

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ
ПРИ РАЗВИТИИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В СИСТЕМЕ КРОВИ¹**

*Е.А. Шамрай**, *М.Ю. Скоркина**, *Е.А. Сладкова**, *О.В. Сыроватская**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
(г. Белгород)

Развитие острого миелобластного лейкоза приводит к дисфункции клеточного звена врожденного иммунитета, вместе с тем в кровотоке сохраняется популяция нормальных лимфоцитов, которые являются ключевыми участниками адаптивного иммунитета, однако их функциональная активность остается малоизученной. В связи с этим цель исследования – изучить функциональные свойства клеточной поверхности лимфоцитов (жесткость, заряд, адгезивные свойства) у пациентов со злокачественной пролиферацией миелоидного ростка системы крови. В работе использованы различные режимы сканирования атомно-силовой микроскопии, которые позволяют изучать микро- и наномеханические свойства клеточной поверхности, измерять модуль Юнга, характеризующий ее жесткость, заряд клеточной мембраны, силы адгезии между клетками. В результате выполненных исследований установлено увеличение жесткости и потенциала клеточной поверхности субпопуляции лимфоцитов во время лечения болезни соответственно на 128 % ($p < 0,05$) и 12 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Изучены межклеточные взаимодействия между лимфоцитами и тромбоцитами: во время лечения сила адгезии между ними возросла на 37 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В группах пациентов на стадии рецидива острого миелобластного лейкоза и во время лечения функциональные свойства клеточной поверхности и клеточные реакции схожи. Полученные результаты имеют теоретическое значение в изучении биофизических свойств поверхности иммунных клеток. Практическое значение выполненного исследования связано с поиском эффективных схем лечения, направленных на сохранение функциональных свойств клеточной поверхности лимфоидного ростка кроветворения.

Ключевые слова: лимфоциты, острый миелобластный лейкоз, модуль Юнга, потенциал поверхности лимфоцитов, сила адгезии клеток, миграция лейкоцитов.

¹Исследование выполнено при поддержке гранта на проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям социально-экономического развития Белгородской области (проект № 33-гр).

Ответственный за переписку: Шамрай Елена Александровна, адрес: 308007, г. Белгород, ул. Студенческая, д. 14; e-mail: elenashamray@yandex.ru

Для цитирования: Шамрай Е.А., Скоркина М.Ю., Сладкова Е.А., Сыроватская О.В. Функциональные свойства лимфоцитов при развитии миелопролиферативных процессов в системе крови // Журн. мед.-биол. исследований. 2018. Т. 6, № 1. С. 85–94. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.1.85

Развитие иммунной недостаточности у больных с опухолевыми процессами в системе крови является одной из актуальных проблем, изучаемых в современных медико-биологических исследованиях. Злокачественные миело-пролиферативные процессы характеризуются клональной пролиферацией гемопоэтических клеток с молекулярными аномалиями в виде генных aberrаций и мутаций [1]. Основную роль в патофизиологии острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) отводят mTOR-сигнальному пути, обеспечивающему выживание и рост опухолевых клеток за счет инициации aberrаций [2–4]. Накопление дефектных миелобластов в костном мозге и последующий их выход в периферическое русло приводят к нарушению гуморальных и клеточных звеньев иммунитета [5]. В частности, для больных ОМЛ выявлены низкая фагоцитарная способность нейтрофилов, напряженность адаптивного иммунитета, нарушение рецепторного аппарата субпопуляции нейтрофилов, которое тесно связано с фенотипом бластных клеток (CD16, CD64) и сопряжено со сниженной комплементарной активностью [6]. Следовательно, развитие злокачественных миело-пролиферативных процессов в системе крови приводит к дисфункции клеточного звена врожденного иммунитета. Вместе с тем в кровотоке сохраняется популяция лимфоцитов, которые являются ключевыми участниками адаптивного иммунитета, однако их функциональная активность остается малоизученной.

Известно, что развитие иммунных реакций во многом определяется свойствами клеточной поверхности лимфоцитов и компетентностью их рецепторного аппарата [7]. Важным аспектом является изучение свойств клеточной поверхности лимфоцитов, которая подвергается значительному влиянию со стороны химиотерапии, приводящей к циркуляции в кровотоке эндогенных токсинов [8]. Цель работы – изучить функциональные свойства клеточной поверхности лимфоцитов (жесткость, заряд, адгезивные свойства) у пациентов со злокачественной пролиферацией миелоидного ростка системы крови.

Материалы и методы. Экспериментальную часть работы выполняли на базе научно-иссле-

довательской лаборатории физиологии адаптационных процессов Белгородского государственного национального исследовательского университета и гематологического отделения областной клинической больницы г. Белгорода. Для эксперимента отбирали кровь больных ОМЛ, находящихся на лечении в стационаре ($n = 13$), а также пациентов с рецидивом данного типа заболевания ($n = 2$). В качестве контроля использовали кровь здоровых людей ($n = 20$). Эксперимент проводили с соблюдением основных норм биомедицинской этики в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (редакция 2013 года). Вначале было получено информированное согласие пациентов на исследование.

Диагностику ОМЛ осуществляли при непосредственном участии врачей-гематологов, согласно алгоритму цитохимической диагностики, принятому в клинической онкогематологии [9]. Общий анализ крови выполняли при участии врача-лаборанта на гематологическом анализаторе «Beckman Coulter LH500» (Франция, 2010).

Кровь получали путем венопункции. Образцы собирали в вакуумные пробирки «Vacuette K3E» («Greinger-Bio-One», Австрия). Лейкоциты выделяли из цельной крови путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 мин с последующей 3-кратной отмывкой средой RPMI-1640 и ресуспендированием в этой же среде. Перед экспериментами проводили тесты на оценку жизнеспособности клеток путем окрашивания 1 мкл суспензии 0,4 %-м раствором трипанового синего в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,2–7,3) и последующего подсчета погибших форм в камере Горяева с использованием светового микроскопа «Axiostar plus» для морфологии («Carl Zeiss», Германия, 2010). В эксперименте использованы пробы с выживаемостью клеток не менее 95 %.

С целью оценки влияния стандартных схем лечения на морфофункциональное состояние миелоидного ростка кроветворения выполняли тесты по определению миграционной активности лейкоцитов и готовили мазки крови больных, на которых описывали морфологию аномальных бластов. Миграционную активность

лейкоцитов оценивали в прямом капиллярном тесте с учетом жизнеспособности клеток не менее 95 % [10].

Функциональные свойства клеточной поверхности лимфоцитов исследовали с использованием атомно-силовой микроскопии. Данный метод позволяет изучать микро- и наномеханические свойства клеточных структур, измерять модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности [11], заряд клеточной поверхности (за счет сил электростатического взаимодействия между заряженным зондом и поверхностью клетки) [12], характеризовать механические контакты между клетками на уровне одной молекулы [13], а также рецепторы клеточной поверхности [14].

Модуль Юнга лимфоцитов измеряли на атомно-силовом микроскопе «Интегра Вита» (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа «Olympus IX-71», производитель – NTMDT, г. Зеленоград, 2009). Жесткость клеток оценивали по экспериментальным силовым кривым, снятым с поверхности лимфоцитов при проведении процедуры силовой спектроскопии. Для снятия силовых кривых готовили суспензию лимфоцитов, которую наносили на чистые обезжиренные стеклянные подложки. Процедуру силовой спектроскопии осуществляли с помощью модифицированного зонда на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG11 [15]. Измерения модуля Юнга проводили на 15 клетках из каждой серии пробоподготовки.

Электрические свойства мембраны опухолевых клеток измеряли в режиме зонда Кельвина. Суспензию клеток для измерения потенциала поверхности (ПП) готовили согласно способу, описанному ранее [16]. ПП измеряли с помощью кантилевера с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN («Nanoworld», США). Из каждой пробы сканировали по 20 клеток, затем полученные сканы обрабатывали в программе «Nova» (NT-MDT, Россия).

Важным в понимании механизмов межклеточного взаимодействия является измерение сил адгезии, т. к. запуск патофизиологических реакций протекает на уровне рецепторного ап-

парата клеток. В связи с этим в исследовании измеряли межмолекулярные силы адгезии в системе «клетка–клетка». Для этого использовали биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного лимфоцита и типлесса CSG11 согласно разработанному нами способу [17]. В системах «лимфоцит–гранулоцит», «лимфоцит–эритроцит», «лимфоцит–тромбоцит» силы адгезии измеряли, регистрируя силовые кривые с поверхности не менее 15 клеток. Силу адгезии рассчитывали с помощью программного обеспечения «Nova» согласно закону Гука:

$$F = k \cdot \Delta Height,$$

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

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Значимость различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t -критерия Стьюдента (при $p < 0,05$) в случае нормального распределения признака и U -критерия Манна–Уитни (при $p < 0,05$) – для непараметрических данных.

Результаты. В периферической крови больных ОМЛ выявлено ($34 \pm 1,5$) % бластов. На мазках идентифицированы формы бластов с рассеянным генетическим аппаратом (рис. 1).

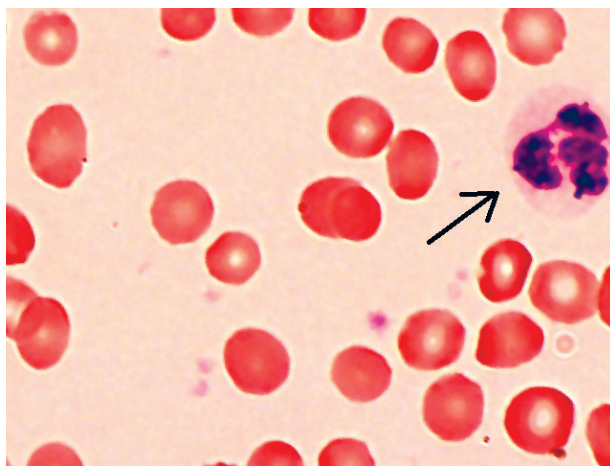


Рис. 1. Кровь больного острым миелобластным лейкозом. Стрелкой показан недифференцированный миелобласт с рассеянным генетическим аппаратом в цитоплазме

Указать, какая часть бластов имела необычный генетический аппарат, невозможно, т. к. у разных больных очень высокая степень гетерогенности клеточных форм и именно такой рассеянный аппарат может встретиться в одном бласте на несколько тысяч клеток.

В группе пациентов с ОМЛ на фоне лечения выявлена анемия: число эритроцитов и концентрация гемоглобина снижены соответственно на 35 % ($p < 0,05$) и 39 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

Злокачественная пролиферация миелоидного ростка протекала на фоне сниженного в 2 раза числа лейкоцитов, однако в лейкоформуле увеличился процент мононуклеарных форм, при этом наблюдалось резкое уменьшение числа эритроцитов и, как следствие, гемоглобина.

В результате лечения у больных ОМЛ существенно снизилась миграционная активность лейкоцитов (на 40 %; $p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 2).

Патологические процессы, протекающие в миелоидном ростке кроветворения, приводят к дисфункции клеточных и гуморальных механизмов иммунитета. Свойства клеточной поверхности лимфоидного ростка существен-

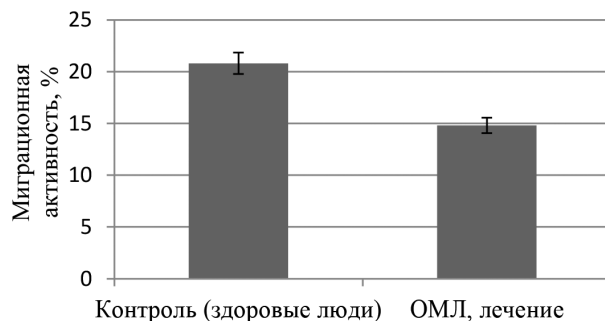


Рис. 2. Миграционная активность лейкоцитов здоровых людей и больных острым миелобластным лейкозом (установлена значимость различий по t -критерию Стьюдента, $p < 0,05$)

но изменяются на различных стадиях течения болезни. Так, в группе больных ОМЛ, находящихся на лечении в стационаре, модуль Юнга лимфоцитов увеличился на 129 % ($p < 0,05$ по Стьюденту) по сравнению с контролем. На стадии рецидива болезни модуль Юнга увеличился на 69 % ($p < 0,05$ по Стьюденту) по сравнению с контролем, однако в сравнении с пациентами, проходившими лечение, он снизился в 1,4 раза (рис. 3а).

Таблица 1

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ КРОВИ
ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Параметр	Контроль (здоровые люди)	ОМЛ, лечение
RBC, $\cdot 10^{12}$, л ⁻¹	4,3±0,5	2,8±0,2*
Hb, г/л	145,0±25,0	88,6±8,6*
Ht, усл. ед.	0,44±0,2	0,30±0,02
WBC, $\cdot 10^9$, л ⁻¹	8,35±1,5	4,09±0,7*
Нейтрофилы, %	65,0±5,2	52,2±1,9*
Базофилы, %	0,50±0,2	1,93±0,8*
Эозинофилы, %	3,0±0,9	0
Лимфоциты, %	28,5±2,5	32,5±3,4*
Моноциты, %	5,0±0,5	8,37±1,5*

Примечание: RBC – число эритроцитов; Hb – концентрация гемоглобина; Ht – гематокрит; WBC – число лейкоцитов; * – установлены статистически значимые различия между показателями здоровых людей и больных ОМЛ по t -критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

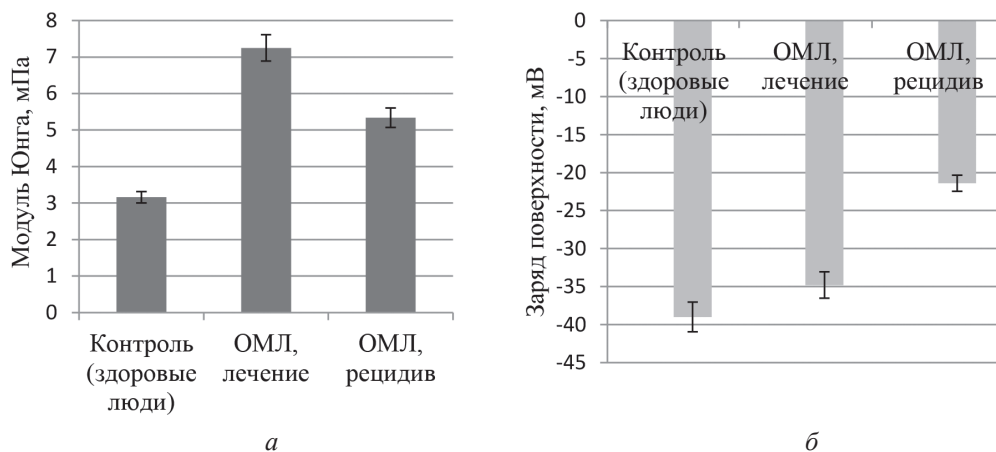


Рис. 3. Свойства клеточной поверхности лимфоцитов у здоровых людей и больных острым миелобластным лейкозом на различных стадиях течения болезни (установлена значимость различий по *t*-критерию Стьюдента, $p < 0,05$)

Увеличение модуля Юнга сопровождалось постепенным повышением заряда клетки. Так, во время лечения заряд клеточной поверхности увеличился на 12 % ($p < 0,05$ по Стьюденту), а на стадии рецидива болезни – на 82 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 3б). Однако тесных корреляционных связей между изменением жесткости и заряда поверхности установить не удалось ($r = 0,1$).

Известно, что потеря отрицательного заряда клеткой инициирует изменение адгезивных свойств между клетками. Сила адгезии в системе «лимфоцит–гранулоцит» при лечении

снизилась на 38 % ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни), а на стадии рецидива болезни – на 86 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 2). Сила адгезии в системе «лимфоцит–эритроцит» снизилась на 54,5 % ($p < 0,05$) во время лечения и на 99,5 % при рецидиве болезни ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Обсуждение. Настоящее исследование подтвердило клиническую картину, характерную для злокачественных миелопролиферативных процессов в системе крови. Выявленные на мазках бластные формы клеток с аномалиями в генетическом аппарате описаны в литературе.

Таблица 2

АДГЕЗИЯ ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ТЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ

Группа	Сила адгезии, нН, в системе		
	«лимфоцит–гранулоцит»	«лимфоцит–эритроцит»	«лимфоцит–тромбоцит»
Контроль (здоровые люди)	75,6±1,1	46,5±0,9	58,4±0,6
ОМЛ, лечение	52,6±0,3*	30,1±0,2*	80,0±1,1*
ОМЛ, рецидив	40,7±0,2*	21,9±0,3*	–

Примечание: * – установлены статистически значимые различия между показателями здоровых людей и ОМЛ по *U*-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Их появление связано с реализацией этапов патологического митоза, что ведет к накоплению хромосомных мутаций и является одним из механизмов возникновения анеуплоидии, а также нарастания генетической гетерогенности клеточных популяций [18].

В периферической крови больных, проходивших лечение в стационаре, обнаружены бласты с вакуолями. Кроме того, на фоне лечения выявлены анемия, лейкопения и сдвиг лейкоформулы в сторону мононуклеаров. Полученные данные согласуются с исследованиями ряда авторов, которые отмечают характерный анемический синдром и лейкопению в группе больных ОМЛ [6, 19, 20].

Использование химиотерапевтических агентов в схеме лечения больных ОМЛ привело к существенному снижению миграционной активности клеток гранулоцитарного ряда. С одной стороны, установленный факт имеет положительное значение, т. к. тормозится метастазирование злокачественных лейкоэмических клонов, однако, с другой стороны, отсутствие селективности действия лекарственных препаратов в отношении здоровых и опухолевых клеток ослабляет функциональную активность нормальных лейкоцитов и тем самым выключает клеточное звено врожденного иммунитета. Согласно данным литературы, химиотерапевтические препараты ингибируют спонтанную и направленную миграцию лейкоцитов [21].

В связи с поражением лейкоэмической линии кроветворения у больных ОМЛ ключевую роль в поддержании их иммунного статуса выполняют лимфоциты. Проведенное исследование позволило установить, что как во время лечения, так и при развитии рецидива болезни увеличиваются жесткость и заряд клеточной поверхности. Выявленные изменения механических и электрических свойств поверхности лимфоцитов мы связываем с развитием реакций интоксикации во время лечения и запуском целого спектра регуляторных реакций цитокинового каскада при развитии рецидива болезни. В литературе представлены данные,

согласно которым применение различных протоколов лечения сопровождается развитием токсических реакций в организме [22]. Ряд исследователей отмечают увеличение концентрации таких цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α бластными клетками миелоидного ряда у больных ОМЛ [23–25]. Исследователи полагают, что ИЛ-6 индуцирует избыточную пролиферацию клеток миеломы, при условии наличия рецепторов на клеточной поверхности к этому цитокину [26].

Важно отметить, что исследование подобного рода, в котором измерены силы межклеточной адгезии между клетками крови, выполнено впервые и в литературе не представлено. Традиционно исследователи публикуют данные, описывающие механизмы взаимодействия лейкоцитов с компонентами внеклеточного матрикса, поскольку данный феномен играет решающую роль в экстравазии лейкоцитов в очаги воспаления. Нами предпринята попытка изучить силы адгезии между нормальными популяциями клеточных линий разных ростков кроветворения и аномальной субпопуляцией лейкоэмического клона. В результате проведенного исследования установлена низкая сила адгезии между лимфоцитами и гранулоцитами, лимфоцитами и эритроцитами как во время лечения, так и при развитии рецидива болезни. Нарушение взаимодействий между гранулоцитарным и лимфоцитарным звеном на различных стадиях болезни является прямым доказательством угнетения иммунных реакций и нарушения клеточных событий между врожденным и адаптивным иммунитетом, вследствие чего иммунный статус больных существенно ослаблен. Вместе с тем сила адгезии между лимфоцитами и тромбоцитами возросла в 1,4 раза по сравнению с контролем. Можно предположить, что установленный факт тесного взаимодействия между лимфоцитом и тромбоцитом является важным звеном в запуске адаптивного иммунитета при «аварийных» ситуациях в системе крови, когда «не работают» механизмы врожденного иммунитета. Известно участие тромбоцитов и

нейтрофилов в патогенезе тяжелого сепсиса. Основным механизмом данного процесса является TLR4-зависимые взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов, приводящие к активации нейтрофилов и формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек для бактерий, при этом нейтрофилы погибают по механизму нетоза [27]. Можно предположить, что в условиях развития ОМЛ, когда поражается звено лейкоцитов, тромбоциты выступают ключевым посредником в активации лимфоцитов. Однако данное предположение требует детальных исследований. В силу объективных причин нам не удалось измерить силу адгезии между лимфоцитом и тромбоцитом на стадии рецидива болезни.

Таким образом, проведенное среди больных ОМЛ исследование установило: развитие в системе крови анемического синдрома, лейкопении и сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону мононуклеаров; наличие в перифе-

рической крови аномальных бластных форм миелоидного ряда пролиферации; снижение миграционной активности лейкоцитов; изменение функциональных параметров клеточной поверхности лимфоцитов – увеличение жесткости и заряда во время лечения и при развитии рецидива болезни; усиление межклеточных контактов между лимфоцитами и тромбоцитами, уменьшение силы адгезии в системах «лимфоцит–гранулоцит», «лимфоцит–эритроцит» во время лечения и при развитии рецидива болезни.

Полученные результаты имеют важное теоретическое значение в плане изучения механизмов поддержания иммунного статуса у больных с миелобластным типом пролиферации, а также практическое значение, связанное с поиском эффективных схем лечения, направленных на сохранение функциональных свойств клеточной поверхности лимфоидного ростка кроветворения.

Список литературы

1. *Ichikawa M., Kurokawa M.* Molecular Mechanism in the Development of Acute Myeloid Leukemia // *Nihon Rinsho*. 2009. Vol. 67, № 10. P. 1889–1893.
2. *Altman J.K., Sassano A., Plataniias L.C.* Targeting mTOR for the Treatment of AML. New Agents and New Directions // *Oncotarget*. 2011. Vol. 2. P. 510–517.
3. *Chen W., Drakos E., Grammatikakis I., Schlette E.J., Li J., Leventaki V., Staikou-Drakopoulou E., Patsouris E., Panayiotidis P., Medeiros L.J., Rassidakis G.Z.* mTOR Signaling Is Activated by FLT3 Kinase and Promotes Survival of FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia Cells // *Mol. Cancer*. 2010. Vol. 9. P. 292.
4. *Min Y.H., Eom J.I., Cheong J.W., Maeng H.O., Kim J.Y., Jeung H.K., Lee S.T., Lee M.H., Hahn J.S., Ko Y.W.* Constitutive Phosphorylation of Akt/PKB Protein in Acute Myeloid Leukemia: Its Significance as a Prognostic Variable // *Leukemia*. 2003. Vol. 17, № 5. P. 995–997.
5. *Антонов В.Г., Козлов В.К.* Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности // *Цитокины и воспаление*. 2004. Т. 3, № 1. С. 8–19.
6. *Плотникова С.В.* Прогностическая значимость маркеров системного воспаления при острых лейкозах: дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2015. 143 с.
7. *Chaplin D.D.* Overview of the Immune Response // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. Vol. 125, № 2, suppl. 2. P. 3–23.
8. *Тумов В.Н.* Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогены) как причина воспаления // *Клин. лаб. диагностика*. 2004. № 5. С. 3–10.
9. *Döhner D., Estey E.H., Amadori S., Appelbaum F.R., Büchner T., Burnett A.K., Dombret H., Fenaux P., Grimwade D., Larson R.A., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G.J., Sanz M.A., Sierra J., Tallman M.S., Löwenberg B., Bloomfield C.D.* Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Adults: Recommendation from an International Expert Panel, on Behalf of the European LeukemiaNet // *Blood*. 2010. Vol. 115, № 3. P. 453–474.

10. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Титова Н.Д. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация. Витебск: ВГМУ, 2006. 198 с.
11. Capella B., Dieter G. Force-Distance Curves by Atomic Force Microscopy // Surf. Sci. Rep. 1999. Vol. 34, № 1–3. P. 1–104.
12. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина // Биофизика. 2014. Т. 59, вып. 2. С. 310–313.
13. Benoit M., Gaub H.E. Measuring Cell Adhesion Forces with the Atomic Force Microscope at the Molecular Level // Cells Tissues Organs. 2002. Vol. 172, № 3. P. 174–189.
14. Grandbois M., Dettmann W., Benoit M., Gaub H.E. Affinity Imaging of Red Blood Cells Using an Atomic Force Microscope // J. Histochem. Cytochem. 2000. Vol. 48, № 5. P. 719–724.
15. Способ определения упругости клеток крови: пат. 2466401 Рос. Федерация, МПК G01N33/49 / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Н.А. Забияков, Е.А. Сладкова; заявитель и патентообладатель Белгород. гос. нац. исслед. ун-т. Заявка № 2011109741 от 15.03.2011.
16. Способ регистрации поверхностного заряда эритроцитов: пат. 2027188 Рос. Федерация, МПК G01N33/49 / Ю.А. Шереметев, Г.И. Макин, Ф.Ю. Суслов; заявитель и патентообладатель Нижегород. с.-х. ин-т. Заявка № 4947820/14 от 26.04.1991.
17. Способ изготовления биомеханического сенсора для измерения сил адгезии в системе «клетка–клетка»: пат. 2627455 Рос. Федерация, МПК G01N33/49, G01N33/48 / Е.А. Шамрай, М.Ю. Скоркина; заявитель и патентообладатель Белгород. гос. нац. исслед. ун-т. Заявка № 2016103153 от 01.02.2016.
18. Казанцева И.А. Патология митоза в опухолях человека. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1981. 144 с.
19. Pouls R.K., Shatmoon R.P., Muhammed N.S. Clinical and Haematological Parameters in Adult AML Patients: A Four Year Experience at Nanakaly Hospital for Blood Diseases // Zanco J. Med. Sci. 2012. Vol. 16, № 3. P. 199–203.
20. Клочкова Г.Н., Беляева С.С., Тикунова Т.С. Гематологические показатели системы крови больных лейкозом // Науч. результат. Сер.: Физиология. 2016. Т. 2, № 2. С. 34–40. URL: http://trphysiology.ru/media/physiology/2016/2/Phys_N282016.6.pdf (дата обращения: 24.01.2018).
21. MacFadden D.K., Saito S., Pruzanski W. The Effect of Chemotherapeutic Agents on Chemotaxis and Random Migration of Human Leukocytes // J. Clin. Oncol. 1985. Vol. 3, № 3. P. 415–419.
22. Паровничикова Е.Н., Савченко В.Г., Клясова Г.А., Исаев В.Г., Куликов С.М., Устинова Е.Н. и др. Токсичность различных протоколов лечения острых миелоидных лейкозов взрослых: результаты четырех российских многоцентровых исследований // Терапевт. арх. 2010. Т. 82, № 7. P. 5–11.
23. Tsimberidou A.M., Estey E., Wen S., Pierce S., Kantarjian H., Albitar M., Kurzrock R. The Prognosis Significance of Cytokine Levels in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndromes // Cancer. 2008. Vol. 113, № 7. P. 1605–1613.
24. Kupsa T., Horacek J.M., Jebavy L. The Role of Cytokines in Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review // Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 2012. Vol. 156, № 4. P. 291–301.
25. Sanchez-Correa B., Bergua J.M., Campos C., Gayoso I., Arcos M.J., Bañas H., Morgado S., Casado J.G., Solana R., Tarazona R. Cytokine Profiles in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis: Survival Is Inversely Correlated with IL-6 and Directly Correlated with IL-10 Levels // Cytokine. 2013. Vol. 61, № 3. P. 885–891.
26. Lautz V.M. A Review of the Cytokine Network in Multiple Myeloma: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications // Cancer. 2003. Vol. 97, № 10. P. 2440–2452.
27. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps Ensnare Bacteria in Septic Blood // Nat. Med. 2007. Vol. 13, № 4. P. 463–469.

References

1. Ichikawa M., Kurokawa M. Molecular Mechanism in the Development of Acute Myeloid Leukemia. *Nihon Rinsho*, 2009, vol. 67, no. 10, pp. 1889–1893.
2. Altman J.K., Sassano A., Platanius L.C. Targeting mTOR for the Treatment of AML. New Agents and New Directions. *Oncotarget*, 2011, vol. 2, no. 6, pp. 510–517.
3. Chen W., Drakos E., Grammatikakis I., Schlette E.J., Li J., Leventaki V., Staikou-Drakopoulou E., Patsouris E., Panayiotidis P., Medeiros L.J., Rassidakis G.Z. mTOR Signaling Is Activated by FLT3 Kinase and Promotes Survival of FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia Cells. *Mol. Cancer*, 2010, vol. 9, p. 292.

4. Min Y.H., Eom J.I., Cheong J.W., Maeng H.O., Kim J.Y., Jeung H.K., Lee S.T., Lee M.H., Hahn J.S., Ko Y.W. Constitutive Phosphorylation of Akt/PKB Protein in Acute Myeloid Leukemia: Its Significance as a Prognostic Variable. *Leukemia*, 2003, vol. 17, no. 5, pp. 995–997.
5. Antonov V.G., Kozlov V.K. Patogenez onkologicheskikh zabolevaniy: immunnye i biokhimicheskie fenomeny i mekhanizmy. Vnekletochnye i kletochnye mekhanizmy obshchey immunodepressii i immunnoy rezistentnosti [Pathogenesis of Oncologic Diseases: Immune and Biochemical Phenomena and Mechanisms. Extracellular and Cellular Mechanisms of General Immunodepression and Immune Resistance]. *Tsitokiny i vospalenie*, 2004, vol. 3, no. 1, pp. 8–19.
6. Plotnikova S.V. *Prognosticheskaya znachimost' markerov sistemnogo vospaleniya pri ostrykh leykozakh* [Prognostic Value of Systemic Inflammation Markers in Acute Leukemia]. Ufa, 2015. 143 p.
7. Chaplin D.D. Overview of the Immune Response. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, vol. 125, no. 2, suppl. 2, pp. 3–23.
8. Titov V.N. Ekzogennyye i endogennyye patologicheskie faktory (patogeny) kak prichina vospaleniya [Exogenous and Endogenous Pathological Factors (Pathogens) as a Cause of Inflammation]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2004, no. 5, pp. 3–10.
9. Döhner D., Estey E.H., Amadori S., Appelbaum F.R., Büchner T., Burnett A.K., Dombret H., Fenaux P., Grimwade D., Larson R.A., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G.J., Sanz M.A., Sierra J., Tallman M.S., Löwenberg B., Bloomfield C.D. Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Adults: Recommendation from an International Expert Panel, on Behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 3, pp. 453–474.
10. Novikov D.K., Novikov P.D., Titova N.D. *Immunokorreksiya, immunoprofilaktika, immunoreabilitatsiya* [Immunocorrection, Immunoprophylaxis, Immunorehabilitation]. Vitebsk, 2006. 198 p.
11. Capella B., Dieter G. Force-Distance Curves by Atomic Force Microscopy. *Surf. Sci. Rep.*, 1999, vol. 34, no. 1–3, pp. 1–104.
12. Sladkova E.A., Skorkina M.Yu. Estimation of Surface Potential of Lymphocytes from Patients with Leukemia Using Kelvin Probe Mode. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 254–256.
13. Benoit M., Gaub H.E. Measuring Cell Adhesion Forces with the Atomic Force Microscope at the Molecular Level. *Cells Tissues Organs*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 174–189.
14. Grandbois M., Dettmann W., Benoit M., Gaub H.E. Affinity Imaging of Red Blood Cells Using an Atomic Force Microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, 2000, vol. 48, no. 5, pp. 719–724.
15. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. *Sposob opredeleniya uprugosti kletok krovi* [Method for Determining Blood Cell Elasticity]. Patent RF no. 2466401, 2011.
16. Sheremetev Yu.A., Makin G.I., Suslov F.Yu. *Sposob registratsii poverkhnostnogo zaryada eritrotsitov* [Method for Recording the Surface Charge of Erythrocytes]. Patent RF no. 2027188, 1991.
17. Shamray E.A., Skorkina M.Yu. *Sposob izgotovleniya biomekhanicheskogo sensora dlya izmereniya sil adgezii v sisteme "kletka-kletka"* [Method for Manufacturing a Biomechanical Sensor for Measurement of Adhesion Forces in a Cell–Cell System]. Patent RF no. 2627455, 2016.
18. Kazantseva I.A. *Patologiya mitozov v opukholyakh cheloveka* [Pathology of Mitosis in Human Tumours]. Novosibirsk, 1981. 144 p.
19. Pouls R.K., Shamoan R.P., Muhammed N.S. Clinical and Haematological Parameters in Adult AML Patients: A Four Year Experience at Nanakaly Hospital for Blood Diseases. *Zanco J. Med. Sci.*, 2012, vol. 16, no. 3, pp. 199–203.
20. Klochkova G.N., Belyaeva S.S., Tikunova T.S. Gematologicheskie pokazateli sistemy krovi bol'nykh leykozom [Haematological Parameters of Blood System in the Patients with Leucosis]. *Nauchnyy rezul'tat. Ser.: Fiziologiya*, 2016, vol. 2, no. 2, pp. 34–40. Available at: http://rrphysiology.ru/media/physiology/2016/2/Phys_N282016.6.pdf (accessed 24 January 2018).
21. MacFadden D.K., Saito S., Pruzanski W. The Effect of Chemotherapeutic Agents on Chemotaxis and Random Migration of Human Leukocytes. *J. Clin. Oncol.*, 1985, vol. 3, no. 3, pp. 415–419.
22. Parovichnikova E.N., Savchenko V.G., Klyasova G.A., Isaev V.G., Sokolov A.N., Kulikov S.M., Ustinova E.N., et al. Toksichnost' razlichnykh protokolov lecheniya ostrykh mieloidnykh leykozov vzroslykh: rezul'taty chetyrekh rossiyskikh mnogotsentrovnykh issledovaniy [Toxicity of Different Treatment Protocols for Acute Myeloid Leukemias in Adults: The Result of Four Russian Multicenter Studies]. *Terapevticheskiy arkhiv*, 2010, vol. 82, no. 7, pp. 5–11.
23. Tsimberidou A.M., Estey E., Wen S., Pierce S., Kantarjian H., Albitar M., Kurzrock R. The Prognosis Significance of Cytokine Levels in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *Cancer*, 2008, vol. 113, no. 7, pp. 1605–1613.

24. Kupsa T., Horacek J.M., Jebavy L. The Role of Cytokines in Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, 2012, vol. 156, no. 4, pp. 291–301.

25. Sanchez-Correa B., Bergua J.M., Campos C., Gayoso I., Arcos M.J., Bañas H., Morgado S., Casado J.G., Solana R., Tarazona R. Cytokine Profiles in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis: Survival Is Inversely Correlated with IL-6 and Directly Correlated with IL-10 Levels. *Cytokine*, 2013, vol. 61, no. 3, pp. 885–891.

26. Lauta V.M. A Review of the Cytokine Network in Multiple Myeloma: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications. *Cancer*, 2003, vol. 97, no. 10, pp. 2440–2452.

27. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps Ensnare Bacteria in Septic Blood. *Nat. Med.*, 2007, vol. 13, no. 4, pp. 463–469.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.1.85

*Elena A. Shamray**, *Marina Yu. Skorkina**, *Evgeniya A. Sladkova**, *Ol'ga V. Syrovatskaya**

*Belgorod National Research University
(Belgorod, Russian Federation)

LYMPHOCYTE FUNCTIONAL PROPERTIES DURING THE DEVELOPMENT OF MYELOPROLIFERATIVE PROCESSES IN THE BLOOD SYSTEM

The development of acute myeloblastic leukemia (AML) leads to dysfunction of the cellular components of the innate immune system; however, a population of normal lymphocytes is preserved in the bloodstream. These white blood cells are key participants of the adaptive immune system, but their functional activity remains poorly studied. Thus, the research aimed to investigate the functional properties of the lymphocyte cell surface (stiffness, charge, and adhesive properties) in patients with malignant proliferation of the myeloid line of the blood system. Various scanning modes of atomic force microscopy were used to study the micro- and nanomechanical properties of the cell surface, measure Young's modulus, characterizing its stiffness, as well as the charge of the cell membrane, and adhesion forces between the cells. The research found that the stiffness and potential of the cell surface of lymphocyte subpopulation during treatment increased by 128 % ($p < 0.05$) and 12 % ($p < 0.05$), respectively, compared with the control. Further, intercellular interactions between lymphocytes and platelets were studied: during the treatment, the adhesive strength between them increased by 37 % ($p < 0.05$), compared with the control. Patients at the stages of treatment and relapse had similar functional properties of the cell surface and cellular responses. The results obtained are of theoretical importance for the study of biophysical properties of the surface of immune cells. In practice, the paper can contribute to the search for effective treatment regimens aimed at preserving the functional properties of the cell surface of the lymphoid line of haematopoiesis.

Keywords: *lymphocytes, acute myeloblastic leukemia, Young's modulus, lymphocyte surface potential, cell adhesion force, leukocyte migration.*

Поступила 09.03.2017
Received 9 March 2017

Corresponding author: Elena Shamray, address: ul. Studencheskaya 14, Belgorod, 308007, Russian Federation; e-mail: elenashamray@yandex.ru

For citation: Shamray E.A., Skorkina M.Yu., Sladkova E.A., Syrovatskaya O.V. Lymphocyte Functional Properties During the Development of Myeloproliferative Processes in the Blood System. *Journal of Medical and Biological Research*, 2018, vol. 6, no. 1, pp. 85–94. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.1.85