

В.О. Шляховенко¹,
І.І. Ганусевич¹,
О.А. Самойленко¹,
Ю.М. Самченко²,
А.В. Верби́нченко¹,
О.О. Соловійова²

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

² Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: нанопластинки *Lar*, реактивація РНКаза, зимограми.

РЕАКТИВАЦІЯ РИБОНУКЛЕАЗ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ СОРБЦІЇ НА НАНОПЛАСТИНКАХ LAPONITE®

Мета: вивчити можливість реактивації рибонуклеаз (РНКаза) клітин периферичної крові хворих на колоректальний рак (КРР) після сорбції на нанопластинках *Laponite*® RD (*Lar*). **Об'єкт і методи:** у дослідженні використана клітинна суспензія периферичної крові хворих на КРР. Проби клітинних лізатів поєднували з 1% суспензією нанопластинок *Lar*, після чого проводили екстракцію РНКаза 0,25 н H_2SO_4 , або 2% розчином додецилсульфату (ДДС) натрію. Для аналізу активності РНКаза використана методика зимограм. **Результати:** встановлено, що при зв'язуванні РНКаза з нанопластинками *Lar* утворюються комплекси з втратою ферментативної активності. Однак РНКаза може бути вивільнена з комплексу екстракцією 0,25 н H_2SO_4 або 2% розчином ДДС натрію. Але при екстракції 2% розчином ДДС натрію фермент здатен відновлювати ферментативну активність, у той час як при екстракції 0,25 н H_2SO_4 ферментативна активність втрачається незворотно. **Висновок:** екстрагована з нанопластинок *Lar* РНКаза може відновити свою активність, як ферменту, який каталізує розщеплення РНК та гібридні молекули РНК/ДНК, в залежності від способу екстракції.

Рак залишається одним із захворювань, що характеризуються високим рівнем смертності та інвалідизації, а його діагностика та терапія — не досить ефективними. Удосконалення методів вчасного виявлення та корекції схем лікування онкологічних захворювань сприятиме підвищенню виживаності пацієнтів та зниженню навантаження на соціальну сферу. Фундаментальне значення для зниження смертності від раку має рання діагностика. Натепер розробляються новітні методи виявлення ранніх ознак захворювання за допомогою біомаркерів (нуклеїнових кислот, білків, малих метаболітів) [1].

Одними з таких потенційних маркерів є рибонуклеази (РНКази) — ферменти, що каталізують деградацію РНК. Це велика і гетерогенна група ферментів, які розщеплюють різні види РНК [2], наслідком чого є різноманітні впливи на фізіологічні та патологічні процеси в організмі. РНКази можуть бути додатковими біомаркерами при встановленні діагнозу онкологічним хворим. Визначення активності РНКаза передбачає їх попередню екстракцію з плазми крові, сечі, тканин. У процесі екстракції білкової фракції, незалежно від застосованого методу, важливо повною мірою зберегти активність досліджуваного ферменту. Саме за її рівнем можна оцінити функціональний стан РНКаза та їхню участь у біологічних подіях. [3]. Наразі активно досліджуються рівні активності позитивно заряджених РНКаза, оскільки деякі з

них характеризуються антимікробною активністю, і з'являється все більше доказів того, що вони беруть участь у формуванні вродженого імунітету. Компоненти крові людини містять низку РНКаза, які виконують відмінні одна від одної функції та, відповідно, чинять різноманітний вплив на внутрішньо- та позаклітинні процеси в організмі. Особливо багаті на ці ферменти еритроцити [4, 5]. Враховуючи важливу роль РНКаза у пухлинній прогресії, показану в багатьох роботах останнього десятиріччя, вивчення можливостей збереження або відновлення активності РНКаза представляє науково-практичний інтерес. Окрім того, на сьогодні у літературі немає даних щодо окремої екстракції позитивно та негативно заряджених РНКаза.

Відомо, що природні глини (бентоніти) незворотно зв'язують та інактивують ці ферменти, що раніше широко використовувалось для отримання неушкоджених високополімерних РНК [6]. Останнім часом у багатьох галузях народного господарства, фармакології і медицині широко використовується штучний аналог бентонітів — нанопластинки *Laponite*® RD (*Lar*), склад та властивості яких на сьогодні добре вивчені. Матеріал *Lar* є нетоксичним, що зумовило його широке застосування у ветеринарії та медицині.

Виходячи з вище зазначеного, метою нашої роботи було дослідження можливості екстрагування з периферичної крові хворих на колоректальний рак

(КРР) позитивно заряджених РНКаз та збереження (відновлення) їх активності методом реактивації ферментативної активності після сорбції на нанопластинках Lар.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано на зразках крові хворих на КРР, які перебували на лікуванні у відділенні пухлин печінки, підшлункової залози та онкоаскулярної хірургії Національного інституту раку МОЗ України (Київ, Україна) у 2020–2022 р. Усі пацієнти дали інформовану згоду на участь у дослідженні та використання їх біологічних матеріалів у дослідницьких цілях відповідно до правил Комітету з етики Національного інституту раку МОЗ України. Свіжоотриману венозну кров хворих на КРР з додаванням ЕДТА центрифугували при 5000 об./хв 5 хв за температури $+4^{\circ}\text{C}$ і відбирали клітинну фракцію для досліджень. 100 мкл суспензії клітин змішували з 5 мл бідистильованої води при $+4^{\circ}\text{C}$.

Реактивацію ферментативної активності проводили з використанням гелеутворюючого Lар 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 — високоочищений сертифікований сорт із низьким вмістом важких металів та інших домішок. Нанопластинки Lар характеризуються ≈ 25 нм діаметром, ≈ 1 нм товщиною та катіонообмінною ємністю 0,7 ммоль/г [7].

Отримані проби клітинних лізатів поєднували з суспензією нанопластинок Lар, після чого проводили екстракцію РНКаз 0,25 н H_2SO_4 , або 2% розчином додецилсульфату (ДДС) натрію (Sigma-Aldrich, США). Концентрацію білка в отриманих екстрактах визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000с (Thermo Fisher Scientific, США). Після цього 100 мкл отриманих зразків (100 мкг білка) розчиняли в 100 мкл 0,4 М Трис-НСІ буфера (pH 6,8), що містив гліцерин (5,0%), ДДС натрію (0,1%) та бромфеноловий синій (0,005%) і вносили у лунки гелю.

Активність РНКаз визначали методом зимограм із фотополімеризацією акриламиду. Електрофорез проводили у вертикальних блоках поліакриламідного гелю, застосовуючи буферну систему Laemmly [8], та систему фотополімеризації [9]. Гель містив 20,0% акриламиду, 2,8% метилен-бісакриламиду, 2,4 мг/мл ЕДТА та 4 мг/100 мл рибофлавіну (Sigma-Aldrich, США). Як субстрат ферментативної реакції у склад гелю вводили високополімерну РНК із *E. coli*. Розчин для полімеризації гелю готували при тьмяному освітленні. Суміш поміщали в електрофоретичну камеру між двома скляними пластинами і освітлювали світлодіодним (LED) випромінювачем видимого світла (400–700 нм), лампа Philips E27 (потужність 11 Вт,

еквівалентна потужність 95 Вт, світловий потік 1100 Лм). Відстань між джерелом світла та електрофоретичною камерою становила 10 см. Під час фотополімеризації цієї суміші протягом 10–20 хв утворювалися високозшиті блоки АМ/Біс, і гель залишався повністю прозорим. Під час електрофорезу напруга становила 100 В, використовувався електродний буфер (суміш розчину гліцину (1,4%), Трис (0,46 М) і ДДС натрію (0,1%). Час розділення становив приблизно 1,5 год. Після закінчення електрофорезу блоки гелю виймали з камери, вносили у розчин 25,0% ізопропанолу для видалення ДДС натрію, після чого інкубували у 0,05 М ацетатному буфері (pH 5,5) або у трис-НСІ буфері (pH 7,7) і забарвлювали у розчині 0,1% толуїдинового синього (Sigma-Aldrich, США). Після відмивання гелів від надлишку барвника їх висувували, фотографували і аналізували за допомогою програми GelAnalyzer для кількісної оцінки ізоформ РНКаз та їх активності.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На *рис. 1* представлені зимограми білків, які після сорбції на Lар були видалені 2% розчином ДДС та 0,5 н розчином H_2SO_4 . На зимограмах виявляється три білкових зони. Видно, що як 2% розчин ДДС натрію (*рис. 1 (1)*), так і розчин 0,5 н H_2SO_4 (*рис. 1 (2)*) вимивають однакові білки з Lар і в однаковій кількості.

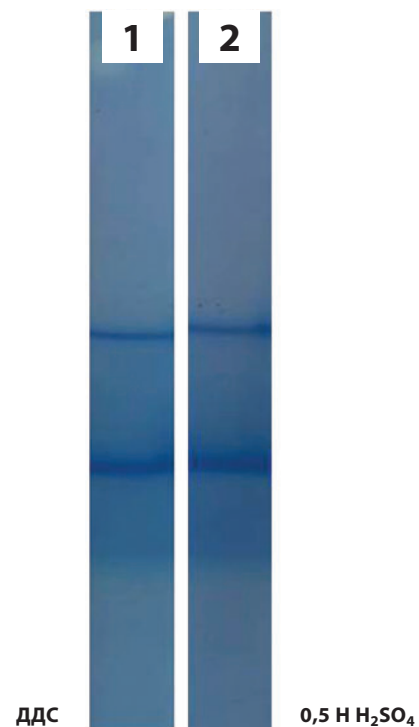


Рис. 1. Зимограма екстрактів білків, отриманих обробкою Lар — 2% ДДС натрію (1) та 0,5 н H_2SO_4 (2). Забарвлення гелю — 0,1% розчин кумасі діамантовий синій R-250

На *рис. 2* представлені зимограми, що відображають різну реактивацію ферментативної активності РНКаз після сорбції на нанопластинках Lар ферментвмісного лізату клітин крові на КРР.

Зокрема, на *рис. 2а* показана відсутність ферментативної активності РНКаз в зимограмах через утворення комплексу: нанопластинки Lар–РНКаз. Результати дослідження вказують, що РНКаз ферментвмісного лізату клітин крові, зв'язуючись з нанопластинками Lар, втрачає ферментативну активність. Однак РНКаз може бути вивільнена з комплексу (нанопластинки Lар–РНКаз) екстракцією 0,25 н H₂SO₄ або 2% розчином ДДС натрію (*рис. 2б*). При екстракції 2% розчином ДДС РНКаз здатна відновлювати ферментативну активність (*рис. 2б (1)*), у той час як при екстракції 0,25 н H₂SO₄ ферментативна активність втрачається незворотно (*рис. 2б (2)*).

Зауважимо, що у ряді досліджень показано, що екстракція РНКаз 0,25 н H₂SO₄ з тканинного матеріалу дає такий же активний фермент як і при виділенні іншими методами [10]. Різниця у даному випадку між екстракцією 0,25 н H₂SO₄



Рис. 2. Зимограми по виявленню РНКазної активності: *a* — ферментвмісного лізату клітин крові, сорбованого на нанопластинках Lар; *б* — екстрактів, отриманих обробкою нанопластинки Lар — 2% ДДС натрію (1) та 0,25 н H₂SO₄ (2). Субстрат — високополімерна РНК, рН інкубації 5,5. Забарвлення гелю — 0,1% розчин толуїдинового синього

та 2% розчином ДДС натрію полягає, можливо, у зміні конформації третинної структури ферменту у зв'язку з впливом кислоти на фізичні властивості нанопластинок Lар.

ВИСНОВКИ

Екстрагована з нанопластинки Lар РНКаз може бути знову активною, як фермент, який каталізує розщеплення РНК та гібридні молекули РНК/ДНК, у залежності від способу екстракції. Так, при екстракції РНКаз з комплексу (нанопластинки Lар–РНКаз) 2% розчином ДДС натрію ферментативна активність відновлюється. Одержані дані можуть бути використані як в діагностиці, так і в оцінці прогнозу перебігу раку з метою формування терапевтичних підходів до лікування хворих.

Робота виконана за підтримки та фінансування Національного фонду досліджень України (грант № 2022.01/0039; 2021.01/0178).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Peixoto D, Pereira I, Pereira-Silva M, *et al.* Emerging role of nanoclays in cancer research, diagnosis, and therapy. *Coord Chem Rev* 2021; **440**: 213956. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213956>.
2. Lee VT, Sondermann H, Winkler WC. Nano-RNases: oligo- or dinucleases? *FEMS Microbiol Rev* 2022; **46**: fuac038. doi: 10.1093/femsre/fuac038.
3. Wang Y, Abrol R, Mak JYW, *et al.* Histone deacetylase 7: a signalling hub controlling development, inflammation, metabolism and disease. *FEBS J* 2023; **290**: 2805–32. doi: 10.1111/febs.16437.
4. Stealey ST, Gaharwar AK, Zustiak SP. Laponite-based nanocomposite hydrogels for drug delivery applications. *Pharmaceuticals* 2023; **16** (6): 821. <https://doi.org/10.3390/ph16060821>.
5. 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/acsinfectdis.0c00594.
6. 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.
7. Samoylenko O, Korotych O, Manilo M, *et al.* Biomedical applications of laponite-based nanomaterials and formulations. In: *Soft Matter Systems for Biomedical Applications*. Bulavin L, Lebovka N (eds). Springer Nature, 2021, 385–452. doi:10.1007/978-3-030-80924-9_15.
8. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227** (5259): 680–5. doi: 10.1038/227680a0.
9. Shlyakhovenko V, Samoylenko O. Photopolymerization with EDTA and riboflavin for proteins analysis in polyacrylamide gel electrophoresis. *Protein J* 2022; **41** (4–5): 438–43. doi: 10.1007/s10930-022-10068-3.
10. Ohgi K, Sand A, Takizawa Y, Jrie M. Purification of acid ribonucleases from bovine spleen. *J Biochem* 1988; **103** (2): 267–73. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122259.

**HUMAN PERIPHERAL BLOOD
RIBONUCLEASES REACTIVATION
AFTER SORPTION ON NANOPATELETS
OF LAPONITE®**

V.O. Shlyakhovenko¹, I.I. Ganusevich¹,
O.A. Samoylenko¹, Yu.M. Samchenko²,
A.V. Verbinenko¹, O.A. Solovyova²

¹ RE Kavetsky Institute of Experimental
Pathology, Oncology and Radiobiology,
NAS of Ukraine,

² FD Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry,
NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to investigate the possibility of enzymatic reactivation of RNase activity of peripheral blood cells of patients with colorectal cancer (CRC) after sorption on nanoplates Laponite® RD (Lap). **Objects and methods:** the study was performed with the cell suspension of peripheral blood of CRC patients. Samples of cell lysates were combined with a 1% suspension of Lap nanoplates. Then RNase was extracted with 0,25 N H₂SO₄ or 2% solution of sodium dodecyl sulfate (SDS). The zymogram technique was used to analyze RNase activity. **Results:** it was found that RNases bind with nanoplates

Lap and form complexes with loss of enzymatic activity. It is known that RNase can be released from the complex by extraction with 0,25 N H₂SO₄ or 2% SDS solution. RNase is able to restore its enzymatic activity when extraction from the complex with a 2% DDS solution is used. But with the extraction of 0,25 N H₂SO₄, the enzymatic activity is irreversibly lost. **Conclusion:** RNase extracted from the nanoplates Lap can be active again as an enzyme that catalyzes the cleavage of RNA and hybrid RNA/DNA molecules, depending on the method of extraction.

Keywords: Lap nanoplates, RNase reactivation, zymograms.

Адреса для листування:

Самойленко О.А.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: a-samoilenko@ukr.net

Одержано: 24.11.2023