

УДК 581.17

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-23-26

Шамрай Е.А.¹
Рядинская А.Г.²
Беляева С.С.³

**УПРУГО-ЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РЕЛЬЕФ ПОВЕРХНОСТИ
ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ И ХРОНИЧЕСКИМ
МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

- 1) аспирант ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, 85, г. Белгород 308015 Россия. *E-mail: elenashamray@yandex.ru*
- 2) студент ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, 85, г. Белгород 308015 Россия
- 3) заведующая гематологическим отделением областной больницы, кандидат медицинских наук, Белгородская областная клиническая больница им. Святителя Иоасафа, ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород 308007. *E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

Аннотация

Методом атомно-силовой микроскопии изучены особенности рельефа поверхности, упруго-эластические свойства лимфоцитов больных острым (ОМЛ) и хроническим (ХМЛ) миелобластным лейкозом на стадии лечения. У больных ОМЛ установлено увеличение жесткости клеток на 64% ($p < 0,05$), которое сопровождалось уменьшением числа глобулярных выступов и впадин на мембране лимфоцитов, а также увеличением их высоты и ширины по сравнению с контролем. У больных ХМЛ на фоне увеличения модуля Юнга на 123% ($p < 0,05$) наблюдали увеличение числа глобулярных выступов в лимфоцитарных клетках по сравнению со здоровыми людьми. Выявленные особенности имеют важное значение для понимания патогенеза лимфопролиферативных заболеваний.

Ключевые слова: лимфоциты; острый миелобластный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; рельеф поверхности; упруго-эластические свойства.

UDC 581.17

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-23-26

Shamray E.A.¹
Ryadinskaya A.G.²
Belyaeva S.S.³

**ELASTIC PROPERTIES AND SURFACE TOPOGRAPHY OF LYMPHOCYTES
IN PATIENTS WITH ACUTE AND CHRONIC MYELOBLAST LEUCOSIS**

- 1) Postgraduate Student Belgorod State National Research University, 85 Pobeda Street, Belgorod 308015 the Russian Federation. *E-mail: elenashamray@yandex.ru*
- 2) Student Belgorod State National Research University, 85 Pobeda Street, Belgorod 308015 the Russian Federation
- 3) Head of the Hematology Department, PhD in Medicine, St. Ioasaph Belgorod Regional Hospital, 8/9 Nekrasov St., Belgorod 308007 the Russian Federation. *E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

Abstract

The authors studied the features of relief surface and elastic properties of lymphocytes in patients with acute myeloblast leucosis (AML) and chronic myeloblast leucosis (CML) on the stage of the treatment with the method of atomic force microscopy. In patients with AML, there was noted an increase of stiffness of cells by 64% ($p < 0.05$) accompanied by a reduction in the number of globules and recesses on the lymphocytes membrane, and an increase in their height and width as compared with the control group. In patients with CML, the authors observed an increase of Young modulus by 123% ($p < 0.05$) and an increase in the number of globules on the surface as compared with healthy people. The revealed features have an important meaning for understanding the pathogenesis of lymphoproliferative diseases.

Key words: lymphocytes; acute myeloblast leucosis; chronic myeloblast leucosis; relief of surface; elastic properties.

Введение

Одной из актуальных проблем физиологии клеток крови является изучение функциональных свойств и структуры поверхности лимфоцитов при различных системных нарушениях. Важное место среди патологий занимают лимфопролиферативные заболевания, которые приводят к нарушению биологических свойств лимфоцитарных клеток [1, 2]. Разные типы протекания лейкоза – острый и хронический – сопровождаются специфическими перестройками клеточных элементов на генетическом и морфофункциональном уровнях. Трансформация функционального состояния неопластических клеток сопровождается изменениями цитоархитектоники, структуры поверхности мембраны. Изменение упаковки элементов цитоскелета при лейкозе обуславливает образование атипичных по форме и размерам глобулярных структур на мембране, за счет которых увеличивается жесткость поверхности [8]. Изучение данного вопроса позволит установить изменения структурно-функциональных свойств, характерных для неопластической клетки, при различных типах протекания болезни, в период лечения и ремиссии, а также разработать терапевтические подходы, направленные на уничтожение аномальных клеток.

Целью исследования было изучить упруго-эластические свойства лимфоцитов и выявить особенности рельефа поверхности клеток при разных типах течения миелобластного лейкоза – острым и хроническом.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на венозной крови больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и хроническим миелобластным лейкозом (ХМЛ) (по 5 проб). В качестве контроля использовали кровь 10 здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет. Человеческую кровь получали путем венепункции с участием специализированно персонала областной клинической больницы им. Св. Иоасафа. Кровь собирали в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ. Лимфоциты из цельной крови выделяли путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин.

Рельеф поверхности лимфоцитов изучали с использованием атомно-силового микроскопа

(АСМ) ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71). Суспензию лимфоцитов наносили на чистые обезжиренные стеклянные подложки, которые помещали во влажную камеру для сохранения их жизнеспособности [7]. Проводили сканирование 20 клеток из каждой пробы в полуконтактном режиме с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG01, с жесткостью 2,5 Н/м и радиусом закругления 3 нм. На полученных сканах с помощью программного обеспечения «Nova» (Зеленоград, 2009) строили кривые профиля участков поверхности лимфоцитов размером 2x2 мкм, на которых измеряли габаритные размеры и подсчитывали число глобулярных выступов, а также углублений.

Упруго-эластические свойства лимфоцитов в опытных и контрольных образцах крови изучали методом эластографии. Измеряли общую жесткость клетки с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG11 (патент РФ № 2466401). Упругость клеток (модуль Юнга) количественно оценивали по экспериментальным силовым кривым, снятым с поверхности клеток при проведении процедуры силовой спектроскопии.

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики. Достоверность различий определяли с использованием *t* критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В опытных пробах наблюдали повышение жесткости поверхности. Модуль Юнга клеток больных ОМЛ возрос на 64% ($p < 0,05$) по сравнению с клетками здоровых людей. Жесткость поверхности лимфоцитов больных ХМЛ была на 123% ($p < 0,05$) выше, по сравнению с контролем (рисунок).

Общее число глобулярных выступов лимфоцитов больных ОМЛ уменьшилось на 67% ($p < 0,05$), на фоне увеличения их высоты и ширины соответственно на 133% и 119% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами здоровых людей. Глубина и ширина углублений плазмалеммы увеличились на 303% и 975% ($p < 0,05$) соответственно, а их число – уменьшилось на 77% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица).

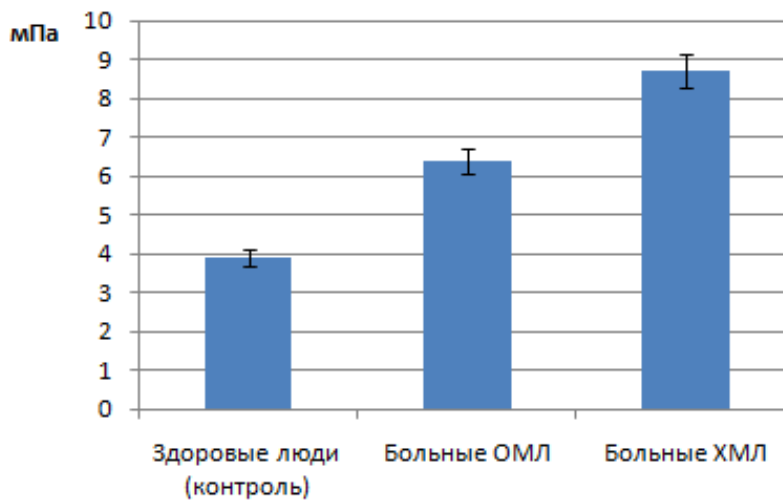


Рис. Величина модуля Юнга поверхности лимфоцитов.

Fig. 1. The value of Young modulus of the surface of lymphocytes.

Таблица 1

Рельеф поверхности лимфоцитов

Table 1

The relief of the surface of lymphocytes

Параметры		Здоровые люди	ОМЛ	ХМЛ
Глобулярные выступы	число	7,0 ± 0,2	3,0 ± 0,5*	10,0 ± 0,8*
	высота, нм	46,0 ± 0,5	107,3 ± 9,8*	162,6 ± 5,4*
	ширина, нм	15,0 ± 0,9	32,9 ± 6,6*	19,0 ± 0,9*
Углубления (инвагинации)	число	9,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2*	8,0 ± 0,6
	высота, нм	26,0 ± 0,9	104,8 ± 15,2*	122,8 ± 3,3*
	ширина, нм	2,0 ± 0,3	21,5 ± 4,4*	15,2 ± 0,6*

*- Статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольной пробах по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

У больных ХМЛ наблюдали увеличение числа, высоты и ширины глобулярных выступов соответственно на 43%, 254% и 27% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Глубина инвагинаций была увеличена на 372% ($p < 0,05$), их ширина – на 660% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Согласно полученным нами данным при развитии миелобластного лейкоза существенно изменяются упруго-эластические свойства мембраны лимфоцитов, а также «рисунок» рельефа поверхности. При развитии ХМЛ жесткость поверхности увеличилась по сравнению с тем же показателем в контроле и у больных ОМЛ. По данным литературы, в blastах миелоидного происхождения элементы цитоскелета переходят в поляризованное состояние, вызывая увеличение жесткости поверхности [5]. Возрастание жесткости лимфоцитов больных создает затруднения при продвижении клеток по капиллярам циркуляторного русла [4].

У больных острой формой миелобластного лейкоза значительно уменьшается общее число глобулярных выступов и впадин при увеличении их высоты (глубины). У больных ХМЛ число глобулярных выступов увеличивается, они более вытянутые и тонкие; число углублений достоверно не отличается от контроля.

При остром миелобластном лейкозе происходит частичное или полное разрушение нитей актина, что ведет к снижению числа углублений и выступов на поверхности плазмалеммы [6]. Наличие более длинных и широких глобулярных структур на мембране лимфоцитов, а также увеличение их числа при хроническом миелобластном лейкозе может способствовать адгезии «жестких» клеток к сосудистой стенке [3]. В результате клетки не способны деформироваться при прохождении через мелкие капилляры, что может провоцировать нарушения микроциркуляции крови.

Заключение

Таким образом, бластные формы клеток больших миелобластным типом лейкоза характеризуются «мягкой» поверхностью, измененным рисунком рельефа поверхности. По данным атомно-силовой микроскопии на поверхности мембраны увеличивается высота и ширина глобулярных структур, число их различно в зависимости от типа миелобластного лейкоза. Выявленные особенности имеют большое значение в области диагностики функционального состояния клеток крови.

Список литературы

1. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А. Метаболический статус лимфоцитов крови при хроническом миелолейкозе и хроническом лимфолейкозе // Медицинская иммунология. 2008. Т. 10, №1. С. 21-26.
2. Смирнова О.В. Хронический миелолейкоз – клинические и иммунологические особенности у взрослых больных // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2012. № 3-2. С. 185-189.
3. Cernuda-Morollon E., Redley A.J. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells // Circulation researcher. 2006. V. 98. pp. 757-758.
4. Dong C., Slattery M., Laing S. Micromechanics of tumor cell adhesion and migration under dynamic flow conditions // Frontiers in Bioscience. 2005. V. 10. pp. 379–384.
5. 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 // Molecular biology of the cell. 2005. V. 16. pp. 2786-2798.
6. Negulyaev Yu.A., Vedernikova E.A., Maximov A.V. Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells // Mol. Biol. Cell. 1996. V. 7. pp. 1857-1864.

7. Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. Evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2010. V. 150(2). pp. 238-240.

8. Wolf K. Compensation mechanism in tumor cell migration // J. Cell Biol. 2003. V. 160. pp. 267-277.

References

1. Smirnova O.W., Manchuk W.T., Savchenko A.A. The metabolic status of blood lymphocytes during chronic myeloleukemia and chronic lymphatic leukemia. Medical Immunology. 2008. V. 1. Pp. 21-26.
2. Smirnova O.W. Chronic myeloleukemia – clinical and immunological features of adult patients. Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of the SB RAMS. 2012. № 3. Pp. 185-189.
3. Cernuda-Morollon E., Redley A.J. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. Circulation researcher. 2006. V. 98. Pp. 757-758.
4. Dong C., Slattery M., Laing S. Micromechanics of tumor cell adhesion and migration under dynamic flow conditions. Frontiers in Bioscience. 2005. V. 10. Pp. 379-384.
5. 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. Molecular Biology of the Cell. 2005. V. 16. Pp. 2786-2798.
6. Negulyaev Yu.A., Vedernikova E.A., Maximov A.V. Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells. Mol. Biol. Cell. 1996. V. 7. Pp. 1857-1864.
7. Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. Evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2010. V. 150(2). Pp. 238-240.
8. Wolf K. J. Compensation mechanism in tumor cell migration. Cell Biol. 2003. V. 160. Pp. 267-277.