

osteoarthritic chondrocytes / Rheumatol. Int. 2018;386:1963–1974. doi: 10.1007/s00296-018-4103-4.

41. Nurgaliev Z.A., Shneider N.A., Trefilova V.V. [et al.]. The Frequency of Low Back Pain. Personal-ized Psychiatry and Neurology 2023;3(1):28–41. <https://doi.org/10.52667/2712-9179-2023-3-1-28-41>.

42. Li Y., Samartzis D., Campbell D.D. [et al.]. Two subtypes of intervertebral disc degeneration distinguished by large-scale population-based study. Spine J. 2016;(9):1079–89. doi: 10.1016/j.spinee.2016.04.020.

43. Harper E.G., Guo C., Rizzo H. [et al.]. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: Implica-

tions for psoriasis pathogenesis. J. Invest. Dermatol. 2009;129:2175–2183. doi: 10.1038/jid.2009.65.

44. Wang H., Ding W., Yang D. Different concentrations of 17 β -estradiol modulates apoptosis induced by interleukin-1 β in rat annulus fibrosus cells / Mol. Med. Rep. 2014;10:2745–2751. doi: 10.3892/mmr.2014.2514.

ТОЧКА ЗРЕНИЯ

И.В. Кононова, С.Н. Мамаева

СРАВНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И НА ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ У ПАЦИЕНТКИ С РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

DOI 10.25789/YMJ.2023.84.31

УДК 616-006.6

Для объяснения более продуктивного выделения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) из эритроцитарной фракции крови по сравнению с плазмой у пациенток с раком шейки матки, было изучено изображение венозной крови с помощью сканирующей электронной микроскопии. Выявлено, что количество наноразмерных биочастиц, среди которых предположительно могут быть несущие ДНК ВПЧ опухолевые внеклеточные везикулы, на поверхности эритроцитов больше, чем в плазме. Для подтверждения того, что эритроцитарная фракция крови является более продуктивным биологическим образцом для выделения ДНК ВПЧ нужно продолжение молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, скрининг, внеклеточные везикулы.

To explain the more productive isolation of HPV DNA from the blood component compared to plasma in cervical cancer patients, using scanning electron microscopy images of venous blood were studied. It was revealed that there are more nano-sized bioparticles on the erythrocytes surface than in plasma. It has been suggested that among nano-sized bioparticles there may be tumor extracellular vesicles carrying HPV DNA. To confirm that the erythrocyte fraction of blood is a more productive biological sample for isolating HPV DNA, continued molecular genetic studies are needed.

Keywords: human papillomavirus, screening, extracellular vesicles.

Несмотря на массово проводимый в России скрининг для профилактики рака шейки матки, смертность от него остаётся высокой и существенно не снижается. А в большинстве регионов Арктической зоны Российской Федерации (АЗРФ) смертность от рака шейки матки ещё выше, чем общероссийская, и также не имеет тренда к снижению [3]. На территориях АЗРФ имеются трудности в реализации государственных задач по повышению уровня жизни населения, обеспечению его качественными товарами и услугами.

Считается, что основными причинами являются климатические условия, размер территории, недостаточность или даже отсутствие транспортной инфраструктуры, значительная дисперсность населённых пунктов, низкая плотность населения, номадизм и т.д. [1]. Эти причины негативно влияют также на использование и эффективность традиционных методов скрининга патологии шейки матки у женщин, проживающих в Арктике. Поэтому существует острая необходимость в разработке простых, применимых в труднодоступных поселениях АЗРФ тестов, представляющих альтернативу традиционному скринингу патологии шейки матки. В этом плане выявление патологии шейки матки и рака шейки матки по анализу крови представляет, по нашему мнению, оптимальный выбор. Действительно, забор крови осуществляется легко, его можно провести на месте нахождения

пациентки, необходим один контейнер для крови, в то время как для традиционного скрининга забор биоматериала требует оснащённый кабинет акушера-гинеколога и большее количество расходных материалов – зеркало гинекологическое, цитощетка, стекла предметные, виала и т.д.

В текущее время в качестве ранних маркеров рака шейки матки исследователи предлагают использовать ряд особых характеристик крови, выявленных такими способами, как, например, измерение ширины эритроцитов (RDW) [14], дифференциальная сканирующая калориметрия [10], Рамановская спектроскопия [8] и т.д. Научные направления по поиску маркеров рака шейки матки в крови включают также исследования протеома, метаболома, транскриптома и генома [4,20].

По нашему мнению, особенно перспективны исследования по обнару-

КОНОНОВА Ирина Васильевна – к.м.н., в.н.с. ЯНЦ КМП, Якутск, irinakon.07@mail.ru, SPIN-код: 3282-7170, ORCID: 0000-0002-9243-6623; **МАМАЕВА Саргылана Николаевна** – к.ф.-м.н., доцент, зав. кафедрой ФТИ СВФУ им. М.К. Аммосова, sargylana_mamaeva@mail.ru.

жению в крови опухолевой ДНК в качестве раннего маркера рака шейки матки. Известно, что причиной рака шейки матки является вирус папилломы человека (ВПЧ), а выявленные в крови фрагменты ДНК ВПЧ можно отнести к опухолевой ДНК рака шейки матки [16]. Но циркулирующая в крови опухолевая ДНК сильно фрагментирована, ее концентрация может быть чрезвычайно низкой [12], период полураспада колеблется от 30 мин до 2 ч [6]. Это объясняет сложности и пока еще невысокую чувствительность тестов для выявления рака шейки матки, основанных на обнаружении циркулирующей в крови опухолевой ДНК.

В подавляющем большинстве исследований в качестве биологического образца для выделения опухолевой ДНК рака шейки матки используется плазма или сыворотка крови. Однако было показано, что фрагменты ДНК ВПЧ можно обнаружить в эритроцитарной фракции крови [2,18], и в этой фракции они обнаруживаются чаще, чем в плазме [18]. Сейчас мы предполагаем, что выделение опухолевой ДНК рака шейки матки из эритроцитарной фракции крови может быть более продуктивным, чем из цельной крови, плазмы и сыворотки.

Опухолевая ДНК, циркулирующая в крови, может быть карго внеклеточных везикул, секретируемых опухолевыми клетками [15]. Одним из методов изучения внеклеточных везикул является сканирующая электронная микроскопия [5,11]. С помощью сканирующей электронной микроскопии у пациенток с раком шейки матки на поверхности эритроцитов были визуализированы биологические наноразмерные частицы эндогенного происхождения [11], среди которых, вероятно, могут быть опухолевые внеклеточные везикулы.

Целью настоящего исследования явилось изучение изображений крови с использованием сканирующей электронной микроскопии у пациентки с раком шейки матки для сравнения количества наноразмерных частиц в плазме крови и на поверхности эритроцитов. Наличие большего количества наноразмерных частиц на поверхности эритроцитов, чем в плазме, пусть и опосредованно, может объяснить более продуктивное выделение ДНК ВПЧ из эритроцитарной фракции крови, чем из плазмы.

Материалы и методы. Мазки для получения изображений были сделаны из венозной крови пациентки Якутского республиканского онкологического диспансера с впервые

выявленным раком шейки матки. Пациентка дала письменное информированное согласие на проведение исследования. Венозная кровь была забрана утром, натощак, в вакуумный контейнер для крови, содержащий КЗ-ЭДТА. Капля полученной крови размазывалась тонким ровным слоем на чистое обезжиренное предметное стекло и высушивалась на воздухе при комнатной температуре в течение 24 ч. Изображения крови были получены с использованием сканирующего электронного микроскопа высокого разрешения JSM-7800F (JEOL, Япония) путем детектирования вторичных электронов нижним детектором при ускоряющем напряжении равном 1 кВ и фокусном расстоянии равном 4,2 мм. Стекло с мазками крови закреплялось с помощью углеродных скотчей. Увеличение изображения образцов крови составило от 500 до 20 000 раз.

Результаты и обсуждение. Была получена серия изображений венозной крови пациентки с раком шейки матки с увеличением от 500 до 20 000 раз. Отчетливая визуализация наноразмерных частиц стала возможной при увеличении от 5 000 раз (рис. 1). Площадь поверхности эритроцитов и площадь плазмы крови, находящейся между ними, на полученном изображении имеют примерно равные пропорции. Для наноразмерных частиц характерен белый цвет, изучение их

элементного состава в предыдущем исследовании показало содержание в них углерода, азота и кислорода, что подтвердило их органическое происхождение [11]. На рис. 1 некоторые из наноразмерных частиц отмечены белыми стрелками и видно, что на поверхности эритроцитов они встречаются значительно чаще, чем в плазме. Размеры частиц на изображениях составили примерно 70 нм (рис. 2), это значение входит в границы размеров внеклеточных везикул.

Внеклеточные везикулы секретируются почти всеми клетками млекопитающих, включая раковые, и между разными типами клеток наблюдается высокая разница в скорости их секреции. Внеклеточные везикулы ограничены билипидным наружным слоем, содержат широкий спектр биоактивных

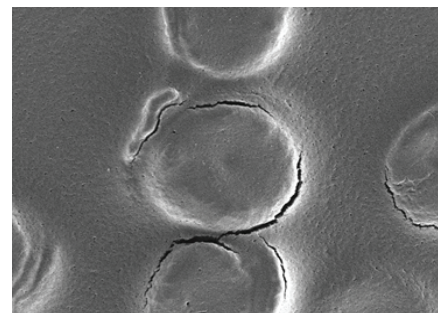


Рис. 1. СЭМ-изображение образца венозной крови пациентки с раком шейки матки при увеличении в 5 000 раз

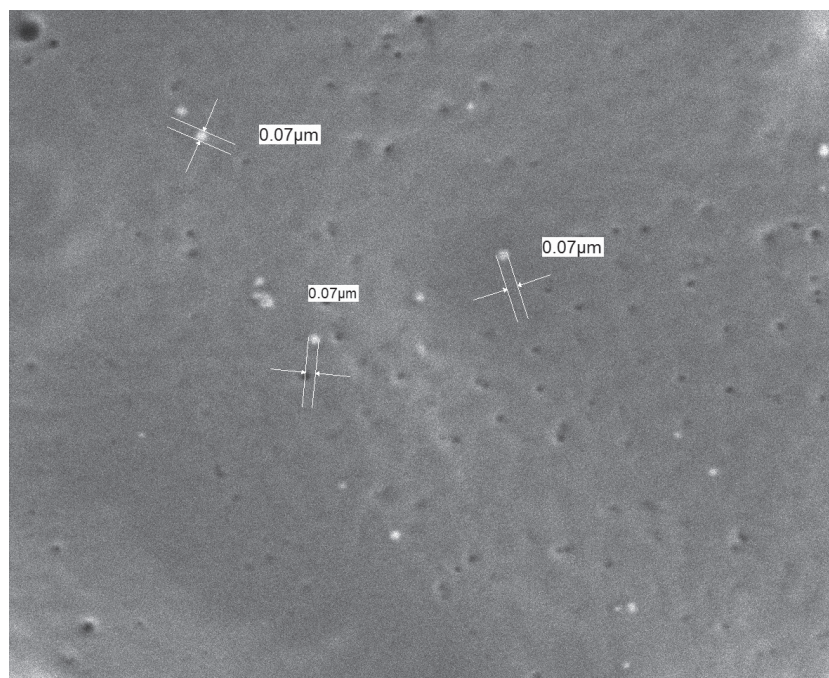


Рис. 2. СЭМ-изображение поверхности эритроцита венозной крови пациентки с раком шейки матки при увеличении в 20 000 раз

молекул, которые играют решающую роль в регулировании разнообразных естественных процессов в организме человека, а также в патологических процессах, таких как вирусное инфицирование, развитие рака и его метастазов [15].

Установлено, что встраивание ДНК во внеклеточные везикулы важно для поддержания клеточного гомеостаза, ингибирование их секреции приводит к накоплению ядерной ДНК в цитозоле, провоцируя фенотип, подобный старению, что приводит к остановке клеточного цикла и, в конечном итоге, к апоптозу. Секреция ДНК через внеклеточные везикулы защищает опухолевые клетки от воспалительной реакции. Предполагается, что более высокие концентрации ДНК связаны с более крупными размерами внеклеточных везикул, и большее количество ДНК содержится во внеклеточных везикулах опухолевых клеток по сравнению с нормальными. ДНК, включенная во внеклеточные везикулы опухолевых клеток, отражает их геном и защищена от нуклеаз [15].

Конечно, наблюдаемые на поверхности эритроцитов внеклеточные везикулы могут секретироваться самими эритроцитами и адгезироваться на их поверхности [9]. Но известно, что многие из рецепторов адгезии эритроцитов сходны с таковыми у других клеток [19]. Внутриклеточные везикулы также имеют рецепторы адгезии, с помощью которых они вступают во взаимодействие с клетками-реципиентами [13]. К тому же установлено, что липидные и белковые профили мембран эритроцитов у здоровых пациентов и онкологических пациентов различаются, и различия не связаны с особенностями питания пациентов [7, 17]. То есть не исключается возможность адгезии внеклеточных везикул, продуцируемых в том числе опухолевыми клетками на поверхности эритроцитов.

Заключение. Мы признаем, что выявленное нами на полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии изображениях венозной крови пациентки с раком шейки матки значительное преобладание количества наноразмерных частиц на поверхности эритроцитов по сравнению с плазмой крови не подтверждает напрямую, что эритроцитарная фракция крови является более про-

дуктивным биологическим образцом для выделения опухолевой ДНК рака шейки матки. Для установления этого нужны дальнейшие молекулярно-генетические исследования. Считаем необходимым отметить, что модификация сканирующего электронного микроскопа термополюсовым катодом Шоттки и сверхгибридным объективом при низких ускоряющих напряжениях позволила проводить исследования образцов крови без нанесения на них токопроводящего покрытия, которое искажает изображение поверхностей в нанометровом диапазоне. С использованием модификации была получена возможность визуализировать наноразмерные частицы в образцах крови, определить их расположение и размеры.

Литература

1. Гассий В.В., Постников А.В. Современные условия реализации политики социально-экономического развития арктических регионов России // Бизнес. Образование. Право. 2020. №2(51). С.31–36. DOI: 10.25683/VOLBI.2020.51.272.
2. Gassiy V. V., Postnikov A. V. Modern conditions for the implementation of the policy of socio-economic development of the Arctic regions of Russia. Business. Education. Law. 2020; 2(51): 31–36.
3. Обнаружение циркулирующей ДНК в безъядерных фракциях крови у пациентки с раком шейки матки / И.В. Кононова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2022. №2. С.86 DOI: 10.17513/spno.31543
4. Detection of circulating DNA in non-nuclear blood components in the patient with cervical cancer / Kononova I.V. [et al.] // Modern problems of science and education. 2022; 2: 86
5. Рак шейки матки в субъектах Арктической зоны России: сравнительный анализ заболеваемости и смертности в период с 2016 по 2020 гг. / И.В. Кононова [и др.] // Якутский медицинский журнал. 2022. № 2(78). С.85–88. DOI 10.25789/YMJ.2022.78.22
6. Cervical cancer in the regions of the Arctic zone of Russia: a comparative analysis of morbidity and mortality in the period from 2016 to 2020 / Kononova I.V. [et al.] // Yakut medical journal. 2022; 2(78): 85–88
7. A comprehensive analysis of metabolomics and transcriptomics in cervical cancer / Yang K. [et al.] // Science Reports. 2017; 7. e.43353. https://doi.org/10.1038/srep43353
8. A study of extracellular vesicles isolated from blood plasma conducted by low-voltage scanning electron microscopy / Kondratov K.A. [et al.] // Cell and Tissue Biology. 2017; 11: 181–190. https://doi.org/10.1134/S1990519X17030051
9. Adashek J.J., Janku F., Kurzrock R. Signed in blood: circulating tumor DNA in cancer diagnosis, treatment and screening // Cancers (Basel). 2021; 13(14). e.3600. doi: 10.3390/cancers13143600.

7. Altered red blood cell membrane fatty acid profile in cancer patients / Amézaga J. [et al.] // Nutrients. 2018; 10(12). e.1853. doi: 10.3390/nu10121853

8. Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer / Feng S [et al.] // Analyst. 2013; 138: 3967–3974 https://doi.org/10.1039/C3AN36890D

9. Characterization of microvesicles released from human red blood cells / Nguyen D.B. [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. 2016; 38(3): 1085–1099. https://doi.org/10.1159/000443059

10. Detection of cervical cancer biomarker patterns in blood plasma and urine by differential scanning calorimetry and mass spectrometry / Garbett N.C. [et al.] // PLOS ONE. 2014. №9(1): e84710. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084710

11. Determination of blood parameters using scanning electron microscopy as a prototype model for evaluating the effectiveness of radiation therapy for cervical cancer / Mamaeva S.N. [et al.] // International Journal of Biomedicine. 2021;11(1): 32–38. DOI: 10.21103/Article11(1)_OA6

12. Elazezy M., Joosse S.A. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management // Computational and Structural Biotechnology Journal. 2017; 16: 370–378. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.10.002.

13. Inhibition of $\alpha v \beta 3$ integrin impairs adhesion and uptake of tumor-derived small extracellular vesicles / Altey W.F. [et al.] // Cell Communication and Signaling. 2020; 18. e.158. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00630-w.

14. Li Y., Li Z., Zhang G. Clinical utility of red blood cell distribution width for the diagnosis and prognosis of cervical cancer // International Journal of Genetic Medicine. 2022; 15: 2597–2606. https://doi.org/10.2147/IJGM.S354569

15. Next-generation cancer biomarkers: extracellular vesicle DNA as a circulating surrogate of tumor DNA / Amintas S. [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021; 8: e.622048. doi: 10.3389/fcell.2020.622048.

16. Rapid and ultrasensitive detection of circulating human papillomavirus E7 cell-free DNA as a cervical cancer biomarker / Rungkamoltip P. [et al.] // Experimental Biology and Medicine. 2021; 246(6): 654–666. doi: 10.1177/1535370220978899.

17. Red blood cells protein profile is modified in breast cancer patients / Pereira-Veiga T. [et al.] // Molecular & Cellular Proteomics. 2022; 12: e.100435. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.

18. Simultaneous detection of the HPV L1 gene and the human β -globin gene in the blood components of cervical cancer patients living in Yakutia / Kononova I.V. [et al.] // International Journal of Biomedicine. 2022; 12(1): 109–114. DOI: 10.21103/Article12(1)_OA10

19. Telen M.J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease // Seminars in Hematology. 2000; 37(2): 130–142. doi: 10.1016/s0037-1963(00)90038-6. PMID: 10791882.

20. Understanding cervical cancer through proteomics / Martínez-Rodríguez F. [et al.] // Cells. 2021; 10(8): e.1854. https://doi.org/10.3390/cells10081854