-0,01 М Трис-НСІ, гелі сканували за допомогою пристрою HP Scanjet 5590 [27, 28]. Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

**Визначення активності ММП-2 та -9.** Активність ММП-2 і ММП-9 визначали методом зимографії у ПААГ на основі SDS-електрофорезу білків, з додаванням желатину в якості субстрату. Після відмивання гелю активні форми ММП-2 та -9 візуалізувались у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, локалізація яких визначались за стандартами молекулярної маси (Sigma-Aldrich, США) і відповідала молекулярній масі кожного із ферментів (72 та 92 kDa відповідно) [29]. Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і ММП-9 (Sigma-Aldrich, США). За умовну одиницю (у.о.) прийнято активність 1 мкг фермента в 1 г вихідного контрольного зразку. Результати оцінюва-

ли за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

**Визначення активності ОДК.** Для визначення активності ОДК за методикою [30, 31], використовували 5 мкг білка в 100 мкл зразка для ферментативної реакції. Результат ферментативної реакції (отриманий супернатант) оцінювали на багатофункціональному рідері для мікропланшета Synergy HT, модель SIAFRTD, (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) при довжині хвилі 426 нм.

**Статистичний аналіз** проведено за критерієм Стьюдента. Різницю вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

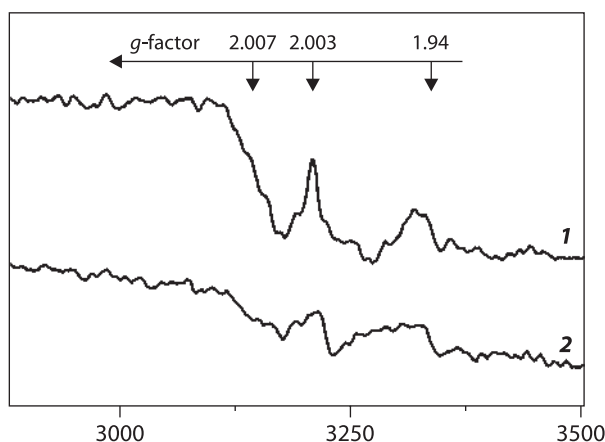
**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Швидкість генерування СР в органах інтактних тварин, яким було введено кLар, за середніми показниками несуттєво ( $p > 0,05$ ) перевищувала її рівні в органах інтактних мишей, яким вводили нативний Lар, а також мишей, яким не вводили сполук (табл. 1).

Виключення становили тканини печінки тварин без пухлин, яким вводили нативний Lар, і спостерігали достовірно нижчу, ніж в контрольній групі, швидкість генерування СР, що свідчить про позитивний вплив цієї форми нанопластинок Lар на окисно-відновний баланс органу (рис. 1).

При дослідженні зразків тканин тварин з карциномою Ерліха загалом, виявлено незначний ( $p > 0,05$ ) вплив обох форм Lар на швидкість генерування СР. Обидві форми нанопластинок Lар (нативна та кислотно-активована) не впливали негативно на окисно-відновний стан печінки та нирок (див. табл. 1).

Швидкість генерування СР в асцитній рідині тварин після введення кLар (Ер/ас + кLар), несуттєво перевищувала ( $p > 0,05$ ) аналогічний показник тварин, яким вводили нативний Lар (Ер/ас + Lар). При цьому, у тварин останньої групи швидкість



**Рис. 1.** Спектри ЕПР тканини печінки тварин без пухлин: 1 — інтактний Кт; 2 — +Lар. Інтенсивність сигналу ЕПР при  $g = 2,003$  відображає рівень генерування СР

генерування СР була достовірно нижчою, ніж в контролі (Ер/ас) (див. табл. 1, рис. 2).

Таким чином, порівняно з контролем, обидві форми нанопластинок Lар (Lар та кLар) суттєво не впливали на окисно-відновний стан пухлинних клітин в асцитній рідині. При дослідженні пухлинної тканини солідної карциноми Ерліха виявлено аналогічний результат, а саме — незначний, з недостовірною різницею, вплив обох форм Lар на швидкість генерування СР (див. табл. 1).

Активність желатиназ в тканинах печінки та нирок інтактних тварин, яким було введено кLар (+кLар), за середніми показниками несуттєво ( $p > 0,05$ ) відрізнялась від рівнів її активності у відповідних органах мишей групи порівняння (+Lар) та контрольної групи (інтактний Кт) (табл. 2). Введення нативного Lар також не справляло суттєвого впливу на активність ММП-2 та ММП-9. Тобто, як нативна, так і кислотно-активована форми Lар не мали негативного впливу на активність

Таблиця 1

**Швидкість генерування СР в органах і тканинах інтактних мишей та мишей з карциномою Ерліха за умов дії нанопластинок Lар**

Тканина	Інтактні миші			Миші з асцитною карциномою Ерліха (Ер/ас)			Миші з солідною карциномою Ерліха (Ер/с)		
	інтактний Кт	+Lар	+кLар	Ер/ас	Ер/ас +Lар	Ер/ас +кLар	Ер/с	Ер/с +Lар	Ер/с +кLар
Асцитна рідина	—	—	—	0,65±0,08	<b>0,44±0,11*</b>	0,58±0,18	—	—	—
Пухлина	—	—	—	—	—	—	0,61±0,12	0,55±0,09	0,67±0,14
Печінка	0,28±0,06	<b>0,17±0,03**</b>	0,31±0,11	0,55±0,12	0,51±0,17	0,63±0,09	0,43±0,12	0,46±0,13	0,46±0,16
Нирки	0,19±0,09	0,22±0,11	0,34±0,07	0,61±0,15	0,57±0,15	0,66±0,18	0,56±0,17	0,60±0,13	0,71±0,19

Примітки: інтактний Кт — тварини без пухлин, без введення сполук; +Lар — тварини без пухлин, яким вводили нативний Lар; +кLар — тварини без пухлин, яким вводили кислотно-активовані Lар; Ер/ас — тварини з Ер/ас, без введення сполук; Ер/ас + Lар — тварини з Ер/ас, яким вводили нативний Lар; Ер/ас + кLар — тварини з Ер/ас, яким вводили кислотно-активовані Lар; Ер/с — тварини з перещепленою Ер/с, без введення сполук; Ер/с + Lар — тварини з перещепленою Ер/с, яким вводили нативний Lар; Ер/с + кLар — тварини з перещепленою Ер/с, яким вводили кислотно-активовані Lар.

\* —  $p < 0,05$  порівняно з відповідним показником Ер/ас; \*\* —  $p < 0,05$  порівняно з відповідним показником інтактного Кт.

желатиназ в тканинах печінки та нирок інтактних тварин.

Деякі інші співвідношення показників активності ферментів спостерігали в асцитній рідині та тканині солідної пухлини мишей з карциною Ерліха (рис. 3). У мишей з асцитною формою карциноми Ерліха активність желатиназ в клітинах асцитної рідини тварин, яким вводили нативний Lap, складала  $5,3 \pm 1,4$  у.о. та була достовірно нижчою за такі показники в групах тварин, яким не вводили сполук або вводили кLap (відповідно у 2,4 та у 2,8 раза). Схоже співвідношення рівнів активності ферментів характерне також для клітин солідної пухлини. Таким чином, порівняно з показниками контролю, обидві форми нанопластинок Lap (кислотно-активована та нативна) не лише не підвищують активність желатиназ, але й у випадку кислотно-активованої форми — навіть значно знижують.

Активність РНКаз в пухлинних клітинах мишей з асцитною карциною Ерліха, яким вводили наночастинки кLap, несуттєво перевищувала даний показник в клітинах асцитної рідини мишей, яким вводили нативний Lap, та тварин контрольної групи (табл. 3). При дослідженні пухлинної тканини солідної карциноми Ерліха виявлено незначний, з недостовірною різницею, вплив обох форм Lap на активність РНКаз. Введення Lap та кLap дослідним мишам суттєво не впливало на активність РНКаз у тканині печінки та нирок. Таким чином, як нативний Lap, так і кLap не впливали на активність РНКаз в тканинах пухлини, нирок, печінки.

Активність ОДК в пухлинних клітинах мишей з асцитною карциною Ерліха, яким було введено нанопластинок кLap, складала  $1,9 \pm 0,7$  у.о. і несуттєво ( $p > 0,05$ ) перевищувала аналогічні показники в групах мишей, яким вводили нативний Lap ( $1,2 \pm 0,5$  у.о.), та в контрольній ( $1,6 \pm 0,7$  у.о.) (табл. 4). При дослідженні пухлинної тканини солідної карциноми Ерліха виявлено незначний, з недостовірною різницею, вплив обох форм Lap

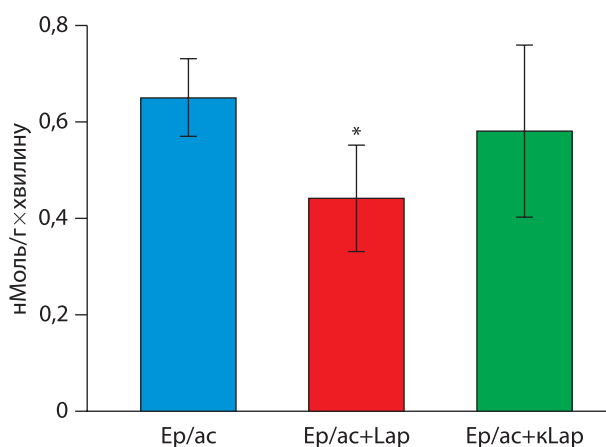


Рис. 2. Швидкість генерування СР в пухлинних клітинах мишей з асцитною формою карциноми Ерліха

\* —  $p < 0,05$  порівняно з показником групи Ep/ac.

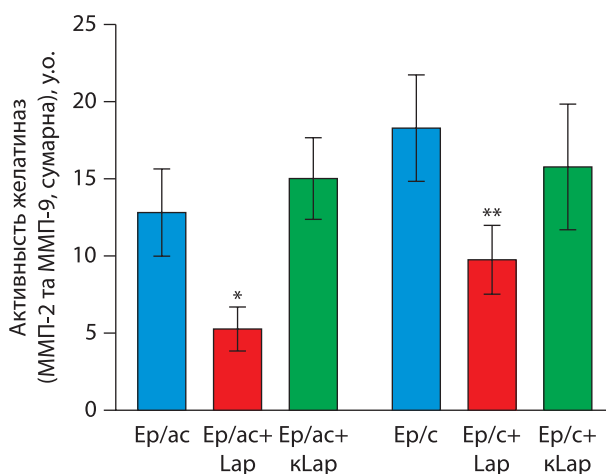


Рис. 3. Активність желатиназ (ММП-2 та ММП-9, сумарна) в пухлинних клітинах мишей з асцитною (Ep/ac) та солідною (Ep/c) формами карциноми Ерліха.

\* —  $p < 0,05$  порівняно з показниками груп Ep/ac та Ep/ac+kLap; \*\* —  $p < 0,05$  порівняно з з показником групи Ep/c.

Таблиця 2

Активність желатиназ (ММП-2 та ММП-9) в органах і тканинах інтактних мишей та мишей з карциною Ерліха за умов дії нанопластинок Lap, у.о.

Тканина	Інтактні миші			Миші з асцитною карциною Ерліха (Ep/ac)			Миші з солідною карциною Ерліха (Ep/c)		
	інтактний Кт	+Lap	+кLap	Ep/ac	Ep/ac +Lap	Ep/ac +кLap	Ep/c	Ep/c +Lap	Ep/c +кLap
Асцитна рідина	—	—	—	12,8±2,8	5,3±1,4 *	15,1±2,7	—	—	—
Пухлина	—	—	—	—	—	—	18,3±3,5	9,7±2,2**	15,8±4,1
Печінка	0,2±0,05	0,2±0,1	0,2±0,1	6,1±2,3	8,8±2,5	12,3±5,3	12,0±3,8	12,5±4,1	14,1±3,9
Нирки	1,2±0,3	1,5±0,3	1,3±0,2	9,4±2,3	7,8±2,1	13,1±3,8	7,7±2,2	7,9±2,6	9,3±3,2

Примітки: позначення груп див. в табл. 1.

\* —  $p < 0,05$  порівняно з відповідним показником Ep/ac та Ep/ac + кLap; \*\* —  $p < 0,05$  порівняно з відповідним показником Ep/c.

Активність РНКаз (у.о.) в органах і тканинах інтактних мишей та мишей з карциною Ерліха за умов дії нанопластинок Lar

Тканина	Інтактні миші			Миші з асцитною карциною Ерліха (Ер/ас)			Миші з солідною карциною Ерліха (Ер/с)		
	інтактний Кт	+Lar	+kLar	Ер/ас	Ер/ас +Lar	Ер/ас +kLar	Ер/с	Ер/с +Lar	Ер/с +kLar
Асцитна рідина	—	—	—	665,0±69,6	674,0±70,0	654,0±79,4	—	—	—
Пухлина	—	—	—	—	—	—	553,0±61,2	526,0±52,9	513,0±76,1
Печінка	612,0±71,2	679,0±74,4	597,0±42,8	588,0±23,1	669,0±60,3	605,0±63,2	553,0±73,9	352,0±43,8	587,0±52,7
Нирки	514,0±20,3	568,0±21,2	557,0±61,9	603,0±72,4	632,0±70,2	598,0±34,2	614,0±46,8	571,0±67,1	582,0±65,1

Примітка: позначення груп див. в табл. 1.

Активність орнітиндекарбоксилази (у.о.) в органах і тканинах інтактних мишей та мишей з карциною Ерліха за умов дії нанопластинок Lar

Тканина	Інтактні миші			Миші з асцитною карциною Ерліха (Ер/ас)			Миші з солідною карциною Ерліха (Ер/с)		
	інтактний Кт	+Lar	+kLar	Ер/ас	Ер/ас +Lar	Ер/ас +kLar	Ер/с	Ер/с +Lar	Ер/с +kLar
Асцитна рідина	—	—	—	1,6±0,7	1,2±0,5	1,9±0,7	—	—	—
Пухлина	—	—	—	—	—	—	0,86±0,5	0,92± 0,2	0,83± 4,1
Печінка	1,1±0,05	1,1±0,1	1,0±0,1	9,6±2,5	8,8±2,5	12,3±5,3	0,9±0,8	0,8±0,1	1,0±0,9
Нирки	1,2±0,3	1,2±0,3	1,2 4± 0,2	8,7±2,1	7,8±2,1	13,1±3,8	0,8±0,2	1,1±0,6	0,8±0,2

Примітка: позначення груп див. в табл. 1.

на активність ОДК. Введення Lar та kLar суттєво не впливало також на активність ОДК у тканині печінки та нирок. Таким чином можна зробити висновок, що як нативний Lar, так і kLar не змінюють активність ОДК в досліджених зразках тканин.

Таким чином, в наших дослідженнях не було виявлено достовірної різниці між показниками активності РНКаз та ОДК при дії нативного та кислотно-активованого Lar порівняно з показниками відповідних контрольних груп як у інтактних мишей, так і у мишей з асцитною або солідною формами карциноми Ерліха.

Окисно-відновний стан та активність низки ферментів (РНКаз, ММП, ОДК), відображають перебіг як нормальних фізіологічних, так і патологічних процесів в організмі, зокрема пухлинної прогресії, а також дозволяють оцінити результати токсичних впливів, які зазвичай пов'язані із запаленням, порушенням проліферації клітин, деструкцією тканин, окисненням біомолекул та клітинних структур тощо. Оцінка відповідних показників в тканинах і органах інтактних тварин та тварин з модельним пухлинним процесом є важливим компонентом вивчення токсичності гідрогелю на основі Lar у нативній та кислотно-активованій формах, особливо зважаючи на подальші дослідження його в якості носія проти-пухлинного препарату.

## ВИСНОВОК

В модельному експерименті визначено, що нативний Lar та його кислотно-активована форма суттєво не впливають на показники окисно-відновного стану, активність РНКаз, желатиназ і орнітиндекарбоксилази в пухлинних клітинах, печінці, нирках. Це свідчить про безпечність використання нанопластинок Lar в якості носія для протипухлинних препаратів.

Робота виконана за підтримки та фінансування Національного Фонду Досліджень України, Грант № 2022.01/0039, 2024; 2021.01/0178 та НАН України, 0120U105603.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Basso J, Miranda A, Nunes S, *et al.* Hydrogel-based drug delivery nanosystems for the treatment of brain tumors. *Gels* 2018; **4** (3): 62. doi: 10.3390/gels4030062.
- Goncharuk O, Samchenko Y, Sternik D, *et al.* Thermosensitive hydrogel nanocomposites with magnetic laponite nanoparticles. *Applied Nanoscience* 2020; **10**: 4559–69. doi: 10.1007/s13204-020-01388-w.
- Kalaydina RV, Bajwa K, Qorri B, *et al.* Recent advances in “smart” delivery systems for extended drug release in cancer therapy. *International journal of nanomedicine* 2018; **13**: 4727–4745. doi: 10.2147/IJN.S168053.
- Sepantafar M, Maheronnaghsh R, Mohammadi H, *et al.* Engineered hydrogels in cancer therapy and diagnosis. *Trends in biotechnology* 2017; **35** (11): 1074–87. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.06.015.

5. **Kalia S.** Polymeric hydrogels as smart biomaterials. In: Springer Series on Polymer and Composite Materials Springer, International Publishing 2016. doi: 10.1007/978-3-319-25322-0.
6. **Singh T, Laverty G, Donnelly R.** Hydrogels: design, synthesis and application in drug delivery and regenerative medicine. CRC Press, 2018. doi: 10.1201/9781315152226.
7. **Jung H, Kim HM, Choy YB, et al.** Laponite-based nano-hybrid for enhanced solubility and controlled release of itraconazole. *Int J Pharm* 2008; **349** (1–2): 283–90. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.08.008.
8. **Das A, Uppaluri R, Das C.** Feasibility of poly-vinyl alcohol/starch/glycerol/citric acid composite films for wound dressing applications. *Int J Biol Macromol* 2019; **131**: 998–1007. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.160.
9. **Samoylenko O, Korotych O, Manilo M, et al.** Biomedical applications of laponite®-based nanomaterials and formulations. In: *Soft Matter Systems for Biomedical Applications*. Springer International Publishing 2022, 385–452. doi: 10.1007/978-3-030-80924-9\_15.
10. **Wang S, Zhou L, Zheng Y, et al.** Synthesis and biocompatibility of two-dimensional biomaterials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2019; **583**: 124004. doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.124004.
11. **Nakamura H, Takada K.** Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Science* 2021; **112** (10): 3945–52. doi: 10.1111/cas.15068.
12. **Zhang Y, Wong HS.** Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells?. *J Exp Biol* 2021; **224** (Pt 5): jeb221606. doi: 10.1242/jeb.221606.
13. **Singh R, Manna PP.** Reactive oxygen species in cancer progression and its role in therapeutics. *Exploration of Medicine* 2022; **3** (1): 43–57. doi: 10.37349/emed.2022.00073.
14. **Wang Q, Cui H, Gan N, et al.** Recent advances in matrix metalloproteinases-responsive nanoprobe for cancer diagnosis and therapy. *Reviews in Analytical Chemistry* 2022; **41** (1): 198–216. doi: 10.1515/revac-2022-0044.
15. **Kalali D.** The role of the matrix metalloproteinase-9 gene in tumor development and metastasis: a narrative review. *Global Medical Genetics* 2023; **10** (2): 48–53. doi: 10.1055/s-0043-1768166.
16. **Mrówczyńska E, Mazurkiewicz E, Mazur AJ.** Gelatin zymography to detect gelatinase activity in melanoma cells. *J Vis Exp* 2022; (181): 10.3791/63278. doi: 10.3791/63278.
17. **Lee VT, Sondermann H, Winkler WC.** Nano-RNases: oligo- or dinucleases?. *FEMS Microbiol Rev* 2022; **46** (6): fuac038. doi: 10.1093/femsre/fuac038.
18. **Wang Y, Abrol R, Mak JYW, et al.** Histone deacetylase 7: a signalling hub controlling development, inflammation, metabolism and disease. *FEBS J* 2023; **290** (11): 2805–32. doi: 10.1111/febs.16437.
19. **Eller CH, Raines RT.** Antimicrobial synergy of a ribonuclease and a peptide secreted by human cells. *ACS Infect Dis* 2020; **6** (11): 3083–8. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00594.
20. **Acquati F, Mortara L, De Vito A, et al.** Innate immune response regulation by the human RNASET2 tumor suppressor gene. *Front Immunol* 2019; **10**: 2587. doi: 10.3389/fimmu.2019.02587.
21. **Artman M, Fry M, Engelberg H.** The preparation and characterization of ribonucleic acid obtained by direct phenol extraction of intact cells of *Escherichia coli* from low ionic environment. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; **25** (1): 49–53. doi: 10.1016/0006-291x(66)90638-3.
22. **Jackson LK, Brooks HB, Osterman AL, et al.** Altering the reaction specificity of eukaryotic ornithine decarboxylase. *Biochemistry* 2000; **39** (37): 11247–57. doi: 10.1021/bi001209s.
23. **Brooks HB, Phillips MA.** Characterization of the reaction mechanism for *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase by multiwavelength stopped-flow spectroscopy. *Biochemistry* 1997; **36** (49): 15147–55. doi: 10.1021/bi971652b.
24. **Pegg AE.** Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 2006; **281** (21): 14529–32. doi: 10.1074/jbc.R500031200.
25. EU. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union L* 2010; **276**: 33–79.
26. **Burlaka AP, Sidorik EP, Ganusevich II, et al.** High formation of superoxide anion and nitric oxide, and matrix metalloproteinases activity in vascular wall of rectal carcinoma vessels. *Exp Oncol* 2006; **28** (4): 323–5.
27. **Shlyakhovenko VO, Samoylenko OA, Verbinenko AV, Stakhovsky EO.** Ribonuclease activity as possible diagnostic and prognosis marker of prostate cancer. *Oncology* 2021; **23** (3): 130–7. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-23-3-2021-g.9665.
28. **Burlaka AP, Virko SV, Grygorenko VM, et al.** The changes of no level and RNase activity in tumor tissue accompanying the progression of prostate cancer. *Exp Oncol* 2022; **44** (2): 159–62. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17785.
29. **DeClerck YA, Perez N, Shimada H, et al.** Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; **52** (3): 701–8.
30. **Samoylenko OA, Stakhovsky EO, Vitruk YV, et al.** Ornithine decarboxylase activity in prostate cancer. *Exp Oncol* 2021; **43** (1): 46–51. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-1.16011.
31. **Luqman S, Masood N, Srivastava S, et al.** A modified spectrophotometric and methodical approach to find novel inhibitors of ornithine decarboxylase enzyme: a path through the maze. *Research square* 2013. doi: 10.1038/protex.2013.045.

## IMPACT OF LAPONITE ON ENZYME ACTIVITY AND REDOX STATE OF THE TUMOR AND ORGANS OF THE DETOXIFICATION SYSTEM OF MICE WITH EHRLICH CARCINOMA

O.A. Samoylenko<sup>1</sup>, Yu.M. Samchenko<sup>2</sup>,  
L.O. Kernosenko<sup>2</sup>, A.V. Verbinenko<sup>1</sup>,  
O.O. Solovieva<sup>2</sup>, A.M. Galeeva<sup>1</sup>,  
I.I. Ganusevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine

<sup>2</sup> F.D. Ovcharenko Biocolloidal Chemistry Institute of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Summary.** Laponite (Lap) is a synthetic clay mineral represented by disk-shaped nanoplatelets. The Lap (native or acid-activated) can be used for encapsulation of medical compounds, in particular anticancer drugs. **Aim:** to study the levels of the rate of superoxide radical (SR) generation, the activity of ribonucleases (RNases), gelatinases and ornithine decarboxylase (ODK) in tumor cells, liver and kidneys of intact mice and mice with Ehr-

*lich carcinoma under the influence of Lap. **Objects and methods:** the purified gel-forming native Lap of the XLG class with the empirical formula  $Si_8Mg_{5.45}Li_{0.4}H_4O_{24}Na_{0.7}$  was used. Acid activation of Lap (aLap samples) was done using sulfuric acid. The laboratory experiments were performed using outbred mice with transplanted Ehrlich carcinoma in ascites and solid forms. Determination of the rate of generation of SR was carried out by the method of electron paramagnetic resonance, RNases and matrix metalloproteinases activities were determined zymography in polyacrylamide gel, ODC activity was determined spectrophotometrically, statistical analysis of the results was performed using Student's t-test. **Results:** the data on the rate of the superoxide generation and the activity of gelatinases in the liver tissue, the tumor tissue and the ascites fluid Ehrlich carcinoma were compared. The introducing of native Lap resulted in noticeable decrease in the rate of the superoxide generation in the liver tissue by 1.7 times as compared with the control group of mice, and in the ascites fluid by 1.5 times as compared with the mice group without Lap. Moreover, introducing of native Lap resulted in the decrease of the gelatinases activity by 2.4 times in the ascites fluid and 1.9 times in the solid Ehrlich carcinoma tissue. The less significant*

*effects were observed for samples with incorporated aLap. No significant difference was found between the indicators of RNase and ODC activities under the influence of native Lap and aLap in intact and tumour-bearing mice. **Conclusion:** in a model experiment on outbred mice with Ehrlich carcinoma, it was determined that native Lap and aLap do not significantly affect the indicators of the redox state, the activity of RNases, gelatinases and ODC in tumor cells, liver and kidneys. It indicates the safety of using of these nanoplatelets for assistance of anticancer drug delivery.*

---

**Keywords:** Laponite, antitumor drug, nanoplatelets, redox state, ribonucleases, matrix metalloproteinases, ornithine decarboxylase.

**Адреса для листування:**

Ганусевич І.І.  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України  
E-mail: iganus2013@gmail.com

Одержано: 21.06.2024