

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И УПРУГО-ЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки  
06.03.01 Биология очной формы обучения, группы 07001315  
Бытко Олеси Дмитриевны

Научный руководитель  
д.б.н., профессор, доцент  
Скоркина М.Ю.

БЕЛГОРОД 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений .....	3
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	8
1.1. Гемопозэ.....	8
1.2. Молекулярные механизмы развития лейкозов .....	14
1.3. Морфофункциональные свойства лимфоцитов при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови .....	18
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	22
2.1. Забор крови и условия эксперимент .....	22
2.2. Пробоподготовка и измерение потенциала поверхности лимфоцитов ...	23
2.3.Пробоподготовка и измерение модуля Юнга лимфоцитов .....	24
Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение .....	27
3.1. Упруго-эластические свойства лимфоцитов в условиях злокачественной пролиферации клеток крови.....	27
3.2.Поверхностный потенциал лимфоцитов в условиях злокачественной пролиферации клеток крови.....	28
Глава 4. Обсуждение результатов исследования .....	31
Выводы .....	34
Список использованной литературы.....	35

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовой микроскоп
- СКК – стволовая кроветворная клетка
- КОЕ – колониеобразующая единица
- КОЕ-ГЭММ – колониеобразующая единица грануло-эритро-моноцито-мегакариоцитопоэза
- CD – cluster designation (кластер дифференцировки)
- КОЕ-ГМ – колониеобразующая единица гранулоцитов и моноцитов
- БОЕ-Э – бурстобразующая единица эритропоэза
- КОЕ-Э – колониеобразующая единица эритропоэза
- ЭСК – эмбриональная стволовая клетка
- КОЕ-Бл – колониеобразующая единица бластных клеток
- HLA-A – human leukocyte antigens-A (рецептор клеточной поверхности МНС I класса)
- HLA-B – human leukocyte antigens-B (рецептор клеточной поверхности МНС I класса)
- HLA-C – human leukocyte antigens-C (рецептор клеточной поверхности МНС I класса)
- HLA-DR – human leukocyte antigens-DR (рецептор клеточной поверхности МНС II класса)
- КОЕ-Г – колониеобразующие единицы нейтрофилов, эозинофилов, базофилов
- КОЕ-Мгкц – колониеобразующая единица мегакариоцитов
- КОЕ-Баз – колониеобразующая единица базофилов
- КОЕ-М – колониеобразующая единица моноцитов и макрофагов
- КОЕ-Эоз – колониеобразующая единица эозинофилов
- КОЕ-Нейтр – колониеобразующая единица нейтрофилов
- ЭП – эритропоэтин

ГМ-КСФ – гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ФСК – фактор стволовых клеток

ИЛ – интерлейкин

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

М-КСФ – макрофагальный колониестимулирующий фактор

ТПО – тромбopoэтин

Th – T-helper

Tk – T-killer

ЛСК – лейкозная стволовая клетка

СК – стволовая клетка

HSC – hematopoietic stem cell (гемopoэтическая стволовая клетка)

LSC – leukemia stem cell (лейкозная стволовая клетка)

ХМЛ – хронический миелобластный лейкоз

Ph – Филадельфийская хромосома

ХЛЛ – хронический лимфобластный лейкоз

IgH – heavy chain of immunoglobulin (тяжёлая цепь иммуноглобулинов)

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ПП – поверхностный потенциал

BCR – мембранный рецептор В-клеток

ABL – фрагмент гена

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из нерешенных проблем современной онкогематологии является разработка стратегий преодоления лекарственной резистентности опухолевых клонов клеток (Siegel et al., 2014). Для решения данной проблемы необходимо детальное исследование свойств биологических мембран, от транспортной функции которых зависит влияние препарата на внутриклеточные молекулярные мишени. В частности, в единичных исследованиях показано изменение сил поверхностного натяжения мембраны, которые непосредственно влияют на интенсивность эндоцитоза и транспорта препаратов в клетку (Rauch, 2000). В связи с чем, актуальным является исследование механических и электрических свойств клеточных мембран лимфоцитов при развитии опухолевых процессов в системе крови.

Степень разработанности темы исследования. В литературе представлены результаты исследований, посвященные составу биомембран клеток при развитии злокачественных лимфопролиферативных процессов. В частности, доказано, что состав эритроцитов и лимфоцитов изменяется, нарушается метаболизм основных классов липидов – увеличивается уровень токсических лизофосфатидилхолинов, что в свою очередь, приводит к деградации глицерофосфолипидов (Казарян, 2011).

Подавляющее большинство исследований посвящено изучению жизненного цикла (Vandewoestyne et al., 2011) и хромосомным аномалиям (Muggen et al., 2014) которым отводят ключевую роль в механизмах развития злокачественных пролиферативных процессов в системе крови (Samanta et al., 2011; Schafranek et al., 2015; Hengeveld, 2015). В частности, исследователи полагают, что соматические мутации в виде гиперэкспрессии онкогенов и/или делеции антионкогенов, являются основными молекулярными событиями при развитии злокачественной пролиферации (Panoskaltsis, 2003). Довольна обширная часть исследований, представленных в литературе, посвящена характеристике на поверхности клеток-предшественников антигенов

дифференцировки, согласно которым типизируют трансформированных предшественников лимфоидных и миелоидных линий (Коленкова, 2002; Haferlach et al., 2005). Часть работ, посвящена исследованию свойств лейкозных стволовых клеток (Becker, 2011; Horton, 2012) и влиянию на них сигнальных веществ микроокружения, таких как факторов роста, хемокинов, иммуномоделирующих соединений (Konopleva, 2011; Krause et al., 2013).

Тем не менее, несмотря на целый спектр работ, представленных в литературе, описывающих свойства и жизненный цикл различных субпопуляций опухолевых клонов клеток, мало изученными остаются механические и электрические свойства клеточных мембран при развитии в системе крови процессов злокачественной пролиферации. В связи с этим были сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования: изучить электрические и упруго-эластические свойства поверхности лимфоцитов с помощью АСМ в условиях злокачественной пролиферации клеток крови.

Задачи исследования:

- 1) измерить потенциал поверхности лимфоцитов в условиях острого и хронического типа пролиферации лимфоидного ростка кроветворения;
- 2) измерить потенциал поверхности лимфоцитов в условиях острого и хронического типа пролиферации миелоидного ростка кроветворения;
- 3) измерить модуль Юнга лимфоцитов при развитии в системе крови острого и хронического лимфобластного типа злокачественной пролиферации на разных стадиях течения болезни;
- 4) измерить модуль Юнга лимфоцитов при развитии в системе крови острого и хронического миелобластного типа злокачественной пролиферации на разных стадиях течения болезни.

Объект исследования – клетки периферической крови людей.

Предмет исследования – изучение механических и электрических свойств поверхности лимфоцитов развития в системе крови злокачественных пролиферативных процессов.

Методы исследования. В работе использованы методы исследования электрических свойств клеточной поверхности с использованием атомно-силового микроскопа Integra Vita (Зеленоград, 2009) в режиме моды Кельвина. Модуль Юнга клеточной поверхности измерен на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии с использованием инертного механического сенсора, приготовленного в ходе сканирования. Обработку полученных сканов и измерение морфометрических параметров лимфоцитов осуществляли с использованием компьютерной программы Nova. Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли методами вариационной статистики.

Теоретическая и практическая значимость. Выполненное исследование содержит новые сведения об электрических и упруго-эластических свойствах лимфоцитов в норме и при развитии процессов злокачественной пролиферации клеток в системе крови. Результаты проведенного исследования могут служить накопительной базой данных о лимфоцитах и их свойствах в норме и при развитии злокачественных трансформаций в системе крови. Полученные данные имеют важное теоретическое и практическое значение в области клеточной биологии и могут быть использованы в качестве дополнительного критерия при определении злокачественных свойств клеток крови.

Структура работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Работа изложена на 43 страницах машинописного текста, включает 3 таблицы и 5 рисунков. Список литературы включает в себя 80 наименований, из которых 32 отечественных и 48 иностранных источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Гемопоз

Гемопоз в физиологических условиях. Популяции клеток крови постоянно обновляются. Поступление новых клеток происходит за счет гемопоза, который не прекращается в течение всей жизни (Шиффман, 2000). Кроветворение, или гемопоз – это сложный многоэтапный процесс образования в специализированных органах клеток крови (Абдулкадыров и др., 2004). Важную роль в этом процессе играют гемопозитические факторы роста (контроль всех этапов кроветворения) и гемопозитическое микроокружение (не прямое участие в кроветворении) (Шиффман, 2000). Гемопоз протекает в два периода: пренатальный (внутриутробный) и постнатальный (после рождения).

Образовавшаяся на стадии гаструлы мезодерма дает начало развитию костного мозга, крови и сердечно-сосудистой системы. Формирование гемопозитических органов происходит благодаря транскрипции генов. В качестве фактора транскрипции генов выступает семейство ядерных белков GATA (GATA-2 – ответственный за пролиферацию и дифференцировку стволовых кроветворных клеток) (Абдулкадыров и др., 2004).

Кроветворение начинается одновременно в желточном мешке, эмбрионе и хорионе на 3-4-ей неделе гестации в виде кровяных островков (Приндулл, 1998). Первые стволовые кроветворные клетки (СКК) образуются в области парааортальной спланхноплевры эмбриона одновременно с желточным мешком (Tavian, 2005). Именно эти клетки являются истинно стволовыми кроветворными. К 4-5-й неделе гестации эндотелиальными клетками уже сформированы капилляры, по которым начинается движение примитивных гемопозитических клеток из желточного мешка, колонизируя сначала печень, а на 8-10 неделе – тимус.

В течение 4-5-й недели возникают различные генерации кроветворных клеток, в том числе полипотентные клетки-предшественники гранулоцито-



эритро-моноцито-мегакариоцитопоза, образующие смешанные колонии – КОЕ-ГЭММ (колониеобразующие единицы грануло-эритро-моноцито-мегакариоцитопоза). Эти клетки экспрессируют рецептор ранних миелоидных стволовых клеток CD34. Одновременно с этим процессом появляются бипотентные грануломоноцитарные клетки-предшественники, образующие колонии из гранулоцитов и моноцитов – КОЕ-ГМ. Здесь же, в желточном мешке, обнаруживаются и эритроидные клетки предшественники, образующие крупные эритроидные колонии из нескольких агрегатов – бурсты или просто эритроидные колонии, называемые соответственно бурстобразующими единицами эритропоза (БОЕ-Э) и колониеобразующими единицами эритропоза (КОЕ-Э) (Migliaccio et al., 1986; Приндулл, 1998).

На 4-й неделе развития происходит закладка эмбриональной печени, которая станет главным местом гемопоэза. Начинается второй период пренатального кроветворения – печеночный, и уже к 30-му дню определяются первые гемопоэтические клетки, несущие на своей поверхности маркер CD34 (маркер ранних кроветворных клеток-предшественников). В данном периоде в основном происходит эритропоз, позже, в фетальной печени, усиливается миелопоэз, а также становится больше гранулоцитов, макрофагов и мегакариоцитов (Абдулкадыров и др., 2004). К 9-й неделе у плода наблюдается В-лимфопоэз (Tavian, 2005).

На 11-12-й неделе развития плода происходит третий этап пренатального кроветворения в костном мозге, который становится постоянным местом гемопоэза. Благодаря взаимодействию капилляров, клеток-предшественников остеобластов и макрофагов эмбриона в период 6-8-й недели, к 10-й неделе между костными трабекулами образуются большие сосудистые синусы и костномозговые полости (Charbord et al., 1996).

Во взрослом организме гемопоэтические клетки проходят 5-6 этапов дифференцировки, постепенно снижая пролиферативную активность и потенциальность, но из-за множества переходных форм между этими этапами не прослеживаются четких границ. В тимусе, селезенке, лимфатических узлах и

лимфоидной ткани происходит лимфопоэз, а в костном мозге – миелопоэз и развитие первичных полипотентных стволовых клеток (Абдулкадыров и др., 2004).

Образование клеток крови разных типов происходит из стволовых клеток. О механизме самообновления самих стволовых клеток существует 2 теории:

- 1) обновление клеток путем асимметричного деления;
- 2) воспроизведение либо двух стволовых клеток, либо двух более зрелых (симметричное деление) (Шиффман, 2000; Зарицкий, 2014).

Так стволовые клетки пополняют и самообновляющийся пул клеток, и дифференцирующийся. Морфологически эти стволовые клетки выглядят как примитивные бластные клетки. Продолжая делиться, дочерние клетки утрачивают способность к воспроизведению клеток разных линий и генерируют клетки одной или нескольких линий (Шиффман, 2000).

ЭСК (1 отдел) экспрессируют гены, в результате деятельности которых образуются СКК (2 отдел) и начинается процесс кроветворения. ЭСК обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и являются бессмертными, СКК – нет. Количество СКК невелико около 0,01%, а вместе с потомками клетками-предшественниками около 0,05% (Абдулкадыров и др., 2004). Данные клетки полипотентные, способны развиваться во все 8 линий гемопоэза, а также способны к ограниченному самоподдержанию ранних СКК (Воробьев и др., 2002). Они могут делиться около 50 раз (Vaziri et al., 1994), тем самым поддерживая продукцию клеток крови в течение всей жизни индивидуума. Большая часть СКК находится в состоянии покоя, обладая пролиферативным потенциалом (Рис. 1.1).

Далее СКК дифференцируются в олигопотентные коммитированные клетки-предшественники (3 отдел). Их способность к потентности ограничена, потому что они коммитированы к дифференцировке в направлении 2-5 гемопоэтических линий. Эти клетки способны образовывать бластные клетки (КОЕ-Бл). Образующиеся колонии смешанные и состоят из гранулоцитов,

эритроидных клеток, макрофагов, мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ) и 2-5-потентные КОЕ (в любом составе). КОЕ-ГЭММ – общий предшественник миелопоэза. Они несут маркер CD34, а также маркер, специфичный для клеток миелоидной линии, – CD33 и детерминанты гистосовместимости – HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DR (Абдулкадыров и др., 2004).

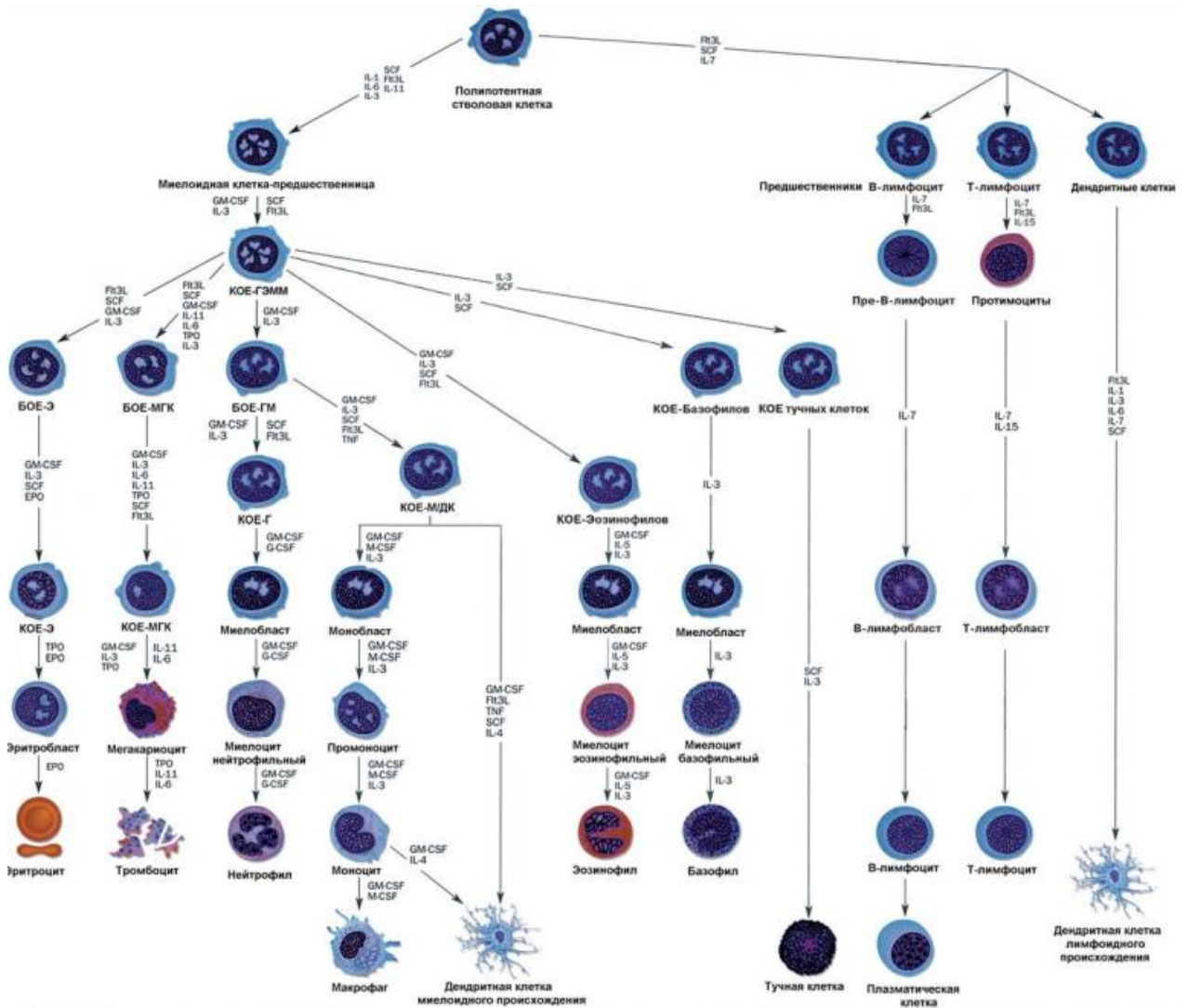


Рис. 1.1. Схема кроветворения (Владимирская, 2015)

В 4 отделе клетки коммитированы в направлении 2-3-й клеточных линий и являются монолипотентными. Здесь обнаруживаются: КОЕ-Г (клетка-предшественник нейтрофилов, эозинофилов, базофилов); КОЕ-Мгкц (предшественники мегакариоцитов); БОЕ-Э и КОЕ-Э (предшественники эритроидных клеток); КОЕ-Баз (предшественник базофилов); КОЕ-М (предшественник моноцитов и макрофагов); КОЕ-ГМ (общий предшественник

гранулоцитов и макрофагов); КОЕ-Эоз (предшественник эозинофилов); КОЕ-Нейтр (предшественник нейтрофилов); предшественники Т- и В-лимфоцитов – пре-Т и пре-В клетки. КОЕ-ГМ экспрессируют CD34, CD33, HLA-DR и антиген более зрелых миелоидных клеток – CD 13, по мере созревания которых на мембране унипотентных моноцитарных и гранулоцитарных КОЕ появляются новые маркеры, но они утрачивают антиген CD34 (Абдулкадыров и др., 2004).

5 отдел характеризуется морфологической узнаваемостью клеток. Он включает бластные клетки-предшественники всех клеточных линий, которые затем превращаются в зрелые клетки (Абдулкадыров и др., 2004).

Эритропоэз. Процесс происходит предположительно в 18 делений и контролируется эритропоэтином (ЭП). Клетки-предшественники эритроцитов не зависят от ЭП, а определяются гранулоцитарными-макрофагальными колониестимулирующими факторами (ГМ-КСФ) и фактором стволовых клеток (ФСК), поэтому эритропоэтин стимулирует последние 8-10 делений (Шиффман, 2000).

Гранулоцитопоэз. Изначально процесс индуцируется благодаря ГМ-КСФ, ФСК и ИЛ-3, а на последних этапах нейтропоэз определяется Г-КСФ, а монопоэз – М-КСФ. Образование эозинофилов индуцируется ИЛ-5, базофилов и тучных клеток – ИЛ-3 и ФСК (Шиффман, 2000).

Мегакариоцитопоэз. Тромбопоэтин (ТПО) стимулирует развитие клеток-предшественников и созревание мегакариоцитов (Шиффман, 2000).

В-лимфопоэз. Полипотентная стволовая клетка дает начало недифференцированным, но коммитированным предшественникам В-клеток. Дифференцировка этих предшественников индуцируется ИЛ-7 и ФСК. Образовавшиеся пре-В-клетки и В-клетки дифференцируются под контролем ИЛ-4 и ИЛ-6 (Шиффман, 2000).

Т-лимфопоэз. Пре-Т-клетки проходят негативную и позитивную селекцию в тимусе, в результате формируются зрелые Т-клетки. Активация Th и

Тк происходит при помощи антигенной стимуляции (антиген + ИЛ-2 или антиген + макрофаги/дендритные клетки) (Шиффман, 2000).

Конечной целью процесса кроветворения является образование зрелых, функционально полноценных клеток крови – лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов (Абдулкадыров и др., 2004). Зрелые клетки крови запрограммированы на клеточную смерть, а стволовые клетки в свою очередь должны самообновляться.

Гемопоз в условиях злокачественной пролиферации. В ходе генетических поломок процесс кроветворения нарушается, и возникают опухоли системы крови (Шиффман, 2000). В литературе представлены две теории, раскрывающие причины генетических поломок. Согласно первой теории – мутация возникает в ранней стволовой клетке, которая затем становится лейкозной стволовой клеткой (ЛСК) (Рис. 1.2). Так же, как и ранняя СК, ЛСК способна самоподдерживаться. Согласно другой теории, мутация возникает в более поздней СКК (клетке-предшественнике), в результате чего клетка приобретает способность к самоподдержанию (Доминский, 2010; Зарицкий, 2014; Park, 2013).

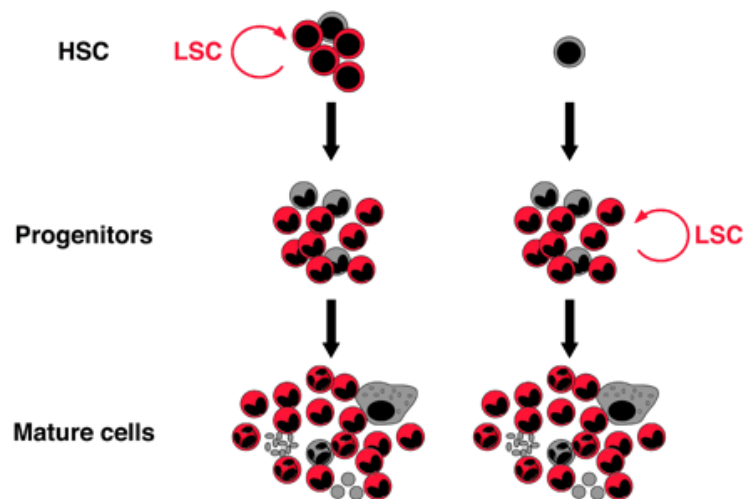


Рис. 1.2. Происхождение ЛСК: HSC – гемопоэтическая стволовая клетка, LSC – лейкозная стволовая клетка, progenitors – клетки-предшественники, mature cells – зрелые клетки (Passeque et al., 2003)

ЛСК, как известно, имеют ряд сходных с нормальными СКК фенотипических и функциональных признаков (способность к самоподдержанию, пролиферативная активность и др.) (Дризе, 2006; Глузман и др., 2014; Passeque et al., 2003).

## 1.2. Молекулярные механизмы развития злокачественных пролиферативных процессов

В литературе обсуждаются молекулярные механизмы возникновения лейкозов. Так развитие хронического миелобластного типа пролиферации связано с постоянной экспрессией тирозин-киназы (независимая от внешних факторов пролиферация клеток). Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) исследователи рассматривают как процесс транскрипционной дерегуляции (Рис. 1.3). В основе развития острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) лежит гиперэкспрессия нормальных генов за счет их реаранжировки в области активных регуляторных элементов (Т-кл. рецептор, гены иммуноглобулинов) (Golub et al., 1999; Зарицкий, 2014).

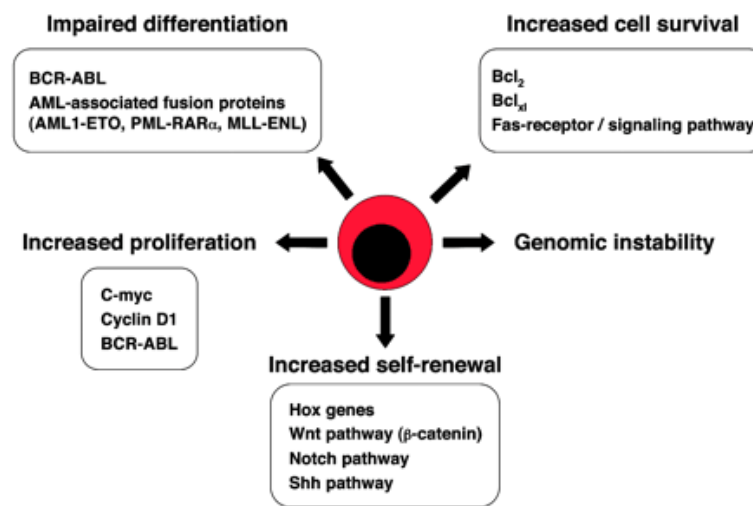


Рис. 1.3. Деретулируемые пути, ведущие к лейкозу (Passeque et al., 2003):  
 impaired differentiation – нарушения процессов дифференцировки клеток,  
 increased cell survival – повышенная клеточная выживаемость, genomic instability – генетическая нестабильность, increased self-renewal – повышенная способность к самообновлению, increased proliferation – повышенная способность к пролиферации

Хроническая форма лейкоза с поврежденным миелоидным ростком кроветворения (ХМЛ) характеризуется повышенной пролиферацией миелоидных клеток-предшественников с сохранением дифференцировки до зрелых клеток. ХМЛ – клональный миелопролиферативный процесс, развивающийся в результате злокачественной трансформации в ранних гемопоэтических предшественниках, с неизвестной этиологией (Ломаиа и др., 2009; Сарсенгалиева и др., 2010). При данном онкологическом заболевании была обнаружена специфическая хромосомная аномалия – делетированная хромосома, названная Ph (Филадельфийская) (Сарсенгалиева и др., 2010). По некоторым исследовательским данным, Ph-хромосома обнаруживается не только в миелоидном, а так же и в лимфоидном ростке кроветворения, но на этот счет еще ведутся споры (Ломаиа, 2013), поэтому в периферической крови могут присутствовать бласты обоих ростков кроветворения (Сяпина, 2011). Аномалия связана с тем, что ген *abl*, локализованный в 9 хромосоме, «перескакивает» на 22 хромосому, в результате чего образуется ген *Bcr-ABL*, продуктом которого является патологический белок, обладающий выраженной тирозинкиназной активностью (Смирнова, 2012; Рябчикова и др., 2013; Зарицкий, 2014; Savano, 2008). В конечном итоге это ведет к блокированию апоптоза и преимущественной выживаемости клеток – носителей *Bcr/ABL* (Волкова, 2010; Ломаиа, 2013; Faderl et al., 1999). Такие клетки усиленно пролиферируют и медленно стареют (Волкова, 2010; Ломаиа, 2013). Важно отметить, что мутация с образованием гена *bcr-abl* привела к открытию отдельных клеток-предшественников для лимфо- и миелопоэза, а также, эта мутация является первопричиной лейкозного заболевания, каких известно немного (Зарицкий, 2014).

Хронический лейкоз с дефектом в лимфопоэзе (ХЛЛ) представляет собой вялотекущую неходжкинскую лимфому с вовлечением периферической крови (Шиффман, 2000). ХЛЛ – это В-клеточное лимфопролиферативное заболевание, морфологическим субстратом которого является клон лимфоцитов, имеющих размеры и морфологию нормального зрелого лимфоцита и

иммунофенотип, соответствующий иммунофенотипу В-лимфоцитов поздних стадий дифференцировки (Волкова, 2007). Повторяющаяся антигенная стимуляция приводит к появлению генетических аномалий. Для ХЛЛ наиболее характерны следующие нарушения кариотипа: дополнительная хромосома 12, делеции длинного плеча хромосом 6 и 13, различные перестройки длинного плеча хромосомы 11. В ряде случаев наблюдаются характерные для В-клеточных новообразований транслокации с участием района 14q32 (область локализации IgH), среди которых преобладают  $t(11;14)(q13;q32)$ ,  $t(2;14)(p13;q32)$ ,  $t(14;19)(q32;p13)$  (Жевак, 2011; Buhmann et al., 2002).

Опухолевая трансформация при развитии ХЛЛ происходит на уровне ранних В-лимфоцитов с последующим блоком в их дальнейшей дифференцировке и пролиферацией клона опухолевых клеток. Лимфоидные элементы при ХЛЛ как бы «заморожены» на данном этапе дифференцировки, и вся лейкозная популяция является практически мономорфной. Накопление опухолевых клеток связано с нарушением процессов регуляции апоптоза. Опухоль постепенно вытесняет нормальные гемопоэтические клетки, что со временем приводит к развитию недостаточности костномозгового кроветворения. Пролиферация опухолевых В-лимфоцитов в костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, реже в других органах (коже, желудочно-кишечном тракте, почках, легком и др.) обуславливает клиническую картину заболевания (Рыбас, 2015).

Для острых лейкозов характерна продукция незрелых бластных клеток без созревания. В итоге это приводит к быстрой замене нормальных гемопоэтических элементов костного мозга. Повреждения могут касаться миелоидного (ОМЛ) или лимфоидного (ОЛЛ) ростка кроветворения (Шиффман, 2000). ЦАМФ-отзывчивым элементом связывающий белок (CREB) избыточно экспрессируется в большинстве образцов костного мозга от пациентов с ОЛЛ и ОМЛ (Piqazzi et al., 2007). CREB представляет собой фактор транскрипции, действует как прото-онкоген в кроветворных клетках. Сверхэкспрессия



CREB дает преимущество выживания для раковых клеток (Shankar et al., 2005; Manafi et al., 2016).

ОМЛ – клональное злокачественное заболевание, характеризующееся неэффективным гемопоэзом. Большинство клеток при ОМЛ имеют различные цитогенетические и молекулярно-генетические повреждения (Шиффман, 2000). Внутреннее тандемное дублирование (ITD) FMS-родственного тирозинкиназного 3 (FLT3) гена, которое встречается в экзонах 14 и 15, является одной из наиболее распространенных соматических мутаций у взрослых острой миелоидной лейкемии (AML) и имеет биологические, прогностические и терапевтические последствия (Azari-Yam et al., 2016). В действующие прогностические классификации ОМЛ включены только некоторые мутации, в частности NPM1, FLT3 и C/EBP $\alpha$ . Выявлен и новый класс мутаций, при которых повреждаются гены, ответственные за эпигенетические процессы регуляции генома. Среди них наиболее изученными к настоящему времени являются мутации в генах DNMT3A, IDH1/2, TET2 и некоторых других (Блау, 2016). Бласты самообновляются, но не происходит их дифференцировки, поэтому накапливаются незрелые формы клеток (Шиффман, 2000).

ОЛЛ – опухолевое заболевание, субстратом которого являются опухолевые лимфобласты, накапливающиеся в костном мозге, крови и других органах. При этом малигнизация происходит на уровне стволовой (или полустволовой) клетки, которая сначала нормально развивается, но потом ее дифференцировка останавливается на стадии лимфобластов, которые продолжают бесконтрольно делиться. В опухолевых клетках гены экспрессируются хаотично, причем, чем более злокачественна клетка, тем более хаотично экспрессируются в ней гены. В связи с этим, можно ожидать нарушения функций опухолевых лимфобластов и, в частности, их участие в индукции аутоиммунных реакций (Сухих, 2008).

### **1.3. Морфофункциональные свойства лимфоцитов при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови**

Цитоскелет. Цитоскелет очень динамичная сеть, которая помогает поддерживать жесткость клетки, и механические свойства клетки тесно связаны со многими клеточными функциями. Кроме того, связь наблюдается с целым рядом биологических функций, такие как клеточная дифференцировка, старение, моторики, метастазирование и механотрансдукция. Цитоскелет представляет собой систему белковых структур, выполняющих в клетке каркасную и двигательную функции. В эту систему входят микрофиламенты (5-7 нм), промежуточные филаменты (10 нм) и микротрубочки (~24 нм), которые благодаря своей динамичности способны быстро полимеризоваться и наоборот – деполимеризоваться (Bai et al., 2017).

Микрофиламенты располагаются в кортикальном слое цитоплазмы в виде слоев или пучков, направленных в клеточные отростки. Белковый состав микрофиламентов представлен, в первую очередь, актином, а также миозином, тропомиозином и альфа-актинином. Кроме амебоидного передвижения клетки, микрофиламенты обеспечивают движение и внутри самой клетки (движение цитоплазмы, митохондрий и деление клетки) (Ritter, 2013).

Промежуточные филаменты наименее подвижные элементы цитоскелета, поэтому им приписывают опорно-каркасную функцию, а по их белкам определяется опухолевое происхождение (иммуноморфологические методы). Локализуются промежуточные филаменты около ядра (Ritter, 2013).

Микротрубочки не ветвятся и представлены в виде полых цилиндров, чья стенка состоит из полимеризованного тубулина. Они делают цитоскелет одновременно и устойчивым, и эластичным, последнее достигается благодаря связи с белками динеинами и кинезинами (Alberts et al., 2002).

Способность лимфоцитов к миграции обуславливается тем, что клетка может изменять свою форму при прохождении через барьер. Изменение клеточной формы происходит за счет полимеризации и деполимеризации акти-

новых элементов цитоскелета (Хаитов, 2009; Friedl, 2001b, Chaohong et al., 2013). Актин контролирует не только форму, а также амебоидное движение, адгезию, хемотаксис, поглощение опсонизированных микробов, образование фагосом и фаголизосом (Хаитов, 2009).

Во время миграции клетка формирует псевдоподии благодаря полимеризации актина в них, в результате чего она принимает вытянутую форму. Прикрепление одного конца клетки и отрывание другого осуществляется процессом адгезии: в месте прикрепления клетки к поверхности образуются выросты, богатые актином (Friedl, 2001a). При амебоидном движении выпячивания клетки вызываются изменения в цитоскелете под действием миозина (Ненашева, 2008).

В ходе развития злокачественной пролиферации в системе крови отмечаются бластные клетки с реорганизованным и динамически измененным актиновым цитоскелетом (Friedl, 2001a). Изменениям также подвергается белок спектрин (Pfeffer, 1990). На распределение спектрина в клетке оказывает влияние химиотерапевтические препараты: скопление спектрина сосредотачивается около ядра (Annunziato et al., 1999).

Упруго-эластические свойства. Изменения в клеточных механических свойствах могут отображаться на ее способности к прохождению через сосудистую сеть: повышенная жесткость не даст клетке нормально пройти через мелкие капилляры. В изменениях жесткости клетки важную роль играет цитоскелет. Сниженная деформируемость лимфобластов, и миелобластов, а также повышенная адгезия и трансмиграция, как полагают, связаны с лейкостазом, в котором клетки агрегируются в сосудистой сети (Rosenbluth et al., 2006). Химиотерапия вызывает увеличение жесткости клеток, что опять-таки затрудняет проходимость через капилляры (Фишер, 2000).

Электрические свойства. Мембранный потенциал влияет на прогрессирование клеточного цикла. Переход G1/S связан с гиперполяризацией (высокая  $K^+$ -проводимость), G2/M происходит с деполяризацией (низкая  $K^+$ -проводимость). Блокирование калиевых каналов является причиной за-

держки G1-фазы. Во время клеточного цикла для уменьшения объема клетки требуется удаление  $K^+$  через потенциал зависимые каналы (M-фаза) (Yin et al., 2007).

Калий-селективные каналы относятся к нескольким семействам: потенциалзависимые –  $K_V$ ,  $Ca^{2+}$ -активируемые и тандем-пор каналы – K2P. Опосредованные калиевым транспортом каналы вызывают изменение мембранного напряжения, воздействуя на движущую силу для притока  $Ca^{2+}$ , и регулируют клеточный объем за счет изменения внутриклеточного  $K^+$  (Yin et al., 2007).

$K_V$  1.3 – один из 40 потенциалзависимых каналов. Он является преобладающим (несколько сотен копий на клетку)  $K^+$ -каналом в наивных T-клетках человека, которые функционально экспрессируют только несколько  $K_{Ca}$  3.1, и играет очень важную роль в активации лимфоцитов и связанной с ними передаче сигналов  $Ca^{2+}$  и IL-2 (Yin et al., 2007).

В мембранных потенциалах покоя (-40) – (-50) мВ лишь малая часть  $K_V$  1.3 каналы остаются открытыми в устойчивом состоянии. Таким образом, более низкие мембранные потенциалы, вплоть до равновесия  $K^+$ , наблюдаемые при переходе G1/S в клеточном цикле, требуют активности некоторого не зависящего от напряжения канала  $K^+$  (например,  $K_{Ca}$  или K2P), открытого при этом диапазоне напряжения (Yin et al., 2007).

Открытие канала, вызванное деполяризацией мембраны, стимулирует функциональное и физическое взаимодействие между группами  $K_V$  1.3 и  $\beta$  1-integrin и активирует функцию интегрина, адгезию и миграцию, тогда как специфическая блокировка  $K_V$  1.3 предотвращает сигнализацию интегрина (Yin et al., 2007).

Некоторые внутриклеточные каналы и транспортеры, выраженные в ядерных, ЭПС и митохондриальных мембранах, особенно последние, играют важную роль в пролиферации раковых клеток и выживаемости. Плазменная мембрана  $K_V$  1.3 может быть селективно блокирована мембрано-непроницаемыми токсинами, тогда как митохондриальный  $K_V$  1.3 блокирует-

ся только мембранопроницаемыми лекарственными средствами; блокировка в последнем случае индуцирует апоптоз в раковых клетках, включая лейкемические (Yin et al., 2007).

$K_{Ca}$  3.1 канала участвует в различных клеточных процессах, а именно: активация с помощью TCR-взаимодействия и стабилизации иммунологического синапса; контроль мембранного потенциала, снижение нормативного объема, миграция клеток и ангиогенез, связанный с опухолью. Активация  $K_{Ca}$  вызывает устойчивую гиперполяризацию вплоть до равновесного потенциала для  $K^+$ .  $K_{Ca}$  2.2 каналы в лейкозных клетках отличаются высокой экспрессией, сравнимой с экспрессией  $K_{Ca}$  3.1 в здоровых Т-клетках (Yin et al., 2007).

K2P представляет  $K^+$  селективные каналы, генетически не связанные с бывшими двумя семействами. Каждая субъединица канала имеет две области пор и минимальное количество трансмембранных сегментов, по два на поры. Активность каналов K2P практически не зависит от напряжения мембраны; скорее, они регулируются различными метаболическими и физическими факторами (Yin et al., 2007).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Забор крови и условия эксперимента

Исследования выполнены на базе кафедры биологии НИУ «БелГУ». В экспериментальной части работы использовали венозную кровь здоровых людей (n=30) в возрасте от 25 до 45 лет, проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы Святителя Иоасафа г. Белгорода. В работе исследована кровь людей в возрасте 17-46 лет с диагнозом лейкоз, находящихся на лечении в гематологическом отделении. В работе исследовали пробы крови пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (n=36), острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) (n=15), хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) (n=12) и хроническим миелобластным лейкозом (ХМЛ) (n=5) (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Схема эксперимента

Группы	Экспериментальная серия	Число проб
I: доноры (контроль)	поверхностный потенциал	30
	упруго-эластические свойства	
II: ОЛЛ при первичной постановке диагноза	поверхностный потенциал	1
	упруго-эластические свойства	
III: ОЛЛ после лечения	поверхностный потенциал	32
	упруго-эластические свойства	
IV: ОЛЛ, рецидив	поверхностный потенциал	3
	упруго-эластические свойства	
V: ОМЛ после лечения	поверхностный потенциал	13
	упруго-эластические свойства	
VI: ОМЛ, рецидив	поверхностный потенциал	2
	упруго-эластические свойства	
VII: ХЛЛ после лечения	поверхностный потенциал	12
	упруго-эластические свойства	
VIII: ХМЛ после лечения	поверхностный потенциал	3
	упруго-эластические свойства	
IX: ХМЛ, рецидив	поверхностный потенциал	2
	упруго-эластические свойства	

Забор периферической крови осуществляли с участием специализированного медперсонала из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, предотвра-

шающая свертывание крови путем блокирования ионов кальция) в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови (0,006843 моль/литр).

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.

## **2.2. Пробоподготовка и измерение потенциала поверхности лимфоцитов**

Для измерения потенциала поверхности (ПП) суспензию лимфоцитов готовили согласно «Способу регистрации изменения поверхностного заряда» (патент РФ 2027188, Шереметьев, 1997). 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 лимфоцитов дважды отмывали изотоничным раствором хлорида натрия по 5 мин. Препараты готовили на обезжиренной металлической подложке.

ПП измеряли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (NT-MDT, Зеленоград, 2009) в режиме моды Кельвина (Руководство..., 2006). Для измерений использовали кантилевер с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, USA). Сканировали по 15 клеток из каждой пробы. Применяемый в настоящее время метод зонда Кельвина основывается на двухпроходной методике. В первом проходе определяли рельеф поверхности образца с использованием полуконтактного метода АСМ-сканирования. На втором проходе этот рельеф отслеживали при прохождении зонда над образцом на некоторой высоте для определения поверхностного электрического потенциала (Рис. 2.1).

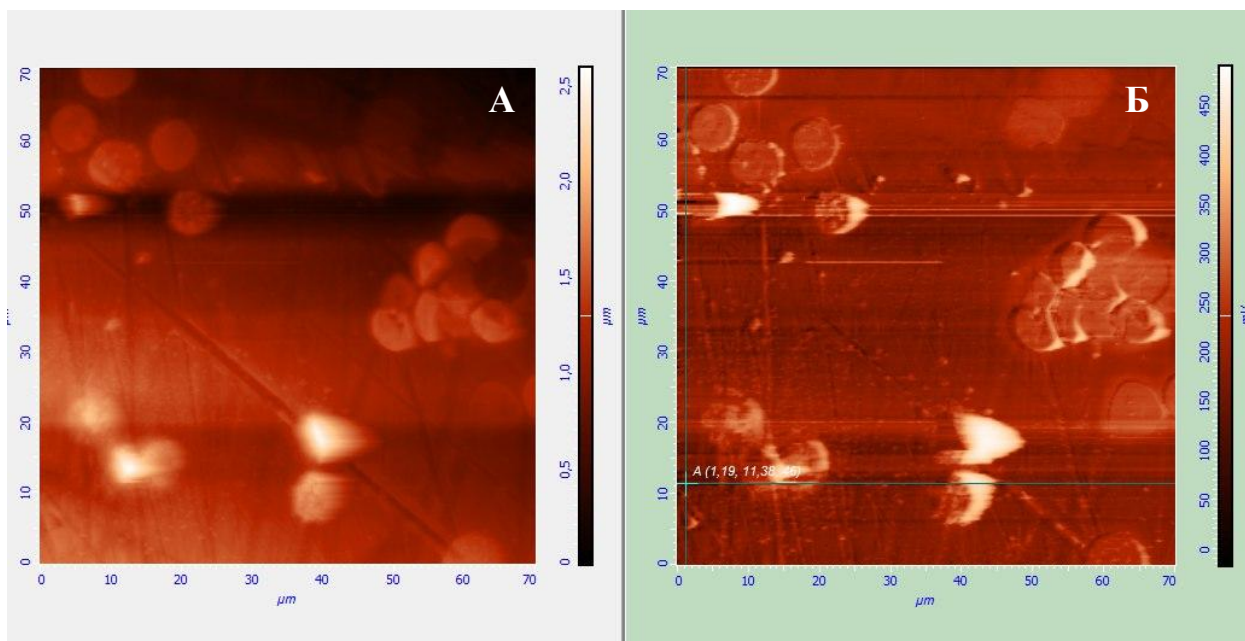


Рис. 2.1. Распределение ПП по поверхности лимфоцитов:  
 А – скан лимфоцитов (первый проход), Б – распределение ПП  
 по поверхности лимфоцитов (второй проход)

Обработку полученных сканов выполняли в программе Nova (Зеленоград, 2009). С помощью инструмента «Point Instruments» определяли значение ПП в 10 участках каждой клетки (см. рис. 2.1б), рассчитывали среднее значение для всех клеток пробы.

### 2.3. Пробоподготовка и измерение модуля Юнга лимфоцитов

Упруго-эластические свойства клеток крови изучали методом эластографии путем сканирования суспензий во влажной камере. Для работы с клетками использовали модифицированные АСМ-зонды в виде полусфер с радиусом закругления 5 мкм (патент РФ 2466401, Скоркина, 2012).

Лимфоциты здоровых и больных различными типами лейкоза получали путем центрифугирования проб крови, которые дважды отмывали изотоничным буферным раствором Дульбеко (рН 7,4) и ресуспендировали в среде Хенкса 199. С целью сохранения жизнеспособности клеток перед сканированием их помещали во влажную камеру (патент на полезную модель РФ 98248, Скоркина, 2010). Для определения модуля Юнга осуществляли скани-



рование на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. Получали силовые кривые, которые использовали для вычисления силы взаимодействия зонда и образца.

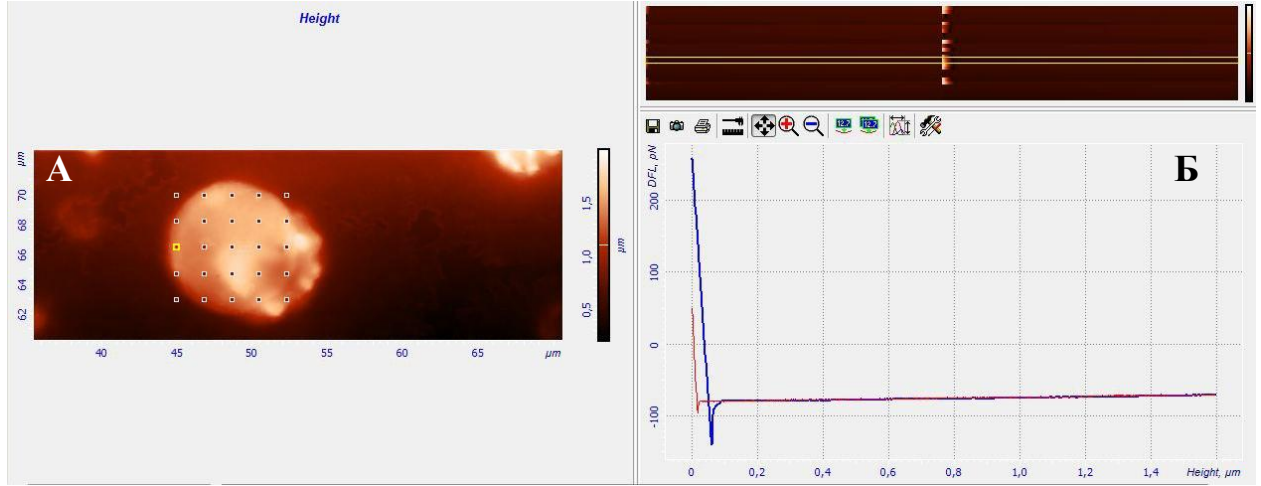


Рис. 2.2. Измерение модуля Юнга лимфоцитов:

А – соответствующие локальные точки силового воздействия на поверхность клетки, Б – экспериментальные кривые сближения зонда с поверхностью (синяя – кривая подвода, красная – кривая отвода зонда)

Силу прижатия зонда к образцу находили исходя из закона Гука:

$$F = k \times x \quad (1)$$

где  $k$  – жесткость зонда (Н/м);

$x$  – глубина проникновения зонда в образец (нм).

Модуль Юнга системы образец-игла рассчитывали исходя из известной формулы (Capella, 1999):

$$F = \frac{4}{3} \sqrt{\frac{3}{R}} E \Delta h^{\frac{3}{2}} \quad (2)$$

где  $F$  – сила с которой зонд действует на образец (Н);

$R$  – радиус закругления зонда (мкм);

$E$  – модуль Юнга (мПА);

$\Delta h$  – глубина погружения зонда в образец (нм).

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием электронных таблиц «Microsoft Excel 2016» и представлены в виде среднеарифметических значений с их средними стандартными ошибками. Полученные данные не всегда соответствовали критерию нормального распределения, поэтому оценку статистической значимости различий в группах наблюдения проводили с использованием F-критерия Фишера при  $p < 0,05$  (Платонов, 2000).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Упруго-эластические свойства лимфоцитов в условиях злокачественной пролиферации клеток крови

В ходе исследований было установлено, что показатели модуля Юнга клеточной поверхности лимфоцитов увеличиваются, за исключение острой формы лимфолейкоза (показатели снижаются) (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Показатели модуля Юнга лимфоцитов

Группы	Модуль Юнга, мПа
Доноры (контроль) (n = 30)	3,16 ± 0,02
ОЛЛ при первичной постановке диагноза (n = 1)	1,87 ± 0,07*
ОЛЛ после лечения (n = 32)	2,21 ± 0,02*
ОЛЛ, рецидив (n = 3)	2,06 ± 0,06*
ОМЛ после лечения (n = 13)	7,25 ± 0,03*
ОМЛ, рецидив (n = 2)	5,34 ± 0,06*
ХЛЛ после лечения (n = 12)	12,81 ± 0,03*
ХМЛ после лечения (n = 3)	8,73 ± 0,05*
ХМЛ, рецидив (n = 2)	6,46 ± 0,07*

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

В условиях ОЛЛ наблюдали снижение модуля Юнга при первичной постановке диагноза – на 41% ( $p < 0,05$ ), после лечения – на 30% ( $p < 0,05$ ) и во время рецидива – на 35% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

В группе больных ОМЛ модуль Юнга лимфоцитов увеличился после лечения – на 229% ( $p < 0,05$ ), а во время рецидива – на 169% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

При развитии хронического типа пролиферации в системе крови установлено значительное увеличение жесткости поверхности во всех исследуемых пробах. Так, после лечения в группе больных как ХЛЛ, так и ХМЛ модуль Юнга увеличился соответственно на 405% ( $p < 0,05$ ) и 216% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. На стадии рецидива болезни при развитии ХМЛ мо-

дуль Юнга увеличился на 204% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (Рис. 3.1).

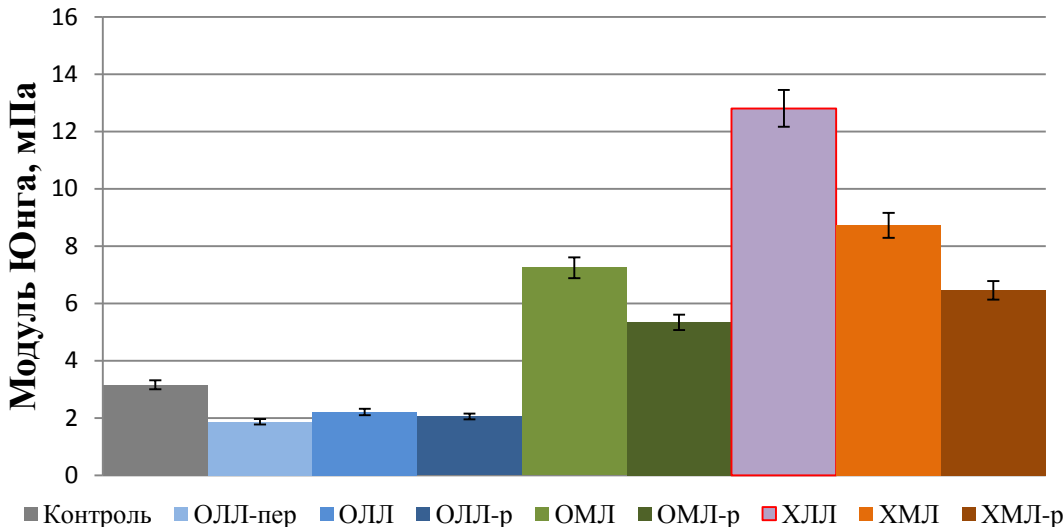


Рис. 3.1. Модуль Юнга поверхности лимфоцитов

Таким образом, снижение жесткости клеток отмечалось только при ОЛЛ с минимальным значением модуля Юнга при первичной постановке диагноза ( $1,87 \pm 0,07$  мПа). В остальных случаях наблюдали увеличение жесткости лимфоцитов и наибольшее ее значение установлено в группе больных ХЛЛ после лечения ( $12,81 \pm 0,03$  мПа).

Достоверных различий значений модуля Юнга при сравнении стадий после лечения и рецидива в группах больных ОЛЛ, ОМЛ и ХМЛ не установлено.

### 3.2. Поверхностный потенциал лимфоцитов в условиях злокачественной пролиферации клеток крови

В ходе исследований было установлено, что клеточная поверхность несет отрицательный заряд. В условиях ОЛЛ потенциал клеточной поверхности лимфоцитов повысился: при первичной постановке диагноза – на 7% ( $p < 0,05$ ), после лечения – на 28% ( $p < 0,05$ ), во время рецидива – на 20% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При ОМЛ потенциал поверхности повы-

сился: после лечения – на 11% ( $p < 0,05$ ), во время рецидива – 45% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 3.2).

Таблица 3.2

## Показатели потенциала поверхности лимфоцитов

Группы	ПП, мВ
Доноры (контроль)	$-39,0 \pm 0,2$
ОЛЛ при первичной постановке диагноза	$-36,3 \pm 0,6^*$
ОЛЛ после лечения	$-27,9 \pm 0,1^*$
ОЛЛ, рецидив	$-31,2 \pm 0,3^*$
ОМЛ после лечения	$-34,8 \pm 0,2^*$
ОМЛ, рецидив	$-21,4 \pm 0,4^*$
ХЛЛ после лечения	$-6,9 \pm 0,1^*$
ХМЛ после лечения	$-12,1 \pm 0,3^*$
ХМЛ, рецидив	$-25,5 \pm 0,3^*$

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

При развитии ХЛЛ потенциал поверхности лимфоцитов был увеличен на 82% ( $p < 0,05$ ), а при ХМЛ: после лечения – на 69% ( $p < 0,05$ ), во время рецидива – на 35% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Все исследуемые типы злокачественной пролиферации сопровождались повышением ПП лимфоцитов, вне зависимости от стадии течения болезни (Рис. 3.2).

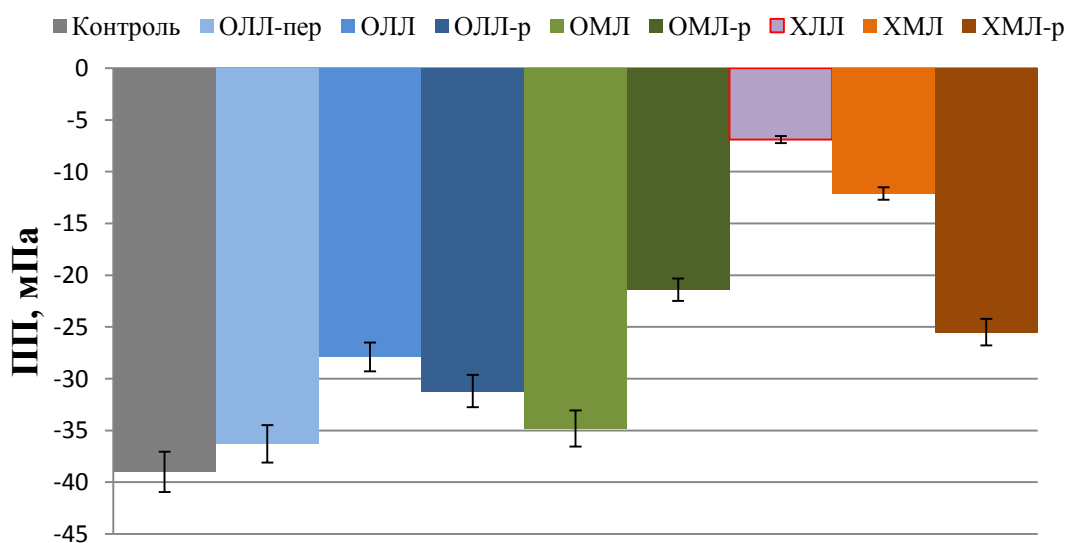


Рис. 3.2. Поверхностный потенциал лимфоцитов

Наибольшее отклонение было зафиксировано при ХЛЛ –  $-6,9 \pm 0,1$  мВ, а наименьшее при ОЛЛ (первичная постановка диагноза) –  $-36,3 \pm 0,6$  мВ, по сравнению с контролем –  $-39,0 \pm 0,2$  мВ.

Сравнивая полученные результаты ПП после лечения и во время рецидива, достоверных различий значений ПП в группах больных ОМЛ и ХМЛ не установлено. В случае ОЛЛ стадия рецидива характеризуется приобретением лимфоцитами отрицательного заряда по сравнению с лечением.

В группе больных ОЛЛ было выявлено увеличение потенциала клеточной поверхности и снижение жесткости мембраны лимфоцитов по сравнению с контролем. В остальных же группах наряду с потерей отрицательного заряда мембраной жесткость мембраны лимфоцитов возрастала.

В группе больных ХЛЛ были одновременно отмечены максимальное значение модуля Юнга и максимальное значение ПП по сравнению со всеми исследуемыми группами.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модуль Юнга лимфоцитов. В выполненном исследовании изучены свойства поверхности лимфоцитов при развитии злокачественных лимфопрролиферативных процессов в системе крови. Анализируя полученные в эксперименте данные модуля Юнга установлено, что при развитии различных стадий ОЛЛ жесткость лимфоцитов снижена по сравнению с другими типами лейкоза и контролем. Выявленные свойства могут способствовать усиленному распространению лимфоцитов в кровь и миграции в ткани. Согласно данным литературы, со временем нормальные клетки могут быть вытеснены трансформированными (Рыбас, 2015). По результатам исследований Сладковой Е.А. (2015) было зафиксировано увеличение числа мигрировавших лимфоцитов на фоне низкой жесткости их мембраны по сравнению с донорами.

Полученные нами данные согласуются с экспериментальными исследованиями, представленными в литературе: лейкозные бластные клетки отличаются от своих нормальных аналогов высокой подвижностью и способностью к деформации (Владимирская, 2015). Эти данные указывают, что в условиях патологического процесса в периферической крови присутствуют молодые клеточные формы (бластные, клетки-предшественники), которые в норме отсутствуют в кровотоке (Зарицкий, 2014). Перераспределения и сборки F-актина цитоскелета индуцирует миграцию клеток (Luo et al., 2017). В итоге из-за избыточного количества злокачественных клеток-предшественников подавляется процесс кроветворения (Balandran et al., 2016).

Развитие хронических форм лимфопрролиферативных процессов в системе крови характеризуется увеличением модуля Юнга по сравнению с донорами и среди всех исследуемых групп. В данном случае, увеличение жесткости поверхности снижает миграционную активность клеток. Согласно данным в работе Сладковой Е.А. (2015) получены аналогичные результаты: уве-

личение жесткости мембраны лимфоцитов, снижение их подвижности и низкая миграционная активность. «Жесткие» лимфоциты, не способные деформироваться при прохождении через капилляры, склонны вызывать закупорку, нарушая микроциркуляцию крови (Rosenbluth et al., 2006).

Показатели модуля Юнга во время рецидива в группах больных ХМЛ и ОМЛ свидетельствует о пониженной жесткости лимфоцитов, по сравнению со стадией после лечения. По данным литературы, повышенная жесткость лимфоцитов после лечения может быть связана с воздействием химиотерапевтических препаратов на клетку (Singh et al., 2007). Повышение жесткости лимфоцитов провоцирует в микрососудистом русле явление лейкостаза (Фишер, 2000; Dong, 2005).

Таким образом, модуль упругости клеточной мембраны может быть полезным биомаркером для количественной оценки эффективности действия химиотерапевтического агента (Khakshour et al., 2014). Сравнивая поведение деформации клеток после обработки, и этот подход приносит новое понимание патогенеза и лечения различных заболеваний (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2015; Bai et al., 2017).

Поверхностный потенциал. Мембранный потенциал лимфоцитов периферической крови у больных разными типами лейкоза был повышен по сравнению с контролем. Мембранный потенциал является следствием изменений в распределении ионов между внешней и внутренней средой клетки (Franco, 2006).

Реакция мембраны клеток может быть связана с изменением трансмембранного сопротивления или проницаемости для специфических ионов. Согласно данным литературы, заряд поверхности лимфоцитов можно объяснить действием калиевых каналов, открытие которых происходит в момент деполаризации мембраны клетки (Каримов, 1994). Если в физиологических условиях, при работе калий-натриевого насоса в клетку поступает 2 иона  $K^+$ , а выходит 3 иона  $Na^+$ , то формируется более отрицательный заряд мембраны. Тогда как в ходе злокачественной пролиферации клеток механизм работы ка-



лий-натриевого насоса нарушается, и многократное увеличение  $K^+$ -проводимости приводит к его избытку в клетке – теряются отрицательные заряды. Увеличение  $K^+$ -проводимости является универсальным признаком бласттрансформации лимфоцитов (Каримов, 1994).

Не исключен вклад и других ионов, участвующих в обмене между внешней и внутренней средой клетки и влияющих на изменение потенциала мембраны. Изменения концентрации ионов  $Ca^{2+}$  представляют собой повсеместный сигнальный механизм, который регулирует различные фазы физиологии лимфоцитов, включая пролиферацию, определение линии в процессе созревания и активацию антигеном. Каждая клетка обладает уникальным набором компонентов, участвующих в этом регулировании, так называемом  $Ca^{2+}$ -инструментарий. Набор может быть изменен на каждом этапе развития в связи с сигнальными событиями или может быть реконструирован в опухолевых клетках для поддержания пролиферации и предотвращения смерти клеток (Yin et al., 2007).

Изменения в трансмембранных градиентах нескольких ионов оказывают влияние на программу клеточной гибели. Внутриклеточный ионный гомеостаз является определяющим фактором, как при активации, так и при прогрессировании апоптозного каскада (Franco R., 2006). Нарушения в гомеостазе ионного обмена приводят к тому, что процесс апоптоза клетки не запускается, в результате чего в крови продолжают циркулировать злокачественные лимфоциты. Дисбаланс в проведении ионов через клетку может быть вызван, как в ходе генетических перестроек (Dobrovinskaya et al., 2015), так и вследствие воздействия химиотерапевтических препаратов, нарушающих деятельность селективных ионных каналов (Yin et al., 2007).

## ВЫВОДЫ

1. Развитие острых и хронических пролиферативных процессов сопровождается появлением в периферической крови лимфоцитов с повышенным значением поверхностного потенциала вне зависимости от стадии течения болезни.

2. Жесткость поверхности лимфоцитов при развитии хронического лимфобластного лейкоза повышена, однако острый лимфобластный тип пролиферации на всех стадиях (после лечения, ремиссии и рецидива) характеризуется сниженной жесткостью.

3. При развитии острой миелопролиферации, как и при хроническом типе – жесткость поверхности лимфоцитов повышена, причем после лечения жесткость клеток выше, чем в фазу рецидива.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдулкадыров, К. М. Гематология [Текст] : Новейший справочник / К. М. Абдулкадыров, Т. А. Андреева, В. А. Балашова [и др.] ; под ред. К. М. Абдулкадырова. – М. : Эксмо ; СПб. : Сова, 2004. – 928 с.
2. Блау, О. В. Мутации генов при острых миелоидных лейкозах [Текст] / О. В. Блау // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 245-256.
3. Владимирская, Е. Б. Клиническая онкогематология [Текст] / Е. Б. Владимирская // Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – Т. 8, № 2. – С. 109-119.
4. Волкова, М. А. Клиническая онкогематология [Текст] : руководство для врачей / М. А. Волкова ; под ред. проф. М. А. Волковой. – 2-е изд. – М. : ОАО Изд-во Медицина, 2007. – 1120 с.
5. Волкова, М. А. Хронический миелолейкоз: вчера, сегодня завтра. К 165-летию первого описания [Текст] / М.А. Волкова // Онкогематология. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 317-325.
6. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии [Текст]. В 3 т. Т. 1. Клетка / А. И. Воробьев, М. Г. Абрамов, М. Д. Бриллиант [и др.] ; под ред. А. И. Воробьева. – 3-е изд., перераб. и допол. – М. : Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
7. Глузман, Д. Ф. О возможных дополнениях к современной схеме нормального кроветворения на основе изучения лейкемических бластных клеток [Текст] / Д. Ф. Глузман, Л. М. Скляренко, С. В. Коваль [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 4. – С. 40-43.
8. Доминский, Д. А. Молекулярные механизмы лейкозогенеза [Текст] / Д. А. Доминский // Онкогематология. – 2010. – № 4. – С. 49-56.
9. Дризе, Н. И. Различия между лейкозными и нормальными кроветворными стволовыми клетками [Текст] / Н. И. Дризе // Онкогематология. – 2006. – № 1–2. – С. 5–9.

10. Жевак, Т. Н. Хронический лимфолейкоз: современные концепции этиологии, патогенеза и особенностей клинического течения (обзор) [Текст] / Т. Н. Жевак, Н. П. Чеснокова, Т. В. Шелехова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 2. – С. 377-385.
11. Зарицкий, А. Ю. Стволовые клетки костного мозга [Электронный ресурс] : видеолекция «От эксперимента к клинике: современная экспериментальная гематология» / А. Ю. Зарицкий // Открытая библиотека видеолекций Лекториум. – СПб. : Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, 2013. – Режим доступа: <https://www.lektorium.tv/lecture/14313>.
12. Казарян, П. А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний [Текст] / П. А. Казарян, С. С. Дагбашян, А. А. Галоян // Онкогематология. – 2011. – Т. 111, № 1. – С. 59-68.
13. Каримов, Д. П. Влияние иммуностимулятора «Вгетан» на свойства мембраны В-лимфоцитов: ионные каналы, мембранный потенциал, электрическая емкость мембраны: аллергология и иммунология [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.36 / Д. П. Каримов. – Москва, 1994. – 28 с.
14. Коленкова, Г. В. Маркеры острого лейкоза в диагностике и прогнозе заболевания у детей [Текст] / Г. В. Коленкова // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 28-35.
15. Ломаиа, Е. Г. Классификация и основы патогенеза хронических миелолиферативных заболеваний [Электронный ресурс] : видеолекция «От эксперимента к клинике: современная экспериментальная гематология» / Е. Г. Ломаиа // открытая библиотека видеолекций Лекториум. – СПб. : Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, 2013. – Режим доступа: <https://www.lektorium.tv/lecture/14317>.
16. Ломаиа, Е. Г. Хронический миелолейкоз – до и после применения иматиниба (часть I) [Текст] / Е. Г. Ломаиа, Д. В. Моторин, Е. Г. Романова и [и др.] // Онкогематология. – 2009. – № 2. – С. 4-16.

17. Ненашева, Т. А. Физиологическая роль немышечных миозинов в подвижности клеток [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.13 / Т. А. Ненашева. – Екатеринбург, 2008. – 25 с.
18. Пат. 2027188 Рос. Федерация, МПК G01N33/49. Способ регистрации изменения поверхностного заряда эритроцитов [Текст] / Ю. А. Шереметев, Г. И. Макин, Ф. Ю. Суслов ; заявитель и патентообладатель НСХ. – № 4947820/14 ; заявл. 24.06.1991 ; опубл. 20.01.1995.
19. Пат. 2466401 Рос. Федерация, МПК G01N33/49. Способ определения упругости клеток крови [Текст] / М. Ю. Скоркина, Е. А. Сладкова, Н. А. Забиняков ; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВПО Белгор. гос. нац. исслед. ун-т (НИУ «БелГУ»). – № 2011109741/15 ; заявл. 15.03.2011 ; опубл. 10.11.2012, Бюл. № 31. – 9 с.
20. Пат. на полезную модель 98248 Рос. Федерация, МПК G01N77. Влажная камера для исследования нативных клеток крови [Текст] / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, С. Д. Чернявских ; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВПО Белгор. гос. нац. исслед. ун-т (НИУ «БелГУ»). – № 2010105541 ; заявл. 16.02.2009 ; опубл. 10.10.2010.
21. Платонов, А. Е. Статистический анализ в медицине и в биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А. Е. Платонов. – М. : Издательство РАМН, 2000. – 52 с.
22. Приндулл, Г. Гемопоз в желточном мешке [Текст] / Г. Приндулл // Гематология и трансфузиология. – 1998. – Т. 43, № 3. – С. 14-15.
23. Руководство пользователя «Зондовая нанолaborатория Интегра Вита». Зеленоград : Copyright НТМДТ. – 2006. – 57 с.
24. Рыбас, А. В. Хронический лимфолейкоз [Текст] / А. В. Рыбас // Вестник молодого ученого. – 2015. – № 4. – С. 40-45.
25. Рябчикова, Н. Р. Хронический миелолейкоз: молекулярный мониторинг в клинической практике [Текст] / Н. Р. Рябчикова, И. Р. Миннихметов, Г. Ш. Сафуанова [и др.] // Онкогематология. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 7-16.

26. Сарсенгалиева, А. К. Хронический миелолейкоз – современный взгляд на патогенетические механизмы, диагностику, лечение и мониторинг терапии [Текст] / А. К. Сарсенгалиева, Л. В. Заклякова, Е. Г. Овсянникова [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 14-19.
27. Смирнова, О. В. Хронический миелолейкоз – клинические и иммунологические особенности у взрослых больных [Текст] / О. В. Смирнова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 85, № 3-2. – С. 185-189.
28. Сухих, И. Н. Острый лимфобластный лейкоз и сахарный диабет 1 типа / И. Н. Сухих // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 661-662.
29. Сяпина, Т. В. Лабораторные маркеры хронического миелолейкоза [Текст] / Т. В. Сяпина, С. С. Бессмельцев, А. В. Козлов // Трансфузиология, Гематология. – 2011. – Т. 12, № 80. – С. 959-979.
30. Фишер, Т. Клиническая иммунология и аллергология [Текст] / Т. Фишер, Д. Адельман ; под ред. Г. Лолор. – М. : Практика, 2000. – 806 с.
31. Хаитов, Р. М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы [Текст] : руководство для врачей. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 352 с.
32. Шиффман, Ф. Дж. Патофизиология крови [Текст] / Ф. Дж. Шиффман ; пер. с англ. – М. – СПб. : «Издательство БИНОМ» – «Невский Диалект», 2000. – 448 с.
33. Alberts, B. Molecular biology of the cell [Текст] / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis [et al.]. – 4<sup>th</sup> edition. – New York : Garland Science, 2002. – 1616 p.
34. Annunziato, F. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo [Текст] / F. Annunziato, L. Cosmi, G. Galli [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 1999. – V. 65, № 5. – P. 691-699.
35. Azari-Yam, A. FLT3 gene mutation profile and prognosis in adult acute myeloid leukemia [Текст] / A. Azari-Yam, J. Tavakkoly-Bazzaz, Y. Semnani [et al.] // Clin. Lab. – 2016. – Vol. 62, № 10. – P. 2011-2017.

36. Bai, G. Characterization of biomechanical properties of cells through dielectrophoresis-based cell stretching and actin cytoskeleton modeling [Текст] / G. Bai, Y. Li, H. K. Chu [et al.] // *Biomed. Eng. Online.* – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. 2-15.
37. Balandran, J. C. Analysis of normal hematopoietic stem and progenitor cell contents in childhood acute leukemia bone marrow [Текст] / J. C. Balandran, E. Vadillo, D. Dozal [et. al.] // *Arh. Med. Res.* – 2016. – Vol. 47, № 8. – P. 629-643.
38. Becker, M. W. Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions [Текст] / M. W. Becker, C. T. Jordan // *Blood Rev.* – 2011. – Vol. 25, № 2. – P. 75-81.
39. Bonnet, D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [Текст] / D. Bonnet, J. E. Dick // *Nat. Med.* – 1997. – T. 3, № 7. – P. 730–737.
40. Buhmann, R. CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells [Текст] / R. Buhmann, C. Kurzeder, J. Rehklau [et al.] // *British Journal of Haematology.* – 2002. Vol. 118, № 4. – P. 968–975.
41. Capella, B. Force-distance curves by atomic force microscopy [Текст] / B. Capella, G. Dieter // *Surf. Sci. Rep.* – 1999. – Vol. 34, № 1-3. – P. 1-104.
42. Chaohong, L. I. U. The actin cytoskeleton coordinates the signal transduction and antigen processing functions of the B cell antigen receptor [Текст] / L. I. U. Chaohong, K. Margaret, M. Heather // *Front. Biol. (Beijing).* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 475-485.
43. Charbord, P. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment [Текст] / P. Charbord, M. Tavian, L. Humeau [et al.] // *J. Blood.* – 1996. – Vol. 87, № 10. – P. 4109-4119.
44. Dobrovinskaya, O. Placing ion channels into a signaling network of T cells: from maturing thymocytes to healthy T lymphocytes or leukemic T lymphoblasts

[Текст] / O. Dobrovinskaya, I. Delgado-Enciso, L. J. Quintero-Castro [et al.] // Biomed res. Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-32.

45. Dong, C. Micromechanics of tumor cell adhesion and migration under dynamic flow conditions [Текст] / C. Dong, M. Slattery, S. Laing // *Frontiers in Bioscience*. – 2005. – V. 10. – P. 379–384

46. Faderl, S. Mechanism of disease: the biology of chronic myelogenous leukemia [Текст] / S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 341, № 3. – P. 164–172.

47. Franco, R. Potential Roles of Electrogenic Ion Transport and Plasma Membrane Depolarization in Apoptosis [Текст] / R. Franco, C. D. Brother, J. A. Cidlowski // *J. Membrane Biol.* – 2006. – Vol. 209, №1. – P. 43-58.

48. Friedl, P. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement [Текст] / P. Friedl, S. Borgmann, E. B. Bröcker // *J. Leukoc. Biol.* – 2001b. – Vol. 70, № 4. – P. 491-509.

49. Friedl, P. Interaction of T-cells and antigen presenting cells: the serial encounter model [Текст] / P. Friedl, M. Gunzer // *Trends. Immunol.* – 2001a. – V. 22, № 4. – P. 187-191.

50. Golub, T. R. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring [Текст] / T. R. Golub, D. K. Slonim, P. Tamayo [et al.] // *Science*. – 1999. – Vol. 286, № 15. – P. 531-537.

51. Haferlach, T. Modern diagnostics in acute leukemia [Текст] / T. Haferlach, W. Kern, S. Schnittger [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2005. – Vol. 56, № 2. – P. 223-234.

52. Hengeveld, P. J. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? [Текст] / P. J. Hengeveld, M. J. Kersten // *Blood Cancer J.* – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 1-8.

53. Horton, S. J. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology [Текст] / S. J. Horton, B. J. Huntly // *Haematologica*. – 2012. – Vol. 97, № 7. – P. 966-974.



54. Khakshour, S. Mechanical characterization of ART-treated Jurkat cells using optical tweezers [Текст] / S. Khakshour, T. V Beischlag, C. Sparrey [et al.] // Engineering in Medicine and Biology Society. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 1-17
55. Konopleva, M. Y. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting [Текст] / M. Y. Konopleva, C. T. Jordan // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29, № 5. – P. 591-599.
56. Krause, D. S. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment [Текст] / D. S. Krause, K. Fulzele, A. Catic [et al.] // Nat. Med. – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 1513-1517.
57. Luo, J. RhoA and RhoC are involved in stromal cell-derived factor-1-induced cell migration by regulating F-actin redistribution and assembly [Текст] / J. Luo, D. Li, D. Wei [et al.] // Mol. Cell Biochem. – 2017. – [Epub ahead of print] – P. 1-9.
58. Manafi, S. R. Cyclic AMP-induced p35 destabilization is independent of CREB in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells [Текст] / S. R. Manafi, M. Safa, M. Banan [et al.] // Int. J. Mol. Cell Med. – 2016. – Vol. 5, № 4. – P. 220-228.
59. Migliacci, G. Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac → Liver transition [Текст] / G. Migliacci, A. R. Migliaccio, S petti [et al.] // J. Clin. Invest. – 1986. – Vol. 78, № 1. – P. 51-60.
60. Muggen, A. F. Basal  $Ca^{2+}$  signaling is particularly increased in mutated chronic lymphocytic leukemia [Текст] / A. F. Muggen, S. Y. Pillai, L. P. Kil [et al.] // Leukemia. – 2014. – Vol. 29, № 2. – P. 321-328.
61. Panoskaltsis, N. Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukaemia [Текст] / N. Panoskaltsis, C. D. Reid, S. C. Knight // Leukemia. – 2003. – Vol. 17, № 4. – P. 716-730.
62. Park, S. Effects of somatic mutations are associated with SNP in the progression of individual acute myeloid leukemia patient: The two-hit theory explains

inherited predisposition to pathogenesis [Текст] / S. Park, Y. Koh, S. S. Yoon // *Genomics Inform.* – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 34-37.

63. Passeque, E. Normal and leukemia hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? [Текст, рисунок] / E. Passeque, C. H. Jamieson, L. E. Ailles [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, № 1. – P. 11842–11849.

64. Pfeffer, L. M. Interferon-alpha modulates the plasma membrane-cytoskeletal complex of human lymphoblastoid cells sensitive to the antiproliferative action of interferon- alpha [Текст] / L. M. Pfeffer, F. R. Landsberger // *J. Interferon Res.* – 1990. – V.10, № 1. – P. 91-97.

65. Piqazzi, M. cAMP response element binding protein (CREB) overexpression CREB has been described as critical for leukemia progression [Текст] / M. Piqazzi, E. Ricotti, G. Germano [et al.] // *Haematologica.* – 2007. – Vol. 92, № 10. – P. 1435-1437.

66. Rauch, C. Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry [Текст] / C. Rauch, E. Farge // *Biophysical J.* – 2000. – Vol. 78, № 6. P. 3036-3047.

67. Ritter, A. T. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse [Текст] / A. T. Ritter, K. L. Angus, G. M. Griffiths // *Immunol. Rev.* – 2013. – Vol. 256, № 1. P. 107-117.

68. Rosenbluth, M. J. Force microscopy of nonadherent cell: a comparison of leukemia cell deformability [Текст] / M. J. Rosenbluth, W. A. Lam, D. A. Fletcher // *Biophys. J.* – 2006. – V. 90, № 8. – P. 2994-3003.

69. Samanta, A. Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia [Текст] / A. Samanta, B. Perazzona, S. Chakraborty [et al.] // *Leukemia.* – 2011. – Vol.25, № 3. – P. 463-472.

70. Savona, M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia [Текст] / M. Savanova, M. Talpaz // *Nature reviews cancer*, 2008. – Vol. 8, № 5. – P. 341-350.

71. Schafranek, L. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for

- TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia [Текст] / L. Schafranek, E. Nievergall, J. A. Powell [et al.] // *Leukemia*. – 2015. – Vol. 29, № 1. – P. 76-85.
72. Shankar, D. B. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia [Текст] / D. B. Shankar, J. C. Cheng, K. Kinjo [et al.] // *Cancer cell*. – 2005. – Vol. 7, № 5. – P. 351-362.
73. Siegel, R. Cancer statistics [Текст] / R. Siegel, J. Ma, Z. Zou [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2014. – Vol. 64, № 1. – P. 9-29.
74. Singh, A. K. Efficacy of CD34 positive cell dose in patients undergoing allogeneic peripheral blood stem cell transplant with total body irradiation [Текст] / A. K. Singh, B. P. Savani, P. S. Albert [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2007. – V. 13, № 3. – P. 339-344.
75. Tavian, M. Embryonic development of the human hematopoietic system [Текст] / M. Tavian, B. Peault // *Int. J. Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 49, № 2-3. – P. 243-250.
76. Vandewoestyne, M. L. Laser microdissection for the assessment of the clonal relationship between chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and proliferating B cells within lymph node pseudofollicles [Текст] / M. L. Vandewoestyne, V. C. Pede, K. Y. Lambein [et al.] // *Leukemia*. – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 883-888.
77. Vaziri, H. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age [Текст] / H. Vaziri, W. Dragowska, R. C. Allsopp [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol. 91, № 21. – P. 9857-9860.
78. Wang, K. Probing cell biophysical behavior based on actin cytoskeleton modeling and stretching manipulation with optical tweezers [Текст] / K. Wang, J. Cheng, S. H. Cheng [et al.] // *Appl. Phys. Lett.* – 2013. – Vol. 103, № 8. – P. 361-370.
79. Yin, W. Impairment of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in CD95(APO-1)-induced human T-cell leukemia cell apoptosis mediated by glutathione depletion and generation of hydrogen peroxide [Текст] / W. Yin, W. Cheng, W. Shen [et al.] // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21, № 8. – P. 1669-1678.

80. Zhang, X. Rapid characterization of the biomechanical properties of drug-treated cells in a microfluidic device [Текст] / X. Zhang, H. K. Chu, Y. Zhang [et al.] // J. Micromech. Microeng. – 2015. – Vol. 25, № 10. – P. 1969-1978.