

УДК 576.08

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-2-9-14

Сладкова Е.А.
Клочкова Г.Н.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ РАЗНЫХ ФОРМ ЛИМФОЛЕЙКОЗА

1) ассистент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции, кандидат биологических наук
ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия. *E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru*

2) заведующая клинико-диагностической лабораторией, кандидат биологических наук
Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа, ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород, 308007, Россия

Аннотация

С использованием метода полуконтактного АСМ-сканирования, алгоритмов исследования структурных элементов цитоскелета и миграционной активности лимфоцитов получены данные о локомоторных свойствах клеток при развитии лимфолейкозов. Лимфоциты больных ОЛЛ с неправильными контурами цитоплазмы, тонкими фибриллами цитоскелета, расходящимися от ядра к краевым участкам цитоплазмы и сглаженным рельефом поверхности характеризуются высокой подвижностью. Локомоторная активность лимфоцитов больных ХЛЛ, характеризующихся рифленой поверхностью и компактными пучками фибрилл в области ядра снижена, что может провоцировать изменения микрореологических свойств крови.

Ключевые слова: лимфоцит; лейкоз; миграция; цитоскелет; клеточная поверхность; атомно-силовая микроскопия

Sladkova E.A.
Klochkova G.N.

COMPARATIVE ANALYSIS OF LYMPHOCYTE LOCOMOTION IN THE DEVELOPMENT OF DIFFERENT FORMS OF LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

1) PhD in Biology, Assistant Lecturer. Department of Ecology, Physiology and Biological Evolution. Belgorod State National Research University, 85 Pobeda St., Belgorod, 308015, Russia. *E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru*

2) PhD in Biology, Head of Clinical Diagnostic Laboratory. Belgorod St. Ioasaph Regional Clinical Hospital
8/9 Nekrasova St., Belgorod, 308007, Russia

Abstract

The data about cells locomotion properties in the development of lymphoblastic leukemia was obtained, using the method of semicontact AFM-scanning, the algorithms of investigation of lymphocyte structural cytoskeleton elements and migratory activity. The lymphocytes of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) have irregular cytoplasmic outlines, thin fibrils of cytoskeleton radiating from the nucleus to the edges of the cell and smoothed surface geometry and are characterized by high motility. Locomotors activity of lymphocytes of patients with chronic lymphoblastic leukemia (CLL) defined by the wavy surface and tight fibril bundles in the nucleus area is decreased, which can lead to the changes of microrheological blood properties.

Key words: lymphocyte; leukemia; migration; cytoskeleton; cellular surface; atomic force microscopy

Метастазирование органной опухоли проходит через серию последовательных этапов, в частности выход неопластических клеток в лимфатические и кровеносные сосуды. Появление опухолевых клеток в периферической крови и лимфе служит для клиницистов одним из первых сигналов к

началу лечения, направленного на предотвращение дальнейшего метастазирования в здоровые органы. Принципиально иных подходов для диагностирования начальных этапов инфильтрации в ткани требуют опухолевые заболевания кроветворной ткани, что обусловлено непосредственным

присутствием неопластических клеток в периферическом русле [6].

Согласно современным данным опухолевые клетки зачастую отличаются от нормальных по своей морфологии и организации цитоскелета. В основе клеточной подвижности лежат перестройки различных типов цитоскелетных структур, важное место среди которых занимает система микротрубочек и актиновых филаментов. Ведущие функции микротрубочек направлены на стабилизацию клеточной формы, образование псевдоподий. Нарушения в их системе лежат в основе многих патологических процессов, в том числе опухолевой трансформации, проявляющейся в усилении расплывания и изменении локомоторного поведения неопластических клеток, связанного с нарушениями в формировании и функционировании псевдоподий: в их протрузии, прикреплении к субстрату и последующем центростремительном натяжении [2]. Эти процессы во многом контролируются микротрубочками и микрофиламентами [8] и являются ключевыми в приобретении клетками способности к миграции в ткани.

Цель исследования – выполнить сравнительный анализ локомоторной активности лимфоцитов при развитии разных форм лимфолейкоза.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили лимфоциты периферической крови больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ, 50 обследованных), хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ, 25 обследованных) и ОЛЛ в ремиссии (30 обследованных) в возрасте от 18 до 45 лет, находящихся на лечении в гематологическом отделении областной клинической больницы г. Белгорода. В качестве контроля использовали лимфоциты здоровых людей (100 обследованных от 25 до 45 лет).

С целью изучения локомоторной активности лимфоцитов проводили сравнительную оценку морфологии клеток, изучали структурную организацию цитоскелета и миграционную активность.

Забор периферической крови здоровых людей и 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. На базе лаборатории 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.

Геометрические параметры и микрорельеф поверхности лимфоцитов изучали в полуконтактном режиме на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита фирмы NT-NDT (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71) [3].

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 1,1 Н/м и радиусом закругления 10 нм, согласно разработанному «Способу исследования нативных клеток крови» (патент РФ № 2398234).

В проведенном исследовании при обработке полученных сканов использовали следующие программные продукты: для расчета высоты (h , мкм) и диаметра (d , мкм) клеток – Nova (NT-MDT, Россия), для расчета площади (S , мкм²) и объема (V , мкм³) клеток – Gwyddion (Gwyddion.net). 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 мкм (рис. 1).

Миграционную активность лимфоцитов оценивали с помощью капиллярного теста с учетом жизнеспособности лимфоцитов не менее 95% [1]. 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).

С целью изучения пространственного расположения структур цитоскелета и

измерения длины пучков филаментов лимфоцитов доноров и больных лейкозом готовили цитологические препараты по следующей схеме, включающей стабилизацию элементов цитоскелета, лизис мембран, фиксацию клеток и их окраску для световой микроскопии [5].

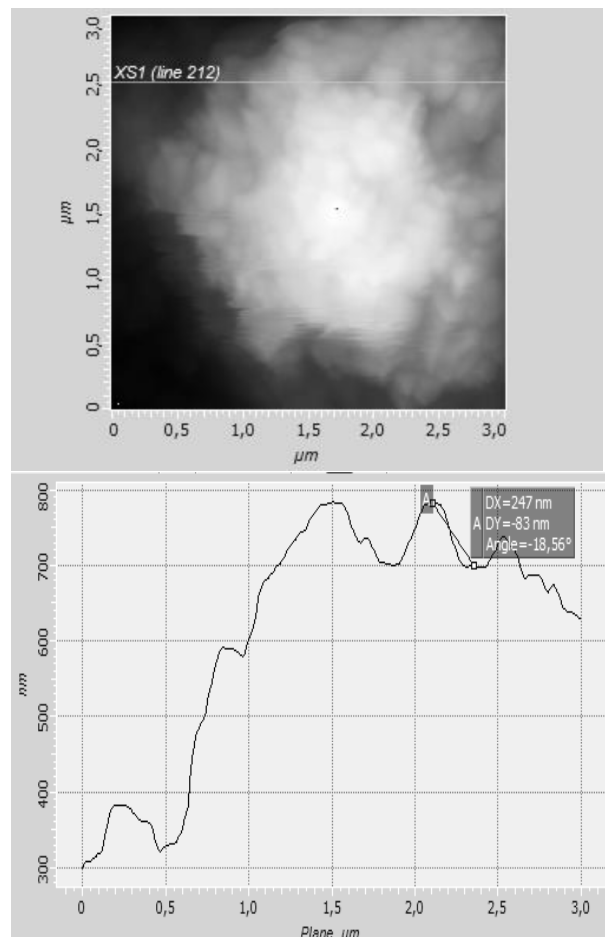


Рис. 1. АСМ-изображение и вид профиля поверхности:
А – глобулярный выступ

Fig. 1. AFM image and surface profile:
A – globular protrusion

Анализ цитологических препаратов микротрубочек осуществляли с помощью комплекса аппаратно-программной (АПК) визуализации изображения «ВидеоТест-МастерМорфология» (производитель НПФ «ВидеоТест», Санкт-Петербург, рег. удостоверение № 29/20010702/6102-04 от 16.02.2004) и светового микроскопа Lomo (ОАО «Ломо», Санкт-Петербург). АПК позволяет передавать изображение препарата с микроскопа в компьютер, с последующим изучением структурной организации и измерением длины пучков филаментов.

Статистический анализ проведен с использованием критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости [4].

Результаты исследования и их обсуждение

При микроскопировании мазков лейкоцитов больных ОЛЛ обнаружены бластные формы с неправильными контурами цитоплазмы и ядра, занимающего большую часть клетки. Площадь поверхности, объем и диаметр лимфоцитов больных ОЛЛ возросли соответственно на 67 %, 101 % и 68,3% ($p < 0,05$), при этом их высота снизилась на 44% ($p < 0,05$) по сравнению с дифференцированными лимфоцитами здоровых людей.

Форма лимфоцитов больных ХЛЛ варьировала от округлой до неправильной. Цитоплазма клеток располагалась в виде тонкого ободка, околядерное пространство было четко выражено. Площадь поверхности, объем, диаметр и высота лимфоцитов увеличились на 52,7 %, 88%, 49,2 % и 89 % ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1).

Лимфоциты больных ОЛЛ в ремиссии имели правильную округлую форму. Объем и диаметр лимфоцитов у больных ОЛЛ в ремиссии возросли соответственно на 41,2 % и 32 % ($p < 0,05$) по сравнению с донорами.

Таблица 1

Геометрические параметры лимфоцитов

Table 1

Lymphocyte geometrical parameters

Параметр	Доноры	ОЛЛ	ХЛЛ	ОЛЛ в ремиссии
Площадь, мкм ²	80,4±2,3	134 ± 2,4 ^a	122,8 ± 2,5 ^{a, б}	82,4 ± 0,2 ^б
Объем, мкм ³	39,1±1,8	86 ± 1,1 ^a	73,6 ± 0,5 ^{a, б}	55,2 ± 0,7 ^{a, б}
Диаметр, мкм	6,3±0,1	10,6± 0,2 ^a	9,4 ± 0,8 ^a	8,3± 0,7 ^a
Высота, мкм	0,9±0,1	0,5 ± 0,02 ^a	1,7 ± 0,1 ^{a, б}	0,8 ± 0,1

^a – статистически достоверные различия при $p < 0,05$ в сравнении с лимфоцитами доноров; ^б – статистически достоверные различия при $p < 0,05$ в сравнении с лимфоцитами больных ОЛЛ

В лейкосуспензии из крови больных ОЛЛ обнаружены лимфоциты больших размеров по сравнению с клетками больных ХЛЛ и ОЛЛ в ремиссии. Площадь поверхности и объем клеток больных ОЛЛ увеличились на 9 % и 17 % ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами больных ХЛЛ, и на 63% и 56 % ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами больных ОЛЛ в ремиссии. Наибольшая высота лимфоцитов была характерна

для больных ХЛЛ, что составляло в среднем 1,7 мкм, наименьшая для больных ОЛЛ – 0,5 мкм.

Лимфоциты больных ОЛЛ имели сглаженный рельеф поверхности по сравнению с

клетками из лейкосуспензии здоровых доноров и больных другими типами лейкозов (рис. 2).

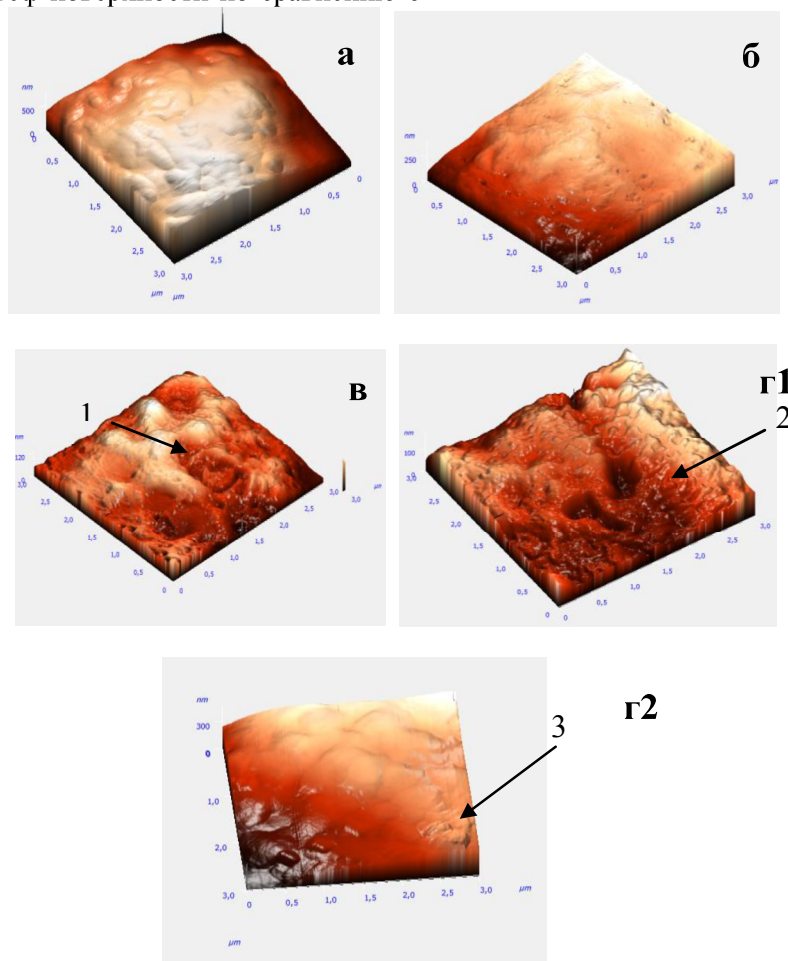


Рис. 2. Рельеф поверхности лимфоцитов: а – доноров, б – больных ОЛЛ, в – больных ХЛЛ, г1 – больных ОЛЛ в ремиссии (1 тип), г2 – ОЛЛ в ремиссии (2 тип).

Примечания: 1 – скопления глобулярных выступов; 2 – крупные инвагинации плазмалеммы, 3 – глобулярные выступы сферической формы

Fig. 2. Lymphocyte surface: а – healthy patients, б – patients with ALL, в – patients with CLL, г1 – patients with ALL in remission type 1, г2 – patients with ALL in remission type 1.

Note: 1 – aggregation of globular protrusions; 2 – large invaginations of cell membrane, 3 – spherical globular protrusions

Конфигурация поверхности лимфоцитов больных ХЛЛ имела ярко выраженный рифленый характер по сравнению с лимфоцитами доноров и больных ОЛЛ (см. рис. 2). Характерной особенностью являлась группировка глобулярных выступов в структуры неправильной формы (см. рис. 2в). В лейкосуспензии из крови больных ОЛЛ в ремиссии выделены два типа лимфоцитов с разной конфигурацией поверхности

плазмалеммы (см. рис. 2 г1, г2). Для лимфоцитов с первым типом клеточной поверхности характерно наличие большого числа мелких глобулярных структур по сравнению с клетками доноров. Одновременно с выступами встречаются крупные инвагинации плазмалеммы. Особенностью лимфоцитов больных ОЛЛ в ремиссии со вторым типом рельефа клеточной поверхности является

наличие глобулярных образований сферической формы.

Число мигрировавших лимфоцитов в группе больных ОЛЛ возросло на 78,5% ($p<0,05$), в то время как число вышедших из капилляра клеток больных ХЛЛ и ОЛЛ в ремиссии снизилось на 30% и 28% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с лимфоцитами доноров (табл. 2).

Наименьшая миграционная активность характерна для лимфоцитов из лейкосуспензии больных ХЛЛ. Количество вышедших из капилляра белых клеток крови в группе больных ХЛЛ снизилось на 61 % ($p<0,05$) по сравнению с клетками больных ОЛЛ. Наибольшее число клеток мигрировало в группе пациентов с ОЛЛ, что составило в среднем 1710 лимфоцитов.

Показатели миграционной активности лимфоцитов

Таблица 2

Parameters of lymphocyte migration

Table 2

Группы	Число лимфоцитов до миграции, в 1 мкл	Число лимфоцитов после миграции, в 1 мкл	Процент мигрировавших клеток, %
Доноры	4715±138	958±67 ^a	20,3±0,8
ОЛЛ	12000±756	1710±135 ^{a,b}	14,3±0,7 ^b
ХЛЛ	18667±2404	667±56 ^{a,b}	3,6±0,3 ^o
ОЛЛ в ремиссии	6222±620	689±32 ^{a,b}	11,1±0,4 ^{o,b}

^a – статистически достоверные различия при $p<0,05$ в сравнении с числом лимфоцитов до миграции в каждой группе; ^b – статистически достоверные различия при $p<0,05$ в сравнении с лимфоцитами доноров после миграции; ^o – статистически достоверные различия при $p<0,05$ в сравнении с лимфоцитами больных ХЛЛ после миграции.

В лимфоцитах больных лейкозом и здоровых людей выявлена сеть цитоскелетных структур, расходящаяся от ядра к периферии клетки. Плотность сети филаментов, которая наблюдается в световой микроскоп, настолько велика, что идентифицировать отдельные фибриллы не представляется возможным, ввиду чего проводили анализ пучков филаментов. Для лимфоцитов здоровых людей и больных ОЛЛ в ремиссии характерна наименьшая плотность расположения пучков фибрилл, основная масса которых располагалась отдельными структурами в области околядерного пространства.

Для лимфоцитов больных ХЛЛ характерна наибольшая плотность сети структур цитоскелета. Пучки фибрилл представляли собой прямые и извитые структуры, располагающиеся в околядерной зоне. Фибриллы в лимфоцитах больных ОЛЛ были собраны в тонкие длинные отдельно лежащие пучки, расходящиеся от ядра к краю цитоплазмы.

Длина пучков цитоскелетных структур лимфоцитов больных ОЛЛ увеличилась на 126,3% и 117% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с клетками здоровых людей и ОЛЛ в ремиссии. Наименьшая длина пучков цитоскелета была характерна для лимфоцитов больных ХЛЛ, что на 61% ($p<0,05$) меньше, чем длина пучков филаментов в клетках больных ОЛЛ (табл. 3).

Для лимфоцитов больных ХЛЛ, имеющих правильные округлые контуры ядра и

цитоплазмы, характерно увеличение объема и площади поверхности за счет возрастания высоты клеток. Такие клетки имели наименьшую подвижность с локализацией филаментов цитоскелета в виде компактных структур в области ядра, что по данным литературы может быть связано с уменьшением числа актиновых нитей и наличием структурных аномалий промежуточных филаментов [10].

Таблица 3

Длина пучков цитоскелета лимфоцитов

Table 3

Length of lymphocyte cytoskeleton bundles

Группа	Длина, мкм
Доноры	0,785 ± 0,2
ОЛЛ	1,776 ± 0,2 ^{a,b}
ХЛЛ	0,699 ± 0,1
ОЛЛ в ремиссии	0,819 ± 0,1 ^o

^a – статистически достоверные различия при $p<0,05$ в сравнении с лимфоцитами доноров; ^b – статистически достоверные различия при $p<0,05$ в сравнении с лимфоцитами больных ОЛЛ; ^o – статистически достоверные различия при $p<0,05$ в сравнении с лимфоцитами больных ХЛЛ.

Для клеток больных ОЛЛ, неправильной формы с вытянутыми краями, характерно распластывание на подложке и высокая подвижность, при этом пучки цитоскелета представляли собой тонкие структуры, располагающиеся от ядра к краевым участкам

цитоплазмы. Вероятно, такие изменения морфофункционального состояния опухолевых лимфоцитов могут создавать условия для формирования ламеллоподий [9], фокальных контактов [7] и способствовать появлению инвазивного потенциала лимфоцитов. Клетки больных ОЛЛ в ремиссии имеют морфологию сходную с лимфоцитами больных в состоянии обострения лейкоза, однако миграционная активность этих клеток снижена, что может быть продиктовано группировкой структур цитоскелета в области ядра в виде компактных фибрилл.

Заключение

Исследование морфологии, структур цитоскелета и миграционной активности позволило получить достоверные данные об особенностях подвижности лимфоцитов больных ОЛЛ, ХЛЛ и ОЛЛ в ремиссии. Выявленные изменения морфофункциональной организации лимфоцитов больных ОЛЛ позволяют говорить о том, что клетки с подобными особенностями способны к миграции в ткани. Лимфоциты больных ХЛЛ могут спровоцировать изменение микрореологических свойств, что вероятно будет способствовать ухудшению оксигенации тканей.

Список литературы

1. Новиков Д.К. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация. Витебск: ВГМУ. 2006. 198 с.
2. Ровенский Ю.А., Васильев Ю.М. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации // *Канцерогенез* / Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина. 2004. С. 376-414.
3. Руководство пользователя «Зондовая нанолaborатория Интегра Вита». Зеленоград: Copyright НТМДТ. 2006. 57 с.
4. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии. М.: Изд-во РАМН. 2000. 52 с.

5. Хайтлина С.Ю. Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке // *Цитология*. 2007. Т. 49, № 5. С. 345-354.

6. Kiselev F. L. Malignant Cell Transformation // *Genetika*. 1985. V. 21. Pp. 885-895.

7. Morrison E.E. Action and Interactions at Microtubule Ends // *Cell. Mol. Life*. 2007. V. 64. Pp. 307-317.

8. Sahai E. Mechanisms of Cancer Cell Invasion // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2005. V. 15. Pp. 87-96.

9. Small J.V. The Actin Cytokeleton // *Electron Microsc. Rev*. 1998. V. 1. Pp. 155-174.

10. Small J.V. How do Microtubules Guide Migrating Cells? // *Nat. Rev, Mol. Cell Biol*. 2002. V. 3. N. 12. Pp. 957-964.

References

1. Novikov D.K. Immunocorrection, Immunoprevention, Immunorehabilitation. Vitebsk: VGMU. 2006. 198 p.

2. Rovenskij Ju.A., Vasil'ev Ju.M. Morphogenetic Reactions of Cells and their Disorders during Tumorous Transformation // *Carcinogenesis* / Edited by D.G. Zaridze. M.: "Medicine". 2004. Pp. 376-414.

3. User Manual "Probe Nanolaboratory Integra Vita". Zelenograd: Copyright NTMDT. 2006. 57 p.

4. Platonov A.E. Statistic Analysis in Biology and Medicine. M.: "RAMS". 2000. 52 p.

5. Hajtlina S.Ju. Mechanisms of Segregation of Actin Isoforms in the Cell // *Cytology*. 2007. V. 49. N. 5. Pp. 345-354.

6. Kiselev F.L. Malignant Cell Transformation // *Genetika*. 1985. V. 21. Pp. 885-895.

7. Morrison E.E. Action and Interactions at Microtubule Ends // *Cell. Mol. Life*. 2007. V. 64. Pp. 307-317.

8. Sahai E. Mechanisms of Cancer Cell Invasion // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2005. V. 15. Pp. 87-96.

9. Small J.V. The Actin Cytokeleton // *Electron Microsc. Rev*. 1998. V. 1. Pp. 155-174.

10. Small J.V. How do Microtubules Guide Migrating Cells? // *Nat. Rev, Mol. Cell Biol*. 2002. V. 3. N. 12. Pp. 957-964.