

**МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ
ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В СИСТЕМЕ КРОВИ**

*Е.А. Шамрай**, *М.Ю. Скоркина**, *Е.А. Сладкова**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет (г. Белгород)

Важное место среди патофизиологических состояний в системе крови занимают хронические миелопролиферативные заболевания. Их развитие с ранних этапов сопровождается изменением структурно-функциональных свойств лимфоцитов. Цель данной работы – изучить упруго-эластические и адгезивные свойства лимфоцитов здоровых людей и больных хроническим миелобластным лейкозом на стадиях лечения и рецидива. Получены новые данные о функциональных свойствах нормальных и трансформированных лимфоцитарных клеток. Результаты исследования показали, что у больных на стадии лечения жесткость клеточной поверхности увеличена в 2,8 раз, при этом адгезия в системах «лимфоцит–лейкоцит», «лимфоцит–эритроцит» уменьшилась соответственно на 33,7 и 38,5 % ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми людьми. В группе больных хроническим миелобластным лейкозом на стадии рецидива болезни жесткость плазмалеммы была увеличена в 2 раза, однако сила адгезии в системе «лимфоцит–лейкоцит» повысилась на 5,2 % ($p < 0,05$), а в системе «лимфоцит–эритроцит» – снизилась на 10,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Вследствие увеличения жесткости поверхности при развитии хронических миелопролиферативных заболеваний клетки не способны деформироваться при прохождении через мелкие капилляры, что приводит к снижению двигательной активности лимфоцитов и может провоцировать повреждения в системе микроциркуляции крови при их перемещении по сосудам. Нарушения адгезивных взаимодействий обуславливают изменения инвазивного потенциала клеток. Таким образом, полученные данные имеют практическое значение для диагностики цитологических нарушений и прогноза течения заболевания.

Ключевые слова: лимфоциты, хронический миелобластный лейкоз, упруго-эластические свойства клеточной поверхности, адгезия лимфоцитов, атомно-силовая микроскопия, биосенсорный чип.

Хронические миелопролиферативные заболевания в системе крови сопровождаются перестройками генетического аппарата, трансформацией морфологии и изменением двигательной активности клеток. В основе этих процессов лежат взаимосвязанные перестройки

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. Механические свойства лимфоцитов при развитии хронических миелопролиферативных процессов в системе крови // Журн. мед.-биол. исследований. 2017. Т. 5, № 3. С. 87–92. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2017.5.3.87

элементов цитоскелета, нарушения адгезивных взаимодействий клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом [1].

При развитии данных заболеваний происходит неконтролируемое увеличение количества миелоидных клеток-предшественников в системе гемопоэза с вовлечением клеток миелоидного, эритроидного, мегакариоцитарного и лимфоидного рядов. Реализуется механизм связи субпопуляций лимфоцитов с иммунофенотипическими особенностями миелобластов, обусловленный взаимодействием между молекулами CD7 и HLA-DR, расположенными на поверхности плазмалеммы миелобластов, и рецепторами лимфоцитарных клеток [2]. Увеличивается роль клеток лимфоцитарного ряда в обеспечении иммунного ответа. В частности, повышается уровень CD3⁺ лимфоцитов, что является компенсаторной реакцией клеточного иммунитета на фоне недостаточности гуморального. Одновременно снижаются функция нейтрофилов и их адаптационный резерв. В крови уменьшается число NK-клеток, отвечающих за противоопухолевый иммунитет, и снижается концентрация иммуноглобулинов Ig A и Ig M [3].

Одним из распространенных видов миелопролиферативных заболеваний в системе крови является хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ). Разные стадии протекания ХМЛ – лечение и рецидив – сопровождаются специфическими изменениями структуры и свойств клеточной поверхности лимфоцитов [4]. При трансформации неопластических клеток во время развития ХМЛ происходит перестройка элементов цитоскелета, ведущая к образованию атипичных глобулярных структур на поверхности плазмалеммы [5] и снижению ее упругости [6], что способствует нарушению функциональной активности клеток крови.

Цель данной работы – изучить упруго-эластические и адгезивные свойства лимфоцитов здоровых людей и больных ХМЛ на стадии лечения и рецидива.

Материалы и методы. Экспериментальному исследованию подвергали лимфоциты, выделенные из цельной крови больных ХМЛ

на стадиях лечения ($n = 4$) и рецидива болезни ($n = 4$) в возрасте от 17 до 46 лет. В качестве контроля использовали кровь здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет ($n = 10$). Человеческую кровь собирали путем венопункции в гепаринизированные вакуумные пробирки с участием специализированного медицинского персонала. Разделяли клетки крови на лимфоциты и эритроциты путем центрифугирования в течение 5 мин при 1500 об./мин при помощи микроцентрифуги BB3V («Jouan», Франция, 2008). Для проверки жизнеспособности лимфоцитов проводили окраску клеточной суспензии 0,4 %-м раствором трипанового синего в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,2–7,3) и последующий подсчет погибших форм в камере Горяева с использованием светового микроскопа «AxioStar plus» для морфологии («Carl Zeiss», Германия, 2010). Жизнеспособность клеток в экспериментальном исследовании составила не менее 95 %.

Механические свойства поверхности клеток исследовали на атомно-силовом микроскопе «Интегра Вита» (NT-MDT, г. Зеленоград, 2009). Для оценки упруго-эластических свойств лимфоцитов готовили суспензионные образцы крови из каждой пробы. Суспензию лимфоцитов наносили на чистые обезжиренные стеклянные подложки. Измеряли общую жесткость клетки с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG11 [7]. Жесткость клеток, количественно характеризующуюся модулем Юнга, оценивали по экспериментальным силовым кривым, снятым с поверхности лимфоцитов при проведении процедуры силовой спектроскопии. Измерения модуля Юнга проводили на 15 клетках из каждой серии пробоподготовки [8]. Таким образом, общее число выполненных измерений в группе больных ХМЛ на стадии лечения равно 60, при развитии рецидива болезни – 60, в контрольной группе – 150.

Для измерения межмолекулярных сил адгезии в системе «клетка–клетка» использовали биосенсорный чип, изготовленный на осно-

ве нативного лимфоцита и типлесса CSG11 согласно разработанному нами способу [9]. Адгезию измеряли в системах «лимфоцит–лейкоцит» и «лимфоцит–эритроцит», регистрируя силовые кривые с поверхности 15 лейкоцитарных клеток и 15 эритроцитов. Общее число выполненных измерений в системе «лимфоцит–лейкоцит» в группе больных ХМЛ на каждой стадии (лечения и рецидива) равно 60, в контрольной группе – 150. Общее число выполненных измерений в системе «лимфоцит–эритроцит» аналогично числу измерений, выполненных в системе «лимфоцит–лейкоцит».

Силу адгезии рассчитывали с помощью программного обеспечения «Nova» (Россия), согласно закону Гука:

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

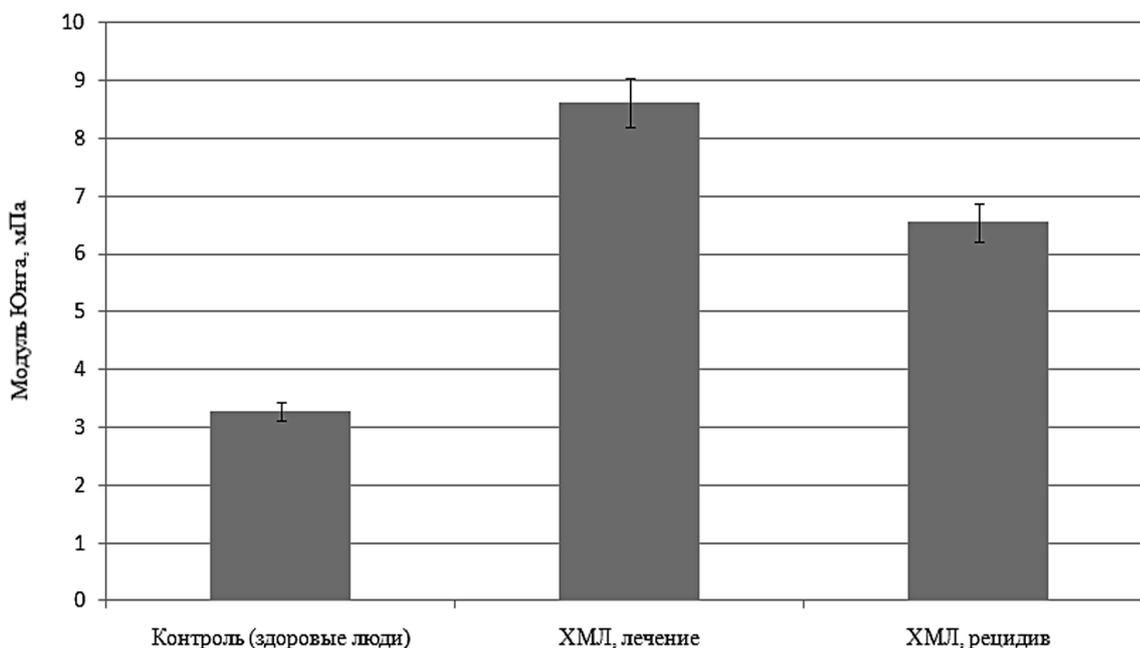
где F – сила адгезии, нН; k – жесткость кантилевера, Н/м; $\Delta Height$ – изменение длины пьезотрубки сканера в направлении Z , нм.

Результаты экспериментального исследования 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. Проведенный эксперимент выявил различия в упруго-эластических свойствах поверхности лимфоцитов между группами здоровых людей и больных ХМЛ на различных стадиях течения болезни (см. рисунок).

Как видно из представленных данных, жесткость поверхности лимфоцитов у больных ХМЛ существенно возросла: модуль Юнга увеличился на стадии лечения на 162,8 % ($p < 0,05$), а во время рецидива – на 99,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В группе больных ХМЛ на стадиях лечения и рецидива наблюдались изменения в силе меж-



Жесткость поверхности лимфоцитов у здоровых людей и больных хроническим миелобластным лейкозом на различных стадиях течения болезни (значимость различий по t -критерию Стьюдента $p < 0,05$)

клеточной адгезии по сравнению с контролем (см. таблицу).

нию межклеточной адгезии. Кроме того, установлена поляризация элементов цитоскелета

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

Группа	Сила адгезии, нН, в системе	
	«лимфоцит–лейкоцит»	«лимфоцит–эритроцит»
Контроль (здоровые люди)	75,6±1,1	46,5±0,9
ХМЛ, лечение	50,1±0,6*	28,6±0,6*
ХМЛ, рецидив	79,5±1,0*	41,7±0,7*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями в контрольной группе и группе больных по U-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$).

В группе здоровых людей сила адгезии в системе «лимфоцит–лейкоцит» на 38,5 % ($p < 0,05$) превышала аналогичный показатель между лимфоцитом и эритроцитом. У больных ХМЛ на стадии лечения сила адгезии между лимфоцитом и лейкоцитом снизилась на 33,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых людей, на стадии рецидива болезни сила адгезии между этими клетками была повышена на 5,2 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Сила адгезии между лимфоцитом и эритроцитом снизилась у больных ХМЛ на стадии лечения (на 38,5 %; $p < 0,05$) и рецидива (на 10,3 %; $p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых людей.

Обсуждение. Выявленные изменения в адгезивной способности клеток могут быть связаны с особенностями морфологии и рельефа поверхности клеток. Так, согласно полученным нами ранее данным [10] при развитии рецидива на поверхности клеток возникают множественные длинные и широкие глобулярные структуры, что может способствовать увеличе-

в клетках, сопровождаемая частичным или полным разрушением нитей актина у больных ХМЛ [11].

Таким образом, лимфоцитарные клетки больных ХМЛ характеризуются значительным увеличением жесткости поверхности на всех стадиях развития заболевания. Сила адгезии между лимфоцитами и лейкоцитами существенно снижается в 1,5 раза на стадии лечения болезни и возрастает при развитии рецидива. В системе «лимфоцит–эритроцит» сила адгезии снижена как на стадии лечения, так и на стадии рецидива.

Полученные результаты могут быть использованы в качестве объективных маркеров патофизиологических состояний в системе крови, в т. ч. на ранних стадиях развития болезни и на стадии рецидива. Установленные экспериментальные данные имеют практическое значение и позволяют оценить свойства клеток в норме и при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови, например лейкоза.

Список литературы

1. Копнин Б.П. Неопластическая клетка. Основные свойства и механизмы их возникновения // *Практ. онкология*. 2002. Т. 3, № 4. С. 229–235.
2. Колбацкая О.П., Тупицын Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных острыми лейкозами в период диагностики заболевания // *Иммунология*. 2012. Т. 33, № 2. С. 77–82.
3. Гранкина Е.А. Характеристика иммунного статуса больных хроническим миелолейкозом // *Рос. иммунол. журн.* 2012. Т. 6(15), № 3. С. 304–306.
4. Казарян П.А., Дагбашян С.С., Галоян А.А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний // *Национальная академия наук Армении: докл.* 2011. Т. 111, № 1. С. 59–68.

5. Голованов М.В., Долтчинкова В. Структура и некоторые свойства гликокаликса лейкоцитов и лейкемических клеток // Вестн. Рос. онкол. науч. центра им. Н.Н. Блохина РАМН. 2002. Т. 13, № 1. С. 13–16.
6. Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U.H., Deryugina E.I., Strongin A.Y., Bröcker E.-B., Friedl P. Compensation Mechanism in Tumor Cell Migration: Mesenchymal–Amoeboid Transition After Blocking of Pericellular Proteolysis // *Cell Biol.* 2003. Vol. 160, № 2. P. 267–277.
7. 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.
8. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Muravyov A.V., Sladkova E.A. The Use of Nanomechanical Sensor for Studies of Morphofunctional Properties of Lymphocytes from Healthy Donors and Patients with Chronic Lymphoblastic Leukemia // *Cell Technol. Biol. Med.* 2012. № 3. P. 163–166.
9. 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.
10. Шамрай Е.А., Рядинская А.Г., Беляева С.С. Упруго-эластические свойства и рельеф поверхности лимфоцитов больных острым и хроническим миелобластным лейкозом // Науч. результат. Сер.: Физиология. 2016. Т. 2, № 1(7). С. 23–26.
11. Gatfield J., Albrecht I., Zanolari B., Steimetz M.O., Pieters J. Association of the Leukocyte Plasma Membrane with the Actin Cytoskeleton Through Coiled Coil-Mediated Trimeric Coronin 1 Molecules // *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 16, № 6. P. 2786–2798.

References

1. Kopnin B.P. Neoplasticheskaya kletka. Osnovnye svoystva i mekhanizmy ikh vozniknoveniya [Neoplastic Cell: Main Properties and Mechanisms of Their Emergence]. *Prakticheskaya onkologiya*, 2002, vol. 3, no. 4, pp. 229–235.
2. Kolbatskaya O.P., Tupitsyn N.N. Subpopulyatsii limfotsitov kostnogo mozga u bol'nykh ostrymi leykozami v period diagnostiki zabolevaniya [Subpopulations of Bone Marrow Lymphocytes in Patients with Acute Leukemia During the Diagnostic Period]. *Immunologiya*, 2012, vol. 33, no. 2, pp. 77–82.
3. Grankina E.A. Kharakteristika immunnogo statusa bol'nykh khronicheskimi mieloleykozom [The Immune Status in Patients with Chronic Myeloid Leukemia]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 304–306.
4. Kazaryan P.A., Dagbashyan S.S., Galoyan A.A. Membrannyye aspekty patogeneza i terapii limfoproliferativnykh zabolevaniy [Membranous Aspects of Pathogenesis and Therapy at Lymphoproliferative Diseases]. *Natsional'naya akademiya nauk Armenii: doklady*, 2011, vol. 111, no. 1, pp. 59–68.
5. Golovanov M.V., Doltchinkova V. Struktura i nekotorye svoystva glikokaliksa leykotsitov i leykemicheskikh kletok [Structure and Some Properties of Leukocyte and Leukemic Cell Glycocalyx]. *Vestnik Rossiyskogo onkologicheskogo nauchnogo tsentra im. N.N. Blokhina RAMN*, 2002, vol. 13, no. 1, pp. 13–16.
6. Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U.H., Deryugina E.I., Strongin A.Y., Bröcker E.-B., Friedl P. Compensation Mechanism in Tumor Cell Migration: Mesenchymal–Amoeboid Transition After Blocking of Pericellular Proteolysis. *Cell Biol.*, 2003, vol. 160, no. 2, pp. 267–277.
7. 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.
8. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Muravyov A.V., Sladkova E.A. The Use of Nanomechanical Sensor for Studies of Morphofunctional Properties of Lymphocytes from Healthy Donors and Patients with Chronic Lymphoblastic Leukemia. *Cell. Technol. Biol. Med.*, 2012, no. 3, pp. 163–166.
9. 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.
10. Shamray E.A., Ryadinskaya A.G., Belyaeva S.S. Uprugo-elasticheskie svoystva i rel'ef poverkhnosti limfotsitov bol'nykh ostrymi i khronicheskimi mieloblastnymi leykozom [Elastic Properties and Surface Topography of Lymphocytes in Patients with Acute and Chronic Myeloblast Leucosis]. *Nauchnyy rezul'tat. Ser.: Fiziologiya*, 2016, vol. 2, no. 1, pp. 23–26.

11. Gatfield J., Albrecht I., Zanolari B., Steimetz M.O., Pieters J. Association of the Leukocyte Plasma Membrane with the Actin Cytoskeleton Through Coiled Coil-Mediated Trimeric Coronin 1 Molecules. *Mol. Biol. Cell*, 2005, vol. 16, no. 6, pp. 2786–2798.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2017.5.3.87

*Elena A. Shamray**, *Marina Yu. Skorkina**, *Evgeniya A. Sladkova**

*Belgorod National Research University (Belgorod, Russian Federation)

LYMPHOCYTE MECHANICAL PROPERTIES DURING THE DEVELOPMENT OF CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE PROCESSES IN THE BLOOD SYSTEM

Chronic myeloproliferative diseases occupy an important place among pathophysiological conditions of the circulatory system. Their progress from the early stages is accompanied by changes in lymphocyte structural and functional properties. This paper aimed to study the elastic and adhesive properties of lymphocytes in healthy individuals and patients with chronic myelogenous leukaemia at the stages of treatment and relapse. New data on the functional properties of normal and abnormal lymphocyte cells were obtained. The results of the study showed that in patients at the treatment stage the stiffness of the cell surface increased by a factor of 2.8, while adhesion in the “lymphocyte–leukocyte” and “lymphocyte–erythrocyte” systems decreased by 33.7 % and 38.5 % ($p < 0.05$), respectively, compared with healthy subjects. In patients with chronic myelogenous leukaemia at the relapse stage, the stiffness of the plasma membrane doubled, while the adhesive strength in the “lymphocyte-leukocyte” system increased by 5.2 % ($p < 0.05$), and in the “lymphocyte-erythrocyte” system it decreased by 10.3 % ($p < 0.05$), compared with the control. Due to increased rigidity of their surface during the development of chronic myeloproliferative diseases, the cells are unable to change their form when passing through small capillaries, which results in lower motor activity of lymphocytes and can damage the microcirculation system as they move through the vessels. Disturbed adhesive interactions change the cell invasive potential. Thus, the obtained data are of practical importance for the diagnosis of cytological disorders and prognosis of the course of the disease.

Keywords: *lymphocytes, chronic myelogenous leukaemia, lymphocyte elastic properties, lymphocyte adhesion, atomic force microscopy, biosensor chip.*

Поступила 22.12.2016
Received 22 December 2016

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. Lymphocyte Mechanical Properties During the Development of Chronic Myeloproliferative Processes in the Blood System. *Journal of Medical and Biological Research*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 87–92. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2017.5.3.87