

ТОЧКА ЗРЕНИЯ

DOI 10.25789/YMJ.2022.80.27

УДК 616-006.6:612.111.6

И.В.Кононова, С.Н.Мамаева, В.А.Алексеев

**ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНОВ БЕТА-ГЛОБИНА
В ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ
У ПАЦИЕНТКИ С РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ**

Представлены результаты детекции, проведенной с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), фрагментов ДНК, кодирующих бета-глобин человека и белок L1 вируса папилломы человека, в образцах плазмы и эритроцитов у пациентки с раком шейки матки. Амплификация фрагмента ДНК, кодирующего бета-глобин человека, была обнаружена только в образце эритроцитов, что косвенно может свидетельствовать о наличии внеклеточной ДНК. Результаты ПЦР-РВ на наличие фрагмента ДНК, кодирующего L1 ВПЧ, были отрицательными, что не позволило подтвердить принадлежность выделенной ДНК к опухолевой. Происхождение идентифицированного в эритроцитарной фракции фрагмента ДНК, кодирующего бета-глобин человека, требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: опухолевая ДНК, внеклеточные везикулы, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

The results of detection of DNA fragments encoding human beta-globin and human papillomavirus L1 protein in plasma and erythrocyte samples from a cervical cancer patient using real-time polymerase chain reaction (qPCR) are presented. Amplification of a DNA fragment encoding human beta-globin was found only in a sample of erythrocytes, which may indirectly indicate the presence of extracellular DNA. The results of qPCR for the presence of a DNA fragment encoding HPV L1 were negative, which did not allow us to confirm that the isolated DNA belonged to the tumor DNA. The origin of the identified in the erythrocyte fraction DNA fragment encoding human beta-globin requires further research.

Keywords: tumor DNA, extracellular vesicles, neutrophil extracellular traps.

Бета-глобин является субъединицей гемоглобина - железосодержащего металлопротеина. У млекопитающих гемоглобин в самом большом количестве содержится в эритроцитах, его основная функция заключается в транспорте кислорода из легких в различные ткани организма. Гемоглобин также взаимодействует с другими газами, такими как диоксид углерода, оксид углерода и оксид азота. Гемоглобин - тетрамер, состоящий кроме двух цепей бета-глобина также из двух цепей альфа-глобина. К каждой из этих цепей присоединен гем, и таким образом каждая цепь может транспортировать кислород. Помимо эритроидных клеток гемоглобин экспрессируется и неэритроидными клетками, такими как эпителиальные клетки, в том числе эпителиальными клетками шейки матки [19].

Установлено, что в нормальных клетках цервикальной и вагинальной слизистой альфа-глобин и бета-глобин могут действовать как эндогенные антимикробные защитные белки против инфекции [14]. Гемоглобин и мРНК обнаруживаются также в клеточных линиях карциномы шейки матки человека (SiHa и CaSki), и экспрессия генов альфа-глобина и бета-глобина в

них значительно выше, чем в нормальных клетках шейки матки [4]. Экспрессия этих генов улучшает жизнеспособность опухолевых клеток, подавляя окислительный стресс [15].

Альфа-глобин и бета-глобин кодируются генами, расположенными на хромосомах 16 и 11 соответственно. Кластер генов бета-глобина упакован в неактивный гетерохроматин в неэритроидных клетках, тогда как гены альфа-глобина встроены в открытые конформации хроматина во всех типах клеток [18]. Транскрипционно-неактивный гетерохроматин играет жизненно важную роль в поддержании стабильной структуры специализированных хромосомных областей с повторяющейся ДНК, потеря целостности в этих участках хромосом может способствовать развитию рака [13].

ДНК, в том числе геномная, обнаруживается во фракциях крови, очищенных от клеток, - в плазме и сыроворотке. Как нормальные, так и опухолевые клетки высвобождают ДНК в циркуляторное русло, но у больных раком она присутствует в повышенном количестве [25]. Предполагается, что детекция опухолевой ДНК в крови может значительно улучшить выявление опухолей на ранней стадии, определить ее прогрессирование и прогноз, а также помочь в таргетной терапии [5]. Детекцию опухолевой ДНК осуществляют в основном в плазме крови, но сложность определения связана с ее низкой концентрацией в этой фракции [24].

Геномную человеческую ДНК обнаруживают также и в эритроцитарной фракции крови, причем даже спустя

25 лет ее хранения [16]. Геномная ДНК - как человеческая, так и инфекционной природы, может быть связана с поверхностью эритроцитов посредством рецепторов, так как известно, что эритроциты на своей поверхности экспрессируют рецепторы, которые, во всяком случае, *in vitro* связывают ДНК бактерий и митохондрий [10].

Полагая, что при раке шейки матки (РШМ) геномная ДНК содержится в крови в повышенном количестве, а наличие в ее составе генов бета-глобина может быть индикатором онкогенеза, была поставлена **цель** - выделить у пациентки с РШМ ДНК из фракций крови, в которых отсутствуют ядерные клетки - из плазмы и эритроцитарной фракции, а также осуществить детекцию фрагмента ДНК, кодирующего бета-глобин человека. Для того, чтобы определить, пусть и косвенно, принадлежность выделенной ДНК к опухолевой, было решено осуществить также детекцию фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 вируса папилломы человека (ВПЧ), так как считается, что при РШМ циркулирующая внеклеточная ДНК, в составе которой имеется геном ВПЧ, происходит из опухолевых клеток [6].

Материал и методы исследования. Исследование было одобрено местным комитетом по биомедицинской этике Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова (протокол № 13 от 4 апреля 2018 г., решение № 2). Материалом исследования послужила венозная кровь, взятая у пациентки Б., жительницы Якутии, с впервые выявленным РШМ, давшей письменное информирован-

КОНОНОВА Ирина Васильевна - к.м.н., в.н.с. ЯНЦ комплексных медицин. проблем, irinakon.07@mail.ru, SPIN-код: 3282-7170, ORCID: 0000-0002-9243-6623; **МАМАЕВА Саргылана Николаевна** - к.ф.-м.н., зав. кафедрой Физ.-технич. ин-та СВФУ им. М.К. Аммосова; **АЛЕКСЕЕВ Владислав Амирович** - м.н.с. ЯНЦ КМП.

ное согласие на проведение исследования. Кровь взята путем венепункции в вакуумный контейнер для забора крови с КЗ-EDTA, приготовлены 4 вида биологических образцов: плазма (образец 1), взвесь отмытых в фосфатном буфере эритроцитов (образец 2) и взвесь обработанных трипсином и затем отмытых также в фосфатном буфере эритроцитов (образец 3). Образец 3 служил контролем отсутствия во взвеси эритроцитов примеси клеток, содержащих ядра. К тому же обработка эритроцитов трипсином была нужна для подтверждения присутствия искоемых фрагментов ДНК на поверхности эритроцитов – так как известно, что трипсин протеолитически разрушает рецепторы клеточной поверхности [27]. Осадок фосфатного буфера (образец 4), который использовался для отмывки эритроцитов, обработанных трипсином, также был взят в работу для детекции ДНК.

Для разделения крови на фракции ее центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 мин. Затем после сбора и удаления мононуклеарного слоя были выделены образцы плазмы и эритроцитарная фракция. Эритроцитарную фракцию трижды отмывали фосфатным буфером для получения эритроцитарной взвеси. В часть эритроцитарной взвеси добавили в соотношении 1:1 трипсин - 0,25%-ный раствор, и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин, после инкубации центрифугировали для получения осадка эритроцитов; затем эритроциты трижды отмыли фосфатным буфером.

Все образцы до выделения ДНК и проведения ПЦР-РВ хранились в морозильнике при температуре -20°C.

Выделение ДНК осуществлялось фенол-хлороформным способом. Концентрацию и качество выделенной ДНК определяли спектрофотометрически с помощью прибора NanoPhotometer Pearl («Implen»).

ПЦР-РВ проводилась на амплификаторе CFX96 («Biorad») с использованием готовой реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR+LowROX («Evrogen»).

Для детекции фрагментов ДНК, кодирующих бета-глобин человека, использовались праймеры PC03/04 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'/5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3').

Для детекции фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ВПЧ, использовались праймеры MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'/5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3').

Длину ампликонов определяли электрофоретически в агарозном геле.

Результаты и обсуждение. Основные результаты, полученные в ходе проведения настоящего исследования, представлены в таблице.

ДНК была выделена из трех образцов – из плазмы, взвеси отмытых эритроцитов и эритроцитов, обработанных трипсином, и ее концентрация во всех перечисленных образцах превысила верхнюю границу чувствительности спектрофотометра - 18750 нг/мкл. В четвертом образце - осадке фосфатного буфера, который использовался для отмывки эритроцитов, обработанных трипсином, ДНК выделить не удалось.

Исследование образца 1. Проведенная ПЦР-РВ с праймерами PC03/04 и MY09/11 для ДНК, выделенной из плазмы, показала отсутствие фрагмента,

кодирующего бета-глобин человека, и сомнительный результат для фрагмента, кодирующего белок L1 ВПЧ (рис.1). Электрофорез подтвердил отсутствие продуктов амплификации фрагмента ДНК, кодирующего бета-глобин человека, и также показал отсутствие продуктов амплификации фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ВПЧ.

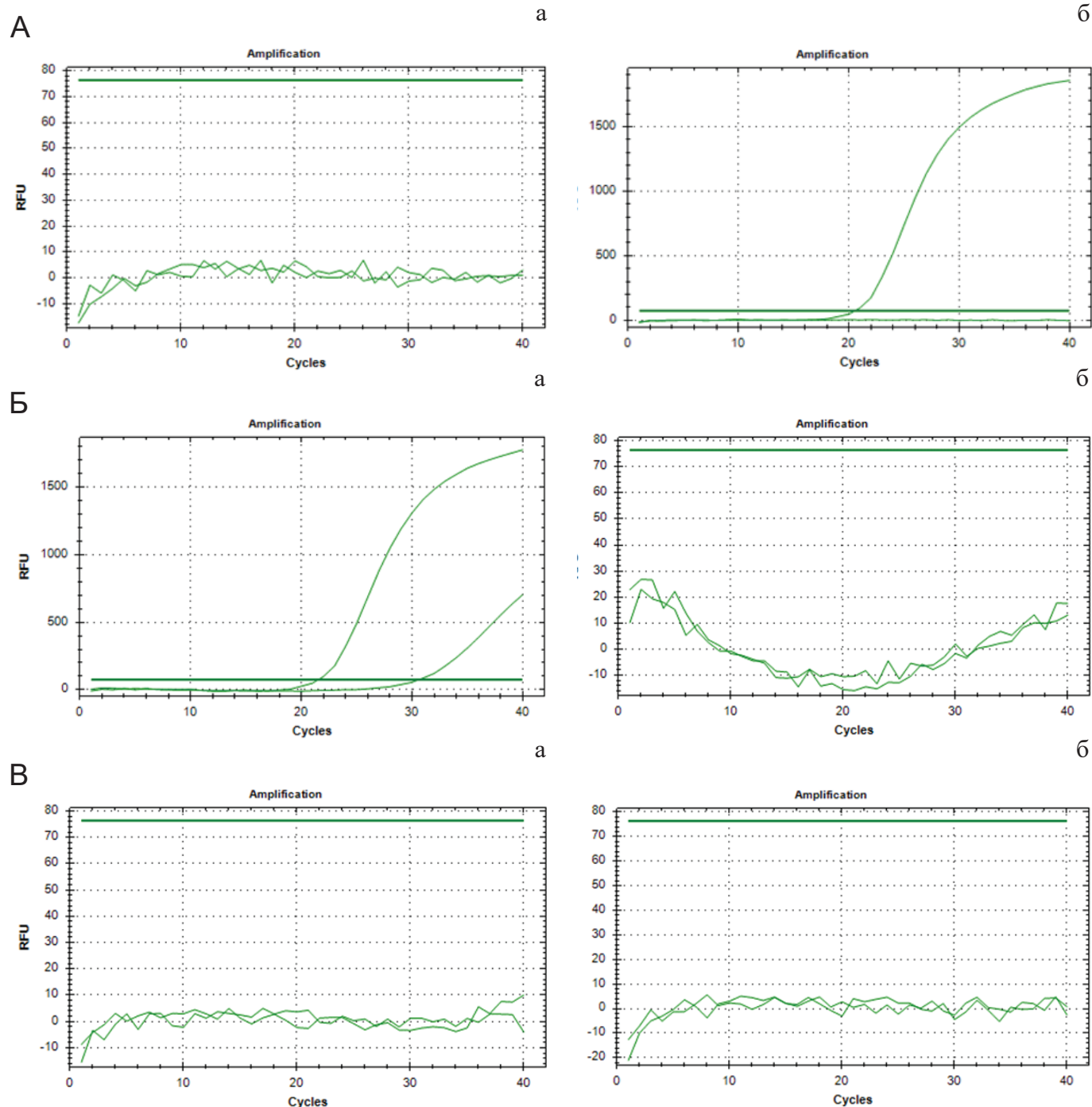
Исследование образца 2. ПЦР-РВ с ДНК, выделенной из образца взвеси эритроцитов, выявила наличие фрагмента, кодирующего бета-глобин человека, и отсутствие фрагмента, кодирующего белок L1 ВПЧ (рис.2). Электрофорез подтвердил наличие продуктов амплификации для фрагмента ДНК, кодирующего бета-глобин человека, и отсутствие продуктов амплификации для фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ВПЧ.

Исследование образца 3. Что касается ДНК, выделенной из взвеси эритроцитов, обработанных трипсином, ПЦР-РВ не выявила наличия в ней фрагментов, кодирующих бета-глобин человека и белок L1 ВПЧ (рис.3). Проведенный гель-электрофорез показал согласованность с этими результатами – показал отсутствие продуктов амплификации для обоих фрагментов ДНК.

Таким образом, у пациентки Б. была обнаружена ДНК во фракциях крови, в которых отсутствуют клетки, содержащие ядра, – в плазме и эритроцитах. ДНК, содержащая фрагмент, кодирующий бета-глобин человека, обнаружена только в эритроцитарной фракции крови. Присутствие этой ДНК в эритроцитарной фракции не может быть объяснено некачественным выделением эритроцитов, то есть наличием в эритроцитарной фракции клеток,

Основные результаты, полученные в ходе проведения экспериментального исследования

	Образец 1 (плазма)	Образец 2 (взвесь эритроцитов)	Образец 3 (контроль - взвесь эритроцитов, обработанных трипсином)	Образец 4 (осадок фосфатного буфера)
Выделение ДНК	(+)	(+)	(+)	(-)
Для фрагмента ДНК, кодирующего бета-глобин человека				
Амплификация фрагмента гена бета-глобина человека методом ПЦР-РВ	(-)	(+)	(-)	Не проводилась
Верификация амплификации с помощью гель-электрофореза	(-)	(+)	(-)	Не проводилась
Вывод	Фрагмент ДНК, кодирующий бета-глобин человека, обнаружен в эритроцитарной фракции			
Для фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ВПЧ				
Амплификация фрагмента гена L1 вируса папилломы человека методом ПЦР-РВ	(+/-) сомнительный	(-)	(-)	Не проводилась
Верификация амплификации с помощью гель-электрофореза	(-)	(-)	(-)	Не проводилась
Вывод	Фрагмент ДНК, кодирующий белок L1 ВПЧ, не обнаружен ни в одной фракции			



Накопление флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной: А - из плазмы, Б - из взвеси эритроцитов, В - из взвеси эритроцитов, обработанных трипсином; амплификация фрагмента ДНК, кодирующего а - бета-глобин человека, б - белок L1 ВПЧ

содержащих ядра, — ретикулоцитов и лейкоцитов, так как детекции ДНК, содержащей фрагмент, кодирующий бета-глобин человека, после обработки эритроцитов трипсином не произошло. Это также говорит о том, что, скорее всего, эта ДНК связана с поверхностью эритроцитов посредством рецепторов, так как трипсин способен протеолитически разрушать рецепторные связи. Отсутствие в эритроцитарной фракции фрагментов ДНК, коди-

рующих L1 ВПЧ, снижает вероятность происхождения ДНК из опухолевых клеток шейки матки, хотя, конечно, это утверждение неочевидно. Возможно, выделенная ДНК принадлежит нейтрофильным внеклеточным ловушкам (neutrophil extracellular trap, NET), которым отводится уникальная роль в онкогенезе [12, 26]. И, возможно, именно в эритроцитарной фракции нейтрофильные внеклеточные ловушки можно определять раньше, чем в плазме

и сыворотке. В текущее время исследователями показано, что в плазме и сыворотке уровни нейтрофильных внеклеточных ловушек коррелируют с прогрессированием рака — колоректального [21], молочной железы [20] и желудка [9]. Также возможным источником выделения ДНК, содержащей фрагмент, кодирующий бета-глобин человека, могут быть и эндогенные внеклеточные частицы, которые были визуализированы на поверхности эри-

троцитов [1], в том числе у пациенток с РШМ [28]. Установлено, например, что при раке поджелудочной железы эндогенные внеклеточные частицы, такие как, например, сывороточные экзосомы, содержат человеческую геномную ДНК [11].

Вопросом является происхождение ДНК, не содержащей искомым фрагментов, выделенной из плазмы и взвеси эритроцитов, обработанной трипсином. Не исключается, что ДНК, выделенная из плазмы, может быть инфекционного происхождения, так как у пациенток с РШМ часто встречаются положительные молекулярно-генетические тесты на присутствие других инфекций, например, передаваемых половым путем [2, 3, 7]. В цервикальном соскобе даже при отрицательных результатах детекции ДНК ВПЧ результаты тестов на ДНК герпесвирусов могут быть положительными [23], а ДНК герпесвирусов обнаруживается и в плазме [8].

Не исключается инфекционное происхождение и ДНК, выделенной из взвеси эритроцитов, обработанных трипсином. Возможно, ее обнаружение в этом образце указывает на присутствие на поверхности эритроцитов ДНК-содержащих иммунных комплексов. Установлено, что трипсин разрушает не все рецепторные связи, например, поверхностные клеточные рецепторы к IgG устойчивы к его воздействию [17], вероятно из-за того, что все-таки протеолитическая активность трипсина специфична [22].

Заключение. У пациентки с РШМ геномная ДНК была выделена и обнаружена в значительном количестве в плазме и эритроцитарной фракции, в том числе и после ее обработки трипсином. ДНК, содержащая фрагмент, кодирующий бета-глобин человека, при отсутствии ее детекции в плазме, была обнаружена в эритроцитарной фракции, вероятно в связанном состоянии с поверхностью эритроцитов посредством рецепторов. Вопрос принадлежности выделенной ДНК к опухолевой является дискуссионным, тем более что фрагмент ДНК, кодирующий белок L1 ВПЧ, ни в одной из фракций обнаружен не был. Происхождение выделенной ДНК должно быть изучено в будущем.

Литература

1. Исследование эритроцитов пациентки с хроническим мезангиопролиферативным

гломерулонефритом методом сканирующей электронной микроскопии / С.Н. Мамаева [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 3. – doi: 10.17513/spno.29910. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29910>.

The study of erythrocytes of the patient with chronic mesangial proliferative glomerulonephritis by scanning electron microscopy / S.N. Mamaeva [et al.] // Modern problems of Science and education. – 2020. – No. 3. – doi: 10.17513/spno.29910. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29910>

2. Abebe M. Prevalence of sexually transmitted infections among cervical cancer suspected women at University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital, North-west Ethiopia / M. Abebe, S. Eshetie, B. Tessema. BMC Infectious Diseases. – 2021. – No. 21. – <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06074-y>

3. Association of sexually transmitted infections and human papillomavirus co-infection with abnormal cervical cytology among women in Saudi Arabia / H.J. Alotaibi [et al.] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – No. 27(6). – P. 1587-1595. – doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.021>.

4. Characterization of adult α - and β -globin elevated by hydrogen peroxide in cervical cancer cells that play a cytoprotective role against oxidative insults / X. Li [et al.] // PLoS One. – 2013. – No. 8(1). – doi: 10.1371/journal.pone.0054342.

5. Cheng F., Su L., Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer / F. Cheng, L. Su, C. Qian // Oncotarget. – 2016. – No. 7(30). – P. 48832-48841. – doi: 10.18632/oncotarget.9453.

6. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis / Y. Gu [et al.] // PLoS One. – 2020. – No. 15(2). – doi: 10.1371/journal.pone.0224001.

7. Co-infection of human papillomavirus and other sexually transmitted bacteria in cervical cancer patients in the Philippines / O. A. Tantengco [et al.] // Gynecologic Oncology Report. – 2022. – No. 40. – doi: 10.1016/j.gore.2022.100943

8. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine? / D. Juhl // Transfusion Medicine. – 2010. – No. 20. – P. 38-47. – doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2009.00951.x>

9. Diagnostic, therapeutic predictive, and prognostic value of neutrophil extracellular traps in patients with gastric adenocarcinoma / Y. Zhang [et al.] // Frontier Oncology. – 2020. – No. 10. – doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01036>.

10. DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia / L. K. M. Lam [et al.] // Science Translational Medicine. – 2021. – No. 13(616). – doi: 10.1126/scitranslmed.abj1008.

11. DNA in extracellular vesicles: from evolution to its current application in health and disease / J. Ghanam [et al.] // Cell and Bioscience. – 2022. – No. 12. – Article number: 37. – <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00771-0>

12. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25 / L. Yang [et al.] // Nature. – 2020. – No. 583. – P. 133-138. – doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2394-6>.

13. Duggan N. M., Tang Z. I. The Formation of Heterochromatin / N. M. Duggan, Z. I. Tang // Nature Education. – 2010. No. 3(9). – URL: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-for->

mation-of-heterochromatin-and-rna-interference-14169031/ (Дата доступа 18 июля 2022 г.).

14. Expression of hemoglobin- α and β subunits in human vaginal epithelial cells and their functional significance / D. Saha [et al.] // PLoS One. – 2017. – No. 12(2). – doi: 10.1371/journal.pone.0171084.

15. Expression of β -globin by cancer cells promotes cell survival during blood-borne dissemination / Y. Zheng [et al.] // Nature Communications. – 2017. – No. 8. – doi: 10.1038/ncomms14344.

16. Extraction of DNA from Frozen Red Blood Cells / A.V. Buchanan [et al.] // Human Biology. – 1993. – No. 65(4). – P. 647-654. – doi: <http://www.jstor.org/stable/41465130>.

17. Fc-receptors for IgG and IgM immunoglobulins on human T lymphocytes: mode of re-expression after proteolysis or interaction with immune complexes / M. C. Mingari [et al.] // Journal of Immunology. – 1978. – No. 121(2). – P. 767-70.

18. Hardison R. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression / R. Hardison // Journal of Experimental Biology. – 1998. – No. 201(Pt 8). – P. 1099-1117. – doi: 10.1242/jeb.201.8.1099.

19. Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous? / D. Saha [et al.] // International Journal of Inflammation. – 2014. – No. 2014. – ID 803237. – doi: 10.1155/2014/803237.

20. Neutrophil extracellular traps associate with clinical stages in breast cancer / M. M. Rivera-Franco [et al.] // Pathology & Oncology Research. – 2020. – No. 26(3). – P. 1781-1785. – doi: <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00763-5>.

21. Neutrophil extracellular traps drive mitochondrial homeostasis in tumors to augment growth / H.O. Yazdani [et al.] // Cancer Research. – 2019. – No. 79(21). – P. 5626-5639. – doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0800>

22. Olsen J.V. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues / J. V. Olsen, S.-E. Ong, M. Mann // Technology. – 2004. – No. 3(6). – P. 608-614. – doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>

23. Prevalence of active infection by herpes simplex virus type 2 in patients with high-risk human papillomavirus infection: A cross-sectional study / M. Bahena-Román [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2020. – No. 92(8). – P. 1246-1252. – doi: 10.1002/jmv.25668.

24. Simple and Low-Cost Sampling of Cell-Free Nucleic Acids from Blood Plasma for Rapid and Sensitive Detection of Circulating Tumor DNA / C.E. Jin [et al.] // Advanced Science. – 2018. – No. 5. – doi: <https://doi.org/10.1002/advs.201800614>

25. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood / G. D. Sorenson [et al.] // Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention. – 1994. – № 3(1). P. 67-71.

26. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis / M.T. Masucci [et al.] // Frontier Immunology. – 2020. – No. 11. – doi: 10.3389/fimmu.2020.01749

27. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells / H.L. Huang [et al.] // Journal of Biomedical Science. – 2010. – No. 17. – doi: <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-36>

28. Using Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy to Study the Formation of Nanoparticles on Red Blood Cell Surface in Cervical Cancer Patients / S.N. Mamaeva [et al.] // International Journal of Biomedicine. – 2020. – No. 10(1). – P. 70-75. – doi: 10.21103/Article10(1)_OA12.