

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗАМИ РАК ШЕЙКИ МАТКИ И РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

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

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

² Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск

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

EXAMINATION OF ERYTHROCYTES OF PATIENTS DIAGNOSED WITH CERVICAL CANCER AND BREAST CANCER DURING RADIATION THERAPY

T.A. Krylova¹, S.N. Mamaeva¹, V.A. Alexeev², I.V. Kononova², G.V. Maximov³

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

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

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Реферат

Цель: Разработка новых подходов в исследовании вирусных частиц в крови при патологии (рак шейки матки (РШМ) и рак молочной железы (РМЖ)) с применением растровой электронной микроскопии (РЭМ) и иммунофлуоресцентного анализа (МФА): изучение морфологии эритроцитов и наличия наноразмерных структур (НРС) на поверхности эритроцитов во время проведения лучевой терапии (ЛТ), а также определение состава НРС.

Материал и методы: В данной работе были исследованы образцы венозной крови пациентов с диагнозом РШМ и РМЖ до, во время и после проведения ЛТ на линейном ускорителе электронов (суммарная доза 48–50 Гр). Методами исследования являлись МФА и РЭМ.

Результаты: Методом МФА до и после ЛТ на мембране эритроцитов были обнаружены использованные в работе мышинные моноклональные антитела против белков вируса папилломы человека (ВПЧ) типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 и козы поликлональные антитела против Н и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированные с флуоресцеином, что свидетельствовало о прикреплении вирусных частиц (ВПЧ и везикулы) к поверхности эритроцитов.

Заключение: Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что вирусные частицы циркулируют в крови пациентов с диагнозами РШМ и РМЖ путем адсорбции на поверхности эритроцитов. Возможно, что это может влиять на этиологию и развитие заболевания, его рецидивов и явления метастазирования. В ходе исследования было выявлено изменение количества вирусных частиц в крови в ходе ЛТ, что может быть использовано в качестве параметра для оценки эффективности ЛТ.

Ключевые слова: эритроциты, рак шейки матки, рак молочной железы, вирус папилломы человека, лучевая терапия, растровая электронная микроскопия, иммунофлуоресцентный анализ

Abstract

Purpose: To develop new approaches in the study of viral particles in the blood in pathology (cervical cancer (CC) and breast cancer (BC)) and its therapy using scanning electron microscopy (SEM) and immunofluorescence analysis: to study the morphology of erythrocytes and the presence of nanoscale structures (NSS) on the surface of erythrocytes during radiation therapy (RT), as well as to determine the composition of NSS.

Material and methods: In this work, venous blood samples from patients diagnosed with CC and BC were examined before, during and after RT. RT was performed on a linear electron accelerator (a total dose of 48–50 Gy). The research methods were SEM and immunofluorescence analysis.

Results: Using the immunofluorescence analysis before and after RT, murine monoclonal antibodies against human papillomavirus (HPV) proteins of types 1, 6, 11, 16, 18, and 31 and goat polyclonal antibodies against the H and L chains of murine immunoglobulins conjugated with fluorescein were detected on the erythrocyte membrane, which indicated the attachment of viral particles (HPV and vesicles) to the surface of erythrocytes.

Conclusion: The results of this study indicate that viral particles circulate in the blood of patients diagnosed with CC and BC by adsorption on the surface of erythrocytes. It is possible that this may affect the etiology and development of the disease, its recurrence and the phenomenon of metastasis. The study revealed a change in the number of viral particles in the blood during RT, which can be used as a parameter for evaluating the effectiveness of RT.

Key words: erythrocytes, cervical cancer, breast cancer, human papillomavirus, radiation therapy, scanning electron microscopy, immunofluorescence analysis

E-mail: tanyakryl9898@mail.ru

<https://doi.org/10.52775/1810-200X-2025-105-1-39-45>

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) и рак шейки матки (РШМ) являются двумя наиболее распространенными видами раковых заболеваний у женщин.

РМЖ стал наиболее распространенным диагностируемым раком во всем мире. РШМ является четвертым по распространенности видом рака у женщин после РМЖ, колоректального рака и рака легких и ежегодно становится причиной 600 тыс. новых случаев и 340 тыс. смертей [1–3].

Несмотря на внедрение новых комплексных мер диагностики, профилактики и лечения РШМ и РМЖ, прогнозируется дальнейший рост этих заболеваний. Кроме того, наблюдается частое появление рецидивов РШМ и РМЖ после различных видов радикального лечения, включая лучевую терапию (ЛТ) на ранних этапах болезни, что усложняет терапию и оказывает отрицательное влияние на выживаемость пациентов. Стоит отметить, что на данный момент нет ясного объяснения причин рецидивов. Поэтому необходимо разработать новые подходы в исследовании механизмов возникновения и развития заболеваний на молекулярном и клеточном уровнях, а также в оценке эффективности лечения и выявления причин рецидивов [4–9].

Известно, что более 99 % случаев РШМ вызваны инфекцией – вирусом папилломы человека (ВПЧ). Важно отметить, что на сегодняшний день, прямая связь РМЖ с ВПЧ оста-

ется предметом дискуссий и исследований. Хотя рак груди обычно не считается связанным с ВПЧ, существуют исследования, продемонстрировавшие наличие ДНК ВПЧ в тканях РМЖ. Распространенность ВПЧ в этих исследованиях, как было показано, колеблется от 4 до 42 %, причем ВПЧ типа 16 является часто обнаруживаемым [10–14].

В ходе предыдущих исследований морфологии эритроцитов, проведенных авторами с использованием метода растровой электронной микроскопии (РЭМ), были выявлены наноразмерные структуры (НРС) на поверхности эритроцитов у пациентов с РШМ. Размеры этих НРС сопоставимы с размерами ВПЧ типов 16 и 18, а также с размерами везикул [15]. Открытие этого явления вызвало необходимость в более глубоком исследовании природы этих НРС (вирусных частиц – вирусов и везикул) и в анализе их влияния на морфологические изменения эритроцитов в процессе ЛТ.

Предполагается, что НРС, находящиеся на поверхности эритроцитов до, во время и после ЛТ, могут представлять собой вирусы или везикулы [16].

Ранее авторами было установлено, что количество, формы и размеры этих частиц изменяются в зависимости от этапов ЛТ. Увеличение числа НРС во время лечения и его изменение (вплоть до полного исчезновения в конце терапии) как в крови, так и на эритроцитах, подчеркивают реакцию организма на ионизирующее излучение (ИИ) во время ЛТ. Вероятно, эти НРС (частицы, количество которых сохра-

няется в процессе терапии) представляют собой вирусы. Как вирусы, остающиеся в крови после лечения, так и везикулы на поверхности мембраны эритроцитов могут способствовать возникновению рецидивов заболевания. Интересно, что увеличение числа везикул в крови во время ЛТ может быть связано с изменением свойств мембран дисморфных эритроцитов, а также более интенсивным выделением раковыми клетками везикул под воздействием ИИ во время ЛТ [16].

На основе этих предположений была выдвинута гипотеза о том, что вирусные частицы ВПЧ могут прикрепляться на цитоплазматической мембране эритроцитов, обеспечивая их циркуляцию в организме у людей с РШМ и РМЖ.

В данной работе используется метод иммунофлуоресцентного анализа (МФА) для исследования НРС, локализованных на мембране эритроцита – предположительно ВПЧ типов 16, 18, до и после проведения ЛТ. Это позволит не только подтвердить или опровергнуть гипотезу о возможном прикреплении вирусных частиц к эритроцитам, но и открыть новые перспективы в понимании механизмов развития и рецидива РШМ и РМЖ.

Материал и методы

В данной работе методами МФА и РЭМ были исследованы образцы венозной крови пациентов радиотерапевтического отделения Якутского республиканского онкологического диспансера с подтвержденным диагнозом РШМ и РМЖ до, во время и после проведения ЛТ. ЛТ проводилась на линейном ускорителе электронов (суммарная доза 48–50 Гр). Все пациенты дали свое письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Для изучения поверхности эритроцитов с использованием метода РЭМ были приготовлены образцы венозной крови пациентов в виде тонких слоев, равномерно распределенных на сухом обезжиренном предметном стекле, высушенных при комнатной температуре. Образцы были исследованы на РЭМ JSM-7800F фирмы JEOL с термополюсовым эмиссионным катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой при ускоряющем напряжении 1–1,5 кВ и рабочем расстоянии 3,9–4,5 мм.

Для обнаружения НРС на поверхности эритроцитов методом МФА был разработан

специальный протокол пробоподготовки эритроцитарной массы крови пациентов с диагнозами РШМ и РМЖ с учетом необходимости сохранения адсорбированных НРС на поверхности эритроцитов. В исследовании используется непрямой иммунофлуоресцентный анализ. В качестве первичных антител были использованы мышиные моноклональные антитела против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 МАВ837 (Sigma-Aldrich), в качестве вторичных антител – козы поликлональные антитела против Н и L цепей мышиных 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, а также системой цифровой визуализации Logos Celena S.

Результаты и обсуждение

В качестве примера на рис. 1 представлены РЭМ изображения поверхности эритроцитов сухого мазка крови пациента с диагнозом РШМ до ЛТ: на поверхности эритроцитов наблюдаются НРС.

На рис. 2 представлены изображения эритроцитов образца крови того же пациента с диагнозом РШМ, которые были получены в соответствии с нашим специально разработанным протоколом пробоподготовки. На представленных изображениях наблюдаются характерные свечения на поверхности отдельных эритроцитов, что служит дополнительным подтверждением гипотезы авторов о том, что НРС, наблюдаемые на РЭМ изображениях, могут представлять собой вирусные частицы.

На рис. 3 представлены РЭМ-изображения поверхности эритроцитов сухого мазка крови пациента с диагнозом РМЖ до (а) и во время (б) ЛТ. На основе представленных снимков можно сделать вывод, что НРС продолжают обнаруживаться на поверхности эритроцитов и после проведения ЛТ.

Изображения, полученные методом МФА, для образца крови пациента с диагнозом РМЖ, представлены на рис. 4. На этих изображениях также наблюдается характерное свечение некоторых эритроцитов, что может говорить о наличии вирусных частиц в крови пациентов с диагнозом РМЖ.

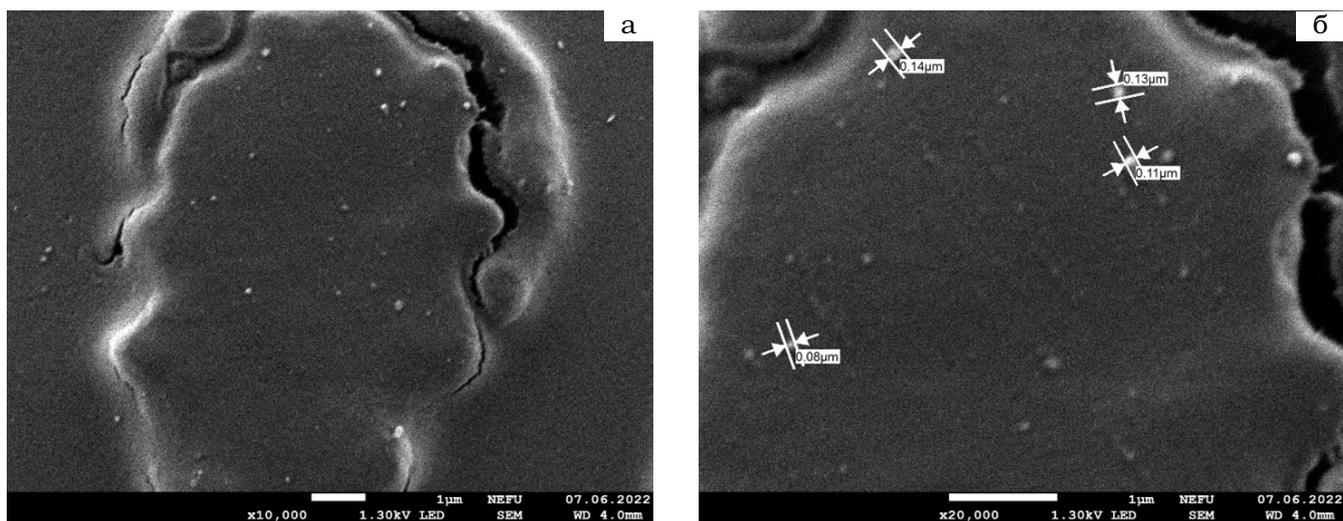


Рис. 1. а – эритроцит при увеличении 10000х; б – НРС на поверхности эритроцита при увеличении 20000х с указанием их размеров

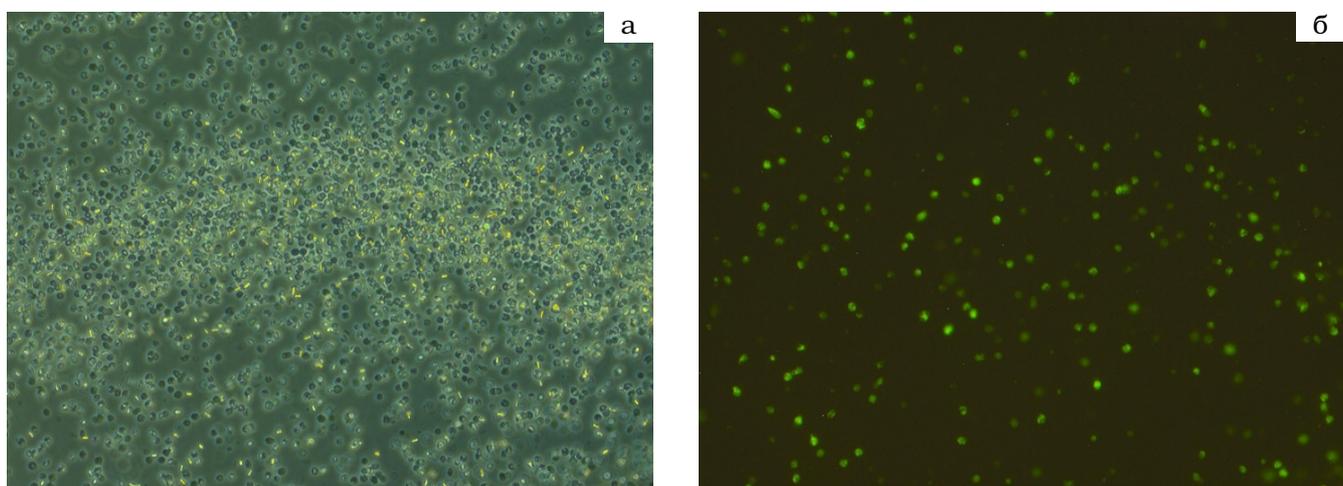


Рис. 2. Снимки мазков крови пациента с диагнозом РПМ: а – фазовый контраст; б – флуоресцентный режим

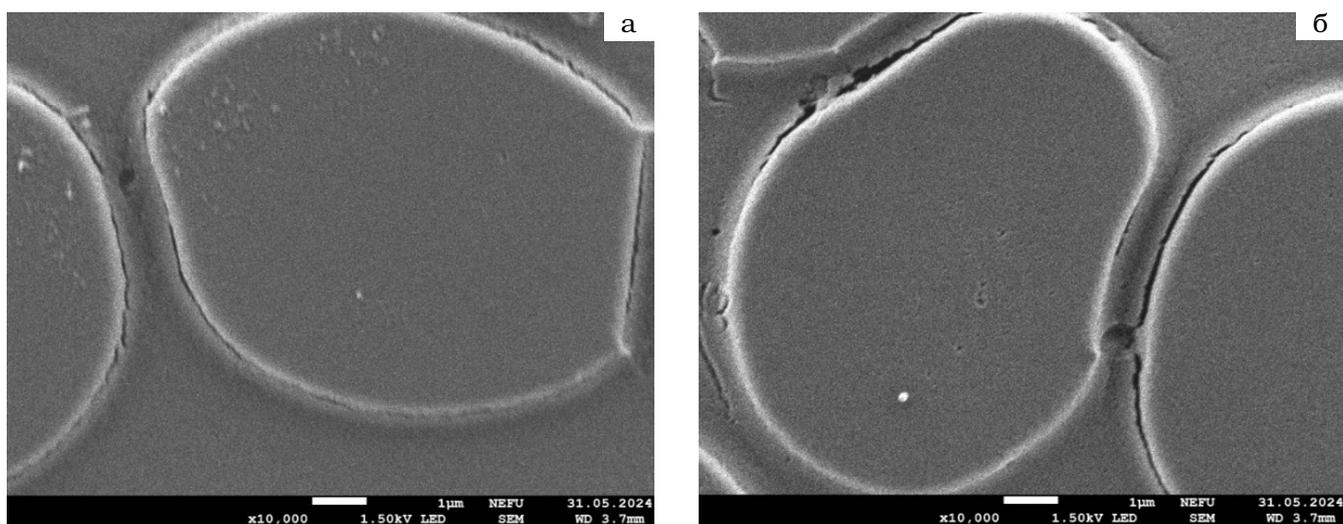


Рис. 3. РЭМ-изображения пациента с диагнозом РМЖ: а – до лучевой терапии; б – во время лучевой терапии

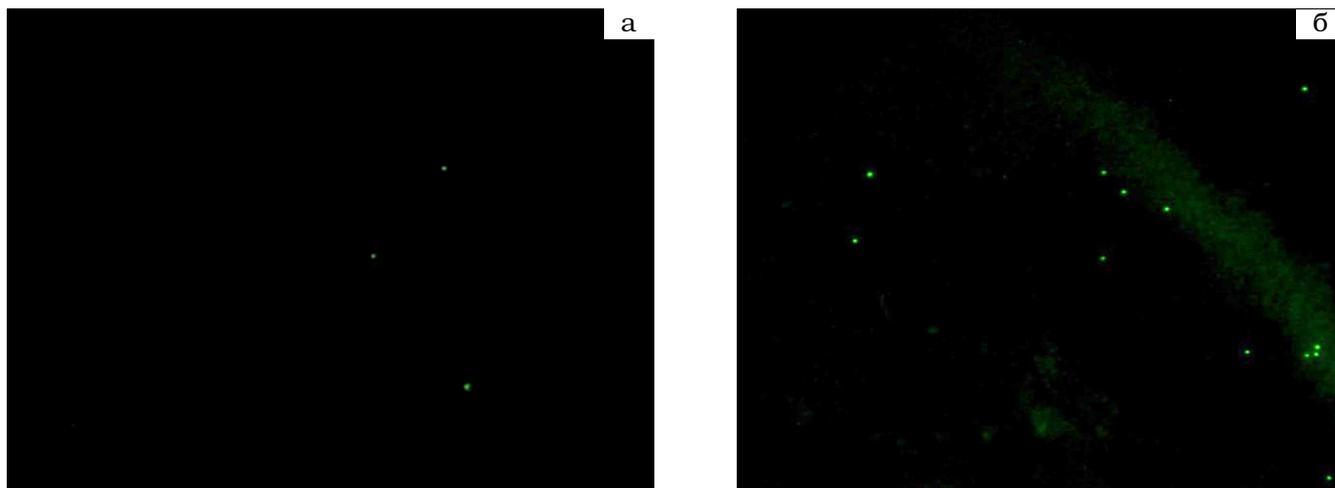


Рис. 4. Снимки мазков крови пациента с диагнозом РМЖ: а – до лучевой терапии; б – во время лучевой терапии

В результате исследования образцов эритроцитарной массы венозной крови методом МФА была показана адсорбция вирусных частиц на поверхности эритроцитов в патологии (РШМ, РМЖ) и во время ЛТ в организме человека. Известны работы, в которых было обнаружено явление прикрепления вирусов на поверхности эритроцитов вне организма человека. Это взаимодействие между клетками и вирусными частицами может оказывать значительное влияние на морфологические и биофизические характеристики клеток, а также, возможно, играть ключевую роль в патогенезе заболевания, влиять на эффективность лечения и способствовать возникновению рецидивов.

Также было проведено исследование состава НРС другим методом. Для проведения элементного анализа НРС на поверхности эритроцитов и в плазме крови использовали дополнительный модуль РЭМ – систему энергодисперсионного микроанализа Oxford INCA Energy 350. Принцип работы микроанализатора заключается в возбуждении атомов анализируемого вещества электронным пучком (зондом) высокой энергии с одновременной регистрацией характеристического рентгеновского излучения атомов, входящих в состав этого вещества. Для анализа состава НРС использовали ускоряющее напряжение 3–4 кВ. В результате исследования определили состав 13 НРС в одном образце крови пациента с диагнозом РШМ до и после лучевой терапии. Например, на рис. 5 представлены область наведения электронного пучка – одна из НРС (а) и ее элементный состав (б).

На рис. 5в представлена гистограмма, показывающая средний элементный состав этих структур в процентах. Данные показывают, что в состав НРС входят углерод (С), азот (N), кислород (O) и фтор (F), которые также входят в состав белков капсидов вирусов [17–24].

Заключение

В результате комплексного исследования была подтверждена гипотеза о вирусной природе НРС, выявленных на поверхности эритроцитов у пациентов с диагнозами РШМ и РМЖ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что вирусные частицы адсорбируются на поверхности эритроцитов, что может существенно влиять на этиологию и развитие онкологических заболеваний, ассоциированных с ВПЧ, а также на их рецидивы.

Разработанный подход открывает новые возможности в области онкологии для профилактики, диагностики и мониторинга лечения РШМ и РМЖ, а также для проведения прогностических исследований у пациентов с этим заболеванием. Более того, данный метод может быть адаптирован для изучения и диагностики других вирусных заболеваний.

Результаты, полученные с помощью РЭМ, свидетельствуют, что у пациентов с РШМ и РМЖ наблюдаются изменения в количестве НРС, обнаруженных на поверхности эритроцитов на разных этапах ЛТ. После окончания ЛТ НРС полностью не исчезают, а продолжают сохраняться на поверхности эритроцитов. Наблюдаемые изменения могут служить основой

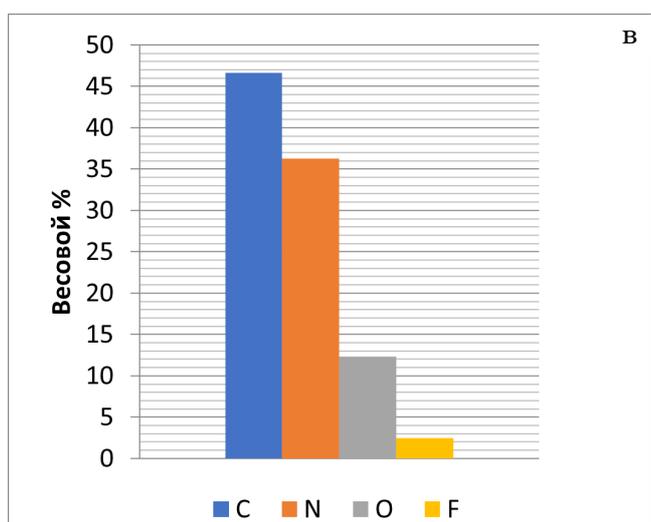
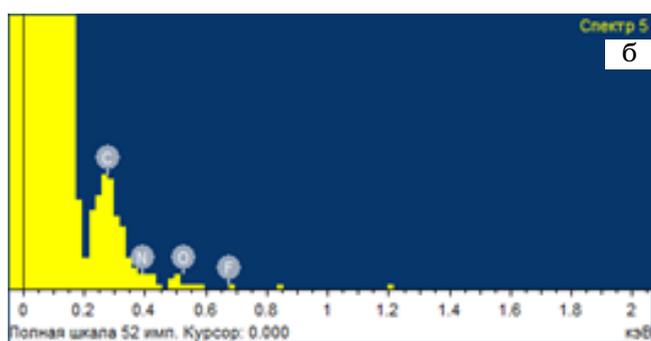
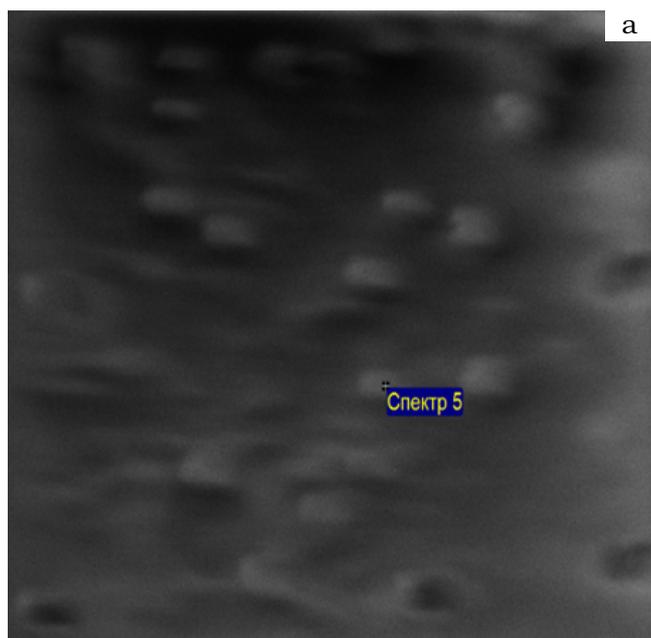


Рис. 5. а – НРС на поверхности эритроцита для исследования элементного состава; б – энергетический спектр, указанного НРС (а); в – гистограмма среднего элементного весового состава НРС в процентах

для разработки показателей эффективности ЛТ раковых заболеваний и объяснить причины возникновения рецидивов и развития заболевания.

Список литературы

1. Sung H, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021; 71 (3); 209-49.
2. Cohen PA, et al. Cervical cancer. Lancet. 2019; 393 (10167); 169-82.
3. Arbyn M, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. Lancet Global Health. 2020; 8 (2); e191-e203.
4. Лушникова ПА, Сухих ЕС, Ижевский ПВ, Сутыгина ЯН, Татарченко МА, Пыжова ИБ. 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>. Lushnikova PA, Sukhikh ES, Izhevsky PV, Sutygina YaN, Tatarchenko MA, Pyzhova IB. Modern Techniques for Cervical Cancer Radiotherapy. Creative surgery and oncology. 2021; 11 (1): 58-67. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2021-11-1-58-67> (In Russ).
5. Tazhibayeva KN, et al. Ways to improve the diagnostics and detection of cervical cancer development and recurrence risk. Oncology and Radiology of Kazakhstan. 2021; 62 (4); 24-7.
6. Шакирова ЭЖ, Зидиханов ДИ. Спасительная (salvage) гистерэктомия после лучевой терапии рака шейки матки: обзор литературы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2021; 17 (3): 121-7. <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-3-121-127>. Shakirova EZh, Zidikhanov DI. Salvage hysterectomy after radiotherapy for cervical cancer: literature review. Tumors of female reproductive system. 2021; 17 (3): 121-7. <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-3-121-127> (In Russ).
7. Крейнина ЮМ, Шевченко ЛН, Каскулова МХ, Дыкина АВ, Смыслов АВ, Троценко СД, Хороненко НА. Актуальные технологии конформной лучевой терапии в современных программах лечения рецидивов рака шейки, тела матки и яичников. Онкогинекология. 2020; (2); 60-70.

- Kreynina YuM, Shevchenko LN, Kaskulova MKh, Dykina AV, Smyslov AV, Trotsenko SD, Khoronenko NA. Novel technologies of conformal radiation therapy in advanced present-day programmes of treatment of recurrent cervical, endometrial and ovarian cancer. *Oncogynecology*. 2020; (2); 60-70 (In Russ).
8. Мансурова ГБ, Саидова КА, Разаков АР, Талыбова СА, Агзамов ОА, Чен ЕЕ и др. Анализ факторов влияющих на рецидивирование рака шейки матки. *Клиническая и экспериментальная онкология*. 2018; 1 (3); 15-8. Mansurova GB, Saidova KA, Razakov AR, Talybova SA, Agzamov OA, Chen EE et al. Factors influencing the recurrence of cervical cancer after combined radiation therapy. *Clinical & Experimental Oncology*. 2018; 1 (3); 15-8 (In Russ).
 9. Шумейкина АО и др. Возможности применения стереотаксической лучевой терапии для лечения рецидивов рака шейки матки (РШМ). *Вопросы онкологии*. 2022; 68 (3); 231-2.
 10. Salman NA, et al. Association of high risk human papillomavirus and breast cancer: a UK based study. *Sci Rep*. 2017; 7 (1); 43591.
 11. Fernandes A, et al. Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. *Ecancermedicalsecience*. 2015; 9; 548.
 12. Ngamkham J, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in breast cancer cells from Thai women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: ARJCP*. 2017; 18 (7); 1839.
 13. Naushad W, Surriya O, Sadia H. Prevalence of EBV, HPV and MMTV in Pakistani breast cancer patients: A possible etiological role of viruses in breast cancer. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 54; 230-7.
 14. Khodabandehlou N, et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. *BMC cancer*. 2019; 19; 1-11.
 15. Mamaeva SN, 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.
 16. Mamaeva SN, 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.
 17. Mamaeva SN, Kononova IV, Alekseev VA, et al. Determination of Blood Parameters using Scanning Electron Microscopy as a Prototype Model for Evaluating the Effectiveness of Radiation Therapy for Cervical Cancer. *Int J Biomed*. 2021; 11 (1); 32-8. [https://doi.org/10.21103/Article11\(1\)_OA6](https://doi.org/10.21103/Article11(1)_OA6).
 18. Osaki M, Okada F. Exosomes and their role in cancer progression. *Yonago Acta Medica*. 2019; 62 (2); 182-90.
 19. Meng X, et al. Circulating exosomes and their cargos in blood as novel biomarkers for cancer. *Translational Cancer Research*. 2018; 7 (2). <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.09.17>.
 20. Hood JL, et al. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Laboratory Investigation*. 2009; 89 (11); 1317-28.
 21. Kalluri R, et al. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Investigation*. 2016; 126 (4); 1208-15.
 22. Soung YH, et al. Exosomes in cancer diagnostics. *Cancers*. 2017; 9 (1); 8.
 23. Mizutani K, et al. Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Research*. 2014; 34 (7); 3419-23.
 24. Skog J, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008; 10 (12); 1470-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследования поддержаны Эндаумент фондом Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова ("Комплексный научно-исследовательский проект по медицинской физике", 2019–2025 гг.), Министерством науки и высшего образования Российской Федерации ("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" № FSRG-2021-0014, "Междисциплинарные исследования и разработки в области медицины, палеонтологии и экологии с применением радиационных технологий" № FSRG-2024-0002).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов. **Поступила:** 25.02.2025. **Принята к публикации:** 10.03.2025.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The research was supported by the Endowment Fund of the North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov (Comprehensive Research Project on Medical Physics, 2019-2025), The Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation ("Development and implementation of new integrated approaches to studying current problems in medicine, agriculture, industry, including the processing of precious stones, as well as paleontology, biology, virology using methods of spectroscopy, microscopy and radiation technologies" No. FSRG-2021-0014, "Interdisciplinary research and development in the field of medicine, paleontology and ecology using radiation technologies" No. FSRG-2024-0002).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 25.02.2025. **Accepted for publication:** 10.03.2025.