
КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА CLINICAL MEDICINE

© Жернакова Н.И., Скоркина М.Ю., Пальчиков М.Ю., Сладкова Е.А., 2019
УДК 576.5
DOI 10.20310/2658-7688-2019-1-4-7-12

Функциональные свойства поверхности лимфоцитов при развитии лимфопролиферативных заболеваний в системе крови

**Нина Ивановна ЖЕРНАКОВА, Марина Юрьевна СКОРКИНА,
Михаил Юрьевич ПАЛЬЧИКОВ, Евгения Анатольевна СЛАДКОВА**

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
308015, г. Белгород, Российская Федерация, ул. Победы, д. 85, кор. 10
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7648-0774>, e-mail: zhernakova@bsu.edu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9441-5295>, e-mail: skorkina@bsu.edu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2426-1307>, e-mail: palchikov@bsu.edu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3072-2402>, e-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Functional properties of lymphocyte surface in the development of lymphoproliferative diseases in the blood system

**Nina I. ZHERNAKOVA, Marina Yu. SKORKINA,
Mikhail Yu. PALCHIKOV, Evgeniya A. SLADKOVA**

Belgorod State University
85-10 Pobedy St., Belgorod 308015, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7648-0774>, e-mail: zhernakova@bsu.edu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9441-5295>, e-mail: skorkina@bsu.edu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2426-1307>, e-mail: palchikov@bsu.edu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3072-2402>, e-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Аннотация. Лимфопролиферативные заболевания сопровождаются изменением функциональных свойств лимфоцитов за счет конформационных перестроек элементов цитоскелета. *Целью* работы явилось изучение функциональных свойств поверхности лимфоцитов в норме и при развитии острого лимфобластного лейкоза на различных стадиях течения болезни. *Материалы и методы.* Для достижения поставленной цели в эксперименте была использована кровь больных острым лимфобластным лейкозом, в качестве группы сравнения – кровь здоровых людей. Препараты крови сканировали на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. *Результаты.* В результате выполненного исследования получены новые данные о функциональных свойствах нормальных и опухолевых лимфоцитов. Установлено снижение модуля Юнга в группе больных острым лимфобластным лейкозом на стадии первичной постановки диагноза на 53 % ($p < 0,05$), на стадии лечения – на 33 % ($p < 0,05$) и рецидива – на 38 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Сила адгезии в системе «клетка–клетка» увеличилась во всех обследованных группах больных. *Заключение.* Полученные результаты имеют значение для изучения механизмов поддержания иммунного статуса у больных лейкозом.

Ключевые слова: лимфоциты, острый лимфобластный лейкоз, модуль Юнга, сила адгезии

Для цитирования: Жернакова Н.И., Скоркина М.Ю., Пальчиков М.Ю., Сладкова Е.А. Функциональные свойства поверхности лимфоцитов при развитии лимфопролиферативных заболеваний в системе крови // Медицина и физическая культура: наука и практика. 2019. Т. 1. № 4. С. 7-12. DOI 10.20310/2658-7688-2019-1-4-7-12.

Abstract. Changes in lymphocyte functional properties due to conformational rearrangements of cytoskeletal elements accompany lymphoproliferative diseases. The aim of the work is to study the functional properties of the lymphocyte surface in normal and in the development of acute lymphoblastic leukemia at different stages of the disease course. Materials and methods. In order to achieve this goal, the experiment used blood of patients with acute lymphoblastic leukemia, as a comparison group – blood of healthy people. Blood preparations were scanned on an atomic force microscope in a power spectroscopy mode. Results. New data on the functional properties of normal and tumor lymphocytes were obtained as a result of the study. We found a decrease in Jung's modulus in the group of patients with acute lymphoblastic leukemia at the stage of primary diagnosis at 53% ($p < 0.05$), at the stage of treatment – at 33% ($p < 0.05$) and relapse – at 38% ($p < 0.05$) compared to control. The strength of adhesion in the cell-cell system increased in all examined groups of patients. Conclusion. Obtained data is important for studying mechanisms to maintain immune status in leukemia patients.

Keywords: lymphocytes, acute lymphoblastic leukemia, Jung's modulus, adhesion strength

For citation: Zhernakova N.I., Skorkina M.Yu., Palchikov M.Yu., Sladkova E.A. Funktsional'nye svoystva poverkhnosti limfotsitov pri razvitiim limfoproliferativnykh zaboolevaniy v sisteme krovi [Functional properties of lymphocyte surface in the development of lymphoproliferative diseases in the blood system] // *Meditsina i fizicheskaya kul'tura: nauka i praktika. – Medicine and Physical Education: Science and Practice.* 2019, vol. 1, no. 4, pp. 7-12. DOI 10.20310/2658-7688-2019-1-4-7-12. (In Russian, Abstr. in Engl.)

Развитие злокачественных лимфопролиферативных процессов в системе крови сопровождается изменением функциональной активности лимфоцитов. Это обусловлено определенными перестройками в структуре клеточной поверхности [1]. В опухолевых клетках происходит дестабилизация плазмалеммы, модификация конформации элементов цитоскелета, перестройка актиновых нитей, системы микротрубочек, фокальных контактов, что в конечном итоге влияет на адгезивные свойства клеточной поверхности [2].

Цель работы – изучить функциональные свойства поверхности лимфоцитов в норме и при развитии острого лимфобластного лейкоза на различных стадиях течения болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования выполнены на базе кафедры биохимии и кафедры семейной медицины Медицинского института НИУ БелГУ. Объект исследования – венозная кровь больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) на стадии первичной постановки диагноза ($n = 10$), лечения ($n = 30$), рецидива

($n = 5$). В качестве контроля использовали кровь здоровых людей ($n = 50$).

Кровь собирали путем венепункции в гепаринизированные вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ с помощью специализированного медицинского персонала Белгородской областной больницы Св. Иоасафа. Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации, получено предварительное информированное согласие участников эксперимента в соответствии с рекомендациями [3].

Клетки крови разделяли на лейкоциты, эритроциты и тромбоциты путем центрифугирования в течение 5 мин. при 1500 об./мин.

Для изучения функциональных свойств поверхности клеток использовали метод атомно-силовой микроскопии (Интегра Вита, конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71, производитель NT-MDT, Зеленоград, 2009). Общую жесткость лимфоцитов измеряли с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG11 [4]. Модуль

Юнга, количественно характеризующий жесткость клеточной поверхности, определяли с помощью экспериментальных силовых кривых, снятых с поверхности не менее 15 лимфоцитов из каждой пробы в режиме силовой спектроскопии.

Силы адгезии в системе «клетка-клетка» измеряли с использованием биосенсорного чипа, изготовленного на основе нативного лимфоцита и типлесса CSG11 [5]. Силы адгезии измеряли в системах «лимфоцит-лейкоцит», «лимфоцит-эритроцит» и «лимфоцит-тромбоцит», регистрируя силовые кривые с поверхности не менее 15 клеток.

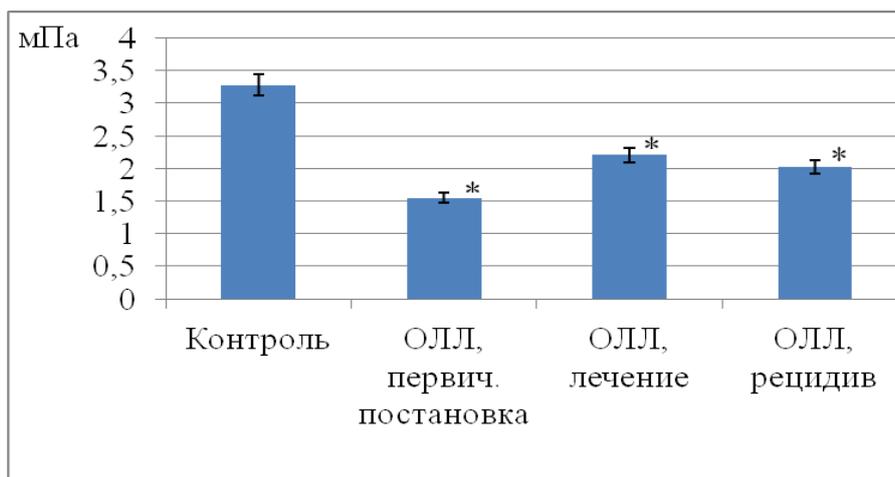
Результаты экспериментального исследования обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выполненного эксперимента установлено снижение модуля Юнга лимфоцитов на всех стадиях развития ОЛЛ по сравнению с нормой (рис. 1).

В норме модуль Юнга поверхности лимфоцитов составил $3,28 \pm 0,03$ мПа. В группе больных ОЛЛ на стадии первичной постановки диагноза показатель жесткости клеток снизился на 53 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. У больных ОЛЛ на стадии лечения и рецидива модуль Юнга уменьшился соответственно на 33 % ($p < 0,05$) и 38 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В группах больных ОЛЛ выявлены изменения сил межклеточной адгезии по сравнению с нормой (табл. 1).



* – достоверность различий между значениями модуля Юнга в контрольной и опытной группах
* – significant differences between the values of Young's module in the control and experimental groups

Рис. 1. Модуль Юнга поверхности лимфоцитов
Fig. 1. Young's module of lymphocytes' surface

В группе больных ОЛЛ на стадии первичной постановки диагноза силы адгезии в системе «лимфоцит-лейкоцит», «лимфоцит-эритроцит», «лимфоцит-тромбоцит» увеличены соответственно на 60 % ($p < 0,05$), 100 % ($p < 0,05$) и 378 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. На стадии лечения ОЛЛ сила адгезии в системе «лимфоцит-лейкоцит» увеличилась на 17 % ($p < 0,05$), в системе «лимфоцит-эритроцит» – на 7 % ($p < 0,05$) «лимфоцит-тромбоцит» – на 248 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При развитии рецидива ОЛЛ силы адгезии в системе «лимфоцит-лейкоцит»,

«лимфоцит-эритроцит», «лимфоцит-тромбоцит» увеличены соответственно на 109 % ($p < 0,05$), 118 % ($p < 0,05$) и 348 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таким образом, на всех стадиях протекания острого лимфобластного лейкоза (первичная постановка диагноза, лечение, рецидив) модуль Юнга поверхности лимфоцитов снизился по сравнению с контролем, что может быть обусловлено перераспределением белков цитоскелета (актина, спектрина) в клетках при злокачественных лимфопроли-

феративных процессах в системе крови, а также под действием химиотерапии в период лечения [6].

В ходе исследования установлено увеличение межмолекулярных сил адгезии в системе «клетка–клетка» во всех группах больных ОЛЛ. Повышение адгезивных свойств клеток при развитии опухолевого процесса в системе крови мы связываем с изменением

цитокинового профиля. Согласно данным литературы, развитие лимфопролиферативного процесса в системе крови сопровождается накоплением TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, модификацией цитокин-рецепторной сети, повышением уровня молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) [7], увеличением экспрессии антигенов (CD9, CD11, CD21, CD22, CD29, CD31, CD38, CD44) [8].

Таблица 1

Сила адгезии в системе «клетка–клетка»

Table 1

Adhesive forces in the system «cell-cell»

Группы Groups	Сила адгезии, нН Adhesive forces, nN		
	«лимфоцит-лейкоцит» «lymphocyte-leukocyte»	«лимфоцит-эритроцит» «lymphocyte-erythrocyte»	«лимфоцит-тромбоцит» «lymphocyte-platelet»
Здоровые люди (контроль) Healthy people (control)	78,4 ± 0,5	42,1 ± 0,3	55,3 ± 0,5
ОЛЛ первичная постановка диагноза ALL primary diagnosis	125,4 ± 1,3*	84,2 ± 0,9*	264,2 ± 0,9*
ОЛЛ лечение ALL treatment	91,8 ± 0,3*	45,0 ± 1,1*	192,4 ± 0,4*
ОЛЛ рецидив ALL relapse	164,1 ± 0,4*	91,8 ± 0,4*	248,2 ± 1,1*

* – статистически достоверные различия по сравнению со значениями контрольной группы

* – statistically significant differences compared with the values of control group

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при развитии злокачественных лимфопролиферативных процессов в системе крови изменяются механические свойства поверхности лимфоцитов. На стадии первичной постановки диагноза ОЛЛ, при лечении и рецидиве болезни значительно

снижается жесткость поверхности лимфоцитарных клеток, при этом межмолекулярные силы адгезии в системе «клетка–клетка» увеличиваются. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в группах больных ОЛЛ на стадии первичной постановки диагноза и при развитии рецидива.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза // Клиническая онкогематология. 2012. Т. 5, № 2. С. 85-95.
2. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. М., 2004. 576 с.
3. Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации. Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта. URL: http://rostgmu.ru/wp-content/uploads/2014/12/WMA_Helsinki.pdf (дата обращения 25.10.2019)
4. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Муравьев А.В., Сладкова Е.А. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом // Клеточные технологии в биологии и медицине 2012. № 3. С. 172-175.
5. Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А. Измерение сил адгезии в системе «клетка–клетка» на основе технологий атомно-силовой микроскопии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 4. С. 213-215.

6. Heng, Y.W., Koh C.G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle // *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2010. Vol. 42. P. 1622-1633. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.04.007.
7. Плотникова С.В., Сафуанова Г.Ш. Цитокины и молекулы межклеточной адгезии как маркеры системного воспаления при острых лейкозах // *Медицинский вестник Башкортостана*. 2011. № 6. С. 136-141.
8. Barber N., Ges S., Belov L. Profiling CD antigens on leukaemias with an antibody microarray // *FEBS Lett*. 2009. Vol. 583. № 11. P. 1785-1791. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.018.

REFERENCES

1. Kazanskij D.B. T-limfotsity v razvitii khronicheskogo limfolejkoza [T-lymphocytes in the development of chronic lymphatic leukemia] // *Klinicheskaya onkologematologiya. – Clinical Oncohematology*. 2012, vol. 5, no. 2, pp. 85-95. (In Russian).
2. Zaridze D.G. Kantserogenez [Carcinogenesis]. Moscow, 2004, 576 p. (In Russian).
3. Khel'sinkaya deklaratsiya Vsemirnoj meditsinskoj assotsiatsii. Eticheskiye printsipy provedeniya meditsinskikh issledovaniy s uchastiyem cheloveka v kachestve sub'yekta [Helsinki declaration of the World Medical Association. Ethical principles of carrying out medical researches with participation of the person as the subject]. Available at: http://rosgmu.ru/wp-content/uploads/2014/12/WMA_Helsinki.pdf (accessed 25.10.2019)
4. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Murav'ev A.V., Sladkova E.A. Ispol'zovaniye nanomekhanicheskogo sensora dlya izucheniya morfofunktsional'nykh svoystv limfotsitov zdorovykh donorov i bol'nykh khronicheskim limfoblastnym lejkozom [Use of nanomechanical sensor to study morphofunctional lymphocyte properties of healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia] // *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine. – Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2012, no. 3, pp. 172-175. (In Russian).
5. Skorkina M.Yu., Shamraj E.A., Sladkova E.A. Izmereniye sil adgezii v sisteme «kletka-kletka» na osnove tekhnologij atomno-silovoj mikroskopii [Measurement of adhesion forces in the cell-cell system based on atomic force microscopy technologies] // *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine. – Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2017, no. 4, pp. 213-215. (In Russian).
6. Heng, Y.W., Koh C.G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2010, vol. 42, pp. 1622-1633. (In Russian). DOI: 10.1016/j.biocel.2010.04.007.
7. Plotnikova S.V., Safuanova G.Sh. Tsitokiny i molekuly mezhkletочноj adgezii kak markery sistemnogo vospaleniya pri ostrykh lejkozakh [Cytokines and intercellular adhesion molecules as markers of systemic inflammation in acute leukemia] // *Meditsinskij vestnik Bashkortostana. - Bashkortostan Medical Journal*. 2011, no. 6, pp. 136-141. (In Russian).
8. Barber N., Ges S., Belov L. Profiling CD antigens on leukaemias with an antibody microarray // *FEBS Lett*. 2009, vol. 583, no 11, pp. 1785-1791. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.018.

Информация об авторах

Жернакова Нина Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, зам. директора по научной работе медицинского института, зав. кафедрой семейной медицины Медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация.

E-mail: zhernakova@bsu.edu.ru

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7648-0774>

Скоркина Марина Юрьевна, доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой биохимии Медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация.

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, сбор материала, написание статьи.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9441-5295>

Information about the authors

Nina I. Zhernakova, Doctor of Medicine, Professor, Deputy Director for Scientific Work, Medical Institute, Head of Family Medicine Department, Medical Institute, Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation.

E-mail: zhernakova@bsu.edu.ru

Contribution: concept and design of research, writing and editing of text.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7648-0774>

Marina Yu. Skorkina, Doctor of Biology, Associate Professor, Head of Biochemistry Department, Medical Institute, Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation.

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Contribution: concept and design of research, collection of material, writing of the article.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9441-5295>

Пальчиков Михаил Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация.

E-mail: palchikov@bsu.edu.ru

Вклад в статью: статистическая обработка данных, написание текста статьи.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2426-1307>

Сладкова Евгения Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация.

E-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Вклад в статью: сбор и обработка материала, написание текста статьи.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3072-2402>

Конфликт интересов отсутствует.

Для контактов:

Скоркина Марина Юрьевна

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 26.10.2019 г.

Поступила после рецензирования 17.11.2019 г.

Принята к публикации 06.12.2019 г.

Mikhail Yu. Palchikov, Candidate of Biology, Associate Professor of Biochemistry Department, Medical Institute, Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation.

E-mail: palchikov@bsu.edu.ru

Contribution: statistical data processing, writing the text of the article.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2426-1307>

Evgeniya A. Sladkova, Candidate of Biology, Associate Professor of Biochemistry Department, Medical Institute, Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation.

E-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Contribution: collection and processing of material, writing the text of the article.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3072-2402>

There is no conflict of interests.

Corresponding author:

Marina Yu. Skorkina

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Received 26 October 2019

Reviewed 17 November

Accepted for press 6 December 2019