

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У ЖЕНЩИН

Е.В. ЖЕРНАКОВ*, В.Н. ДМИТРИЕВ**, М.Ю. СКОРКИНА*

*ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Россия; e-mail: Zhernakov@bsu.edu.ru

**ОГБУЗ БОД «Белгородский онкологический диспансер», ул. Куйбышева, д. 1, г. Белгород, 308010, Россия

Аннотация. Цель исследования. изучение возможностей использования возможностей атомно-силовой микроскопии в ранней диагностике неопластических процессов у женщин. **Материалы и методы исследования.** В эксперименте использовали биопсийный материал яичников и кровь пяти женщин, больных раком яичников II стадии в возрасте (45-59 лет). С целью получения опухолевых клеток тканей яичника использована техника дезинтеграции ткани 0,025% трипсином. В эксперименте анализировали функциональные свойства опухолевых клеток яичников и клеток крови. Функциональные свойства клеточных субпопуляций (модуль Юнга, силы межклеточной адгезии) измеряли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА в режиме силовой спектроскопии. **Результаты и их обсуждение.** В результате выполненного исследования установлено снижение жесткости эритроцитов на 92,2% ($p < 0,05$) по сравнению с опухолевыми клеткам яичников и увеличение силы межклеточной адгезии в системе «лейкоцит-опухолевая клетка» на 176,6% ($p < 0,05$) по сравнению с системой «эритроцит-опухолевая клетка». **Заключение.** Полученные результаты дополняют современные представления о механизмах межклеточного взаимодействия и являются одним из перспективных направлений в онкодиагностике ранних новообразований яичников.

Ключевые слова: опухолевые клетки яичников, эритроциты, лейкоциты, модуль Юнга, сила адгезии.

THE USE OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN EARLY DIAGNOSTICS OF NEOPLASTIC PROCESS IN WOMEN

E.V. ZHERNAKOV*, V.B. DMITRIEV**, M.YU. SKORKINA*

*Belgorod State National Research University, Pobeda Str., 85, Belgorod, 308015 Russia; e-mail: zhernakov@bsu.edu.ru

**Belgorod Oncology Center, Kuibushev tr., 1, Belgorod 308010, Russia

Abstract. The research purpose was to study the possibilities of using the approaches of atomic force microscopy in the early diagnosis of neoplastic processes in women. **Materials and methods.** In the experiment, ovarian biopsy material and blood of five women with stage II ovarian cancer aged 45-59 years were used. To obtain tumor cells of ovarian tissues, a tissue disintegration technique of 0.025% trypsin was used. In the experiment, the functional properties of ovarian tumor cells and blood cells were analyzed. The functional properties of cell subpopulations (Young's modulus, intercellular adhesion forces) were measured using an INTEGRA atomic force microscope in the power spectroscopy mode. **Results.** As a result of the study was found a decrease in erythrocyte stiffness by 92.2% ($p < 0.05$) compared with ovarian tumor cells and an increase in the strength of intercellular adhesion in the leukocyte-tumor cell system by 176.6% ($p < 0.05$) compared with the "erythrocyte-tumor cell" system. **Conclusion.** The obtained data complement the current understanding of the mechanisms of intercellular interaction and they are one of the promising directions in the oncodiagnosis of early ovarian neoplasms.

Keywords: ovarian tumor cells, red blood cells, white blood cells, Young's modulus, adhesion force.

Проблема ранней диагностики неопластических процессов у женщин, в частности рака яичников, остается одной из самых сложных в гинекологической практике. Необходимость своевременной диагностики и разработки адекватных терапевтических подходов требуют поиска более точных и принципиально новых критериев, характеризующих особенности развития данной патологии. Многокомпонентное строение гонад, сочетание гистологических структур самых разных функциональных направлений обуславливает широкий спектр новообразований этого органа [6]. В основе развития опухолей лежит нарушение ауторегуляторных механизмов. В последние десятилетия особенно активно изучаются факторы межклеточного взаимодействия при онкологических заболеваниях, в результате чего формируются новые взгляды на механизмы опухолевого роста и метастазирования, разрабатываются оригинальные подходы к лечению неоплазий [2]. Проводится изучение внутриопухолевого кровотока с по-

мощью цветового доплеровского сканирования [7].

Широкое внедрение в практику исследования сканирующей зондовой микроскопии, использующей различные модификации атомно-силовых микроскопов, создает новые направления в изучении функциональных свойств клеточной поверхности [8]. В современной цитофизиологии вопросы влияния опухолевого роста тканей на клетки крови остаются мало изученными, в связи с чем, перспективным является использование технологий атомно-силовой микроскопии для оценки функционального состояния клеточных популяций.

Целью работы явилось изучение возможностей использования возможностей атомно-силовой микроскопии в ранней диагностике неопластических процессов у женщин.

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовали биопсийный материал яичников и кровь пяти женщин, больных раком яичников II стадии в возрасте (45-59 лет). Взятие опухолевых

тканей яичников и крови, а также постановка диагноза выполнены на базе гинекологического отделения Белгородского онкологического диспансера г. Белгорода при участии врачей хирургов и лабораторных диагностов – цитологов.

С целью сохранения жизнеспособности клеток биопсийный материал яичников помещали в среду Игла MEM с солями Хенкса без глутамин. Для получения отдельных клеток из опухолевой ткани яичника использована техника дезинтеграции ткани 0,025% трипсином. Клетки, образующиеся при этом, прикрепляются к поверхности пластиковой чашки Петри. Затем монослой клеток собирали, промывали фосфатно-солевым буфером с 1 мМ ЭДТА и инкубировали с раствором трипсина (0,025%) в течение 15 минут при 37 °С. После чего трипсин удаляли, клетки суспендировали в среде Игла MEM с солями Хенкса без глутамин. Полученные опухолевые клеточные суспензии овариальных клеток использовали для изучения функциональных свойств поверхности методами атомно-силовой микроскопии.

Кровь собирали в вакуумные пробирки *Vacurette K3E*, содержащие сухую ЭДТА в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови. Осуществляли сепарацию форменных элементов крови на эритроциты и лейкоциты. Выделение эритроцитов осуществляли путем центрифугирования цельной крови на при 1500 об/мин и последующим их суспендированием в буферном физиологическом растворе с *pH* 7,4. Выделение лейкоцитарной популяции проводили путем центрифугирования при 1500 об./ мин в течение 5 минут. Полученную надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо отбирали, затем центрифугировали 10 мин при той же скорости, после чего ресуспендировали клетки в среде *RPMI* 1640.

Модуль Юнга опухолевых клеток яичников и форменных элементов крови измеряли в режиме силовой спектроскопии на АСМ ИНТЕГРА Вита согласно методу, описанному в работе [3]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток, таким образом, общая выборка составила 300 клеток (по 100 из каждой субпопуляции).

Измерение сил межклеточной адгезии осуществляли с использованием биосенсорного чипа. При выполнении эксперимента для каждой пробы конструировали два биосенсорных чипа, изготовленных на основе нативной клетки крови из каждой субпопуляции (эритроцитарной и лейкоцитарной) и тип-лесса *CSG11 (USA)* согласно способу, изложенному в работе [4]. Выбор в качестве биосенсора нативной клетки крови основан на том факте, что в микроциркуляторном русле они активно взаимодействуют с опухолевыми клетками яичников. В режиме силовой спектроскопии измеряли силу межклеточной адгезии в системе «клетка крови-опухолевая клетка яичника», регистрируя силовые кривые с поверхности не менее 20 клеток в каждой пробе. Силу адгезии рассчитывали, согласно закону Гука:

$$F = k \times \Delta Height \quad (1)$$

где *F* – сила адгезии, нН; *k* – жесткость кантилевера, Н/м; $\Delta Height$ – изменение длины пьезотрубки сканера в направлении *Z*, нм.

Экспериментальные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета анализа «*Microsoft Excel 7.0*» на персональном компьютере. Результаты исследований представлены в виде среднеарифметических значений с их средними стандартными ошибками. Исследуемые параметры находятся в пределах нормального распределения. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. В результате выполненного исследования выявлены существенные различия в модуле Юнга между форменными элементами крови и опухолевыми клетками яичников. Модуль Юнга лейкоцитов снижен на 83,6% ($p < 0,05$), а эритроцитов – на 92,2% ($p < 0,05$) по сравнению с опухолевыми клетками яичников (табл.).

Таблица

Значения модуля Юнга и сил межклеточной адгезии

Параметр	Эритроцит	Лейкоцит	Опухолевая клетка яичника	Эритроцит-опухолевая клетка яичника	Лейкоцит – Опухолевая клетка яичника
Модуль Юнга, мПа	10,06±0,3	21,21±0,5	129,58±3,8		
Сила адгезии, пН				77,7±1,6	214,9±3,7*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями клеток крови по сравнению с опухолевыми клетками по критерию Стьюдента (число степеней свободы $df=2$, $p < 0,05$)

Согласно полученным данным, сила адгезии между лейкоцитом и опухолевой клеткой на 176,6% ($p < 0,05$) выше по сравнению с адгезией между эритроцитом и опухолевой клеткой.

Принципиально новым подходом и отправной точкой в исследованиях и выявлении ранних новообразований женской репродуктивной системы может стать использование форменных элементов крови в качестве чувствительных биомаркеров, активно контактирующих и взаимодействующих с опухолевыми клетками. Установленное в эксперименте более выраженное снижение жесткости эритроцитов связано с отсутствием ядра и способностью клетки деформироваться и проходить через мелкие капилляры по сравнению с лейкоцитами, которые имеют ядро. Кроме того, эритроциты, помимо дыхательной функции, выступают активными транспортерами иммунных комплексов на своей поверхности.

Известно, что рост опухолей определяется степенью развитости в них сосудистой системы. В исследованиях зарубежных авторов представлены данные о том, что эндотелиальные клетки микрососудов выделяют в экстрацеллюлярный матрикс и в опухоль

факторы роста фибробластов и тромбоцитов, инсулиноподобный фактор роста, гепаринсвязанный эпителиальный фактор роста, интерлейкины [5]. Все эти факторы влияют на функциональные свойства клеточной поверхности и являются ауто- и паракринными регуляторными сигналами, привлекающими в опухолевый очаг иммунные клетки [1]. Не исключено, что существенное увеличение сил межклеточной адгезии между опухолевой клеткой и лейкоцитами, установленное нами в эксперименте, указывает на ключевую роль цитокинов, которые концентрируются в условиях опухолевого микроокружения.

Заключение. Таким образом, в условиях опухолевого процесса в тканях яичников у женщин в периферической крови, жесткость эритроцитов снижена по сравнению с лейкоцитами и опухолевыми клетками. Вместе с тем увеличение силы адгезии между лейкоцитом и опухолевой клеткой яичника указывает на усиление противоопухолевой активности белых клеток крови. С точки зрения микроциркуляции крови по сосудам, снижение жесткости клеток позволяет эритроцитам быстрее продвигаться в узких участках русла, за счет способности к деформации, а усиление адгезии лейкоцитов к опухолевым клеткам, является индикатором развития противоопухолевого иммунитета. Полученные результаты дополняют современные представления о механизмах межклеточного взаимодействия и являются одним из перспективных направлений в диагностике ранних новообразований яичников.

Литература / References

1. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практическая онкология. 2003. Т. 4, № 3. С. 131–139 / Kadagidze ZG. Tsitokiny [Cytokines]. *Prakticheskaya onkologiya*. 2003;4(3):131-9. Russian.
2. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина, 2003. / Paltcev MA, Ivanov AA,

Severin SE. *Meghkletochnye vzaimodeistvia* [Intercellular interactions]. Moscow: Medicine; 2003. Russian.

3. Федорова М.З., Муравьев А.В., Сладкова Е.А. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 3. С. 172–175 / Fedorova MZ, Murav'ev AV, Sladkova EA. *Ispol'zovanie nanomekhanicheskogo sensora dlya izucheniya morfofunktsional'nykh svoystv limfotsitov zdorovykh donorov i bol'nykh khronicheskim limfoblastnym leykozom* [Using a nanomechanical sensor to study the morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*. 2012;3:172-5. Russian.

4. Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А. Измерение сил адгезии в системе "клетка-клетка" на основе технологий атомно-силовой микроскопии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 4. С. 213–215 / Skorkina MIO, Shamray EA, Sladkova EA. *Измерение сил адгезии в системе "клетка-клетка" на основе технологий атомно-силовой микроскопии* [Measurement of adhesion forces in the cell-cell system based on atomic force microscopy technologies]. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2017;4:213-5. Russian.

5. Hida K., Maishi N., Annan D.A., Hida Y. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, N. 5. P.1272 / Hida K, Maishi N, Annan DA, Hida Y. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1272.

6. Kaarnezis A.N., Cho K.R., Gliks C.B., Pearce C.L., Huntsma D.G. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies // *Nat Rev Cancer*. 2017. Vol. 17. P. 65–74 / Kaarnezis AN, Cho KR, Gliks CB, Pearce CL, Huntsma DG. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:65-74.

7. Li Z., Xuam Z., Wang Yu. Diagnostic value of ultrasound score, color Doppler ulytrasound RI and spiral CT for ovarian tumors // *Oncol Lett*. 2019. Vol. 17, No. 6. P. 5499–5504 / Li Z, Xuam Z, Wang Yu. Diagnostic value of ultrasound score, color Doppler ulytrasound RI and spiral CT for ovarian tumors. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5499-504.

8. Skorkina M., Sladkova E., Shevchenko T., Cherkashina O., Gudkova E. Mechanical stress affects the functional activity of human granulocytes // *Series on Biomechanics*. 2020. Vol. 34, N.1. P. 48–54 / Skorkina M, Sladkova E, Shevchenko T, Cherkashina O, Gudkova E. Mechanical stress affects the functional activity of human granulocytes. *Series on Biomechanics*. 2020;34(1):48-54.

Библиографическая ссылка:

Жернаков Е.В., Дмитриев В.Н., Скоркина М.Ю. Использование атомно-силовой микроскопии в ранней диагностике неопластических процессов у женщин // Вестник новых медицинских технологий. 2020. №3. С. 54–56. DOI: 10.24411/1609-2163-2020-16706.

Bibliographic reference:

Zhernakov EV, Dmitriev VB, Skorkina MYu. *Ispol'zovanie atomno-silovoy mikroskopii v ranney diagnostike neoplasticheskikh protsessov u zhenshchin* [The use of atomic force microscopy in early diagnostics of neoplastic process in women]. *Journal of New Medical Technologies*. 2020;3:54-56. DOI: 10.24411/1609-2163-2020-16706. Russian.