

УДК 576.08

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-4-14-19

Сладкова Е.А.,
Шамрай Е.А.,
Кротова Е.Е.,
Селиверстов Е.С.,
Быльченко А.А.,
Скоркина М.Ю.

ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПИИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Аннотация

Методом атомно-силовой микроскопии установлены изменения структуры, механических свойств и потенциала поверхности лимфоцитов больных острым миелобластным лейкозом под действием химиотерапии. Лимфоциты больных миелолейкозом после лечения несут на своей поверхности глобулярные структуры, при этом жесткость плазмалеммы и ее потенциал возрастают. Кроме того, деполаризованные жесткие лимфоциты, подвергшиеся воздействию химиотерапии, обладают сниженной локомоторной активностью.

Ключевые слова: лимфоцит; миелолейкоз; потенциал поверхности; рельеф поверхности; механические свойства; химиотерапия

Sladkova E.A.,
Shamray E.A.,
Krotova E.E.,
Seliverstov E.S.,
Bylchenko A.A.,
Skorkina M.Yu

EFFECTS OF CHEMOTHERAPY ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUCOSIS

Abstract

Using the atomic force microscopy, there were revealed some changes in the structure, mechanical properties and surface charge of the lymphocytes of patients with acute myeloid leucosis under the effect of chemotherapy. The lymphocytes' surface of patients with acute myeloid leucosis have globular structures, and plasmalemmas' rigidity and potential increase after treatment. In addition, the depolarized hard cells exposed to chemotherapy have a reduced locomotor activity.

Key words: lymphocyte; leucosis; surface charge; topography; mechanical properties; chemotherapy

Опухолевый процесс в кроветворной ткани приводит к нарушению не только функционирования поврежденного ростка, но оказывает негативное воздействие и на другие популяции клеток крови. Вместе с тем, основополагающим принципом терапии лейкозов является применение лекарственных препаратов с целью воздействия непосредственно на лейкемический клон. Однако не редки случаи формирования резистентности клеток к химиотерапии, что указывает на включение клеточных механизмов, способствующих выживанию клеток [10]. Так же, не исключена возможность развития новой устойчивой к химиотерапии популяции клеток с неспецифическими функциональными свойствами [5]. В подобных условиях развития опухолевого процесса совершенно не

изученными остаются структурно-функциональные параметры нормальных лимфоцитов, контактирующих с опухолевыми клетками миелобластной линии.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния химиотерапии на структурно-функциональные особенности лимфоцитов больных острым миелобластным лейкозом.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на кафедре биологии НИУ «БелГУ». Объектом исследования служили лимфоциты периферической крови больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) при первичной постановке диагноза (25 обследованных) и после химиотерапии (25 обследованных), находящихся на лечении в гематологическом отделении областной клинической больницы г. Белгорода.

Забор периферической крови больных лейкозом проводили из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови, в клинической лаборатории гематологического отделения областной больницы г. Белгорода.

В лаборатории кафедры биологии НИУ «БелГУ» проводили разделение красной и белой крови путем центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об./мин, полученную надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо отбирали и центрифугировали еще 10 мин при той же скорости. Получали суспензию лейкоцитов.

Микрорельеф поверхности лимфоцитов изучали в полуконтактном режиме на атомно-силовом микроскопе (АСМ) ИНТЕГРА Вита фирмы NT-NDT (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71) [4]. Для АСМ-исследования суспензию лейкоцитов наносили на обезжиренное предметное стекло и с целью сохранения жизнеспособности клеток помещали во влажную камеру (патент РФ № 98248). Сканирование 15 клеток из каждой пробы осуществляли в полуконтактном режиме с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилеверы серии NSG03, с жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм, согласно разработанному «Способу исследования нативных клеток крови» (патент РФ № 2009125268). При обработке полученных сканов использовали программное обеспечение Nova (NT-MDT, Россия). Для оценки структурных неоднородностей клеточной поверхности строили кривые профиля бокового сечения, на которых подсчитывали число, измеряли линейные размеры углублений и глобулярных выступов на участке плазмалеммы площадью 3×3 мкм².

Упруго-эластические свойства лимфоцитов изучали в режиме силовой спектроскопии. Исследования проводили с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG 11, согласно «Способу определения упругости клеток крови» (патент № 2466401). Регистрировали силовые кривые отвода и подвода кантилевера с поверхности 15 клеток. Полученные силовые кривые обрабатывали на основе модели Герца в модификации Снедона [11].

Для изучения электрических свойств в одиночных клетках измеряли потенциал поверхности (ПП) в режиме зонда Кельвина в режиме силовой спектроскопии [4]. Суспензию лейкоцитов для измерения ПП готовили по

следующему способу (патент № 2027188). Белые клетки крови отмывали изотоничным раствором хлорида натрия в течение 5 мин, затем проводили фиксацию 0,25% раствором глутарового альдегида в течение 20 мин. По истечении указанного времени суспензию лейкоцитов дважды отмывали изотоничным раствором хлорида натрия по 5 мин и готовили препараты на обезжиренной металлической подложке. Измерение ПП осуществляли кантилевером серии NSG03/TiN с токопроводящим титановым покрытием (Nanoworld, USA). Обработку полученных сканов осуществляли в программе Nova (Зеленоград, 2009).

Миграционную активность лимфоцитов оценивали с помощью капиллярного теста с учетом жизнеспособности лимфоцитов не менее 95% [1]. 0,02 мл лимфоцитарной взвеси ресуспендировали в 4 мл культуральной среды RPMI-1640. Жизнеспособность клеток проверяли в камере Горяева (патент РФ № 2126230) после окраски трипановым синим. В камере Горяева подсчитывали не менее 100 клеток, определяя среди них процент окрашенных (погибших). Клеточной суспензией (0,1 мл) заполняли стеклянный капилляр. С одного конца капилляр запаивали; другой, содержащий клетки, погружали в агарозные лунки, заполненные 1 мл среды № 199. Для каждой суспензионной пробы в затвердевшем геле пробивали не менее 5 лунок (размером 2,5 мм). Капилляры инкубировали при 37°C в течение 24 ч в строго вертикальном положении. Капилляры извлекали из лунок пинцетом. Мигрировавшие из них клетки ресуспендировали, оценивали их жизнеспособность описанным выше способом. Для определения количества лимфоцитов человека в 1 мкл крови использовали стандартные методики, согласно которым подсчет лимфоцитов осуществляли в 25 больших квадратах сетки счетной камеры Горяева под большим увеличением (окуляр 20х, объектив 40х).

Расчет числа лимфоцитов проводили по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 400 \cdot b}{v}$$

- где X - число лимфоцитов в 1 мкл крови;
a - число лимфоцитов в 25 больших квадратах;
b - разведение крови (20);
v - число подсчитанных малых квадратов (400);
400 - объем одного малого квадрата 1/400.

Находили среднее число клеток в группе из пяти капилляров, что соответствовало числу спонтанно мигрировавших лимфоцитов.

С целью изучения пространственного расположения системы цитоскелета и измерения длины пучков филаментов лимфоцитов больных лейкозом готовили цитологические препараты по следующей схеме, включающей стабилизацию элементов цитоскелета, лизис мембран, фиксацию клеток и их окраску для световой микроскопии [9]. Анализ цитологических препаратов осуществляли с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации изображений «ВидеоТестМастерМорфология» (производитель НПФ «ВидеоТест», Санкт-Петербург, рег. удостоверение № 29/20010702/6102-04 от 16.02.2004) и светового микроскопа Lomo (ОАО «Ломо», Санкт-Петербург). Комплекс «ВидеоТест» позволяет передавать изображение препарата с микроскопа на компьютер, с последующим изучением морфологии системы микротрубочек и измерением длины пучков филаментов.

Результаты исследований представлены в виде среднеарифметических значений с их средними стандартными ошибками. Статистический анализ проведен с использованием критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости [3].

Результаты исследования и их обсуждение

В лейкосуспензии лимфоцитов из крови больных ОМЛ после лечения, так же как и в суспензии клеток больных ОМЛ при первичной постановке диагноза не обнаружено бластных форм лимфоидного ряда. Лимфоциты больных ОМЛ после лечения имели правильную округлую форму, модуль Юнга которых возрастал на 69% ($p < 0,05$) по сравнению с клетками больных при первичной постановке диагноза (табл.1).

Изменение механических свойств клеточной поверхности лимфоцитов больных ОМЛ после лечения происходит одновременно с повышением потенциала поверхности. Так, ПП лимфоцитов больных ОМЛ увеличился на 7% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами больных ОМЛ при первичной постановке диагноза (см. табл. 1).

Таблица 1

Величины модуля Юнга и потенциал поверхности лимфоцитов больных ОМЛ

Table 1

The values of the Young's modulus and the charge of the surface of lymphocytes

Группа	Модуль Юнга, мПа	ПП, мВ
Первичная постановка диагноза	4,2±0,1	- 38,3±0,6
После лечения	7,1±0,3 ^a	- 35,7±0,3 ^a

^a Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов больных лейкозом при первичной постановке диагноза и после лечения по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечание: ПП – поверхностный потенциал.

Изменение механических свойств клеточной поверхности лимфоцитов больных ОМЛ после лечения происходит одновременно с повышением потенциала поверхности и снижением миграционной активности клеток. Число

мигрировавших лимфоцитов снизилось на 162% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами больных ОМЛ при первичной постановке диагноза (табл. 2).

Таблица 2

Показатели миграционной активности лимфоцитов больных ОМЛ

Table 2

Indicators of migration activity of lymphocytes of patients with AML

Группы	Число лимфоцитов до миграции, в 1 мкл	Число лимфоцитов после миграции, в 1 мкл
После лечения	4715,0±138,0	958,0±67,0 ^a
При первичной постановке диагноза	16900,0±3559,0	2519,0±514,0 ^a

^a Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов больных лейкозом при первичной постановке диагноза и после лечения по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

На поверхности лимфоцитов больных ОМЛ после лечения выявлены однотипные глобулярные

выступы, которые локально были собраны в структуры дугообразной формы (рис. 1). Высота

глобулярных выступов лимфоцитов увеличилась на 91% ($p < 0,05$), на фоне уменьшения ширины и их общего числа соответственно на 25% и 61% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами больных ОМЛ при первичной постановке диагноза. Ширина углублений плазмалеммы увеличилась на 450% ($p < 0,05$), а их количество – уменьшилось на 77% ($p < 0,05$).

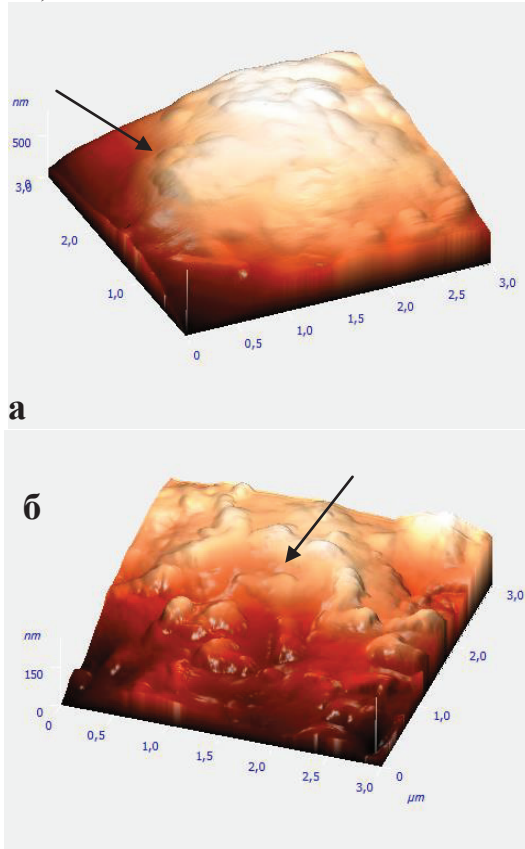


Рис. 1. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОМЛ: а – при первичной постановке диагноза, б – после лечения (стрелками показаны дугообразные скопления глобулярных выступов).
Fig. 1. The topography of the lymphocytes of patients with AML: a - in the primary diagnosis, b - after treatment (arrows indicate the arcuate projections of globular clusters).

В лимфоцитах больных ОМЛ после лечения и при первичной постановке диагноза выявлена сеть цитоскелетных структур, расходящаяся от ядра радиально. Плотность расположения фибрилл, при наблюдении в световой микроскоп была настолько велика, что идентифицировать отдельные нити не представлялось возможным, ввиду чего проводили анализ пучков цитоскелетных структур, состоящих из скопления фибрилл. Длина пучков в группе больных ОМЛ после лечения достоверно не отличалась от группы при первичной постановке диагноза. Визуальных различий в строении и расположении элементов цитоскелета лимфоцитов больных

ОМЛ после лечения по сравнению с клетками больных при первичной постановке диагноза не установлено.

В группе больных ОМЛ после лечения на поверхности лимфоцитов число глобулярных выступов увеличилось, они были собраны в структуры дугообразной формы, что может быть связано с изменением мембранных белков цитоскелета под воздействием химиотерапии [8].

Увеличение жесткости лимфоцитов больных ОМЛ после лечения создает определенные затруднения при продвижении клеток по капиллярам циркуляторного русла. Известно, что упруго-эластические свойства клеток крови тесно связаны с организацией подмембранных структур цитоскелета [7], однако в проведенном исследовании существенных различий в расположении и длине элементов цитоскелета между лимфоцитами больных ОМЛ при первичной постановке диагноза и после лечения не выявлено. Тем не менее, в группе больных ОМЛ после лечения наблюдали повышение заряда клеточной поверхности и снижение миграционной активности лимфоцитов. Вероятно, химиотерапевтические препараты способны вызывать перераспределение электрических зарядов на поверхности клеток, и, как следствие, деполяризация мембран лимфоцитов на фоне снижения их миграционной активности способствует адгезии «жестких» клеток к сосудистой стенке [6]. В результате, клетки не способны деформироваться при прохождении через мелкие капилляры, что может провоцировать нарушения микроциркуляции крови.

Заключение

Результаты экспериментальных исследований, представленные в данной работе, расширяют и дополняют современные представления о функциональном статусе лимфоцитов при миелобластном лейкозе. В результате проведенного исследования доказано, что химиотерапевтическое лечение приводит к возникновению на поверхности лимфоцитов глобулярных структур, способствует увеличению жесткости плазмалеммы и повышению ее заряда. Установленные особенности организации лимфоцитарной популяции больных ОМЛ как при первичной постановке диагноза, так и после лечения могут быть полезны для диагностики риска развития и прогрессирования инфекционных осложнений, сопровождающих опухолевый процесс, что даст возможность повысить качество жизни и средний показатель выживаемости пациентов.

Работа выполнена при поддержке гранта на проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям социально-экономического развития Белгородской области (номер проекта 33-гр от 19.10.2016).

Список литературы

- Новиков Д.К. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация / Витебск: ВГМУ. 2006. 198 с.
- 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.
- Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с.
- Руководство пользователя «Зондовая нанолaborатория Интегра Вита». Зеленоград: Copyright НТМДТ. 2006. 57 с.
- Савва Н.Н. Актуальность и перспективы определения минимальной остаточной болезни при остром лимфобластном лейкозе у детей // Онкологический журнал. 2009. Т. 3, № 9. С. 72-77.
- Cernuda-Morollon E. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells // Circulation researcher. 2006. Vol. 98. Pp. 757-758.
- Gatfield J. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules // Molecular biology of the cell. 2005. Vol. 16. Pp. 2786-2798.
- Gough N.R. When repair is suicide // Sci. Signal. 2009. Vol. 2. No. 85. Pp. 283.
- Pepa S.D. A new technique for the visualization of the cytoskeleton in cultured fibroblasts with Coomassie blue R250 // Cell Biol. 1980. Vol. 4. Pp. 149-154.
- Volkova T.O., Bagina U. S., Zykina N.S., Malysheva I.E., Poltorak A.N. Treatment of cells K562/4-NQO and K562/2-DQO with chemical compounds of multidrug resistance leads to apoptosis // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems of Biology – BGRS/SB-2010. Novosibirsk, 2012. P. 40-42.
- Wojcikiewicz E. Force and compliance measurements on living cells using atomic force microscopy // Biol. Proced. Online. 2004. Vol. No. 6. Pp. 1-9.

References

- Novikov D.K. Immunocorrection, immunoprophylaxis, immunorehabilitation. Vitebsk: VGMU, 2006. 198 p.
- Patent RF 2027188 The Method of Recording the Erythrocytes' Surface Charge Changes / Sheremetev Yu.A., Makin G.I., Suslov F.Yu. Patent-holder NSH, date of priority № 4947820/14 of 24.06.1991.
- Platonov A.E. Statistical analysis in medicine and biology. M.: RAMN, 2000. 52 p.
- A User guide "Probe nonlaboratory IntegraVita". Zelenograd: Copyright NTMDT, 2006. 57 p.

- Savva N.N. Urgency and prospect of estimation of minimal residual disease during acute lymphoblastic leucosis in children // Journal of Oncology. 2009. Vol. 3(9). Pp. 72-77.
- Cernuda-Morollon E. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells // Circulation researcher. 2006. Vol. 98. Pp. 757-758.
- Gatfield J. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules // Molecular biology of the cell. 2005. Vol. 16. Pp. 2786-2798.
- Gough N.R. When repair is suicide // Sci. Signal. 2009. Vol. 2. No. 85. Pp. 283.
- Pepa S.D. A new technique for the visualization of the cytoskeleton in cultured fibroblasts with Coomassie blue R250 // Cell Biol. 1980. Vol. 4. Pp. 149-154.
- Volkova T.O., Bagina U. S., Zykina N.S., Malysheva I.E., Poltorak A.N. Treatment of cells K562/4-NQO and K562/2-DQO with chemical compounds of multidrug resistance leads to apoptosis // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems of Biology – BGRS/SB-2010. Novosibirsk, 2012. P. 40-42.
- Wojcikiewicz E. Force and compliance measurements on living cells using atomic force microscopy // Biol. Proced. Online. 2004. Vol. No. 6. Pp. 1-9.

Сладкова Евгения Анатольевна, старший преподаватель кафедры биологии, к.б.н
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия
E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru

Шамрай Елена Александровна, аспирант 2-го года обучения
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия

Кротова Екатерина Евгеньевна, магистрант 2-го года обучения
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия

Селиверстов Евгений Сергеевич, студент 3-го курса
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия

Быльченко Александр Алексеевич, студент 3-го курса

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,

Ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия

Скоркина Марина Юрьевна, профессор кафедры биологии, д.б.н.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,

Ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия

Sladkova Evgenija Anatolevna, PhD in Biology, Senior Lecturer, Department of Biology,

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru

Shamray Elena Aleksandrovna, Postgraduate Student, Department of Biology,

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

Krotova Ekaterina Evgenievna, Graduate Student of the Second Year of Study,

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

Seliverstov Evgenij Sergeevich, Student of the Third Year of Study

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

Bylchenko Aleksandr Alekseevich, Student of the Third Year of Study

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

Skorkina Marina Yurievna, Doctor of Biology, Professor, Department of Biology,

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia