

УДК 576.52

Скоркина М.Ю.,
Беляева С.С.,
Клочкова Г.Н.,
Салих А.М.С.

**ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА
НА СТРУКТУРУ И МЕХАНИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ
ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

Скоркина Марина Юрьевна,

*доцент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции,
кандидат биологических наук, доцент*

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

Беляева Светлана Сергеевна

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

Клочкова Галина Николаевна

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

Салих Аммар Муслим Салих, студент

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

АННОТАЦИЯ

Установлено влияние адреналина на структуру и механические свойства поверхности зрелых лимфоцитов здоровых людей и недодифференцированных лимфоцитов больных хроническим типом лимфобластного лейкоза. Под влиянием адреналина методом атомно-силовой спектроскопии доказано различие в цитоархитектонике поверхности лимфоцитов исследуемых групп. Так, под влиянием адреналиновой нагрузки поверхность лимфоцитов здорового человека становится шероховатой, а больного хроническим типом лейкоза – рифленой. В тоже время адреналин ухудшает упруго-эластические свойства как клеток здоровых, так и больных людей. Выявленные эффекты адреналиновой нагрузки на клеточном уровне имеют важное значение для понимания патогенеза функциональных состояний, сопровождающихся изменением микрореологических свойств крови.

Key words: адреналин, лимфоциты, атомно-силовая микроскопия, упруго-эластические свойства.

UDC 576.322.2

*Skorkina M.Yu.,
Belayeva S.S.,
Klochkova G.N.,
Salih A.M.S.*

**THE INFLUENCE OF ADRENALINE
ON THE STRUCTURAL AND
MECHANICAL PROPERTIES
OF THE SURFACE
OF HUMAN LYMPHOCYTES**

Skorkina Marina Yuryevna

PHD in biology, assistant professor

Belgorod State National Research University,

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia; *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

Belayeva Svetlana Sergeevna

Belgorod St Iosaph Regional Hospital,

8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia; *E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

Klochkova Galina Nikolaevna

Belgorod St Iosaph Regional Hospital,

8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia; *E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

Salih Ammar Muslim Salih, Student

Belgorod State National Research University,

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia; *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

ABSTRACT

The authors have established the influence of adrenaline on the structure and mechanical properties of the surface of human lymphocytes and lymphocytes from patients with chronic leukemia. With the method of atomic force microscopy, the authors have revealed that under the influence of adrenaline there is a difference in the topography of lymphocytes' surface in both groups. Under the influence of adrenalin load the surface of lymphocytes in healthy donors becomes roughened, but the lymphocytes' surface in patients with chronic leukemia is ruffled. At the same time, adrenaline decreases elastic properties of cells. The effects of adrenalin load on the cell identified in the study are important for understanding of the pathogenesis of the functional status accompanied by a change in the microrheological properties of blood.

Key words: adrenalin; lymphocytes; atomic force microscopy; elastic properties.

Адреналин выступает важным регулятором функциональной активности иммунокомпетентных клеток, оказывая стимулирующее влияние на и рецепторы [11]. На поверхности иммунных клеток присутствуют α - и β -адренорецепторы. Установлено, что β -адренергическая стимуляция в отличие от α -адренергической подавляет функции лейкоцитов [7]. β_2 -адренорецепторы представлены на поверхности всех лимфоцитов за исключением Th_2 [13]. Несмотря на то, что к настоящему моменту установлены различные пути α - и β -адренергической стимуляции лимфоцитов на молекулярном уровне [5, 10], не выясненным остается вопрос о влиянии адреналина на свойства и структуру клеточной поверхности как в высоко специализированных клетках, так и в клетках с нарушенным механизмом созревания и дифференцировки. В связи с этим, целью исследования было изучить изменение структуры и механических свойств поверхности лимфоцитов здоровых людей и больных лейкозом под влиянием адреналиновой нагрузки.

Материалы и методы исследования.

В экспериментальной части работы использовали венозную кровь здоровых людей (25 человек) в возрасте от 25 до 45 лет, а также кровь больных ХЛЛ (25 человек) в возрасте от 17 до 46 лет, находящихся на лечении в гематологическом отделении областной клинической больницы г. Белгорода. Человеческую кровь получали методом венепункции при участии специализированного медперсонала. Суспензию лимфоцитов получали путем центрифугирования цельной крови при 1500 об/мин, с последующим отмыванием лейкоцитарного кольца в растворе Дульбекко (рН 7,4). Адреналиновую нагрузку осуществляли путем инкубации 30 мкл клеточной суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей 10^{-9} ммоль/л адреналина в течение 15 мин. По окончании времени инкубации пробы центрифугировали 5 мин

при 1500 об/мин, надосадочную жидкость убирали. В качестве контроля использовали лимфоциты, помещенные в аутологичную плазму и инкубированные при тех же условиях.

Механические свойства клеток крови изучали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (Зеленоград, 2009) в режиме силовой спектроскопии во влажной камере [3] Для работы с клетками использовали модифицированные АСМ-зонды в виде полусфер с радиусом закругления 5 мкм [4]. Модуль Юнга, характеризующий упругость клеток, рассчитывали исходя из известной формулы [6].

Структуру поверхности лимфоцитов изучали на нативных клетках крови с использованием атомно-силового микроскопа в режиме полуконтактного сканирования. Сканировали по 20 клеток из каждой пробы. Сканирование осуществляли с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилеверы серии NSG03 жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм. Строили кривые профиля участков поверхности размером 3,5Х3,5 мкм, на которых измеряли высоту и подсчитывали количество глобулярных выступов, а также углублений, образовавшихся в мембране после нагрузок.

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета анализа «Microsoft Excel 7.0» на персональном компьютере. Статистический анализ результатов экспериментов проведен с применением критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости.

Результаты исследования и их обсуждение.

Лимфоциты доноров. В условиях активации и блокады β -адренорецепторов рельеф поверхности лимфоцитов был изменен, в структуре плазмалеммы наблюдали рифленость по сравнению с «рисунком» мембраны в плазме (рис. 1).

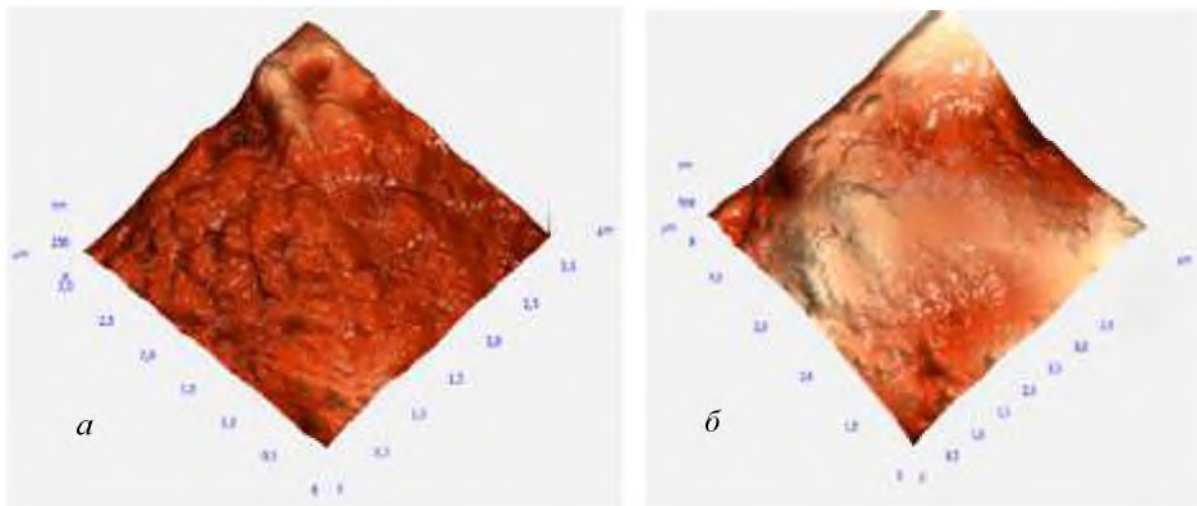


Рис. 1. Рельеф поверхности лимфоцитов доноров:
а – в условиях адреналиновой нагрузки; б – в аутологичной плазме.

Fig. 1. Relief of surface of donors' lymphocytes:
a – in the conditions of adrenalin load; b – in the autologous plasma.

Наблюдаемая на сканограммах шероховатость поверхности под влиянием адреналина сопровождается увеличением числа глобулярных выступов на 27,7% ($p < 0,05$), при этом высота их снизилась на 42,4% ($p < 0,05$) по сравнению с размерами глобул в плазме (табл. 1).

Под влиянием адреналиновой нагрузки произошло заметное сокращение числа

углублений в мембране на 55,5% ($p < 0,05$) по сравнению с плазмой, их диаметр и глубина уменьшились соответственно на 28,7% и 32,6% ($p < 0,05$). Модуль Юнга лимфоцитов увеличился на 57% ($p < 0,05$), а глубина погружения кантилевера в мембрану уменьшилась на 45% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 1

Цитоархитектоника и механические свойства лимфоцитов доноров под влиянием адреналина

Table 1

Topography and mechanical properties of donors' lymphocytes under the influence of adrenaline

Параметры		Плазма (контроль)	Адреналин
Глобулярные выступы	высота, нм	41,30 ± 3,7	17,54 ± 0,53*
	число	36,0 ± 0,9	46,0 ± 1,1*
Углубления в мембране	диаметр, нм	221,8 ± 24,0	63,79 ± 1,15*
	глубина, нм	17,30 ± 0,60	5,64 ± 0,15*
	число	18,0 ± 1,1	10,0 ± 2,3*
Жесткость	модуль Юнга, μPa	3,50 ± 0,20	5,49 ± 0,37*
	глубина погружения кантилевера, нм	345,20 ± 3,74	155,12 ± 23,48*

*- Статистически достоверные различия между значениями в пробах с адреналином по сравнению с плазмой по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Лимфоциты больных ХЛЛ. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХЛЛ под влиянием адреналина (рис. 2а) был менее

структурирован по сравнению с контролем (лимфоциты больных ХЛЛ в аутологичной плазме; рис. 2в).

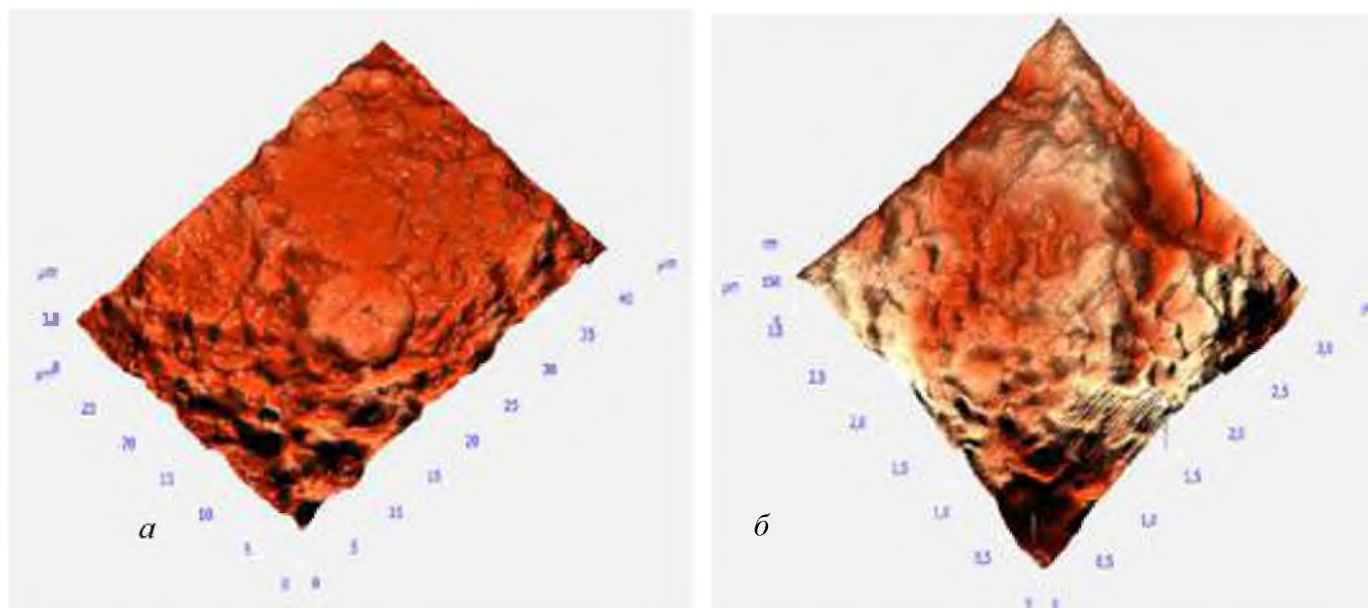


Рис. 2 Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХЛЛ: а – в условиях адреналиновой нагрузки; б – в аутологичной плазме.

Fig. 2. Relief of surface of lymphocytes in patients with CLL: a – in the conditions of adrenalin load, b – in the autologous plasma.

Количество углублений в мембране уменьшилось на 70% ($p < 0,05$), при этом их глубина увеличилась на 344% ($p < 0,05$), а диаметр сократился на 93,7% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Под влиянием адреналиновой

нагрузки число глобулярных выступов сократилось на 79% ($p < 0,05$), а их высота возросла на 314% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 2).

Цитоархитектоника и механические свойства лимфоцитов больных ХЛЛ под влиянием адреналина

Таблица 2

Topography and mechanical properties of lymphocytes in patients with CLL under the influence of adrenaline

Table 2

Параметры		Плазма (контроль)	Адреналин
Глобулярные выступы	высота, нм	$17,6 \pm 0,9$	$72,85 \pm 1,3^*$
	число	$125,0 \pm 1,1$	$26,0 \pm 0,9^*$
Углубления в мембране	диаметр, нм	$149,4 \pm 12,9$	$9,29 \pm 1,89^*$
	глубина, нм	$8,01 \pm 0,9$	$35,54 \pm 3,57^*$
	число	$40,0 \pm 2,3$	$12,0 \pm 1,36^*$
Жесткость	модуль Юнга, μPa	$1,80 \pm 0,01$	$4,19 \pm 0,31^*$
	глубина погружения кантилевера, нм	$1035,20 \pm 7,32$	$258,01 \pm 31,07^*$

*- Статистически достоверные различия между значениями в пробах с адреналином по сравнению с плазмой по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука, 1994. 288 с.
2. Казарян П.А., Дагбашян С.С., Галоян А.А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний // Доклады Национальной академии наук Армении. Биохимия. 2011. Т. 111, №1. С. 59-68.
3. Патент РФ на полезную модель № 98248 Влажная камера для исследования нативных клеток крови / Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Чернявских С.Д. заявитель и патентообл. БелГУ, заявка № 2010105541 дата приоритета от 16.02.2010.
4. Патент на изобретение РФ № 2466401 Способ определения упругости клеток крови / Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Забиняков Н.А. заявитель и патентообл. БелГУ, заявка № 2011109741 дата приоритета от 15.03.2011.
5. Barnes P.J. Beta-adrenergic receptors and their regulation // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995. V. 152. Pp. 838-860.
6. Capella B., Dieter G. Force-distance curves by atomic force microscopy // Surf. Sci. Rep. 1999. V. 34. Pp. 1-104.
7. Epinephrine exchanges platelet – neutrophil adhesion in whole blood in vitro / Hozn N.A., Anatase D.M., Hecker K.E., Baumert J.H., Robizsch T., Rossaint R. // International Anesthesia Research Society (Anesth. Annal.) 2005. V. 100. Pp. 520-526.
8. Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes / Dave R.H., Saengsawang W., Yu J.Z., Donati R., Rasenick M // Neurosignals. 2009. V. 17. Pp. 100-108.
9. Hoffman E.K. Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease // Cell Physiol. Biochem. 2000. V. 10. Pp. 273-288.
10. Le Tulzo Y., Shenkar R., Kaneko D. Hemorrhage increases cytokine expression in lung mononuclear cells in mice: involvement of catecholamines in nuclear factor-kappa B regulation and cytokine expression // J. Cell Invest. 1997. V. 99. Pp. 1516-1524.
11. Rainer T.H., Lam N., Cocks R.A. Adrenaline upregulates monocyte L-selectin in vitro // Resuscitation. 1999. V. 43. Pp. 47-55.
12. Roychowdhury S., Rasenick M. Submembrane microtubules cytoskeleton irregularity of microtubule assembly by heterotrimeric G proteins // FEBS. 2008. V. 275. Pp. 4654-4663.
13. Sanders B., Baker R., Ramer-Quinn S. Differential expression of the β_2 -adrenergic receptor by Th₁ and Th₂ clones. Implications for cytokine production and B cell help // J. Immunol. 1997. V. 158. Pp. 4200-4210.
14. Wymann M.P., Schneider R. Lipid signaling in discose // Nat. Rev. Moll. Cell Biol. 2008. V. 9. Pp. 162-176.

REFERENCES:

1. Avdonin P.V., Tkachuk V.A. Receptors and Intracellular calcium. Moscow: Science, 1994. 288 p.
2. Ghazaryan P.A., Daghbashyan S.S., Galoyan A.A. Annul. of National Acad. Sci. Biochemistry. V. 111 (2011). Pp. 59-68.
3. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Chernyavskih S.D. Patent RU 98248
4. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Sladkova E.A., Zabinyakiov N.A. Patent RU 2466401
5. Barnes P.J. Am. J. Respir. Crit. Care Med. V. 152. (1995). Pp. 838-860.
6. Capella B., Dieter G. Surf. Sci. Rep. V. 34. (1999). Pp. 1-104.
7. Hozn N.A., Anatase D.M., Hecker K.E., Baumert J.H., Robizsch T., Rossaint R. International Anesthesia Research Society (Anesth. Annal.) V. 100. (2005). Pp. 520-526.
8. Dave R.H., Saengsawang W., Yu J.Z., Donati R., Rasenick M Neurosignals. V. 17. (2009). Pp. 100-108.
9. Hoffman E.K. Cell Physiol. Biochem. V. 10. (2000). Pp. 273-288.
10. Le Tulzo Y., Shenkar R., Kaneko D. J. Cell Invest. V. 99. (1997). Pp. 1516-1524.
11. Rainer T.H., Lam N., Cocks R.A. Resuscitation. V. 43. (1999). Pp. 47-55.
12. Roychowdhury S., Rasenick M. FEBS. V. 275. (2008). Pp. 4654-4663.
13. Sanders B., Baker R., Ramer-Quinn S. J. Immunol. V. 158. (1997). Pp. 4200-4210.
14. Wymann M.P., Schneider R. Nat. Rev. Moll. Cell Biol. V. 9 (2008). Pp. 162-176.