

УДК 576.322.2

ШАМРАЙ Е.А., КРОТОВА Е.Е.
SHAMRAY E.A., KROTOVA E.E.

МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗОМ

THE MIGRATION ACTIVITY OF THE LYMPHOCYTES IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH LEUKEMIA

Аннотация

С использованием метода торможения миграции лимфоцитов изучена двигательная активность лимфоцитов здоровых доноров и больных различными формами лейкоза. Установлено, что двигательная активность лимфоцитов больных как острым, так и хроническим типами лейкоза снижена в среднем на 27-82% по сравнению со здоровыми донорами. В тестах с митоген стимулированными клетками показано, что под влиянием ФГА миграционная активность лимфоцитов больных острым миелобластным лейкозом возрастает на 10%, в группах больных другими типами лейкоза снижается на 10-55% по сравнению со здоровыми донорами. Под влиянием Кон А двигательная активность лимфоцитов больных лейкозом снижена на 42-57% относительно контрольной группы. Активация лимфоцитов в присутствии митогенов представляет удобную модель для изучения процессов роста и пролиферации клеток млекопитающих.

Ключевые слова: лимфоциты; миграционная активность; лейкоз; митогены.

Abstract

Using the method of inhibition of lymphocyte migration, the authors have studied the migration activity of lymphocytes in healthy donors and patients with leukemia. The study proves that the lymphocytes migration activity in both acute and chronic types of leukemia has decreased by about 27-28% as compared with healthy donors. The tests with mitogen stimulation cells demonstrate that under the influence of PHGA, the migration activity of lymphocytes in patients with acute myeloblastic leucosis has increased by 10%, and in the groups with other types of leucosis it has decreased by 10-55% as compared with healthy donors. Under the influence of Con A, the migration activity of lymphocytes in patients with leukemia has decreased by 42-57% as compared with a control group. The activation of lymphocytes in the presence of mitogens is a convenient model for studying the processes of growth and proliferation of cells in mammals.

Key words: lymphocytes; migration activity; leucosis; mitogens.

Миграционная активность лимфоцитов является важным показателем функционального состояния клеток, отклонение которого от нормы происходит вслед-

ствие перестроек в структуре элементов цитоскелета [1]. Удобной моделью для изучения процессов трансформации элементов цитоскелета является стимуляция

лимфоцитов митогенами. По данным литературы, митогенная стимуляция лимфоцитов индуцирует изменение компонентов мембран [2], перестройку структур цитоскелета [3], увеличивает уровень сенсибилизации клеток [4]. Целью выполненного исследования было изучение особенностей миграционной активности лимфоцитов здоровых доноров и больных различными типами лейкоза в условиях митоген стимулированной трансформации.

Материалы и методы исследования. В экспериментальной части работы использовали венозную кровь здоровых доноров (100 человек) в возрасте от 25 до 45 лет. В работе исследована кровь больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) (120 человек). В качестве контроля использовали кровь здоровых доноров (100 человек). Кровь получали путем венопункции.

Миграционную активность лимфоцитов оценивали с помощью реакции торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ). Получали лейкоцитарную суспензию путем центрифугирования при 1500 об./мин, которую делили на три пробы по 1 мл в каждой. Первую пробу инкубировали без добавления митогенов, вторую – с добавлением 0,02 мл фитогемагглютина (ФГА), третью – с 0,02 мл конканавалина А (Кон А). Использовали методику РТМЛ в прямом капиллярном тесте с учетом жизнеспособности лимфоцитов не менее 95% [5]. Жизнеспособность клеток проверяли в камере Горяева после окраски трипановым синим [6]. Заполняли стеклянные капилляры клеточной суспензией (по 0,1 мл). С одного конца капилляр запаивали; другой, содержащий клетки, погружали в агарозные лунки, заполненные 1 мл среды № 199. Для каждой суспензионной пробы в затвердевшем геле пробивали 5 лунок. Капилляры инкубировали при 37°C в течение 24 ч в вертикальном положении. Мигрировавшие из них клетки ресус-

спендировали, оценивали их жизнеспособность описанным выше способом. Для определения количества лимфоцитов в 1 мкл крови использовали стандартные методики. Расчет числа лимфоцитов проводили по формуле:

$$X = \frac{a \times 400 \times b}{v}, \quad (1)$$

где X – число лимфоцитов в 1 мкл крови;
а – число лимфоцитов в 25 больших квадратах;

б – разведение крови;

в – число подсчитанных малых квадратов.

Вычисляли индекс подавления миграции лимфоцитов митогеном в сравнении со спонтанной (без митогена) миграцией. Расчет индекса проводили по следующим формулам:

$$\text{ИТМЛ} = \frac{n(o)}{n(k)}, \quad (2)$$

$$\text{ИТМЛ} = \frac{n(k) - n(o)}{n(k)} \times 100\%, \quad (3)$$

где ИТМЛ – индекс торможения миграции лимфоцитов;

n (k) – количество мигрировавших лимфоцитов без воздействия митогенов (контроль);

n (o) – количество лимфоцитов, мигрировавших под влиянием митогенов ФГА или Кон А (опыт).

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием электронных таблиц «Microsoft Excel 7.0». Достоверность полученных данных оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. В группе здоровых доноров процент мигрировавших клеток в контрольных пробах составил 20,3±0,8%. У больных ОМЛ количество мигрировавших лимфоцитов в пробах без воздействия митогенов составило 14,9±1,0% от начального. В группе больных ОЛЛ двигательная активность лимфоцитов в контроле составила 14,3±0,7%. На стадии ремиссии ОЛЛ

миграционная активность лимфоцитов в контроле достоверно не различалась с фазой острого протекания заболевания и составила $11,1 \pm 0,4\%$. В группе больных ХЛЛ количество мигрировавших клеток составило $3,6 \pm 0,3\%$.

Установлено существенное снижение миграционной активности в группе больных людей по сравнению со здоровыми донорами (рис. 1).

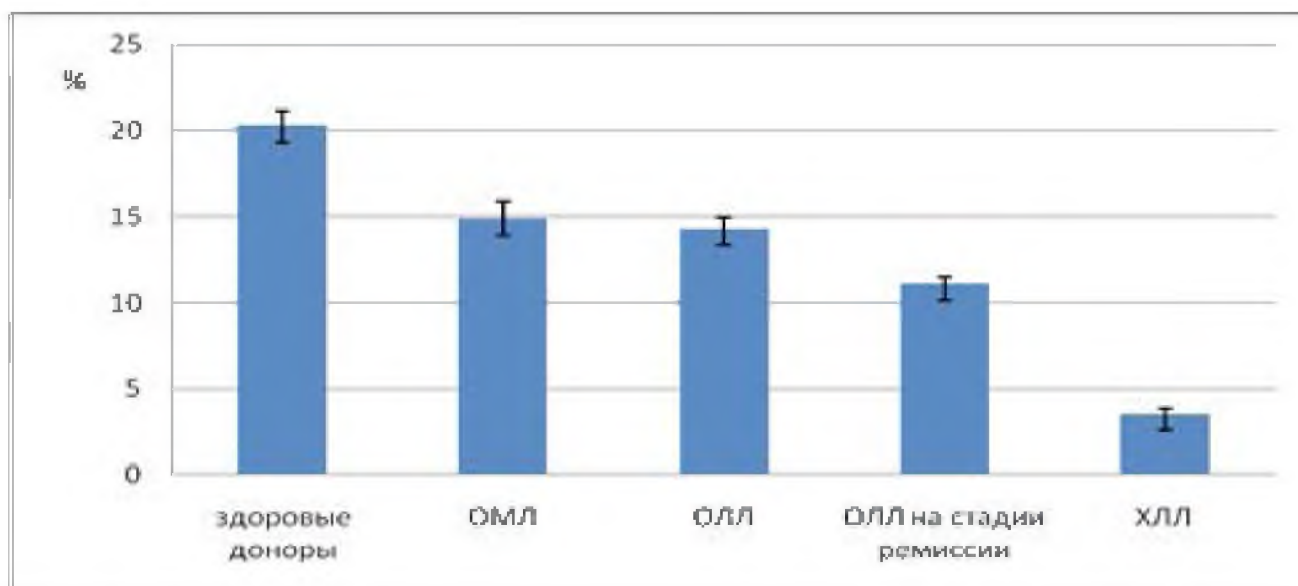


Рис. 1. Процент мигрировавших лимфоцитов в группах здоровых доноров и больных лейкозом в норме

У здоровых доноров количество лимфоцитов до миграции в пробах с ФГА было снижено на 20% ($p < 0,05$), а после проведения теста на миграцию – на 38% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В пробах с Кон А число лимфоцитов до миграции достоверно не различалось с контролем, а после миграции снизилось на 64% ($p < 0,05$). В целом, при добавлении митогенов в инкубационную среду миграционная активность лимфоцитов существенно снижается. Наиболее выраженное тормозящее влияние на двигательную активность белых клеток крови оказывал Кон А.

В группе больных ОМЛ в пробах с ФГА число клеток до миграции было снижено на 76,6% ($p < 0,05$), в то же время после миграции – 69% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При добавлении в инкубационную среду Кон А число лимфоцитов до миграции было снижено на 62% ($p < 0,05$), а после миграции – на 91% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Двигательная

активность лимфоцитов больных ОМЛ существенно замедляется под влиянием КонА и ускоряется при добавлении в среду инкубации ФГА.

У больных ОЛЛ под влиянием ФГА количество лимфоцитов до миграции было снижено на 35% ($p < 0,05$), в то время как после миграции – на 60,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При добавлении в среду Кон А число лимфоцитов до миграции уменьшилось на 41% ($p < 0,05$), а после миграции – на 85,7% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В группе больных ОЛЛ в стадии ремиссии под влиянием ФГА число лимфоцитов до миграции было снижено на 27% ($p < 0,05$), а после миграции – на 32,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При добавлении в среду Кон А число клеток до миграции практически не отличалось от значений контроля, а после миграции снизилось на 58% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Под влиянием митогенов миграцион-

ная активность лимфоцитов больных ОЛЛ снижается. Наиболее выраженное торможение миграции лимфоцитов под влиянием митогенов установлено в группе больных ОЛЛ с острым течением болезни.

У больных ХЛЛ в пробах с ФГА количество лимфоцитов до миграции было снижено на 71% ($p < 0,05$), а после миграции – на 37% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При добавлении в инкубационную среду Кон А число клеток до миграции снизилось на 66,7% ($p < 0,05$), а после миграции – на 61,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Под влиянием ФГА миграционная активность лимфоцитов больных ХЛЛ возрастает, а при добавлении КонА снижается по сравнению с контролем.

Под влиянием ФГА миграционная активность лимфоцитов больных ОМЛ возрастает, а в группах больных ОЛЛ, ОЛЛ в ремиссии и ХЛЛ снижается по сравнению со здоровыми донорами. Под влиянием Кон А миграционная активность лимфоцитов больных различными типами лейкоза снижена по сравнению с группой здоровых доноров (рис. 2).

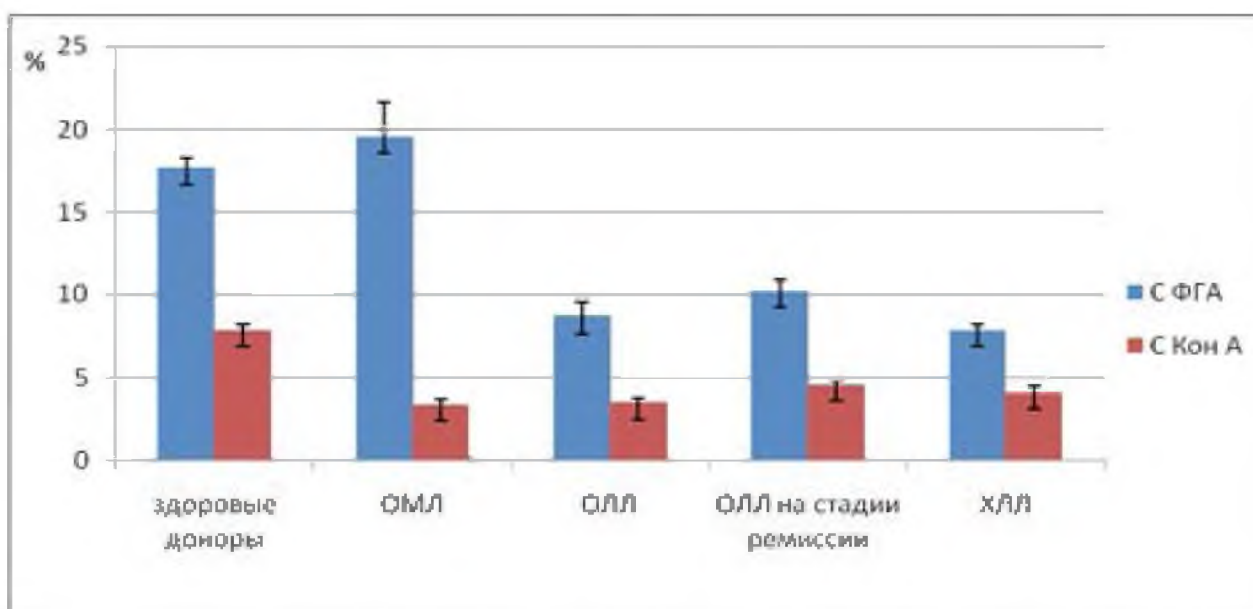


Рис. 2. Процент мигрировавших лимфоцитов под влиянием ФГА и Кон А в группе здоровых доноров и больных лейкозом

Установлено увеличение ИТМЛ лимфоцитов больных лейкозом под влиянием

митогенов, вследствие снижения их двигательной активности (табл.).

Таблица

ИТМЛ лимфоцитов здоровых доноров и больных лейкозом

Группы обследованных пациентов	ФГА	Кон А
Здоровые доноры	24,1±4,1	58,3±2,6
Больные ОМЛ	69,3±2,9*	90,9±1,1*
Больные ОЛЛ	64,6±5,7*	86,2±2,9*
Больные ОЛЛ в стадии ремиссии	44,8±4,6*	60,2±0,8
Больные ХЛЛ	37,9±7,3*	65,0±2,9*

* – достоверность различий между группами здоровых доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

В группе больных ОМЛ при добавлении ФГА ИТМЛ увеличился на 187% ($p < 0,05$), а под влиянием Кон А – на 56% ($p < 0,05$) по сравнению с ИТМЛ лимфоцитов здоровых доноров. В группе больных ОЛЛ ИТМЛ возрос в пробах с ФГА на 168% ($p < 0,05$), с Кон А – на 48% ($p < 0,05$) по сравнению с ИТМЛ здоровых доноров. В стадии ремиссии болезни ИТМЛ в пробах с Кон А существенно не отличался от значений группы здоровых доноров, а в пробах с ФГА увеличился на 85% ($p < 0,05$). В группе больных ХЛЛ ИТМЛ возрастал на 57% и 11,4% ($p < 0,05$) соответственно при добавлении ФГА и Кон А.

Установленное в результате проведенных экспериментов снижение миграционной активности лимфоцитов здоровых доноров при добавлении в среду митогенов обусловлено, согласно данным литературы, их сенсibilизацией. Сенсibilизированные к митогену лимфоциты резко снижают скорость передвижения в среде, выделяя при этом фактор, ингибирующий миграцию клеток (LMIF) [7]. Реакция осуществляется при непосредственном взаимодействии антигенспецифических рецепторов с митогеном. Митоген-активируемые киназы, функционирующие в лимфоцитах, отвечают на внеклеточные стимулы и регулируют многие клеточные процессы, такие как экспрессию генов, деление, дифференцировку и апоптоз [8]. По данным литературы, нормальные лимфоциты, активированные *in vitro* ФГА и Кон А, синтезируют и выделяют значительное количество фактора LMIF по сравнению с клетками в нестимулированных культурах, под влиянием которого снижается пластичность цитоплазматической мембраны, а также уменьшается скорость полимеризации актиновых филаментов [9].

Выявленное нами тормозящее влияние Кон А и ФГА на двигательную активность лимфоцитов больных различными формами лейкоза, возможно, связано с влиянием

митогенов на элементы цитоскелета. Миграционная активность лимфоцитов больных лейкозом существенно снижена на 27-82% в зависимости от разновидности лейкоза по сравнению с клетками здоровых доноров. Согласно данным литературы под влиянием митогенного стимула в атипичных клетках крови происходят изменения филаментов цитоскелета, ферментативных систем, липид-липидных соотношений и белковых компонентов в мембранах [10].

Заключение. Анализ результатов проведенных исследований и сопоставление их с данными, полученными ранее, свидетельствует о том, что миграционная активность лимфоцитов больных лейкозом существенно снижена по сравнению с клетками здоровых доноров. Добавление в среду митогенов тормозит двигательную активность, как лимфоцитов здоровых доноров, так и больных различными формами лейкоза. Влияние митогенов на миграцию клеток крови обусловлено их взаимодействием с рецепторным аппаратом клетки, что инициирует каскад внутриклеточных процессов (дифференцировка, перестройка клеточных структур, синтез ферментов, факторов, ингибирующих миграцию).

Литература:

1. Friedl P., Brocker E.B. T-cell migration in 3-D extracellular matrix: guidance by polarity and sensations // *Dev. Immunol.* 2000. № 7. P. 249-266.
2. Schwartz M.A., Shattil S.J. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases // *Trends Biochem. Sci.* 2000. № 25. P. 388-391.
3. Friedl P., Borgmann S., Bröcke E.-B. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement // *Journal of Leukocyte Biology.* 2001. № 70. P. 491-509.
4. Ghia P., Chiorazzi N., Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic

lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation // J. Intern. Med. 2008. № 264(6). P. 549-562.

5. Новиков Д.К. Медицинская иммунология. Минск: Высш. Шк., 2005. 301 с.

6. Золотницкая Р.П. Методы гематологических исследований. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 2007. 148 с.

7. Faixl J., Rottner K. The making of filopodia // Current Opinion in Cell Biology. 2006. № 18. P. 18-25.

8. Translocation of spectrin and protein kinase C to a cytoplasmic aggregate upon lymphocyte activation / Gregorio C.C., Kubo R.T., Bankert R.B., Repasky E.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. № 89. P. 49-47.

9. Actin cytoskeletal dynamics in T-lymphocyte activation / Samstag Y., Sybille M.E., Klemke M., Wabnitz G.H. // Journal of Leukocyte Biology. 2003. № 73. P. 30-48.

10. Hume D.A., Weidemann M.J. Mitogenic Lymphocyte Transformation // Elsevier. 2000. № 202. P. 731-739.

References:

1. Friedl P., Brocker E.B. – Dev. Immunol. no. 7. (2000): 249-266.

2. Friedl P., Borgmann S., Bröcke E.-B. – Journal of Leukocyte Biology. no. 70. (2001): pp. 491-509.

3. Schwartz M.A., Shattil S.J. – Trends Biochem. Sci. no.25. (2000): pp. 388-391.

4. Ghia P., Chiorazzi N., Stamatopoulos K. – J. Intern. Med. V. 264. no 6. (2008): pp. 549-562.

5. Novikov D.K. Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology]. Minsk, 2005. 301 p.

6. Zolotnickaya R.P. Metody gematologicheskikh issledovaniy. Laboratornye metody issledovaniy v klinike [The Methods of Hematology Investigations. The Laboratory Methods in the Clinic]. Moscow, 2007. 148 p.

7. Faixl J., Rottner K. Current Opinion in Cell Biology. no. 18. (2006): pp. 18-25.

8. Gregorio C.C., Kubo R.T., Bankert R.B., Repasky E.A. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA. no. 89. (2002): pp.49-47.

9. Samstag Y., Sybille M.E., Klemke M., Wabnitz G.H. – Journal of Leukocyte Biology. no. 73. (2003): pp.30-48.

10. Hume D.A., Weidemann M.J. – Elsevier. no. 202. (2000): pp. 731-739.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шамрай Елена Александровна

студент

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015,
Россия

E-mail: elenashamray@yandex.ru

Кротова Екатерина Евгеньевна

студент

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015,
Россия

E-mail: elenashamray@yandex.ru

DATA ABOUT THE AUTHORS

Shamray Yelena Aleksandrovna

Student

Belgorod State National
Research University

85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: elenashamray@yandex.ru

Krotova Yekaterina Yevgenyevna

Student

Belgorod State National
Research University

85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: elenashamray@yandex.ru