

В.О. Шляховенко¹
О.А. Самойленко¹
А.В. Верби́нко¹
Е.О. Стаховський²

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

²Національний інститут раку МОЗ України, Київ, Україна

Ключові слова: рак передміхурової залози, активність рибонуклеаз, простатоспецифічний антиген, шкала Глісона.

АКТИВНІСТЬ РИБОНУКЛЕАЗ ЯК МОЖЛИВИЙ ДІАГНОСТИЧНИЙ І ПРОГНОСТИЧНИЙ МАРКЕР РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Мета: дослідити зв'язок рівня активності рибонуклеаз (РНКаз) у злоякісних пухлинах передміхурової залози та у біологічних рідинах хворих на рак передміхурової залози (РПЗ) з клініко-патологічними особливостями неопластичного процесу та оцінити можливість їх застосування в якості діагностичних і прогностичних критеріїв для персоналізованої оцінки перебігу РПЗ та для розробки нових схем персоналізованого лікування (прогнозування чутливості злоякісних пухлин до протипухлинних агентів). **Об'єкт і методи:** у дослідженні використовували зразки пухлинної тканини, периферичної крові та сечі 120 хворих з різними стадіями РПЗ (Т1–Т4) (середній вік становив $65,0 \pm 7,88$ років) і 30 пацієнтів з простатичною інтраепітеліальною неоплазією (середній вік становив $60,2 \pm 3,6$ років). Активність РНКаз визначали методом зимограм із застосуванням електрофорезу в 15% поліакриламідному гелі. **Результати:** встановлено поступове зниження активності РНКаз у тканині передміхурової залози при прогресуванні РПЗ (від $460,8 \pm 20,3$ у.о. до $103,5 \pm 22,9$ у.о.). Одночасно спостерігається зростання рівня простатоспецифічного антигена у плазмі крові хворих та величини поширення процесу за шкалою Глісона. Встановлено, що у донорів найбільш високу ферментативну активність виявляють еритроцити та сеча. **Висновки:** у тканині пухлин відмічено поступове зниження активності РНКаз у процесі прогресування пухлинного процесу. Уцитозолі еритроцитів периферичної крові хворих на РПЗ відмічено зниження ферментативної активності РНКаз порівняно з донорами. У плазмі крові хворих на РПЗ відбувається зростання активності РНКаз при поширеності процесу за шкалою Глісона ≥ 7 . Одержані дані показують, що активність РНКаз може бути додатковим біомаркером для діагностики РПЗ і розробки тактики лікування з урахуванням індивідуальних особливостей.

Рак передміхурової залози (РПЗ) — одне з найбільш поширених злоякісних новоутворень у чоловіків. Темпи підвищення захворюваності на РПЗ є найвищими серед усіх злоякісних новоутворень [1], а значне збільшення кількості хворих на цю онкопатологію відзначено за останні два десятиліття. Значна поширеність РПЗ спостерігається і в Україні. Незважаючи на 5-річну виживаність в 98,9% випадків при раку передміхурової залози, у 20–30% чоловіків через 5 років виявляється рецидив [2]. Саме із цим пов'язаний той факт, що діагностиці та лікуванню цієї патології останнім часом приділяється все більше уваги як за кордоном, так і в Україні. Таким чином, існує нагальна потреба в розробці нових підходів для більш ефективної терапії РПЗ. Вирішальне значення як для прогнозу перебігу онкопатології, так і для розробки нових схем персоналізованого лікування має вивчення нових маркерів у тканині злоякісних пухлин передміхурової залози.

Рибонуклеази (РНКази) — велика і гетерогенна група гідролітичних ферментів, які виконують в клітині різноманітні функції, що робить їх важливим

чинником епігеномної регуляції [3]. Вони відповідають за утворення і процесинг різноманітних видів РНК, включаючи мРНК, усіх видів мікроРНК, а також визначають тривалість існування різних РНК в клітині. Ці особливості визначають їх роль у таких важливих життєвих процесах, як синтез білка, проходження через клітинний цикл, диференціювання, а також реалізації апоптозу. Клітинні популяції, що швидко проліферують, відзначаються низькою активністю РНКаз, що зумовлено високою інтенсивністю синтезу білка і необхідністю активного функціонування великої кількості різноманітних РНК, задіяних у процесах трансляції. Цей фермент представляє інтерес, оскільки його активність пов'язана з функцією багатьох органів і систем цілісного організму та часто змінюється при багатьох захворюваннях, включаючи пухлини, під час яких виявляються зміни активності РНКази. Передміхурова залоза належить до органів, функція яких залежить від гормональних впливів та ряду допоміжних сигналів, зокрема багатьох регуляторних РНК, наявних у біологічних рідинах. Рівень багатьох мі-

кроРНК та інших некодуєчих РНК значною мірою залежить від ферментів, що знаходяться в крові, лімфі та рідинах позаклітинного середовища. Численна група ферментів гідролізу РНК — РНКаз недостатньо вивчена у цьому напрямку, зокрема мало відомостей про конкретний біологічний вплив кожного з таких ферментів. У той же час відомо, що відсутність або зміни внаслідок мутації у структурі молекули РНКаз L можуть бути однією з причин виникнення раку передміхурової залози. Дані літератури свідчать, що перспективним у плані діагностики та прогнозування перебігу РПЗ є визначення активності та гетерогенності РНКаз [4]. Є також дані про те, що мутації гена, який кодує синтез РНКаз L, мають пряме відношення до виникнення РПЗ у людини. Shook і співавт. вважають РНКазу L маркерним ферментом при РПЗ [5]. Наведені дані свідчать про доцільність вивчення РНКаз при цій онкопатології у людини. Поява нових методів дослідження, зокрема методики зимограм, що поєднує у собі високу розділяючу силу електрофорезу в поліакриламідному гелі з технікою виявлення ферментативної активності безпосередньо в електрофореграмах, розширила можливості досліджень у цьому напрямку. Застосування методу зимограм дає можливість не тільки оцінити загальну активність ферменту, але і виявити зміни його молекулярної маси та наявності ізоформ. Такий підхід допоможе покращити діагностику пухлин передміхурової залози і краще обґрунтувати тактику лікування. Отже, дослідження активності РНКаз в пухлинах передміхурової залози та біологічних рідинах хворих на РПЗ є досить перспективними. Однак асоціативні зв'язки між активністю РНКаз та клініко-патологічними особливостями раку передміхурової залози (рівень простатоспецифічного антигену (ПСА) та шкала Глісона) вимагають подальших досліджень. Тому метою роботи було дослідити зв'язок рівня активності РНКаз у злоякісних пухлинах передміхурової залози та у біологічних рідинах хворих на РПЗ з клініко-патологічними особливостями неопластичного процесу та оцінити можливості їх застосування в якості діагностичних і прогностичних критеріїв для персоналізованої оцінки перебігу РПЗ та для розробки нових схем персоналізованого лікування (прогнозування чутливості злоякісних пухлин до протипухлинних агентів).

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пацієнти. У дослідженні взяли участь 120 хворих з різними стадіями РПЗ (T1–T4) (середній вік становив $65,0 \pm 7,88$ років), 30 пацієнтів з простатичною інтраепітеліальною неоплазією (ПІН) (середній вік становив $60,2 \pm 3,6$ років), які лікувалися в Національному інституті раку МОЗ України протягом 2017–2018 рр. та 30 умовно здорових чоловіків (група контролю). Усі пацієнти не отримували неoad'ювантну гормональну терапію. Від пацієнтів була отримана інформована згода на викорис-

тання зразків у дослідницьких цілях. Дослідження було проведено відповідно до Гельсінської декларації та затверджено Комітетом з етики Національного інституту раку МОЗ України. Клінічний діагноз встановлювали на підставі визначення ПСА в сироватці крові, пальцевого ректального дослідження, комп'ютерної томографії органів малого тазу та/або трансректального ультразвукового та патоморфологічного дослідження передміхурової залози, остеосцинтиграфії, рентгенографії грудної клітки. У всіх пацієнтів діагноз підтверджено після трансректальної мультифокальної біопсії передміхурової залози під контролем ультразвукового дослідження (УЗД). Стадію пухлинного процесу визначали згідно з Міжнародною системою класифікації пухлин 2016 [6]. Проведено патоморфологічне дослідження видаленої пухлини відразу після операції для визначення ступеня поширення пухлинного процесу за шкалою Глісона. Видалені зразки тканини передміхурової залози фіксували протягом ночі у 10% буферному нейтральному формаліні (рН 7,2) за кімнатної температури, зневоднювали у градуїзованій серії розчинів етанолу і вносили у парафіновий блок за стандартною процедурою. З парафінових блоків готували зрізи товщиною 5 мкм. Кожен десятий зріз фарбували гематоксиліном та еозином [7]. Оцінку прогресування пухлинного процесу проводили за шкалою Глісона [8]. Вимірювані бали становили від 6 до 10 (табл. 1). Залежно від показників шкали Глісона пацієнтів розподіляли на дві різні групи (<7 та ≥ 7). Рівні ПСА (отримані з передопераційних клінічних оцінок) знаходилися в інтервалі від 5,0 до 30,4 нг/мл із середнім значенням 13 г/мл.

Приготування екстрактів пухлинної тканини. Заморожену тканину (100 мг) хворих на РПЗ подрібнювали до тонкого порошку за допомогою ступки, періодично додаючи рідкий азот, який запобігає відтаванню тканини. Для визначення активності РНКаз порошок гомогенізували в 5 обсягах буферного розчину Гронова. Гомогенат центрифугували при 5000 об/хв (5 хв) у центрифугі з охолодженням (модель L7–70; Sigma). Для дослідження використовували супернатант, отриманий після центрифугування. Усі процедури одержання екстрактів проводили на льоду. Концентрацію білка визначали із застосуванням спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США).

Приготування фракції еритроцитів та плазми крові. Приблизно 6–9 мл периферичної крові пацієнтів (до радикальної простатектомії) та здорових донорів (добровольців лабораторії) було зібрано натщесерце у 9 мл пробірки, VACUTEST PLAST (VACUTEST KIMA, Італія), що містять K_3 EDTA 16,2 мг для вимірювання активності РНКаз у плазмі крові та еритроцитах.

Фракція цитозолу еритроцитів. Для видалення макрофагів та інших ядерних клітин суспензію крові пропускали через мікроколонку з целюлозою (4 • 18 мм) і центрифугували при 5000 г про-

тягом 5 хв. Осад, що складається з еритроцитів, суспендували в 7 об. розчину NaCl (154 мМоль/л) і знову центрифугували. Процедуру промивання розчином NaCl повторювали тричі. Отримані таким чином еритроцити ресуспендували в розчині 0,05 М Na-фосфатного буфера рН 7,4 і центрифугували при 3000 г протягом 15 хв. Супернатант видаляли і додавали до осаду 7 об. деіонізованої води. Після 30 с ретельного перемішування гемолізат центрифугували протягом 2 хв при 5000 г. Надосадову рідину, яка складалася з гемолізату та уламків еритроцитів, збирали для подальшої обробки. Осад відкидали. Надосадову рідину еритроцитів центрифугували протягом 30 хв при 30 000 г для видалення уламків та мембранної фракції еритроцитів. Отримана фракція цитозолу еритроцитів не мала виявлених елементів клітинної структури.

Фракція плазми крові. Досліджувані зразки крові (10 мкл) змішували зі 100 мкл охолодженого (4 °С) 0,14 М розчину хлориду натрію і вносили в пробірки 1,5 мл (Еппендорф), ретельно перемішували і центрифугували при 5000 г протягом 5 хв. До супернатанту додавали 500 мкл охолодженого ацетону, після чого поміщали в морозильну камеру при -20 °С на 10 хв, потім центрифугували при 5000 г протягом 5 хв. Для дослідження використовували осад, отриманий після центрифугування.

Приготування зразків сечі. Ранкові зразки сечі (15–40 мл) отримували у всіх учасників без ректального обстеження передміхурової залози або масажу, а потім центрифугували при 10 000 г протягом 30 хв для видалення уламків клітин та осаду.

Визначення концентрації білка. Концентрацію білка в отриманих екстрактах та фракціях визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000с (Thermo Fisher Scientific, США). Для визначення активності ферменту використовували 5 мкг білка в 10 мкл/зразок. До 30 мкл фракції (пухлини, цитозолу еритроцитів, плазми та сечі) додавали 30 мкл 2% SDS в 4 мМ буфері трис-НСІ рН 8,8, що містив 0,005% бромфеноловий синій з додаванням 5% сахарози. Суміш нагрівали при 90 °С протягом 10 хв, центрифугували при 3000 г протягом 10 хв і надосадову рідину (7 мкл) вносили у лунки поліакриламідного гелю. Застосовано метод зимограм для виявлення активності РНКаз у крові (еритроцитах і плазмі крові) та сечі [9].

Визначення активності РНКаз методом зимограм. Одержані екстракти досліджували методом ензимогам із застосуванням електрофорезу в 15% поліакриламідному гелі у системі Laemmli [9, 10, 11]. У лунки гелю вносили по 7 мкл досліджуваного зразка. Електрофорез проводили у вертикальних блоках гелю, товщиною 0,8 мм. Для цього в якості субстрату до складу гелю вводили 20 мг/мл високополімерної РНК дріжджів *Torula* (*Torulopsis utilis*) (Sigma-Aldrich, США). Електрофорез проводили за кімнатної температури та за постійної напруги (100 В) в електродному буфері, що містив 1,4% глі-

цин, 27,5 мМ Трис-НСІ та 0,1% додецилсульфату натрію. Після електрофорезу додецилсульфат натрію видаляли з гелів обробкою в 40 мл 25% ізопропанолу в 0,01 М Трис-НСІ буфері протягом ночі. Ізопропанол видаляли і гелі інкубували в 0,05 М ацетатному буфері рН 5,5 протягом 60 хв за 37 °С. Після інкубації гелі промивали 0,01 М Трис-НСІ протягом 10 хв і фарбували 0,2% розчином толуїдинового синього (Sigma-Aldrich, США) в 0,01 М Трис-НСІ протягом 20 хв. Гелі промивали один раз протягом 10 хв і двічі протягом 20 хв в 0,01 М Трис-НСІ. Після остаточного промивання 10% розчином гліцерину 0,01 М Трис-НСІ гелі сушили на целофані. Гелі сканували за допомогою сканера HP Scanjet 5590. Результати оцінювали з використанням стандартної програми TotalLab 1.01.

Вивчення впливу двовалентних металів на активність РНКаз у хворих на РПЗ. Після закінчення електрофорезу електрофореграми виймали з апарату і після видалення додецилсульфату розрізали вздовж доріжок на три фрагменти, які містили однакову кількість розділеного матеріалу. Перший фрагмент інкубували в незміненому буфері, другий — у буфері, що містив 20 мкМ, а третій — 200 мкМ сульфату цинку або сульфату міді. Проби інкубували в термостаті протягом 60 хв за 37 °С як описано вище. Ензимограми обробляли у програмі TotalLab.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою математичної програми медико-біологічної статистики STATISTICA 6.0. Для оцінки достовірності отриманих результатів використовували *t*-критерій Стьюдента; достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Активність РНКаз у злоякісних пухлинах передміхурової залози у хворих на РПЗ. Дефіцит продукції РНКазі L клітинами передміхурової залози вважається однією з вірогідних причин злоякісної трансформації клітин і РПЗ. Зокрема, встановлено, що алель гена *HPCL* кодує специфічну одониткову РНКазу RNASEL, пов'язану також з антивірусною дією інтерферону. Ця РНКаз енізиматично активується шляхом зв'язування з незвичайним 2'-5' фосфорильованим олігоаденілатом (2–5A). Активована 2–5A РНКаз запускає процес апоптозу в пухлинних клітинах. У клітинах з мутацією гена *HPCL* апоптоз блокується і пухлинні клітини виживають [12, 13]. Тому вивчення РНКаз при пухлинах передміхурової залози може сприяти розробці нового маркера діагностики цього захворювання. У роботі проведено дослідження активності РНКаз в пухлинах передміхурової залози хворих на ПІН та РПЗ.

У цьому розділі досліджень вивчали активність РНКаз у тканині пухлини залежно від стадії захворювання у порівнянні з рівнем ПСА та ступенем поширення процесу (за шкалою Глісона). Одержані дані представлені на рис. 1.

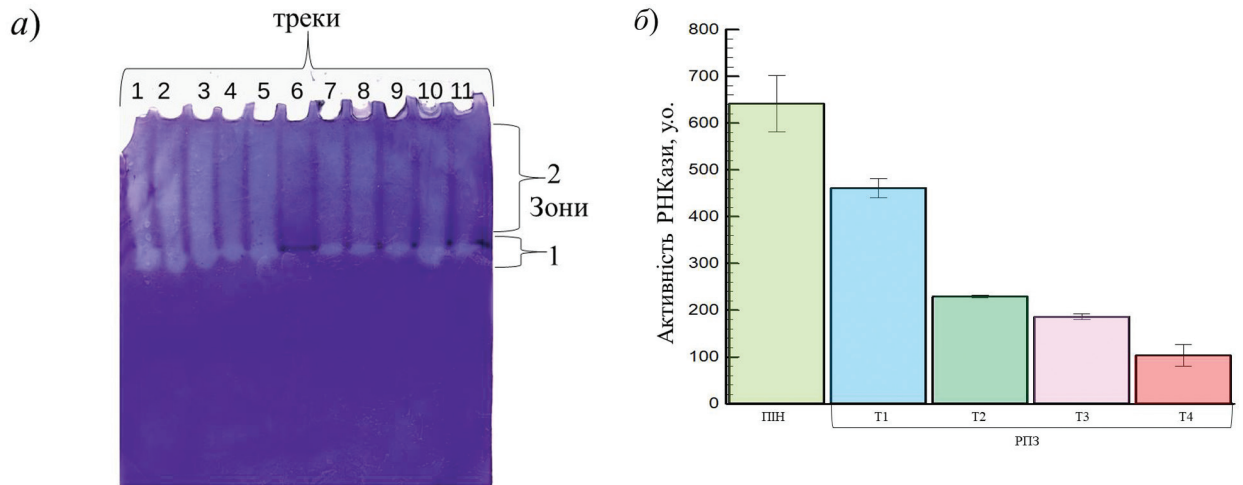


Рис. 1. Активність РНКаз у тканині передміхурової залози хворих на ПІН та РРЗ: *a* — типова ензимограма: трек 1 — ПІН, трек 2 — Т1, треки 3–5 — Т2, треки 6–7 — Т3, треки 8–11 — Т4; *б*) — активність РНКаз у тканині передміхурової залози хворих на ПІН та РРЗ на різних стадіях захворювання (Т1–Т4).

Таблиця 1

Інтервали змін рівнів ПСА та балів за шкалою Глісона у хворих різних груп

Клініко-патологічні показники	Групи хворих				
	ПІН	РРЗ			
		Т1	Т2	Т3	Т4
ПСА, нг/мл	2,6–5,9	7,5–14,5	5–17,4	11,9–27,4	13,0–26,1
Бал за шкалою Глісона	–	6	6–9	7–9	7–10

Ферментативна активність РНКаз реєструється в ензимограмах у вигляді двох дискретних зон (див. рис. 1а). Зона 1, у вигляді одиночної вузької смуги, що виявляє найбільшу електрофоретичну рухомість, представляє собою рівень активності немодифікованого ферменту. Зона 2 — набір РНКаз, модифікованих глікозидними залишками, за даними ряду авторів [14, 15, 16] вони представляють ферменти, модифіковані приєднанням залишків сіалових кислот і тому виявляють активність у поліакриламідному гелі у вигляді широкої зони із значно меншою рухомістю. Важливо відмітити, що ферментативна активність в електрофореграмах реєструється у чистому вигляді, оскільки природний інгібітор РНКаз має значно більшу молекулярну масу і рухається у даній системі електрофору значно повільніше, ніж РНКаз (див. рис. 1а). Змін рухомості або появи нових зон ферментативної активності РНКаз при РРЗ не відмічено. У даному розділі досліджень представлені результати середніх значень активності, обчислених для обох зон (див. рис. 1б). Найбільш висока активність РНКаз виявляється у тканині передміхурової залози при ПІН. На наступних стадіях розвитку пухлини (Т1–Т4) спостерігається прогресивне зниження ферментативної активності. Одночасно спостерігається зростання рівня ПСА у плазмі крові хворих та величини поширення процесу за шкалою Глісона (див. табл. 1).

При дослідженні активності РНКаз велике значення має йонне оточення ферменту. Особливу роль у прояві активності відіграють йони цинку. Відомо, що йони цинку беруть участь у багатьох метаболічних процесах. Цей життєво важливий елемент відіграє важливу роль у синтезі та перетвореннях ну-

клеїнових кислот. Цинк належить до найбільш важливих і незамінних для життєдіяльності організму людини мікроелементів. За поширенням в організмі людини цей елемент — на другому місці після заліза. Здатність цинку брати участь у процесах лігандоутворення з органічними молекулами пояснює надзвичайно широкий спектр його участі у різних біологічних системах. Це поєднується з відносною безпекою цього елемента, особливо відсутністю окислювальних властивостей (на відміну від заліза і міді), що покращує транспорт і метаболізм цинку в організмі та швидке біологічне засвоєння його клітинами. Цинк є незамінним для генної експресії і метаболізму нуклеїнових кислот, а, відповідно, і всіх процесів росту і диференціації клітин. Він також є структурним компонентом біологічних мембран, клітинних рецепторів, протейнів, входить до складу понад 200 ензиматичних систем, що регулюють основні процеси обміну речовин [17]. Цинк є структурним компонентом таких ферментів, як РНК-полімераза, ДНК-полімераза, алкогольдегідрогеназа, карбоксипептидаза А і В, піруваткарбоксилаза, супероксиддисмутаза та багатьох інших, що дозволяє зробити висновок про широкий спектр метаболічної активності цього елемента [18, 19]. В організмі людини загалом міститься близько 2 г цинку (у м'язах, кістках та інших тканинах). Найвища концентрація його в еритроцитах, передміхуровій та підшлунковій залозах. Більша частина цинку в крові (75–85%) зв'язана з карбоангідразою еритроцитів. Цинк є інгібітором формування і трансформації еритроцитів у їх гемолізовані форми, а також стабілізатором клітинних плазматичних мембран проти дії вірусної інфекції і токсинів. Високий вміст цин-

ку у шкірі, волоссі, нігтях, а також у чоловічих репродуктивних органах, зокрема у передміхуровій залозі. Середній вміст цього елемента в сироватці крові становить близько 960 мкг/л; добова потреба в ньому — 0,3 мкМ/кг, при деяких захворюваннях вона може зростати до 0,7 мкМ/кг [20]. Йони цинку активують ряд гідролітичних ферментів, зокрема нуклеаз.

Передміхурова залоза є органом, у якому концентрується цинк в організмі людини. Відомо, що при злоякісному переродженні передміхурової залози рівень цинку в залозі різко знижується. Тому важливо було оцінити безпосередній вплив цинку на активність РНКаз у цьому органі. Мідь є біологічним конкурентом цинку, а тому важливо було порівняти вплив цього металу на активність РНКаз передміхурової залози. Особливу перевагу має при цьому застосування методу ензимограм, оскільки у процесі ферментативної реакції в електрофореграмі фермент виступає у практично ізольованій формі і на нього не діють сторонні фактори. На рис. 2 представлені результати вивчення впливу іонів двохвалентних металів (міді та цинку) на активність РНКаз у тканині передміхурової залози хворих на РПЗ.

Під час дослідження впливу іонів міді на активність РНКаз РПЗ виявилася чітка закономірність. При всіх застосованих концентраціях (20 мкМ і 200 мкМ) йони міді виражено інгібують активність РНКаз передміхурової залози (див. рис. 2а), що відрізняє їх від дії йонів цинку (див. рис. 2б). У багатьох метаболічних процесах їх вплив виявляється взаємно протилежним. Дослідження впливу йонів цинку проводилися аналогічно такому з йонами міді (див. рис. 2б). З представлених даних видно, що невисокі концентрації цинку (20 мкМ) стимулюють активність РНКаз. Однак при подальшому підвищенні концентрації цинку (200 мкМ) активність РНКаз не відрізняється від контрольних показників (див. рис. 2б). Можливо, одним із факторів, що ви-

значають низький рівень активності РНКаз у передміхуровій залозі при прогресуванні пухлини (Т4) (див. рис. 1б), є відомий факт зниження рівня цинку в цьому органі.

Активність РНКаз у цитозолі еритроцитів донорів та хворих на ПІН та РПЗ. Ізольована РНКаз з цитозольної фракції еритроцитів людини являє собою полі-С-авідну РНКазу з максимальною активністю при рН 6,5. Фермент стійкий до обробки сильними кислотами та нагрівання до 95 °С. Молекулярна фільтрація еритроцитарної РНКазі показує, що вона складається з двох фракцій, що відрізняються за молекулярною масою 19 кДа та 15 кДа [21]. Оскільки еритроцити не метаболізують РНК, то не можна передбачати жодної функції для РНКазі та інгібітора, пов'язаного з РНКазою, в еритроцитах. Якщо припустити, що спостережувана еритроцитарна РНКаз є залишковим ферментом, оскільки вона функціонувала в ядерних попередниках еритроцитів, можна вважати, що рівні вільної та інгібованої активності еритроцитарної РНКазі можуть бути пов'язані з нормальним або аномальним механізмом дозрівання еритроцитів.

У периферичній крові донорів найбільш високу ферментативну активність виявляє цитозоль еритроцитів ($335 \pm 75,1$ у.о.) та сеча ($352 \pm 98,0$ у.о.) (див. табл. 1). РНКазі цитозоль еритроцитів на ензимограмах представлені у вигляді однієї зони активності (рис. 3а; треки 1–8). Інтенсивність цієї зони в цитозолі еритроцитів хворих (ПІН та РПЗ) значно знижена порівняно з еритроцитами донорів (див. рис. 3а; трек 1). Відзначається різке зниження загальної активності РНКаз в цитозолі еритроцитів у пацієнтів на різних стадіях захворювання порівняно з донорами (табл. 2). У деяких пацієнтів рівень активності знижується до 0 (див. рис. 3а, трек 6). Можна відмітити виражене падіння активності РНКаз в цитозолі еритроцитів у хворих з діагнозом ПІН та РПЗ (в 22,7 та 12,0 разів відповідно, порів-

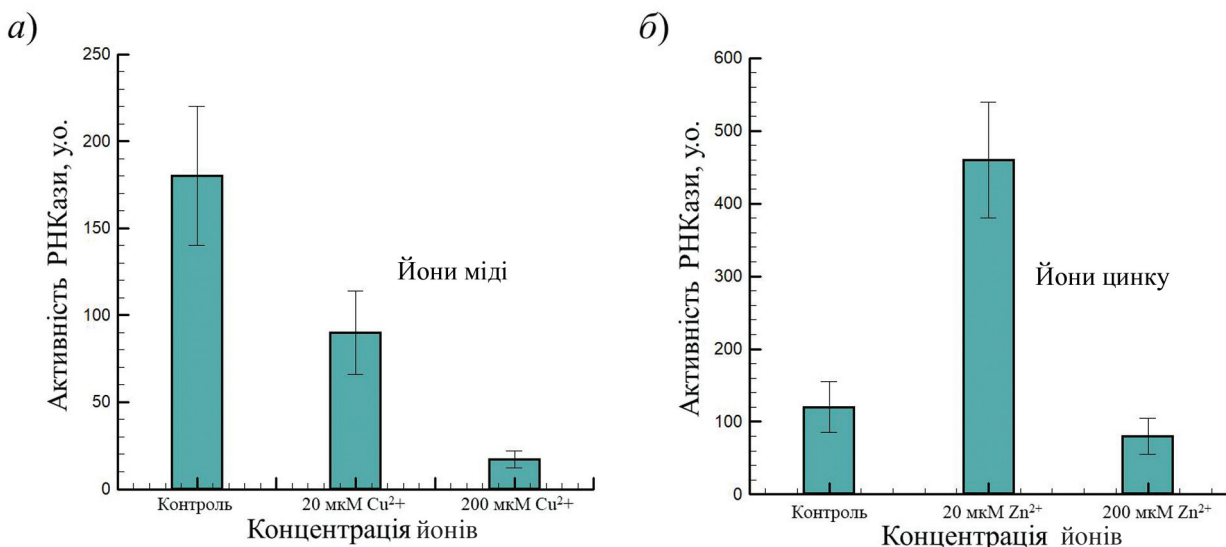


Рис. 2. Залежність активності РНКаз в тканині пухлини у хворих на РПЗ від концентрації йонів міді (а) та цинку (б). Контроль — 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН 7,5

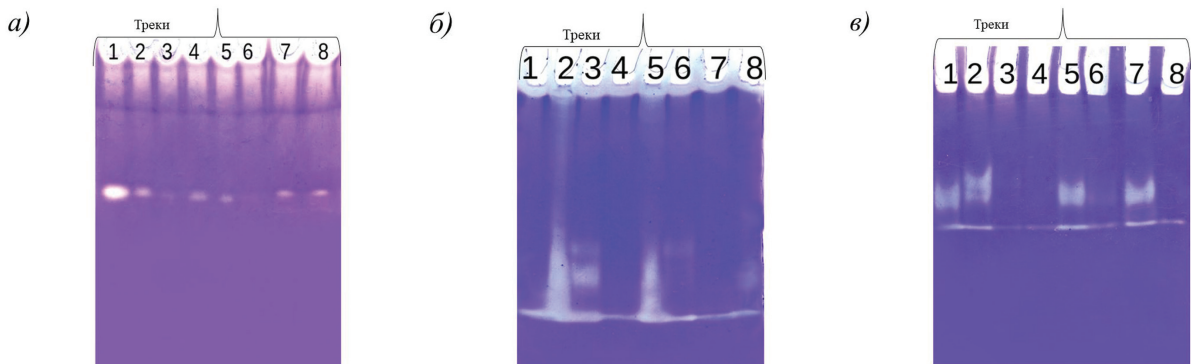


Рис. 3. Активність рибонуклеаз: *a* — у цитозолі еритроцитів донорів (1); хворих на РПЗ (Т2) (2) та ПІН (3–8); *б* — в цитозолі еритроцитів (1, 4, 7), плазмі крові (2, 5) та сечі (3, 4, 6, 8) хворих на РПЗ; *в* — активність рибонуклеаз у сечі донорів (1, 2, 3, 4) та хворих на РПЗ (5, 6, 7, 8) (типові ензимограми)

няно з донорами) (див. табл. 2). Також була вивчена активність РНКаз в цитозолі еритроцитів хворих на РПЗ залежно від ступеня поширеності процесу. Хворих було розподілено на дві групи відповідно до показника поширення пухлини за шкалою Глісона: група I — хворі з показником за шкалою Глісона <7, група II — хворі з величиною показника за шкалою Глісона ≥ 7 (рис. 4). Порівнюючи величини активності РНКаз у цитозолі еритроцитів, можна помітити, що у хворих з поширеним неопластичним ростом в групі II активність ферменту знижена в 9 разів ($p < 0,05$) порівняно з активністю ферменту у хворих групи I. Цей показник може бути використаний як додатковий діагностичний і прогностичний маркер поширеності пухлинного процесу.

Таблиця 2

Активність РНКаз в еритроцитах, плазмі крові та сечі донорів, хворих на гіперплазію та РПЗ

	Донори (n=30)	Хворі з ПІН (n=30)	Хворі на РПЗ (n=120)
Цитозоль еритроцитів	335,0 \pm 75,1	9,5 \pm 4,5*	24,4 \pm 8,7*
Плазма крові	141,9 \pm 51,2	165,8 \pm 13,5	176,3 \pm 16,7
Сеча	352,7 \pm 98,7	310 \pm 89,1	264,0 \pm 95,2

* $p < 0,05$ порівняно з показниками донорів

На рис. 3 представлені типові ензимограми активності РНКаз у цитозолі еритроцитів, плазмі крові та сечі донорів та хворих на ПІН або РПЗ. Було встановлено, що в цитозолі еритроцитів, плазмі крові та сечі спектри РНКаз радикально відрізняються між собою, що виключає можливість прямого потрапляння ферментів з еритроцитів у плазму крові, а з плазми крові через нирковий бар'єр — у сечу.

Активність РНКаз у плазмі крові. Плазма крові містить ряд РНКаз, які продукуються клітинами кровотворної системи, ендотелією судин та органів людського організму. Активність РНКаз у плазмі крові хворих на РПЗ в ензимограмах (див. рис. 3б; треки 2, 5) виявляється у вигляді ряду зон (4–8), з нечіткими межами, що пов'язано, згідно з даними літератури, з утворенням міжмолекулярних агрегатів та модифікацією частини ферменту вуглеводневими залишками. Плазма крові як у донорів, так і у хворих на ПІН та РПЗ виявляє значно нижчу питому активність порівняно із сечею, що частково пов'язано з великою кількістю загального білка в плазмі кро-

ві. Під час порівняння 2 груп хворих на РПЗ за поширеністю пухлинного процесу за шкалою Глісона було показано, що рівень активності РНКаз в плазмі крові в групі II (за шкалою Глісона ≥ 7) в 5 разів вищий ($p < 0,001$), ніж у групі I (за шкалою Глісона <7) (рис. 4). Згідно з нашими даними, активність РНКаз у плазмі крові теж може бути важливим додатковим прогностичним маркером поширеності пухлинного процесу.

Активність РНКаз у сечі. Сеча людини виявляє активність РНКаз, що пов'язано з діяльністю багатьох органів і систем організму. При дослідженні РНКаз сечі методом ензимограм виявляється її гетерогенність. У сечі хворих на РПЗ (див. рис. 3в; треки 3, 6, 8) реєструється дві або навіть три зони активності. З представлених даних видно, що активність РНКаз у сечі донорів, хворих з ПІН та РПЗ варіює в значних межах, від високої (див. рис. 3в; треки 1, 2, 5, 7) до дуже низької (див. рис. 3в; треки 3, 4, 6, 8). Появи нових ферментів, або зміни величини молекулярної маси у хворих на РПЗ порівняно з донорами не відмічено (див. рис. 3в).

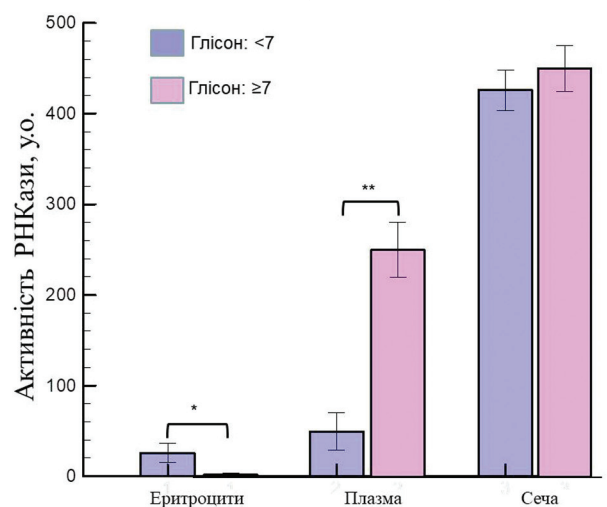


Рис. 4. Активність РНКаз у крові та сечі хворих на РПЗ залежно від прогресування процесу за шкалою Глісона * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

За статистикою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у 2018 р. РПЗ є другою провідною причиною смерті від раку серед чоловіків із 1,2 млн

нових випадків у всьому світі [22]. У західних країнах рівень захворюваності високий порівняно зі східними, що спричинено способом життя та харчуванням [23]. Через мультифокальну природу більшості РПЗ, клональну гетерогенність у кожного пацієнта та неможливість відбору проб всієї пухлини, інформація з однієї біопсії тканини, як правило, є недостатньою і не відображає динаміку пухлини у всій передміхуровій залозі. Застосування методу ензімограм дозволяє більш детально прослідкувати значення активності РНКаз та їх ізоформ у розвитку злоякісних новоутворень передміхурової залози. Зокрема показана зворотна залежність між активністю РНКаз у пухлинній тканині, рівнем ПСА, ступенем поширеності процесу (за шкалою Глісона) та стадією розвитку захворювання. У процесі розвитку РПЗ та його поширення спостерігається зростання рівня ПСА та одночасне зниження активності РНКаз у пухлинній тканині.

Метаболом плазми крові відображає загальну реакцію організму пацієнта як на захворювання (рак), так і на проведене лікування (хіміо-, гормональна або променева терапія). Тому нова стратегія рідинної біопсії виникла як перспективний малоінвазивний метод отримання генетичного профілю РПЗ, який долає ці обмеження [24, 25]. Вивчення активності РНКаз у біологічних рідинах (крові та сечі) за допомогою неінвазивної аналітичної процедури забезпечує отримання більш повної інформації про прогресування пухлини. Визначення активності РНКаз у цитозолі еритроцитів та плазмі крові показало здатність відрізнити РПЗ від здорових донорів та корелювання зі стадією захворювання. Активність РНКаз у цитозолі еритроцитів та плазмі крові є дуже перспективним кандидатом на діагностичний та прогностичний біомаркер, що може відкрити більше можливостей для діагностики та прогнозування перебігу РПЗ. Для ранньої діагностики метод ензімограм є простим і доступним за ціною, не вимагає хірургічного втручання, потребує мінімальної кількості досліджуваного матеріалу і може бути використаний для досліджень у пацієнтів з РПЗ та іншими захворюваннями сечостатевої системи.

ВИСНОВКИ

1. Застосування техніки ензімограм дозволило встановити, що у тканині пухлин хворих на РПЗ спостерігається зниження ферментативної активності РНКаз при прогресуванні пухлини, що асоціюється зі зростанням рівня ПСА у плазмі крові хворих та величиною поширеності процесу за шкалою Глісона.

2. Показано, що в цитозолі еритроцитів периферичної крові хворих на ППН та РПЗ спостерігається зниження активності РНКаз (в 22,7 та 12,0 разів відповідно, порівняно з донорами). У хворих на РПЗ з поширеним неопластичним ростом (за шкалою Глісона ≥ 7) активність РНКаз знижена в 9,0 разів ($p < 0,05$) порівняно з активністю ферменту в групі хворих з менш поширеним процесом (за шкалою Глісона < 7).

3. Показано, що активність РНКаз у плазмі крові хворих на РПЗ з поширеним неопластичним ростом (за шкалою Глісона ≥ 7) в 5 разів вища ($p < 0,001$), ніж у хворих з менш поширеним процесом (за шкалою Глісона < 7).

4. Одержані дані свідчать, що активність РНКаз у цитозолі еритроцитів та плазмі периферичної крові хворих на РПЗ може бути можливим додатковим біомаркером для діагностики і розробки тактики лікування з урахуванням індивідуальних особливостей, яка допоможе уникнути побічних реакцій при застосуванні радикальних методів лікування та виникненні рецидивів.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; **46** (4): 765–81.
2. Rosario S. Polyamine Biosynthetic Metabolic Dysregulation: Targeting and the Adaptive Response. 2020.
3. Shlyakhovenko VO. Ribonucleases. Possible new approach in cancer therapy. *Exp Oncol* 2016; **38** (1): 2–8.
4. Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* 2003; **42** (7): 1805–12.
5. Shook SJ, Beuten J, Torikko KC, et al. Association of RNASEL variants with prostate cancer risk in Hispanic Caucasians and African Americans. *Clin cancer Res* 2007; **13** (19): 5959–64.
6. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons, 2016.
7. Popescu LM. Adaptation Biology and Medicine. Alpha Science International Limited, 2013.
8. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992; **23** (3): 273–9.
9. Yasuda T, Nadano D, Tenjo E, et al. The zymogram method for detection of ribonucleases after isoelectric focusing: analysis of multiple forms of human, bovine, and microbial enzymes. *Anal Biochem* 1992; **206** (1): 172–7.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227** (5259): 680–5.
11. Yen Y, Green PJ. Identification and properties of the major ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1991; **97** (4): 1487–93.
12. Cussenot O, Valeri A, Berthon P, et al. Hereditary prostate cancer and other genetic predispositions to prostate cancer. *Urol Int* 1998; **60** (2): 30–4.
13. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, et al. Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2', 5'-oligoadenylates. *Cancer Res* 2003; **63** (20): 6795–801.
14. Sakakibara R, Hashida K, Kitahara T, et al. Characterization of a unique nonsecretory ribonuclease from urine of pregnant women. *J Biochem* 1992; **111** (3): 325–30.
15. Thomas JM, Crisp M, Hodes ME. Sialic acid residues contribute to the heterogeneity of human serum ribonuclease:

demonstration by isoelectric focusing and neuraminidase treatment of serum. *Clin Chim acta* 1984; **142** (1): 73–81.

16. Mizuta K, Awazu S, Yasuda T, *et al.* Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: comparison with urine ribonucleases. *Arch Biochem Biophys* 1990; **281** (1): 144–51.

17. Silva CS, Moutinho C, da Vinha A, *et al.* Trace Minerals in Human Health: Iron, Zinc, Copper, Manganese and Fluorine. *Int J Sci Res Methodol* 2019; **13** (3): 57–80.

18. Bhagavan NV, Ha C-E. Essentials of medical biochemistry: with clinical cases. Academic Press, 2011.

19. Crichton RR. Biological inorganic chemistry: a new introduction to molecular structure and function. Elsevier, 2012.

20. Sandstead HH. Zinc deficiency: a public health problem? *Am J Dis Child* 1991; **145** (8): 853–9.

21. Czajkowska B, Naskalski JW, Sznajd J. Ribonuclease from cytosolic fraction of human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 1986; **154** (1): 19–27.

22. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; **68** (6): 394–424.

23. Ying M, Zhao R, Jiang D, *et al.* Lifestyle interventions to alleviate side effects on prostate cancer patients receiving androgen deprivation therapy: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol* 2018; **48** (9): 827–34.

24. Arancio W, Belmonte B, Castiglia M, *et al.* Tissue Versus Liquid Biopsy: Opposite or Complementary? In: *Liquid Biopsy in Cancer Patients*. Springer, 2017: 41–9.

25. Ghosh RK, Pandey T, Dey P. Liquid biopsy: a new avenue in pathology. *Cytopathology* 2019; **30** (2): 138–43.

RIBONUCLEASE ACTIVITY AS POSSIBLE DIAGNOSTIC AND PROGNOSIS MARKER OF PROSTATE CANCER

V.O. Shlyakhovenko¹, O.A. Samoilenko¹,
A.V. Verbinenko¹, E.O. Stakhovsky²

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

²National Cancer Institute, MH of Ukraine, Kyiv,
Ukraine

Summary. Aim: to investigate the relationship between the level of ribonuclease (RNase) activity in the prostate tumor, in the biological fluids and the clinical and path-

ological features of the neoplastic process of patients with prostate cancer (PCa). Evaluate the possibility of their use as diagnostic and prognostic criteria for personalized assessment of the development and course of PCa and for the development of new schemes of personalized treatment (prediction of the sensitivity of malignant tumor to antitumor agents). Object and methods: the study used samples of tumor tissue, peripheral blood and urine of 120 patients with different stages of PCa (T1-T4) (mean age was 65.0 ± 7.88 years) and 30 patients with prostatic intraepithelial invasion (PIN) (mean age was $60,2 \pm 3.6$ years). The RNase activity was determined by zymogram using electrophoresis in 15% polyacrylamide gel. **Results:** the gradual decrease of the RNases activity in prostate tissue with the progression of PCa was found (from $460.8 \pm 20.3AU$ to $103.5 \pm 22.9 AU$). At the same time, there is an increase in the level of prostate-specific antigen (PSA) in the blood plasma of patients and the degree of the spread of the process, according to the Gleason scale. It was found that erythrocytes cytosol and urine show the highest enzymatic activity in donors. **Conclusions:** in tumor tissue a gradual decrease of the RNase activity during the progressing of tumor growth was found. In erythrocytes cytosol of patients with PCa a decrease of the RNase activity was observed in comparison to donors. An increase of the RNase activity in the blood plasma of PCa patients with the Gleason scale (≥ 7) was found. The obtained data show that the RNase activity may be additional biomarker for the diagnosis and choosing tactics for personalized treatment of PCa patients.

Key Words: prostate cancer, ribonuclease activity, prostate-specific antigen, Gleason scale.

Адреса для листування:

Шляховенко В.О.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: doctorvlad38@gmail.com

Одержано: 28.09.2021