

УДК 576.5

DOI: 10.18413/2409-0298-2017-3-2-3-8

Шамрай Е.А.,  
Беляева С.С.

**МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В СИСТЕМЕ КРОВИ**

**Аннотация**

В проведенном исследовании установлено снижение миграционной активности лимфоцитов при развитии острого и хронического типов лимфобластного лейкоза, которое сопровождалось повышением жесткости клеточной поверхности и снижением силы адгезии в системе «клетка-клетка» после миграции. В группе больных острым лимфобластным лейкозом выявлено достоверное снижение миграционной активности и жесткости клеточной поверхности лимфоцитов. Однако после миграции жесткость лимфоцитов увеличилась на 113% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. В группе больных хроническим лимфобластным лейкозом на стадии лечения наблюдали снижение миграционной активности на 82% ( $p < 0,05$ ) и увеличение жесткости поверхности на 305% ( $p < 0,05$ ). После миграции наряду с увеличением жесткости поверхности отмечали снижение силы адгезии в системе «лимфоцит-лимфобласт» и «лимфоцит-эритроцит». Полученные результаты имеют важное теоретическое и практическое значение для изучения функциональной активности опухолевых лимфоцитов при развитии лимфопролиферативных процессов в системе крови и механизмов поддержания иммунного статуса у больных лейкозом.

**Ключевые слова:** лимфоциты; лимфобластный лейкоз; миграция; модуль Юнга; адгезия.

UDC 576.5

E.A. Shamray,  
S.S. Belyaeva

**MIGRATORY ACTIVITY AND MECHANICAL PROPERTIES OF LYMPHOCYTES IN THE DEVELOPMENT OF LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES IN THE BLOOD SYSTEM**

**Abstract**

In the study, a decrease in the migration activity of lymphocytes was observed in the development of acute and chronic types of lymphoblastic leukemia, which was accompanied by an increase in the stiffness of the cell surface and a decrease in the adhesion strength in the cell-cell system after migration. In the group of patients with acute lymphoblastic leukemia, a significant decrease in the migration activity and stiffness of the cell surface of lymphocytes was detected. However, after migration, the stiffness of lymphocytes increased by 113% ( $p < 0.05$ ) compared to the control. In the group of patients with chronic lymphoblastic leukemia, a decrease in migration activity by 82% ( $p < 0.05$ ) and an increase in surface stiffness by 305% ( $p < 0.05$ ) were observed at the treatment stage. After migration, along with an increase in the stiffness of the surface, a decrease in the adhesion strength in the "lymphocyte-lymphoblast" and "lymphocyte-erythrocyte" system was noted. The obtained results are of great theoretical and practical importance for the study of the functional activity of tumor lymphocytes in the development of lymphoproliferative processes in the blood system and mechanisms for maintaining the immune status in patients with leukemia.

**Keywords:** lymphocytes; lymphoblast leukemia; migration; Young's modulus; adhesion.

**Введение**

Функциональная активность лимфоцитов при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови зависит от свойств плазмалеммы. Нарушения физиологического состояния клетки сопровождаются определенными перестройками в структуре биомембран [3], приводящими к изменению

механизмов локомоторного поведения трансформированных клеток. По данным литературы в опухолевых клетках происходит дестабилизация плазмалеммы с последующей модификацией ее свойств, вызванная снижением эффективности фосфоинозитдеспецифичной фосфодиэстеразы, накоплением фосфатидной кислоты [4].

Изменение упруго-эластических и адгезивных свойств клеточной поверхности влияет на характер движения лимфоцитов. Это может быть обусловлено перераспределением внутри клетки связанного с плазмалеммой спектрина, который регулирует локомоторную активность и вязкость мембраны, вызванным повышением уровня секреции интерферона  $\alpha$  при развитии патологических процессов [12]. Ранее установлено, что адгезивные свойства клеточной мембраны, кроме того, находятся под контролем актинового цитоскелета, системы микротрубочек и фокальных контактов [1].

Вследствие изменения миграционной активности лимфоцитов и механических свойств их поверхности происходит нарушение иммунологических защитных механизмов. В настоящее время достаточно большое внимание уделяется изучению роли двигательной активности клеток и межклеточных контактов в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний. Изменение адгезивных свойств поверхности клеток крови при этом остается в значительной мере не изученным.

Цель данной работы – изучить миграционную активность лимфоцитов и изменение механических (упруго-эластических и адгезивных) свойств клеточной поверхности при миграции клеток в норме, а также при развитии острого и хронического лимфобластного лейкоза на стадии лечения.

### Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на базе НИЛ «Физиология адаптационных процессов» НИУ БелГУ. Объект исследования – венозная кровь больных ОЛЛ ( $n = 40$ ) и ХЛЛ ( $n = 12$ ) на стадии лечения в стационаре. В качестве контроля использовали кровь здоровых людей ( $n = 30$ ).

Кровь собирали путем венопункции в гепаринизированные вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ с помощью специализированного медицинского персонала гематологического отделения областной клинической больницы г. Белгорода. Клетки крови разделяли на лейкоциты и эритроциты путем центрифугирования в течение 5 минут при 1500 об./мин. В экспериментальных исследованиях использовали пробы, жизнеспособность клеток в которых составляла 95% и выше. Для определения жизнеспособности клеток 1 мкл суспензии окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в фосфатно-солевом буфере (рН 7,2-7,3). Подсчитывали процент погибших клеток в камере

Горяева с использованием светового микроскопа Axiostar plus для морфологии (Carl Zeiss, Германия, 2010). Миграционную активность лимфоцитов оценивали в прямом капиллярном тесте [10].

Для изучения функционального состояния и механических свойств поверхности клеток в работе был использован метод атомно-силовой микроскопии (Интегра Вита, конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71, производитель NT-MDT, Зеленоград, 2009). Для оценки упруго-эластических свойств готовили суспензию лейкоцитов, наносили ее на чистые обезжиренные стеклянные подложки. Измеряли общую жесткость клетки с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG11 [11]. Оценку модуля Юнга лимфоцитов, количественно характеризующего жесткость клеточной поверхности, проводили с помощью экспериментальных силовых кривых, снятых в режиме силовой спектроскопии. Измерения модуля Юнга проводили на 15 клетках из каждой пробы [14].

Для оценки межмолекулярных сил адгезии в системе «клетка-клетка» использовали биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного лимфоцита и типлесса CSG11 согласно способу, разработанному коллективом авторов [2]. В системе «лимфоцит-лейкоцит», «лимфоцит-лимфоцит», «лимфоцит-эритроцит» измеряли силы адгезии, регистрируя силовые кривые с поверхности 15 лейкоцитарных (контроль) или 15 лимфобластных (опыт) клеток и 15 эритроцитов. Силы адгезии рассчитывали с помощью программного обеспечения Nova согласно закону Гука:

$$F = k \times \Delta \text{Height} ,$$

где  $F$  – сила адгезии, нН;

$k$  – жесткость кантилевера, Н/м;

$\Delta \text{Height}$  – изменение длины пьезотрубки сканера в направлении  $Z$ , нм.

Модуль Юнга и силы адгезии измеряли в пробах до и после миграции клеток в норме и в группах пациентов с ОЛЛ и ХЛЛ.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность 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 исследования и их обсуждение**

В результате лечения у больных ОЛЛ и ХЛЛ существенно снизилась миграционная

активность лимфоцитов на 36,5% ( $p<0,05$ ) и 82% ( $p<0,05$ ) соответственно по сравнению с контролем (рис. 1).

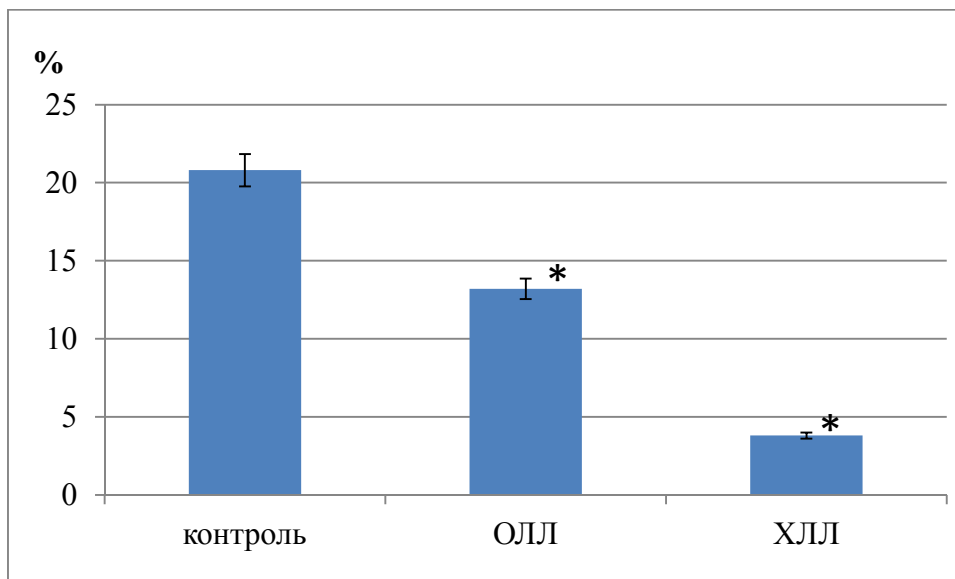


Рис. 1. Показатели миграционной активности лимфоцитов:

\* – достоверность различий между значениями миграционной активности в контрольной и опытной группах по t критерию Стьюдента ( $p<0,05$ ).

Fig. 1. Indicators of migration activity of lymphocytes.

\* – reliability of differences between values of migration activity in the control and experimental groups according to Student's test ( $p<0.05$ ).

В результате проведенных исследований выявлены различия в упруго-эластических свойствах поверхности лимфоцитов между

группами здоровых людей и больных ОЛЛ и ХЛЛ как до миграции клеток, так и после нее (рис. 2).

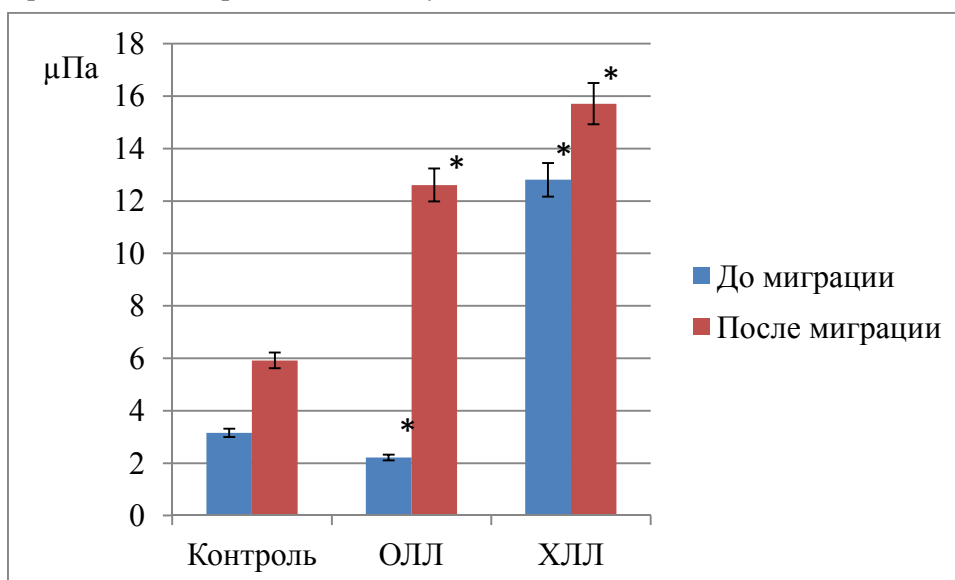


Рис. 2. Величина модуля Юнга поверхности лимфоцитов:

\* – достоверность различий между значениями модуля Юнга в контрольной и опытной группах по t критерию Стьюдента ( $p<0,05$ ).

Fig. 2. Value of Young's modulus of lymphocytes.

\* – reliability of differences between values of migration activity in the control and experimental groups according to Student's test ( $p<0.05$ ).

В контрольной группе жесткость поверхности лимфоцитов до миграции составила  $3,16 \pm 0,02$  мПа, после миграции –  $5,92 \pm 0,06$  мПа. В группе больных ОЛЛ модуль Юнга до миграции снизился на 30% ( $p < 0,05$ ), а после миграции увеличился на 113% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями соответствующих показателей контрольной группы. При развитии

ХЛЛ жесткость поверхности лимфоцитов достоверно увеличилась до миграции на 305% ( $p < 0,05$ ), а после миграции – на 165% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями соответствующих показателей контрольной группы.

В группе больных ОЛЛ и ХЛЛ на стадии лечения наблюдали изменения сил межклеточной адгезии по сравнению с контролем (таблица).

Таблица 1

**Величины силы адгезии (нН) в системе «клетка-клетка»**

Table 1

**Values of adhesive force (nN) in the system “cell-cell”**

Параметры		Группы обследованных		
		Контроль	Больные ОЛЛ	Больные ХЛЛ
До миграции	«лимфоцит-лейкоцит»	$75,5 \pm 0,7$	-	-
	«лимфоцит-лимфобласт»	-	$74,0 \pm 0,4$	$64,6 \pm 0,6^*$
	«лимфоцит-эритроцит»	$46,5 \pm 0,6$	$45,0 \pm 1,1$	$49,7 \pm 0,3^*$
После миграции	«лимфоцит-лейкоцит»	$60,9 \pm 0,4$	-	-
	«лимфоцит-лимфобласт»	-	$50,8 \pm 0,4^*$	$35,4 \pm 0,3^*$
	«лимфоцит-эритроцит»	$39,0 \pm 0,4$	$23,6 \pm 0,5^*$	$36,6 \pm 0,6^*$

\* – статистически достоверные различия по сравнению со значениями показателей контрольной группы по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

В группе больных ОЛЛ до миграции лимфоцитов величины сил межклеточной адгезии достоверно не отличались от показателей в контрольных пробах. После миграции клеток сила адгезии в системе «лимфоцит-лимфобласт» снизилась на 17% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Измерение сил адгезии в системе «лимфоцит-эритроцит» позволило оценить ослабление межклеточных взаимодействий и, соответственно, снижение функциональной активности лимфоцитов после миграции. Сила адгезии в системе «лимфоцит-эритроцит» снизилась на 39,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с контролем. У больных ХЛЛ до миграции лимфоцитов сила адгезии в системе «лимфоцит-лимфобласт» снизилась на 14% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в системе «лимфоцит-лейкоцит» в группе здоровых людей. В пробах крови больных ХЛЛ сила адгезии в системе «лимфоцит-эритроцит» до миграции увеличилась на 7% ( $p < 0,05$ ) относительно контроля, после миграции в системе «лимфоцит-лимфобласт» сила адгезии снизилась на 42% ( $p < 0,05$ ), а в системе «лимфоцит-эритроцит» – на 6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Таким образом, при развитии злокачественных лимфопролиферативных процессов в системе крови существенно снижается миграционная активность лимфоцитов. Это может быть обусловлено уменьшением числа или полным исчезновением в

трансформированных клетках пучков актиновых нитей, которые принимают участие в движении клеток вдоль капилляра с помощью псевдоподий [7]. По данным литературы [13] динамика актина, общая интенсивность полимеризации микрофиламентов (образования псевдоподий) по краю опухолевой клетки снижается, нарушается процесс образования связанных с ними фокальных контактов.

Снижение упругости поверхности клеток создает затруднения при их продвижении по сосудам микроциркуляторного русла, снижает миграционную активность лимфоцитов. Согласно данным Копнина Б.П. [6], повышение жесткости лимфоцитов при миграции по капилляру обусловлено их сжатием за счет уплотнения цитоплазмы. Значительное возрастание жесткости опухолевых клеток может быть вызвано воздействием химиотерапевтических агентов на распределение спектрина в цитоплазме лимфоцитов, что вызывает его агрегацию в области ядра и образование нерастворимых фракций белка [9].

Ослабление межклеточной адгезии приводит к нарушению механизмов передвижения лимфоцитов по капилляру. В ряде исследований показано, что снижение адгезивных свойств поверхности опухолевых клеток при развитии патологического процесса обусловлено дефектностью формирования фокальных контактов [5]; дисбалансом цитокинового



профиля, нарушением цитокин-рецепторной сети, которая играет важную роль в установлении и стабилизации контактов между взаимодействующими клетками [8].

### Заключение

Таким образом, при развитии лимфопролиферативных процессов в системе крови происходит снижение двигательной активности опухолевых клеток. В процессе миграции по капилляру жесткость поверхности трансформированных клеток значительно повышается, а сила адгезии в системе «клетка-клетка» снижается. Уменьшение миграционного потенциала опухолевых лимфоцитов обуславливает снижение реактивности иммунной системы при злокачественных лимфопролиферативных процессах. Выявленные особенности могут быть использованы в области диагностики функционального состояния клеток крови.

Информация о конфликте интересов: авторы не имеют конфликта интересов для декларации.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interests to declare.

### Список литературы

1. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. 576 с.
2. Заявка на изобретение «Способ изготовления биомеханического сенсора для измерения сил адгезии в системе «клетка-клетка» / Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А. – № 2016103153, дата приоритета от 01.02.2016.
3. Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза // Клиническая онкогематология. 2012. Т. 5, № 2. С. 85-95.
4. Казарян П.А., Дагбашян С.С., Галоян А.А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний // Национальная академия наук Армении. 2011. Т. 111, № 1. С. 59-68.
5. Копнин Б.П. Неопластическая клетка. Основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. 2002. Т. 3, № 4. С. 229-235.
6. Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста, сходства и различия солидных опухолей и лейкозов // Клиническая онкогематология. 2012. Т. 5, № 5. С. 165-185.
7. Литвицкий П.Ф., Жевак Т.Н. Гемобластозы. Лейкозы лимфоидного происхождения // Вопросы современной педиатрии. 2016. № 15 (5). С. 457-470.
8. Милорадов М.Ю., Узикова Е.В., Булаева С.В. Взаимодействие клеток крови, феномены и молекулярная сигнализация // Ярославский педагогический вестник. 2012. Т. 3, № 4. С.165-171.

9. Новик А.В. Таргетная терапия при лимфопролиферативных заболеваниях // Практическая онкология. 2010. Т. 11, № 3. С. 131-142.

10. Новиков Д.К. Медицинская иммунология. Минск: Выш. Шк., 2005. 301 с.

11. Пат. 2466401 Российская Федерация G01N33/49 Способ определения упругости клеток крови / Скоркина М.Ю., Сладкова Е.А., Забиняков Н.А. – заявитель и патентообл. БелГУ, № 2011109741 дата приоритета от 15.03.2011.

12. Плотникова С.В., Сафуанова Г.Ш. Цитокины и молекулы межклеточной адгезии как маркеры системного воспаления при острых лейкозах // Медицинский вестник Башкортостана. 2011. Т. 6, № 6. С. 136-140.

13. Fais S., Malorni W. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions // J. Leukoc. Biol. 2003. V. 73 (5). Pp. 556-563.

14. 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 Technologies in Biology and Medicine. 2012. V. 3. Pp. 163-166.

### References

1. Zaridze D.G. Carcinogenesis. M.: Medicine, 2004. 576 p. *Russian*.
2. Application for invention «Method of manufacturing of biomechanical sensor for measuring adhesive forces in the system “cell-cell”» / Skorkina M.Yu., Shamray E.A. – No. 2016103153 date priority 01.02.2016. *Russian*.
3. Kazanskiy D.B. T-lymphocytes in the development of chronic lympholeukemia // Clinical oncohaematology. 2012. V. 5, No. 2. Pp. 85-95. *Russian*
4. Kazaryan P.A., Dagbashyan S.S., Galoyan A.A. Membrane aspects of pathogenesis in the therapy of lymphoproliferative diseases // The National Academy of Armenia. 2011. V. 111, No. 1. Pp. 59-68. *Russian*.
5. Kopnin B.P. Neoplastic cell. Main properties and mechanisms of their occurrence // Practical oncology. 2002. V. 3, No 4. Pp. 229-235. *Russian*.
6. Kopnin B.P. Modern views about mechanisms of malignant growth, similarities and differences in solid tumor and leucosis // Clinical oncohematology. 2012. V. 5, No 5. Pp. 165-185. *Russian*.
7. Litvitskiy P.F., Zhevak T.N. Hemoblastoses. Leucosis of lymphoid origin // Questions of modern pediatric. 2016. No 15 (5). Pp. 457-470. *Russian*.
8. Miloradov M.Yu., Uzikova E.V., Bulaeva S.V. Interaction of blood cells, phenomena and molecular signaling // Yaroslavl Pedagogical Bulletin. 2012. V. 3, No 4. Pp.165-171. *Russian*.
9. Novik A.V. Target therapy in lymphoproliferative diseases // Practical oncology. 2010. V. 11, No 3. Pp. 131-142. *Russian*.
10. Novikov D.K. Medicine immunology. Minsk, 2005. 301 p. *Russian*.

11. Patent 2466401 of the Russian Federation G01N33/49 Method of deterring the elasticity of blood cells / Skorkina M.Yu., Sladkova E.A., Zabiniakov N.A., BSU – the applicant and patent holder, No 2011109741 date priority of 15.03.2011. *Russian*.

12. Plotnikova S.V., Safuanova G.Sh. Cytokines and molecules intracellular adhesion as the markers of system inflammation in acute leucosis // Medical Bulletin of Bashkortostan. 2011. V. 6, No 6. Pp. 136-140. *Russian*

13. Fais S., Malorni W. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions // J. Leukoc. Biol. 2003. V. 73 (5). Pp. 556-563.

14. 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 Technologies in Biology and Medicine. 2012. V. 3. Pp. 163-166.

**Шамрай Елена Александровна**, аспирант  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,  
Ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия  
*E-mail: elenashamray@yandex.ru*

**Беляева Светлана Сергеевна**, заведующая гематологическим отделением областной больницы, кандидат медицинских наук,

Белгородская областная клиническая больница им. Святого Иоасафа,  
ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород, 308007, Россия  
*E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

**Shamray Elena Aleksandrovna**, Postgraduate Student

The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod State National Research University»,

85 Pobeda St., Belgorod, 308015, the Russian Federation

*E-mail: elenashamray@yandex.ru*

**Belyaeva Svetlana Sergeevna**, PhD in Medicine, Head of the Hematology Department,

St. Ioasaph Belgorod Regional Hospital,  
8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, the Russian Federation

*E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*