

УДК 576.08

Сладкова Е. А.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ
И СТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТИ
ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ
ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
НА СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ
И РЕМИССИИ БОЛЕЗНИ****Сладкова Евгения Анатольевна**

ассистент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции
Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru

АННОТАЦИЯ

С использованием метода атомно-силовой микроскопии изучены функциональные свойства и структура поверхности лимфоцитов больных лимфобластным лейкозом на стадии обострения и ремиссии болезни. Жесткость лимфобластных форм, циркулирующих в крови больных ОЛЛ, снижена, потенциал поверхности увеличен. Рельеф плазмалеммы таких клеток сглажен. Установлено, что в состоянии ремиссии ОЛЛ, в периферической крови присутствуют два типа лимфоцитов с разной конфигурацией клеточной поверхности, при этом для них характерно снижение жесткости и повышение потенциала поверхности.

Ключевые слова: лейкоз; лимфоцит; атомно-силовая микроскопия; модуль Юнга; потенциал поверхности; рельеф плазмалеммы.

UDC 576.08

*Sladkova E. A.****THE FUNCTIONAL PARAMETERS
AND STRUCTURE OF THE SURFACE
OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS
WITH LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA
IN BOTH ACUTE STAGE AND
REMISSION*****Sladkova Eugenia Anatolievna***Assistant Lecturer*

Belgorod State National Research University,

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

*E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru***ABSTRACT**

In this paper, we have studied the functional properties and structure of the surface of lymphocytes in patients with lymphoblastic leukemia (ALL) in the acute stage and remission of the disease using the atomic force microscopy. The rigidity of the surface of lymphoblastic cells circulating in ALL patients was low, while the surface potential increased. The surface of the plasma membrane of those cells was smoothed. We have found that in the stage of remission of ALL, two types of lymphocytes with different surface shape were present in the peripheral blood, wherein they were characterized by a reduction in stiffness and an increase in the surface potential.

Keywords: leukemia; atomic force microscopy; Young's modulus; surface potential; plasmalemma shape.

Лейкозные клетки характеризуются рядом отклонений в генетической и метаболической системах [10], что обуславливает приобретение ими злокачественности и высокого метастатического потенциала. Так, лимфобласты больных ОЛЛ характеризуются высокой пролиферативной активностью на фоне полной иммунологической некомпетентности [8]. Показано, что опухолевое перерождение клеток сопровождается изменением структуры их поверхности [14], ее механических [1] и электрических [5] свойств. При эффективной терапии в течение острого лейкоза может наступать стадия ремиссии [9]. Несмотря на многочисленные данные о лейкозогенезе, представленные в литературе, неизученным остается вопрос о преобразовании структуры и функциональных свойств лимфоцитов больных ОЛЛ при переходе острой фазы болезни в ремиссию.

Цель исследования – изучить функциональные параметры и структуру поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ и ОЛЛ в ремиссии.

Материалы и методы исследования.

Исследования выполнены на кафедре анатомии и физиологии живых организмов НИУ «БелГУ». Изучали структуру и функциональные свойства поверхности лимфоцитов 25 больных ОЛЛ и 15 пациентов с лимфобластным лейкозом на стадии ремиссии. Контролем служили лимфоциты 50 здоровых людей.

Забор периферической крови здоровых пациентов и больных лейкозом осуществляли из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, предотвращающая свертывание крови путем блокирования ионов кальция) в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови (0,006843 моль/литр). Разделение проб крови на лейкоциты и эритроциты осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об./мин. Полученную надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо отбирали, затем центрифугировали 10 мин при той же скорости. Получали суспензию лейкоцитов.

Микрорельеф поверхности лимфоцитов изучали в полуконтактном режиме на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT-MDT, Зеленоград, 2009). Для сканирования использовали кантилеверы серии

NSGo3 с радиусом закругления 10 нм, частота развертки сканирования составляла порядка 0,6-0,8 Гц. Суспензию лейкоцитов наносили на обезжиренное предметное стекло и сканировали по 15 лимфоцитов из каждой пробы согласно разработанному «Способу исследования нативных клеток крови» [3].

С целью оценки структурных неоднородностей клеточной поверхности проводили подсчет числа морфологических образований поверхности и измеряли их линейные размеры на участке плазмалеммы площадью 3×3 мкм. Строили кривые профиля бокового сечения.

Упруго-эластические свойства лимфоцитов изучали в режиме силовой спектроскопии с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG 11, согласно разработанному автором в коллективе с соавторами «Способу определения упругости клеток крови» [4].

В результате проведения АСМ-спектроскопии получали силовые кривые подвода и отвода. Для расчета модуля Юнга использовали кривые подвода, которые с помощью скрипта DFL_to_Force программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия, 2009) преобразовывали из системы координат «ток расфокусирования – высота» в систему координат «сила – высота». Модуль Юнга рассчитывали по формуле [7].

Измерение потенциала поверхности (ПП) осуществляли в режиме зонда Кельвина с помощью кантилевера с токопроводящим титановым покрытием серии NSGo3/TiN (Nanoworld, USA). Из каждой пробы сканировали по 15 клеток и проводили обработку полученных сканов в программе Nova (Зеленоград, 2009). Суспензию лейкоцитов для измерения потенциала поверхности (ПП) готовили согласно «Способу регистрации изменения поверхностного заряда» [2].

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости.

Результаты исследования и их обсуждение. В крови больных лимфобластным лейкозом циркулируют бластные формы с неправильными контурами цитоплазмы и ядром, занимающим большую часть клетки. Рельеф поверхности таких лимфоцитов сглажен (рис. 1) по сравнению с клетками доноров.

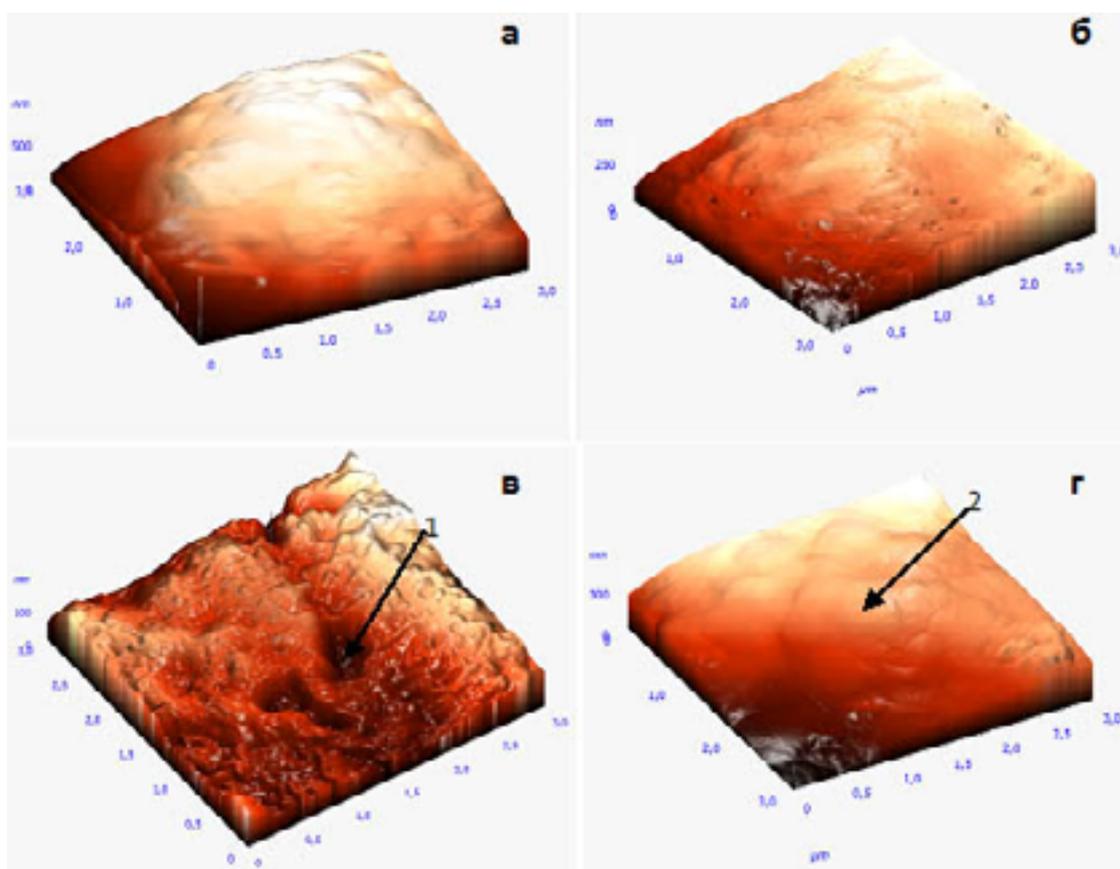


Рис. 1. Рельеф поверхности лимфоцитов: а – здоровых людей; б – больных ОЛЛ; в – больных ОЛЛ в ремиссии (1 тип), г – больных ОЛЛ в ремиссии (2 тип) (1 – крупные инвагинации плазмалеммы, 2 – глобулярные выступы сферической формы)

Fig. 1. The surface of lymphocytes: a – healthy people; b – patients with ALL; c – patients with remission of ALL (1 type); d – patients with remission of ALL (2 type) (1 – large plasmalemma invagination; 2 – globular projections of spherical shape)

Высота и ширина глобулярных выступов плазмалеммы лимфоцитов больных ОЛЛ были снижены на 85% и 78% ($p < 0,05$), при этом их количество уменьшилось на 57% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами до-

норов. Глубина инвагинаций на поверхности мембраны и их количество уменьшились соответственно на 55% и 44% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами доноров (табл. 1).

Таблица 1

Рельеф поверхности лимфоцитов

Table 1

The surface of lymphocytes

Группы	Глобулярные выступы			Углубления (инвагинации)		
	Кол-во	Высота, нм	Ширина, нм	Кол-во	Глубина	Ширина
Доноры (контроль)	7±0,2	46±0,5	15±0,9	9±0,4	26±0,9	2±0,3
ОЛЛ	3±0,1 ^a	7±0,5 ^a	3,3±0,8 ^a	5±0,5 ^a	11,6±0,3 ^a	3,4±0,2 ^a
ОЛЛ в ремиссии (1 тип)	12±0,7 ^a	5±0,2 ^a	3±0,2 ^a	3±0,3 ^a	105±0,3 ^a	27,5±0,7 ^a
ОЛЛ в ремиссии (2 тип)	5±0,3 ^a	39±0,5 ^a	22±0,1 ^a	1±0,3 ^a	12±0,5 ^a	3±0,8

^a Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Модуль Юнга лимфоцитов больных ОЛЛ уменьшился на 54% ($p < 0,05$) по сравнению с группой доноров (табл. 2). Потенциал

поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ был повышен на 34% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами доноров (см. табл. 2).

Таблица 2

Величины модуля Юнга и ПП лимфоцитов

Table 2

Young's modulus and surface charge of lymphocytes

Группа	Модуль Юнга, мПа	Потенциал поверхности, мПа
Доноры (контроль)	3,9±0,1	- 37,3±0,6
ОЛЛ	1,8±0,2 ^a	- 27,8±0,9 ^a
ОЛЛ в ремиссии	2,5±0,1 ^a	- 29,0±0,5 ^a

^a Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

В крови больных ОЛЛ в ремиссии выделены два типа лимфоцитов с разной конфигурацией поверхности плазмалеммы (см. рис. 1). Для лимфоцитов с первым типом клеточной поверхности характерно наличие мелких глобулярных структур. Одновременно с выступами встречались крупные инвагинации плазмалеммы. Для лимфоцитов больных ОЛЛ в ремиссии со вторым типом рельефа клеточной поверхности характерно наличие глобулярных образований сферической формы и редко встречающиеся мелкие инвагинации.

Высота и ширина глобулярных структур лимфоцитов 1 типа уменьшились на 89% и 80% ($p < 0,05$), при этом их количество возросло на 72% ($p < 0,05$) по сравнению с клетками доноров. Глубина и ширина инвагинаций плазмалеммы увеличились на 304% и 1275% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными структурами лимфоцитов доноров. Ширина глобулярных образований лимфоцитов 2 типа больных ОЛЛ в ремиссии увеличилась на 47% ($p < 0,05$), а их высота уменьшилась на 15% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами доноров. Инвагинации на клеточной поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ в ремиссии практически не встречались, их количество снизилось на 89% ($p < 0,05$), а глубина на 54% ($p < 0,05$) в сравнении с клетками доноров.

Модуль Юнга лимфоцитов как с первым, так и со вторым типом клеточной поверхности уменьшился на 36% ($p < 0,05$) по сравнению с группой доноров (см. табл. 2). Потенциал поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ в ремиссии был повышен на 29% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами доноров.

Установлено, что для больных ОЛЛ харак-

терно присутствие в периферическом русле «мягких» бластных форм с неправильными контурами цитоплазмы, и сглаженным рельефом поверхности. Согласно данным литературы, снижение значений модуля Юнга на периферии цитоплазмы может создавать условия для формирования ламеллоподий [13] и фокальных контактов [12]. Увеличение поверхностного потенциала клеток способствует повышению адгезии к сосудистому эндотелию [11]. Не исключено, что подобные изменения функциональных параметров и структуры могут спровоцировать выход «мягких» лимфобластов больных ОЛЛ в ткани и способствовать формированию метастатических очагов.

В группе пациентов больных ОЛЛ в ремиссии в периферической крови выявлено присутствие двух типов лимфоцитов с разной конфигурацией поверхности. Так, для первого типа клеток было характерно наличие мелких глобул и крупных инвагинаций, а для второго – крупных глобулярных образований сферической формы и редко встречающиеся мелкие инвагинации. Не исключено, что появление двух морфологически разнородных популяций клеток является следствием воздействия химиотерапии [6].

В лимфоцитах двух морфологических типов характерно снижение жесткости в области ядра и по периферии цитоплазмы, и повышение ПП, аналогично клеткам больных лимфолейкозом на стадии обострения. Сохраняющаяся деполяризация мембраны лимфоцитов и сниженная жесткость указывают на потенциальные возможности клеток к адгезии и проникновению через эндотелий в ткани [11].

Следовательно, в результате использования химиотерапевтических схем подавляется развитие бластных форм, но потенциальная способность лимфоцитов к миграции в ткани сохраняется.

Заключение. Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что в крови больных лимфобластным лейкозом циркулируют бластные формы со сглаженным рельефом плазмалеммы. Сниженная жесткость и повышенный потенциал поверхности таких клеток создают условия для выхода лимфобластов в

ткани и формирования метастатических очагов. В крови больных лейкозом на стадии ремиссии обнаружены лимфоциты как с мелкими выступами на плазмалемме, так с крупными глобулярными образованиями. Жесткость и потенциал поверхности лимфоцитов, как с первым, так и со вторым типом клеточной поверхности, изменялись аналогично лимфобластам больных острой формой лейкоза, что указывает на потенциальные возможности лимфоцитов больных ОЛЛ в ремиссии сохранять злокачественные свойства.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Горло Е.И. Структурно-функциональное состояние мембран клеток крови и лимфы у онкологических больных при различных химиотерапевтических воздействиях: Автореф. ... к. б. н. Ростов-на-Дону, 2000. 24 с.
2. Патент РФ 2027188 Способ регистрации изменения поверхностного заряда эритроцитов / Шереметев Ю.А., Макин Г.И., Суслов Ф.Ю. – заявитель и патентообл. НСХ, дата приоритета № 4947820/14 от 24.06.1991.
3. Патент РФ 2398243 Способ исследования нативных клеток / Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Сладкова Е.А., Забияков Н.А. – заявитель и патентообл. БелГУ, дата приоритета № 2009125268 от 01.07.2009.
4. Патент РФ 2466401 Способ определения упругости клеток крови / Скоркина М.Ю., Сладкова Е.А., Забияков Н.А. – заявитель и патентообл. БелГУ, дата приоритета № 2011109741 от 15.03.2011.
5. Тарасова И.М. Изменение физико-химических свойств лимфоцитов в процессах развития индуцированного канцерогенеза и общей реакции на повреждение: Дисс. ... к-та физ.-мат. наук. М, 1985. 187 с.
6. Barret A.J. Efficacy of CD34 positive cell dose in patients undergoing allogeneic peripheral blood stem cell transport with total body irradiation // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007. V. 13. Pp. 339-344.
7. Capella B., Dieter G. Force-distance curves by atomic force microscopy // *Surf. Sci. Rep.* 1999. V. 34. Pp. 1-104.
8. Clun W., Karandikav N.J., Kroft S.H. Stability of leukemia associated immunophenotyps in precursor B-lymphoblastic leukemia // *Am. J. Clin. Pathol.* 2007. V. 127 (1). Pp. 39-46.
9. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia / Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., Andreeff M., Cortes J., Faderl S., Thomas D., Koller C., Wierda W., Detry M.A., Lynn A., Kantarjian H. // *J. Clin Oncol.* V. 20. Pp. 4079-4088.
10. Hayashi S.S., Kawasaki O.C., Harada M., Niho Y. Sequential expression of lymphokine genes during phytohemagglutinin-stimulated mitogenesis of normal human peripheral mononuclear cells // *Biomed. Pharmacother.* 1993. V.47. Pp. 155-160.
11. Mello A., Volkov Y., Kelleher D. Comparative Locomotory Behavior of T Lymphocytes versus T Lymphoma // *Cells on Flat and Grooved Surfaces*. 2003. V. 31. Pp. 1106-1113.
12. Mooren O.L., Kotova T.I., Moore A.J. Dynamism 2 GTPase and cortactin remodel actin filaments // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. Pp. 23995-24005.
13. Small J. V. The actin cytoskeleton // *Electron Microsc. Rev.* 1998. V. 1. Pp. 155-174.
14. Wolf K. Compensation mechanism in tumor cell migration // *J. Cell Biol.* 160. Pp.267-277.

REFERENCES:

1. Gorlo E.I. The Structural and Functional State of Membranes of Blood Cells and Lymph in Patients with Cancer with Different Chemotherapeutic Treatment. PhD Thesis in Biology. Rostov-on-Don, 2000. 24 p.
2. Patent RF 2027188 The Method of Recording the Erythrocytes' Surface Charge's Changes / Sheremetev Yu.,A, Makin G.I., Suslov F.Yu.. – Patent-holder NSH, date of priority № 4947820/14 of 24.06.1991.
3. Patent RF 2398243 The Method of Study of Native Cells / Skorkina M.Yu., Chernivskish S.D., Sladkova E.A., Zabiniakov N.A. – Patent-holder BelSU, date of priority № 2009125268 of 01.07.2009.
4. Patent RF24664013. The Method of Study of Blood Cell Stiffness / Skorkina M.Yu., Sladkova E.A., Zabiniakov N.A. – Patent-holder BelSU, date of priority № 2011109741 of 15.03.2011.
5. Tarasova I.M. Altering the Physiochemical Peculiarities of Lymphocytes during the Cancer Genesis and General Damage Reaction. PhD Thesis in Physics and Mathematics. M, 1985. 187 p.
6. Barret A.J. Efficacy of CD34 positive cell dose in patients undergoing allogeneic peripheral blood stem cell transport with total body irradiation // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007. V. 13. Pp. 339-344.
7. Capella B., Dieter G. Force-distance curves by atomic force microscopy // *Surf. Sci. Rep.* 1999. V. 34. Pp. 1-104.
8. Clun W., Karandikav N.J., Kroft S.H. Stability of leukemia associated immunophenotypes in precursor B-lymphoblastic leukemia // *Am. J. Clin. Pathol.* 2007. V. 127 (1). Pp. 39-46.
9. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia / Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., Andreeff M., Cortes J., Faderl S., Thomas D., Koller C., Wierda W., Detry M.A., Lynn A., Kantarjian H. // *J. Clin Oncol.* V. 20. Pp. 4079-4088.
10. Hayashi S.S., Kawasaki O.C., Harada M., Niho Y. Sequential expression of lymphokine genes during phytohemagglutinin-stimulated mitogenesis of normal human peripheral mononuclear cells // *Biomed. Pharmacother.* 1993. V.47. Pp. 155-160.
11. Mello A., Volkov Y., Kelleher D. Comparative Locomotory Behavior of T Lymphocytes versus T Lymphoma // *Cells on Flat and Grooved Surfaces*. 2003. V. 31. Pp. 1106-1113.
12. Mooren O.L., Kotova T.I., Moore A.J. Dynamamin 2 GTPase and cortactin remodel actin filaments // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. Pp. 23995-24005.
13. Small J. V. The actin cytoskeleton // *Electron Microsc. Rev.* 1998. V. 1. Pp. 155-174.
14. Wolf K. Compensation mechanism in tumor cell migration // *J. Cell Biol.* 160. Pp.267-277.