

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ МЕТОДОМ ИММУНОФЛУОРСЕЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

С.Н. Мамаева¹, В.А. Алексеев², И.В. Кононова², Н.А. Николаева¹, Т.А. Крылова¹,
А.Н. Павлов¹, А.А. Габьшева¹, Г.В. Максимов³

¹ Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск

² Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

Во всем мире продолжает увеличиваться число больных с диагнозом рак шейки матки. Несмотря на интенсивное развитие методов диагностики и терапии, наблюдаются явления рецидивов в условиях отсутствия четкого объяснения их возникновения и метастазирования, усложняющего терапию и влияющего на выживаемость пациентов. В связи с этим существует необходимость разработки новых методов исследования для более детального изучения возникновения и развития заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, а также эффективности лечения и причин возникновения рецидивов.

В данной работе проводятся исследования наночастиц на поверхности эритроцитов, выявленные ранее авторами методом растровой электронной микроскопии, и приводятся результаты исследования образцов крови пациентов с раком шейки матки с представлением нового метода пробоподготовки и с использованием иммунофлуоресцентного анализа по их идентификации, проведенной на основе предположения о том, что эти наночастицы являются вирусными частицами.

В результате совместного использования методов иммунофлуоресцентного анализа и электронной микроскопии подтверждена гипотеза о вирусной природе наночастиц, локализованных на поверхности эритроцита у пациентов с раком шейки матки. С помощью данной методики установлено, что на цитоплазматической мембране эритроцитов находятся частицы вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что вирусы циркулируют в крови пациента, прикрепляются на поверхности эритроцитов и это, видимо, влияет на развитие рака шейки матки, его рецидивов и метастазирования.

Ключевые слова: иммунофлуоресцентный анализ, эритроциты, вирус папилломы человека 16, 18, рак шейки матки, растровый электронный микроскоп

DOI: 10.52775/1810-200X-2022-96-4-64-71

Введение

В настоящее время рак шейки матки (РШМ) является одним из наиболее распространенных заболеваний. Эпидемиологические и вирусологические исследования подтверждают, что 95 % всех плоскоклеточных

раков шейки матки содержат ДНК ВПЧ 16, 18. К концу 2020 г. по данным Международного агентства по изучению рака GLOBOCAN, РШМ входит в первую десятку раковых заболеваний по оценкам заболеваемости и смертности. В 2020 г. было зарегистрировано 604 127 новых

и 341 831 смертельных случаев РШМ, а к 2040 г. заболеваемость всеми видами рака возрастет более чем на 19 млн [1, 2].

Итак, несмотря на разработки новых комплексных мер и профилактики по борьбе с РШМ, методов ранней диагностики и высокотехнологичного лечения, ожидается еще больший рост заболеваемости РШМ. Кроме того, наблюдаются частое возникновение рецидивов РШМ после различных видов радикальной терапии, в том числе после лучевой терапии (ЛТ) на ранних стадиях развития заболевания, и явление метастазирования, усложняющее терапию и влияющее на выживаемость пациентов [3–8]. Отметим, что на данный момент не существует четкого объяснения рецидивов данного заболевания. В связи с этим существует необходимость разработки новых методов исследования для более детального изучения возникновения и развития заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, а также эффективности лечения и причин возникновения рецидивов.

Известно, что вирус папилломы типов 16 и 18 является причиной возникновения РШМ. Около 99,7 % его случаев вызвано персистирующей генитальной инфекцией, индуцированной вирусом папилломы человека высокого риска. Вирус обычно поражает кожно-слизистый эпителий и продуцирует вирусные частицы в зрелых эпителиальных клетках, а затем вызывает нарушение нормального контроля клеточного цикла и стимулирование неконтролируемого деления клеток, что приводит к накоплению генетических повреждений [9].

Согласно полученным ранее авторами результатам исследований морфологии эритроцитов образцов крови пациентов с РШМ методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) на поверхности эритроцитов были обнаружены наночастицы (НЧ), размеры которых были сопоставимы с размерами вируса папилломы человека 16 и 18 (ВПЧ16, 18) и других вирусов [10]. В связи с этим возникла необходимость идентификации этих НЧ – определения их природы, а также объяснения зависимости морфологии эритроцитов от ЛТ. Было предположено, что НЧ, локализованные на поверхности эритроцитов, до, в ходе и после ЛТ могут являться вирусами и везикулами [11]. Терминологически внеклеточные везикулы (с размерами от 30 до 2000 нм) делят на: микровезикулы/микрочастицы/экзосомы, образующиеся в результате выпячивания и отделения

плазматической мембраны от внешней стороны клеток; экзосомы, формирующиеся в результате высвобождения мультивезикулярных тел за счет отделения участков плазматической мембраны во внутреннюю часть клетки; апоптотические тела, высвобождаемые из клеток при их апоптотическом повреждении. Различные экстремальные стрессовые воздействия меняют выраженность, локализацию и структуру секретлируемых клетками везикул [12]. Известно, что внеклеточные везикулы включают в себя разнообразную группу связанных с липидами наночастиц, которые высвобождаются большинством типов клеток как в нормальных, так и в патологических состояниях [13]. Экзосомы вовлечены в ключевые процессы клеточной коммуникации [14], они были найдены во всех биологических жидкостях человеческого тела, таких как кровь [15], слюна [16], слезы [17] и т.д. Эти частицы достаточно малы и стабильны для проникновения в из различных тканей в биологические жидкости и клетки мишени.

Кроме того, ранее авторами была установлена зависимость количества, морфологии и размеров этих частиц в зависимости от этапов ЛТ. Возникновение большого количества НЧ во время ЛТ и их изменение (вплоть до полного исчезновения в конце лечения) в крови (и на эритроцитах, и в плазме), размеры которых определялись как непрерывные величины, в отличие от НЧ, которые обнаруживались до ЛТ (только на эритроцитах), размеры которых определялись как дискретные величины, могут рассматриваться как факторы реакции организма человека на воздействие ионизирующее излучение во время ЛТ. У некоторых пациентов (у пациентов с третьим и четвертым стадиями развития рака) наличие мембраносвязанных НЧ вероятно, обусловлено структурами на поверхности эритроцита, которые существовали еще до ЛТ. Вероятно, эти НЧ (частицы, которые сохраняют свое количество во время терапии) являются вирусами. И вирусы, сохраняющиеся в крови после терапии, и везикулы, локализованные на поверхности мембраны эритроцита, могут быть факторами возникновения рецидивов заболевания. Возможно, что возникновение большого количества везикул в крови во время ЛТ связано, в частности, с измененными свойствами мембран дисморфных эритроцитов [11].

В исследованиях Inci Fatih et al проводились исследования по выявлению вирусов в крови. Так были использованы методы атомной

силовой микроскопии, растровой сканирующей электронной микроскопии (РЭМ) и наноплазмонного обнаружения, с помощью которых можно было обнаруживать и количественно определять интактные вирусы иммунодефицита человека, не повреждая структуру и характеристики вирусов, включая их капсидную структуру [18]. В исследовании безопасности переливания доноров крови, их конкретных реципиентов и лиц, получавших компоненты крови и препараты для лечения гемофилии, были проведены исследования вероятности передачи вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши при переливании крови. Образцы сыворотки крови были протестированы методом иммунофлуоресцентного анализа на наличие антител к ядерному антигену, специфичный к клеткам, латентно инфицированным вирусом, однако передачи вирусной инфекции не было обнаружено, вероятно из-за низкой чувствительности использованного метода [19].

Обнаружение этих вирусов по-прежнему представляет собой значительные биологические и инженерные проблемы. Биологические проблемы возникают из-за присутствия множества подтипов вирусов, что затрудняет достижение повторяемой и надежной эффективности их обнаружения из клинических образцов без необходимости длительных этапов подготовки.

Таким образом, для подтверждения предположения авторов были необходимы исследования природы и состава НЧ эритроцитов с помощью биохимических методов, в частности иммунофлуоресцентным анализом (МФА). Задача данной работы заключалась в исследовании НЧ, локализованных на мембране эритроцита – предположительно ВПЧ 16, 18, до и после проведения ЛТ, у пациентов с РШМ. Результаты подобного исследования в дальнейшем позволят оценить иммунологическую роль таких эритроцитов при развитии заболевания.

Материал и методы исследования

В данном исследовании были использованы образцы венозной крови 17 пациентов Якутского республиканского онкологического диспансера с подтвержденным диагнозом РШМ, проходивших лучевую терапию. Исследование было проведено в соответствии с этическими принципами медицинских исследова-

ний с участием человека, принятыми 18-й Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации, Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г., и с поправками, внесенными 52-й Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь 2000 г. Было получено одобрение местного комитета по биомедицинской этике Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова (протокол № 13 от 4 апреля 2018 г., решение № 2). Все пациенты дали свое письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Для исследования поверхности эритроцитов методом РЭМ были подготовлены образцы венозной крови пациентов с РШМ в виде тонких слоев, равномерно нанесенных на сухое обезжиренное предметное стекло, которые высушивались в условиях комнатной температуры.

Для обнаружения наночастиц на поверхности эритроцитов методом МФА был разработан специальный протокол пробоподготовки эритроцитарной массы крови пациентов с диагнозом РШМ.

Пробоподготовка

Образцы крови, собранные в пробирки с ЭДТА, центрифугировали в течение 5 минут при 600g, затем сливали супернатант а осадок помещали в 15 мл центрифужную пробирку для дальнейшей промывки фосфатным буфером (PBS). Следует отметить, что мы старались брать в основном центральную часть осадка, не касаясь верхней границы фаз и дна пробирки, где концентрируются различные ядродержащие клетки и другие элементы крови.

После переноса эритроцитарной фракции общий объем суспензии доводился до 10 мл при помощи PBS, после чего образцы центрифугировали в течение 5 минут при 600g. Процедуру промывки фосфатным буфером повторяли 3–4 раза.

Клетки фиксировали 1 % раствором параформальдегида (PFA) в PBS. Для этого к отмытому осадку добавляли фиксирующий раствор, доводя общий объем до 10 мл и далее аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки несколько раз и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре.

Фиксирующий раствор удаляли центрифугированием при тех же условиях, а осадок промывали 2 раза раствором FACS (2 % телячьей сыворотки в PBS). На этом этапе образцы

были готовы к иммунофлуоресцентному анализу.

Иммунофлуоресцентный анализ

Данный метод широко используется в современной клеточной и молекулярной биологии и достаточно подробно описан во многих работах. В нашем случае суспензия фиксированного образца была разбавлена при помощи FACS раствора в соотношении 1:3 (250:750 мкл соответственно). 100 мкл разбавленного образца переносили в чистую пробирку типа эппендорф и аккуратно добавляли 1 мкл первичных антител с последующей инкубацией в течение ночи при +4°C. В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich).

После инкубации образец центрифугировали в течение 5 минут при 800g, сливали супернатант и промывали 3 раза раствором FACS, после промывки к образцу, растворенному в 500 мкл раствора FACS добавляли 2 мкл вторичных антител, которые были представлены козьими поликлональными антителами против H и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI). Сухие мазки были подготовлены после часовой инкубации образцов с антителами и визуализированы при помощи микроскопа AxioVert.A1 (Zeiss) с флуоресцентным фильтром FITC.

Сканирующая электронная микроскопия

В данной работе использовали РЭМ JEOL 7800 F с термополювым катодом Шоттки в режиме детектирования вторичных электронов с поверхности образцов для получения изображения поверхности эритроцитов крови пациентов с РШМ для подтверждения наличия на них НЧ на поверхности эритроцитов до и после ЛТ. Для этого готовились сухие мазки венозной крови, полученные у тех же 17 пациентов до проведения пробоподготовки для исследований методом МФА. Мазки исследовали при ускоряющем напряжении 1,3 кВ и фокусном расстоянии 4,0 мм с использованием системы Gentle Beam.

Результаты и обсуждение

В данной работе, параллельно были проведены исследования одних и тех же образцов цельной венозной крови пациентов с РШМ разными методами: 1) исследование морфологии эритроцитов сухих мазков методом РЭМ; 2) исследование эритроцитов методом МФА.

На рис. 1 представлены РЭМ-изображения поверхности эритроцитов сухого мазка крови пациентки с РШМ. На эритроцитах выявлены НЧ, размеры которых сопоставимы с размерами ВПЧ 16, 18.

На рис. 2 и 3 представлены изображения эритроцитов образцов крови – эритроцитарной массы крови, полученной на основе разработанного нами нового описанного выше протокола пробоподготовки пациентов с РШМ, до

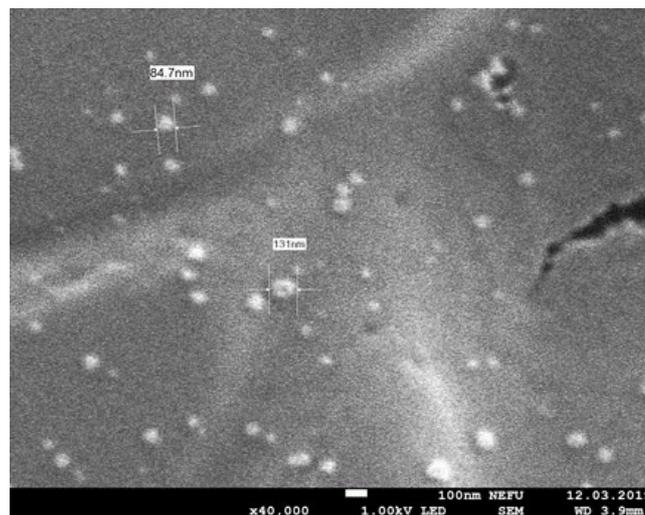
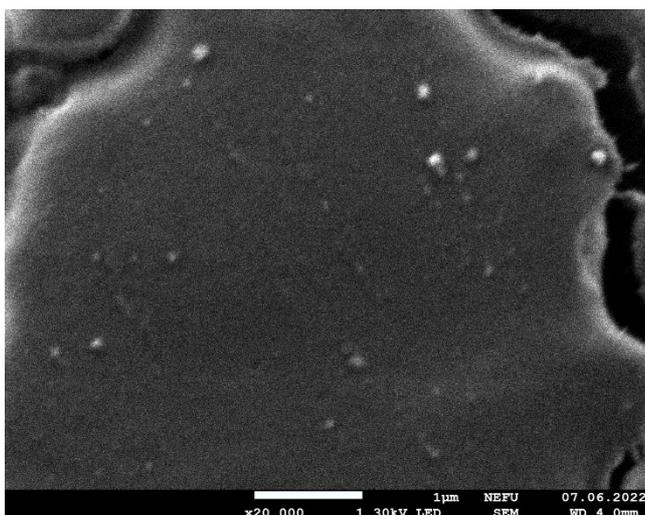


Рис. 1. РЭМ-изображение поверхности эритроцита: а) при 20000×; б) при 40000×

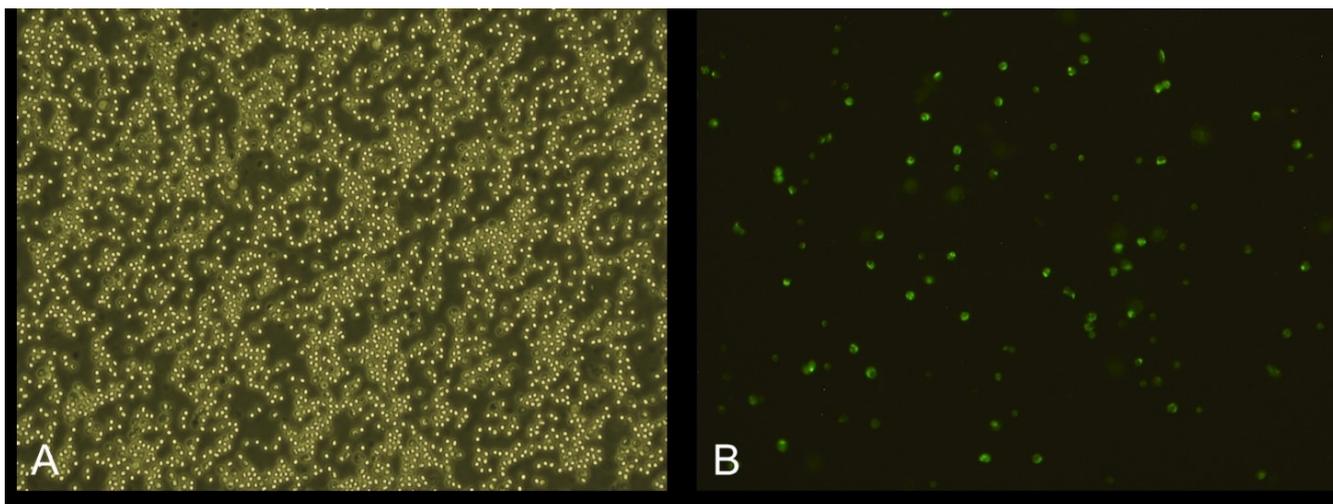


Рис. 2. Микрофотографии эритроцитов пациента с РШМ (200×) А) фазовый контраст; В) флуоресцентный режим

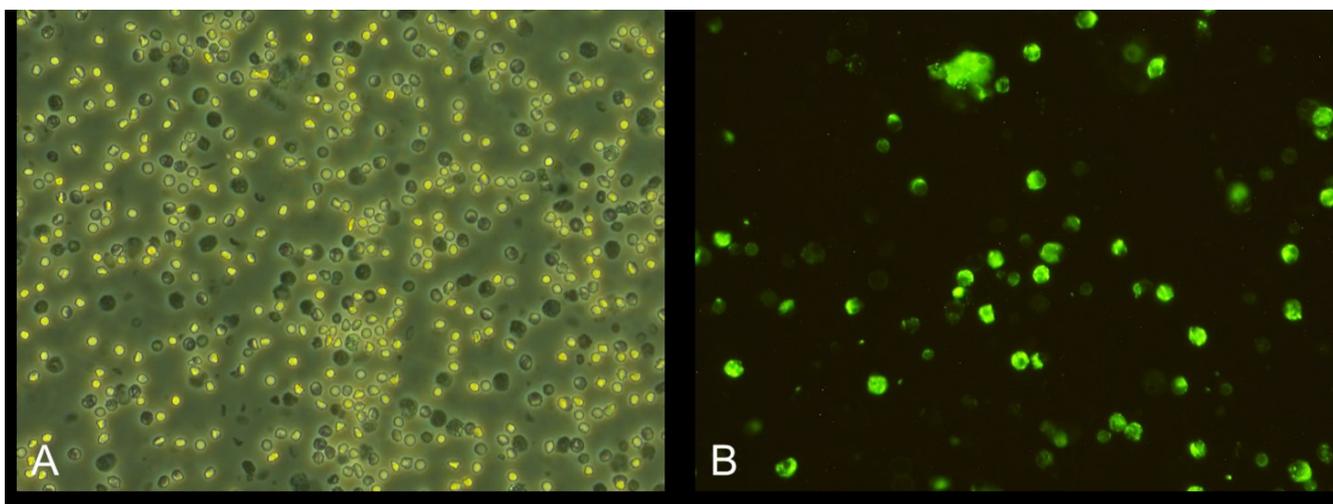


Рис. 3. Микрофотографии эритроцитов пациента с РШМ (400×) А) фазовый контраст; В) флуоресцентный режим

лучевой терапии. Эти изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа при различных увеличениях и условиях проведения микрофотографирования: с фазовым контрастом и при флуоресцентном режиме. На изображениях видны свечения на поверхности некоторых эритроцитов, тем самым подтверждаются предположения авторов о том, что наблюдаемые на РЭМ-изображениях наночастицы могут являться вирусными частицами.

Для обнаружения ядро-содержащих клеток образцы также были окрашены красителем Hoechst 33342, однако мы не обнаружили све-

тящихся ядер в ультрафиолетовом спектре, что также свидетельствует о том, что обнаруженные нами светящиеся элементы являются эритроцитами.

Кроме того, было выявлено, что свечение на поверхности эритроцитов наблюдается в образцах пациентов до и после ЛТ, т.е. эти частицы были и до проведения ЛТ и никак не связаны с воздействием ионизирующего излучения.

В наших предыдущих работах [10, 11], которые явились основополагающими для данного исследования необходимости дифференцировки НЧ на поверхности эритроцитов (опреде-

ления отличия НЧ как везикул и вирусов, которые наблюдаются на поверхности эритроцитов в виде НЧ) не хватало достаточных результатов исследований в пользу определения НЧ на поверхности эритроцитов как вирусов. И результаты данного исследования являются тем самым необходимым звеном в определении этих НЧ как вирусов.

Кроме того, другой группой исследователей было показано, что поверхностные рецепторы и лиганды экзосом ответственны за распределение и прикрепление экзосом к клеткам мишеням и внеклеточному матриксу [20, 21]. Как следствие, экзосомы циркулирующие в крови и прикрепляемые к форменным элементам крови, не подвергаются немедленному слиянию с клеткой, а остаются на какое-то время экзосомами, прикрепленными к поверхности клетки. Роль циркулирующих экзосом, прикрепленных к поверхности эритроцитов, в распространении опухоли остается неясной, однако были получены убедительные доказательства того, что РНК и белки входящие в состав таких частиц, могут играть важную роль в диагностике раковых заболеваний [22, 23].

Размеры вириона вируса папилломы человека составляют около 55 нм. Такие размеры нами были определены для наночастиц на поверхности эритроцитов методом РЭМ. Факт того, что наночастицы сходных размеров могут быть обнаружены в крови [24] и то, что в крови были обнаружены участки ДНК РШМ [25] может свидетельствовать о том, что часть из этих везикул могут являться вирусами.

Таким образом, основываясь на результаты данной работы и других исследователей можно утверждать, что вирус папилломы человека может прикрепляться и транспортироваться на поверхности эритроцитов, влияя на их морфологию, биофизические свойства, и, возможно, играть определяющую роль в развитии заболевания, иметь влияние на результаты терапии и рецидивов заболевания.

Также в последнее время были получены существенные доказательства, свидетельствующие о том, что ВПЧ может играть определенную роль в развитии рака молочной железы (РМЖ). Однако данные, связывающие РМЖ с хронической ВПЧ-инфекцией, были противоречивыми, что привело к отсутствию консенсуса [26, 27].

Поэтому в дальнейшем нами планируется проведение исследования эритроцитов крови пациентов с РМЖ, используя разработанные

нами методы исследования эритроцитов для РШМ.

Кроме того, на основе данного и последующего исследований может быть выявлена роль эритроцитов в возникновении различных видов заболеваний, в том числе и заболеваний почек. Действительно, с помощью РЭМ нами были выявлены наночастицы на поверхности эритроцитов сухих мазков крови пациентов с заболеваниями почек по размеру сопоставимые с размерами вирусов, таких как ЦМВ, герпес-вирус.

Заключение

В результате комплексного подхода и совместного использования методов иммунофлуоресцентного анализа и электронной микроскопии подтверждена гипотеза о вирусной природе наночастиц, локализованных на поверхности эритроцита у пациентов с раком шейки матки. С помощью данной методики установлено, что на цитоплазматической мембране эритроцитов находятся частицы вируса папилломы человека 16 и 18. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что вирусы циркулируют в крови пациента, адсорбируются на поверхности эритроцитов, и это влияет на этиологию и развитие некоторых вирусных заболеваний, в первую очередь онкологических заболеваний и их рецидивов.

Полученную методику можно рассматривать как новый подход в разработке системной нанобиотехнологии для биомедицины (в профилактике, диагностике, мониторинге терапии рака шейки матки и проведении прогностических исследований пациентов с раком шейки матки). Данная методика также может быть использована в исследовании и диагностике других видов вирусных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта № FSRG-2021-0014 "Разработка и внедрение новых комплексных подходов исследования актуальных задач медицины, сельского хозяйства, промышленности, в том числе, обработки драгоценных камней, а также палеонтологии, биологии, вирусологии с применением методов спектроскопии, микроскопии и радиационных технологий", а также Эндаумент Фонда СВФУ им. М.К. Аммосова.

Список литературы

1. <https://www.miskawaanhealth.com/cancer/global-cancer-statistics/>.
2. <https://gco.iarc.fr/today/home>.
3. Лушникова ПА, Сухих ЕС, Ижевский ПВ и др. Современные методы лучевой терапии рака шейки матки. Креативная хирургия и онкология. 2021; 11(1): 58-67. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2021-11-1-58-67>.
4. Tazhibayeva KN, Sadykova AD, Tasboltaeva DT, et al. Ways to improve the diagnostics and detection of cervical cancer development and recurrence risk. *Oncology and Radiology of Kazakhstan*, 2021; (4(62)): 24-7. DOI: 10.52532/2663-4864-2021-4-62-24-27
5. Шакирова ЭЖ, Зидиханов ДИ. Спасительная (salvage) гистерэктомия после лучевой терапии рака шейки матки: обзор литературы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2021; 17(3):121-7. DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-3-121-127.
6. Крейнина ЮМ, Шевченко ЛН, Каскулова МХ и др. Актуальные технологии конформной лучевой терапии в современных программах лечения рецидивов рака шейки матки, тела матки и яичников. Онкогинекология. 2020; 2(34): 60-70. DOI: 10.52313/22278710-2020-2-60.
7. Мансурова ГБ, Саидова КА, Разаков АР и др. Анализ факторов влияющих на рецидивирование рака шейки матки. Клиническая и экспериментальная онкология. 2018; 1(3): 15-8.
8. Шумейкина АО, Вавилов КВ, Самойлова ЕА и др. Возможности применения стереотаксической лучевой терапии для лечения рецидивов рака шейки матки (РШМ). Материалы VIII Петербургского международного онкологического форума "Белые ночи 2022". Опухоли женской половой системы: лучевая терапия. Вопросы онкологии. Приложение. 2022; 68(3): 231-2.
9. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol*. 2020; 40(5): 602-8.
10. Mamaeva SN, Kononova IV, Ruzhansky M, et al. Using Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy to Study the Formation of Nanoparticles on Red Blood Cell Surface in Cervical Cancer Patients. *Int J Biomed*. 2020; 10(1): 70-5. DOI: 10.21103/Article10(1)_OA12.
11. Mamaeva SN, Kononova IV, Alekseev VA, et al. Determination of blood parameters obtained under SEM as a prototype model for evaluating the effectiveness of radiation therapy for cervical cancer. *Int J Biomed*. 2021; 11(1): 32-8; DOI: 10.21103/Article11(1)_OA6.
12. Шендеров БА, Сеница АВ, Захарченко ММ, Ткаченко ЕИ. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020; 179(7): 118-30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg179-7-118-130].
13. Fahrman JF, et al. Plasma-derived extracellular vesicles convey protein signatures that reflect pathophysiology in lung and pancreatic adenocarcinomas. *Cancers*. 2020; 12(5): 1147.
14. Lawson J, Dickman C, Towle R. et al. Extracellular vesicle secretion of miR 142 3p from lung adenocarcinoma cells induces tumor promoting changes in the stroma through cell cell communication. *Molecular carcinogenesis*. 2019; 58(3): 376-87.
15. Zhang W, Ou X, Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int J Oncol*. 2019; 54(5): 1719-33.
16. Xiao H, Wong DTW. Proteomic analysis of microvesicles in human saliva by gel electrophoresis with liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 723: 61-7.
17. Tamkovich S, Grigoreva A, Eremina A, et al. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? *Clinica Chimica Acta*. 2019; 495: 529-37.
18. Operskalski EA, Busch MP, Mosley JW, et al. Blood donations and viruses. *Lancet*. 1997; 349(9061): 1327.
19. Inci F, Tokel O, Wang SQ, et al. Nanoplasmonic quantitative detection of intact viruses from unprocessed whole blood. *ACS nano*. 2013; 7(6): 4733-45.
20. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*. 2019; 21(1): 9-17.
21. Tamkovich SN, Yunusova NV, Tugutova E, et al. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and ovarian cancer patients. *Asian*

- Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP. 2019; 20(1): 255.
22. Tamkovich SN., Bakakina YS, Tutanov OS, et al. Proteome analysis of circulating exosomes in health and breast cancer. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2017; 43(2): 126-34.
23. Tamkovich S, Tutanov O, Efimenko A, et al. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. Current Molecular Medicine. 2019; 19(4): 273-85.
24. Zhang W, Ou X, Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. Int J Oncol. 2019; 54(5): 1719-33.
25. Tutanov O, Shtam T, Grigor'eva A, et al. Blood Plasma Exosomes Contain Circulating DNA in Their Crown. Diagnostics. 2022; 12(4): 854.
26. Wang T, Chang P, Wang L, et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. Medical Oncology. 2012; 29(1): 48-55.
27. Islam MS, Chakraborty B, Panda CK. Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. Ann Translat Med. 2020; 8(10).

EXAMINATION OF THE SURFACE OF ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER BY IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS

S.N. Mamaeva¹, V.A. Alekseev², I.V. Kononova², N.A. Nikolaeva¹, T.A. Krylova¹,
A.N. Pavlov¹, A.A. Gabysheva¹, G.V. Maksimov³

¹ M.K. Ammosov North Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

² Yakutsk Scientific Center of Complex medical Problems, Yakutsk, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The number of patients diagnosed with cervical cancer continues to increase all over the world. Despite the intensive development of diagnostic and therapy methods, the phenomenon of relapses in the absence of a clear explanation for their occurrence, and of metastasis are observed, which complicates treatment and affects the survival of patients. In this regard, there is a need to develop new research methods for a more detailed study of the occurrence and development of the disease at the molecular and cellular levels, as well as the effectiveness of treatment and the causes of relapses.

In this paper, nanoparticles are studied on the surface of red blood cells, which were revealed by the authors using scanning electron microscopy previously, and results of the study of blood samples of patients with cervical cancer using a new sample preparation method and immunofluorescence analysis for their identification are presented on the basis of the assumption that these nanoparticles are viral particles.

With the combination of immunofluorescence and electron microscopy methods, we were able to confirm our hypothesis of the viral nature of nanoparticles attached to the surface of red blood cells of patients diagnosed with cervical cancer. With this approach, it was found that the particles of human papillomavirus 16 and 18 are located on the cytoplasmic membrane of red blood cells. The results of this study indicate that viruses circulate in the patient's blood, and are attached to the surface of red blood cells. This apparently affects the development of cervical cancer, its relapse, and metastasis.

Key words: *immunofluorescence analysis, erythrocytes, HPV 16, 18, cervical cancer, scanning electron microscope*

E-mail: sargylana_mamaeva@mail.ru