

УДК 576.08

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-27-30

Сладкова Е.А.¹
Тикунова Т.С.²

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ
В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА**

- 1) ассистент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции, кандидат биологических наук ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, д. 85, Белгород, 308015, Россия. *E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru*
- 2) заместитель главного врача по организационно-методической работе, кандидат медицинских наук, Белгородская областная клиническая больница им. Св. Иоасафа, ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород, 308007, Россия
E-mail: tikunovats@bokb.ru

Аннотация

В проведенном исследовании методом зонда Кельвина измерен потенциал поверхности лимфоцитов при развитии разных форм лимфолейкоза. Установлено, что для лимфобластов больных острым лимфобластным лейкозом, недодифференцированных лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом и зрелых лимфоцитов больных острым лейкозом на этапе ремиссии характерна деполяризация плазмалеммы. В кровеносном русле больных хроническим лимфолейкозом циркулируют клетки с наибольшим значением потенциала поверхности. Значение потенциала поверхности лимфобластов больных острым лейкозом на стадии обострения и лимфоцитов больных на этапе ремиссии не имеет достоверных различий.

Ключевые слова: лимфоцит; лейкоз; потенциал поверхности; метод зонда Кельвина

UDC 576.08

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-27-30

Sladkova E.A.¹
Tikunova T.S.²

**CHANGES IN THE LYMPHOCYTES SURFACE POTENTIAL
IN THE LYMPHOPROLIFERATIVE PROCESS**

- 1) Assistant Lecturer, PhD in Biology, Department of Ecology, Physiology and Biological Evolution, Belgorod State National Research University, 85 Pobeda Street, Belgorod 308015, Russia
E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru
- 2) Deputy Chief Doctor for Organizational and Methodical Work, PhD in Medicine, St. Joasaph Belgorod Regional Hospital, 8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia. *E-mail: tikunovats@bokb.ru*

Abstract

The lymphocytes surface potential was measured with the Kelvin's probe in different forms of lymphoblastic leukemia. It was established that lymphoblasts in patients with lymphoblastic leukemia, undifferentiated lymphocytes in patients with chronic lymphoblastic leukemia and mature lymphocytes in patients with acute leukemia had a depolarized membrane during remission. The values of surface potential of lymphoblasts in patients with acute leukemia were not significantly different from patients with leukemia in the remission phase.

Key words: lymphocyte; leukemia; surface potential; Kelvin's probe

Нарушение генетического и метаболического аппаратов лимфоцитов приводит к изменению фундаментальных процессов лимфопоэза – пролиферации и дифференцировки [6], что служит ключевым моментом для приобретения клеткой злокачественности. Способность лимфоцитов к опухолевому перерождению основывается на изменении физико-химических свойств клеток [7]. В ряде экспериментальных

работ показано, что потенциал поверхности клетки непосредственно участвует в поддержании необходимого равновесия между пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом [1]. Ввиду чего, изменение поверхностного потенциала лимфоцитов может быть непосредственно связано с процессами их опухолевого перерождения.

Целью настоящего исследования явилось изучение потенциала поверхности лимфоцитов в условиях развития лимфопролиферативного процесса.

Материалы и методы исследования

Исследован потенциал поверхности лимфоцитов больных острым лимфобластным лейкозом в стадии обострения (ОЛЛ), хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) и острым лимфобластным лейкозом в ремиссии (ОЛЛ в ремиссии) по 20 пациентов в каждой группе. В качестве контроля взяты лимфоциты 50 здоровых людей.

Забор периферической крови здоровых пациентов и больных лейкозом осуществляли из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, предотвращающая свертывание крови путем блокирования ионов кальция) в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови (0,006843 моль/литр). Дифференциальный анализ крови проводили при

непосредственном участии врачей-лаборантов клинической лаборатории областной больницы г. Белгорода.

Разделение проб крови на лейкоциты и эритроциты осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об./мин. Полученную надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо отбирали, затем центрифугировали 10 мин при той же скорости. Получали суспензию лейкоцитов.

Измерение потенциала поверхности (ПП) в одиночных лимфоцитах проводили в режиме зонда Кельвина на атомно-силовом микроскопе (АСМ) [4]. Применяемый в настоящее время метод зонда Кельвина основывается на двухпроходной методике. В первом проходе определяется рельеф поверхности образца с использованием полуконтактного метода АСМ-сканирования. На втором проходе этот рельеф отслеживается при прохождении зонда над образцом на некоторой высоте для определения поверхностного электрического потенциала (рис. 1).

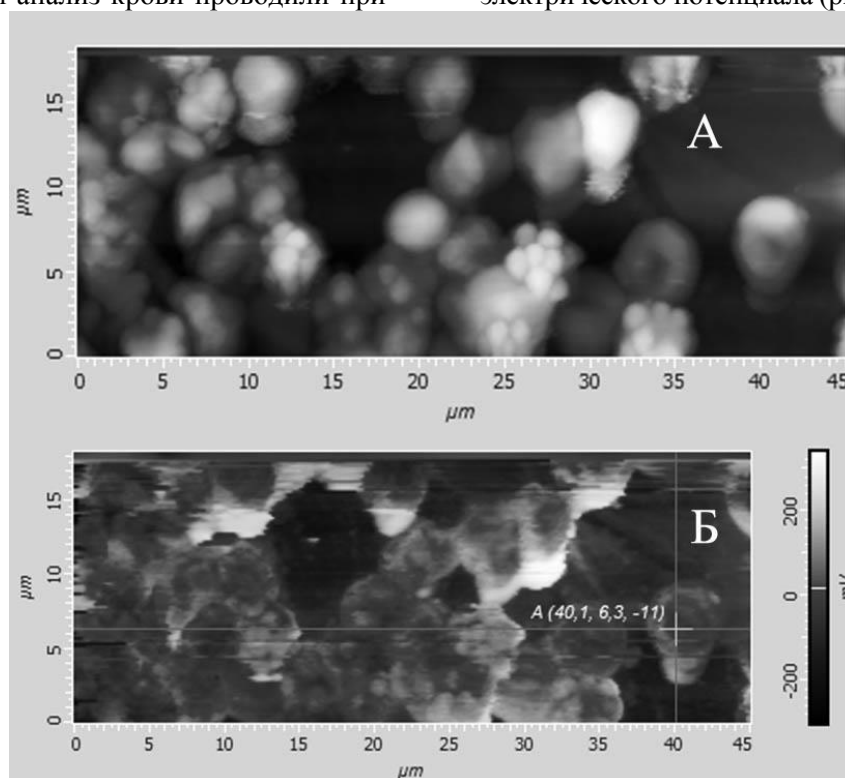


Рис 1. Распределение ПП по поверхности лимфоцитов: А – скан лимфоцитов (первый проход), Б – распределение ПП по поверхности лимфоцитов (второй проход).

Fig.1. Lymphocytes' surface potential breakdown a - image of lymphocytes (first passage), b - lymphocytes surface potential breakdown (second passage)

Суспензию лейкоцитов для измерения потенциала поверхности (ПП) готовили согласно

«Способу регистрации изменения поверхностного заряда» [2]. Клетки крови отмывали изотоничным

раствором хлорида натрия в течение 5 мин, затем проводили фиксацию 0,25% раствором глутарового альдегида в течение 20 мин. Далее суспензию лейкоцитов дважды отмывали изотоничным раствором хлорида натрия по 5 мин. Препараты готовили на обезжиренной металлической подложке.

Потенциал поверхности (ПП) измеряли с помощью кантилевера с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, USA). Сканировали по 15 клеток из каждой пробы. Обработку полученных сканов выполняли в программе Nova (Зеленоград, 2009). С помощью инструмента «Point Instruments» определяли значение ПП в 10 участках каждой клетки на скане распределения потенциала по поверхности лимфоцита (см. рис. 1б), рассчитывали среднее значение для всех клеток пробы.

Статистический анализ проведен с использованием критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости [3].

Результаты исследования и их обсуждение

В периферической крови больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) выявлены лимфобласты, значение потенциала поверхности (ПП) которых повышено на 34% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами здоровых людей (рис. 2). Не исключено, что деполяризация плазмалеммы лимфобластов может повышать адгезивные свойства клеток [8]. Такая особенность опухолевых клеток в сочетании со снижением жесткости их мембраны, установленным в наших исследованиях [5], дает клеткам возможность активно мигрировать в ткани.

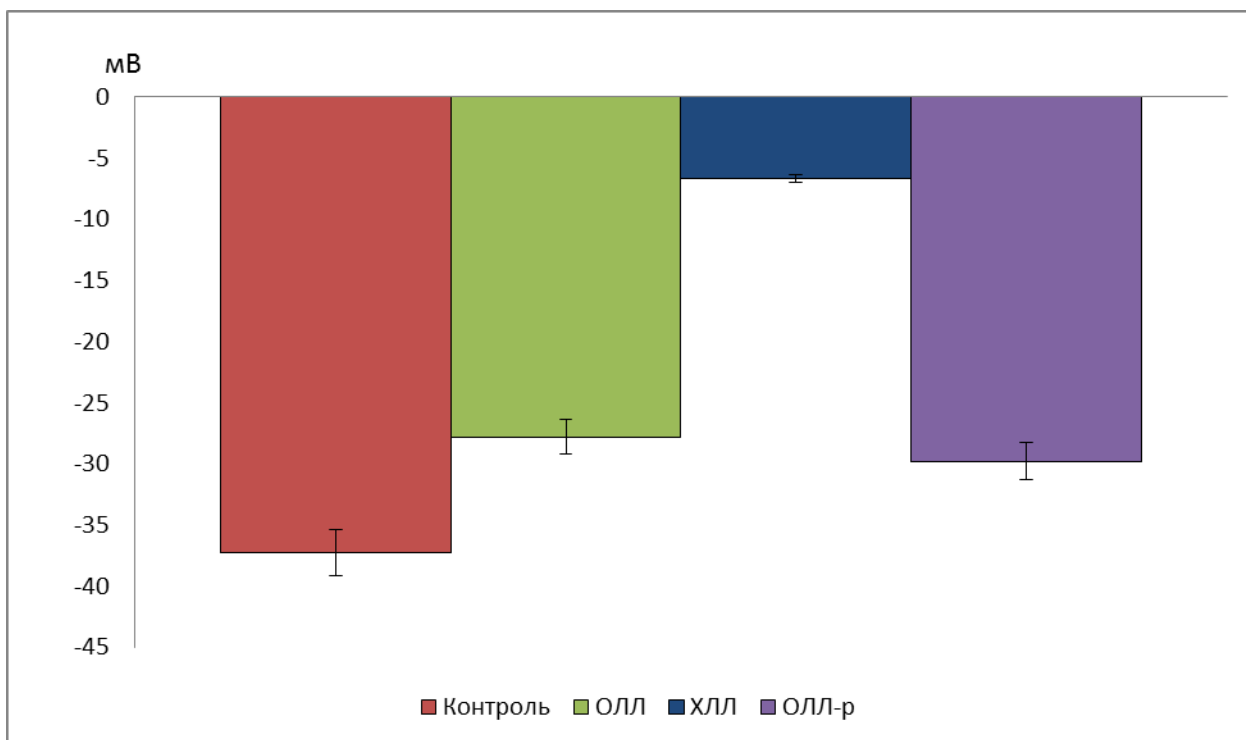


Рис. 2. Потенциал поверхности клеток лимфоидного ряда

Fig. 2. Lymphocytes surface potential

При развитии хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) установлена гетерогенность лимфоидной популяции. Преимущественно в периферическом русле циркулировали недодифференцированные формы – пролимфоциты, встречались единичные лимфобласты. В среднем ПП клеток лимфоидного ряда больных ХЛЛ повышен на 456% ($p < 0,05$) по сравнению с клетками контрольной группы.

Достоверных различий значений ПП лимфобластов и пролимфоцитов не установлено (см. рис. 2). Подобное значительное повышение ПП лейкозных клеток при хроническом течении лимфолейкоза результат существенных изменений в работе ионных каналов плазмалеммы клеток [10], что влечет за собой перестройки цитоскелетных структур и изменение локомоторного поведения лимфоцитов [9].

Незрелые форменные элементы лимфоидного ряда отсутствовали в крови больных острым лимфобластным лейкозом на стадии ремиссии (ОЛЛ в ремиссии), циркулирующие в периферическом русле лимфоциты морфологически не отличались от клеток крови здоровых людей. Однако ПП таких лимфоцитов был повышен на 28,6% ($p < 0,05$; см. рис. 2).

Сравнивая значения ПП между больными разными формами лимфолейкоза установлено, что для пролимфоцитов и бластов больных ХЛЛ характерно наибольшее повышение потенциала поверхности: соответственно на 315% и 333% ($p < 0,05$) по сравнению с ОЛЛ и ОЛЛ в ремиссии. При этом значения ПП лимфобластов больных ОЛЛ и лимфоцитов больных ОЛЛ в ремиссии находились в пределах недостоверных различий, что может указывать на сходство в протекании метаболических процессов в лимфобластах и лимфоцитах на разных стадиях острого лейкоза.

Заключение

Результаты экспериментальных исследований, представленные в данной работе, расширяют и дополняют современные представления о функциональном статусе лимфоцитов при лейкозогенезе. Установлено, что развитие различных форм лимфолейкоза сопровождается деполяризацией мембраны как бластных форм, так и дифференцированных лимфоцитов. Причем, наибольшее увеличение потенциала поверхности по сравнению с лимфоцитами здоровых людей характерно для лимфобластов и пролимфоцитов больных лимфолейкозом в хронической форме. Кроме того, после лечения у больных острым лейкозом на стадии ремиссии в крови циркулируют лимфоциты, потенциал поверхности которых сходен со значениями аналогичного параметра лимфобластов больных на стадии обострения.

Список литературы

1. Никонова М.Ф., Литвинова М.М., Варфоломеева М.И. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. 1999. № 2. С. 20-23.
2. 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.
3. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с.
4. Руководство пользователя «Зондовая нанолaborатория Интегра Вита». Зеленоград: Copyright НТМДТ. 2006. 57 с.

5. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Структурно-функциональные особенности лимфоцитов больных лимфобластным лейкозом // Цитология. 2013. Т. 55, № 6. С. 388-393.

6. Смирнова О.В., Манчук В.Т. Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 6. С. 577-584.

7. Bisset L.R., Lung T.L., Kaelin M. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland // Eur. J. Haematol. 2004. V. 72. P. 203-212.

8. Cernuda-Morollon E. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells // Circulation researcher. 2006. V. 98. P. 757-758.

9. 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. V. 16. P. 2786-2798.

10. Negulyaev Yu.A. Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells // Mol. Biol. Cell. 1996. V. 7. P. 1857-1864.

References

1. Nikonova M.F., Litvinova M.M., Varfolomeeva M.I. Apoptosis and proliferation as alternative forms of T-lymphocytes response on stimulation. Immunology. 1999. № 2. Pp. 20-23.
2. Patent RF 2027188 The Method of Recording the Erythrocytes' Surface Charge's Changes / Sheremetev Yu.A., Makin G.I., Suslov F.Yu. – Patent-holder NSH, date of priority No. 4947820/14 from 24.06.1991.
3. Platonov A.E. Statistical analysis in medicine and biology. Moscow: RAMN. 2000. 52 p.
4. User guide «Probe Nanolaboratory Integra Vita». Zelenograd: Copyright NTMDT. 2006. 57 p.
5. Sladkova E.A., Skorkina M.Yu. Structure functional features of lymphocytes from the patients with lymphoblastic leucosis. Cytology. 2013. V. 55 (6). Pp. 388-393.
6. Smirnova O.V., Manchuk V.T. The features of the immune system cells during acute lymphoblastic leukemia. Medical Immunology. 2013. V. 15 (6). Pp. 577-584.
7. Bisset L.R., Lung T.L., Kaelin M. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. Eur. J. Haematol. 2004. V. 72. Pp. 203-212.
8. Cernuda-Morollon E. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. Circulation Researcher. 2006. V. 98. Pp. 757-758.
9. 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. V. 16. Pp. 2786-2798.
10. Negulyaev Yu.A. 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.