

ВЛИЯНИЕ БЕТА-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Л.Р. Закирова¹, М.Ю. Скоркина¹, Н.И. Жернакова¹, Е.А. Шенцева¹, С.С. Беляева²

¹ФГАО ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Медицинский институт, кафедра биохимии;

²ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница им. Св. Иоасафа»,
гематологическое отделение

В выполненном исследовании изучено влияние бета-адренергических агонистов (адреналин) и антагонистов (обзидан) на структуру и упруго-эластические свойства лимфоцитов доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ). Методом атомно-силовой микроскопии доказано различие в структуре и свойствах клеточной поверхности лимфоцитов доноров и больных хроническим лимфолейкозом. Так, под влиянием адреналина установлена шероховатость мембраны лимфоцитов доноров, которая сопровождалась увеличением числа глобулярных выступов на 27,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В группе больных ХЛЛ рельеф поверхности был сглажен, число глобулярных структур снизилось на 79,2 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В выполненном исследовании доказаны однонаправленные изменения упруго-эластических свойств поверхности как в группе здоровых, так и больных ХЛЛ. Под действием обзидана увеличивается глубина погружения кантилевера и снижается модуль Юнга клеточной мембраны по сравнению с действием адреналина. Выявленные эффекты бета-адренергических агонистов и антагонистов на клеточном уровне имеют важное значение для понимания патогенеза функциональных состояний, сопровождающихся изменением микрореологических свойств крови.

Ключевые слова: адреналин, обзидан, лимфоциты, хронический лимфобластный лейкоз, атомно-силовая микроскопия, упруго-эластические свойства.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-1(69)-112-115

EFFECT OF BETA-ADRENERGIC AGONISTS AND ANTAGONISTS ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LYMPHOCYTES FROM HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA

L.R. Zakirova¹, M.Yu. Skorkina¹, N.I. Zhernakova¹, E.A. Shentseva¹, S.S. Belyaeva²

¹FSAEI HE «Belgorod State National Research University», Medical Institute, Department of Biochemistry;

²RSBHI «Belgorod Regional Clinical Hospital named after St. Joasaph», Department of Hematology

In the research the effect of beta-adrenergic agonists (adrenaline) and antagonists (obsidanum) on structure and resilient-elastic properties of lymphocytes from donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia (CLL) is studied. The method of atomic force microscopy is proved the difference in structure and properties of a cellular surface of lymphocytes of donors and patients with a chronic lymphatic leukemia. So, under the effect of adrenaline it is revealed the roughness of donor's lymphocyte membrane which was followed by increasing in number of globular protrusions of 27,7 % ($p < 0,05$) in comparison with reference group. In group of patients with CLL the surface was smoothed, the number of globular structures decreased of 79,2 % ($p < 0,05$) in comparison with reference group. In the performed research the unidirectional changes of resilient-elastic properties of a surface as in group of healthy donors, so as in patients with CLL are proved. Under the effect of obsidanum the depth of a cantilever immersion increases and Jung's module of a cellular membrane decreases in comparison with effect of adrenaline. The revealed effects of beta-adrenergic agonists and antagonists at the cellular level are important for understanding the pathogenesis of the functional states which are followed by change of micro rheological properties of blood.

Key words: adrenaline, obsidanum, lymphocytes, chronic lymphoblastic leukemia, atomic force microscopy, resilient-elastic properties.

Исследование структурных особенностей и клеток крови играет важную роль с точки зрения изучения динамики механических свойств поверхности при клеточной миграции [8], в процессе дифференцировки и пролиферации при метастазировании опухолевых популяций клеток [7].

К настоящему моменту известно, что образование агрегированных доменов и выпячиваний на поверхности мембраны сопровождается локальной концентрацией фосфорилированных белков цитоскелета – α -актина [3]. Согласно данным проведенных ранее исследований, установлена тесная связь между снижением модуля Юнга в клетках крови

больных лейкозом и организацией актиновых филаментов [5]. В связи с чем представляет интерес изучение рельефа и упруго-эластических свойств мембраны лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) под воздействием бета-адреноблокатора и адреналина. Активация адренергической системы угнетает функции лимфоцитов [4], однако изучение влияния бета-адренергических агонистов и антагонистов на свойства и структуру клеточной поверхности высоко специализированных клеток и клеток с нарушенным механизмом созревания и дифференцировки остается мало изученным.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить рельеф и упруго-эластические свойства мембраны лимфоцитов здоровых доноров и больных ХЛЛ под влиянием бета-адренергических агонистов (адреналин) и антагонистов (пропранолол гидрохлорид).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедры биохимии Медицинского института НИУ БелГУ. Изучены лимфоциты людей – здоровых доноров (200 обследованных) в возрасте от 25 до 45 лет и больных хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) (100 обследованных) в возрасте от 17 до 46 лет, находящихся на лечении в гематологическом отделении областной клинической больницы г. Белгорода.

С целью изучения рельефа и упруго-эластических свойств мембраны лимфоцитов использован метод функциональных нагрузок *in vitro*, включающий инкубацию клеточных суспензий с адреналином, обзиданом (пропранолол гидрохлорид).

Адреналиновую нагрузку осуществляли путем инкубации 30 мкл клеточной суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей 10^{-9} ммоль/л адреналина в течение 15 мин. Лимфоциты человека инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Пробу с обзиданом проводили путем инкубации 30 мкл суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей 10^{-9} ммоль/л обзидана 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 (конфигурация на базе инвертированного микроскопа Olympus IX -71) в режиме силовой спектроскопии во влажной камере [2]. Для работы с клетками использовали модифицированные АСМ-зонды в виде полусфер с радиусом закругления 5 мкм [1]. 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 1,1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. Строили кривые профиля участков поверхности размером 3,5×3,5 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 при нормальном распределении исследуемых признаков.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лимфоциты доноров. В результате выполненных экспериментов выявлены изменения в структуре рельефа поверхности лимфоцитов (рис. 1).

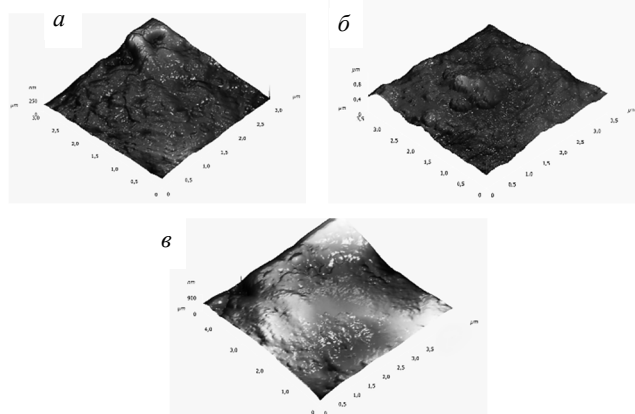


Рис. 1. Рельеф поверхности мембраны лимфоцитов доноров:

а – в условиях адреналиновой нагрузки; б – при обработке клеток обзиданом; в – в аутологичной плазме

Наблюдаемая на сканограммах шероховатость поверхности мембраны лимфоцитов, после обработки клеток адреналином, сопровождалась 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 (контроль; табл. 1).

Таблица 1

Рельеф и упруго-эластические свойства мембраны лимфоцитов доноров под влиянием адреналина и обзидана

Параметры структур и упруго-эластических свойств поверхности		Плазма (контроль)	Адреналин	Обзидан
Глобулярные выступы	высота, нм	41,3 ± 3,7	17,54 ± 0,53*	75,78 ± 8,80*^
	число	36,0 ± 0,9	46,0 ± 1,1*	35,0 ± 1,6^
Углубления в мембране	диаметр, нм	221,8 ± 24,0	63,79 ± 1,15*	110,12 ± 1,32*^
	глубина, нм	17,3 ± 0,6	5,64 ± 0,15*	13,65 ± 1,76^
	число	18,0 ± 1,1	10,0 ± 2,3*	17,0 ± 1,9^
Жесткость	модуль Юнга, μPa	3,5 ± 0,2	5,49 ± 0,37*	2,79 ± 0,29*^
	глубина погружения кантилевера, нм	345,20 ± 3,74	155,12 ± 23,48*	468,48 ± 15,46*^

Здесь и далее. *Статистически достоверные различия между значениями в пробах с адреналином и обзиданом по сравнению с плазмой по критерию Стьюдента при $p < 0,05$; ^статистически достоверные различия между значениями в пробах с обзиданом по сравнению с адреналиновой нагрузкой по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 2

Рельеф и упруго-эластические свойства мембраны лимфоцитов больных ХЛЛ под влиянием адреналина и обзидана

Параметры структур и упруго-эластических свойств поверхности		Плазма (контроль)	Адреналин	Обзидан
Глобулярные выступы	высота, нм	17,6 ± 0,9	72,85 ± 1,30*	15,72 ± 0,90^
	число	125,0 ± 1,1	26,0 ± 0,9*	24,0 ± 0,4*
Углубления в мембране	диаметр, нм	149,4 ± 12,9	9,29 ± 1,89*	0,88 ± 0,10*^
	глубина, нм	8,01 ± 0,90	35,54 ± 3,57*	14,88 ± 2,93*^
	число	40,0 ± 2,3	12,00 ± 1,36*	9,0 ± 0,2*^
Жесткость	модуль Юнга, μPa	1,80 ± 0,01	4,19 ± 0,31*	2,58 ± 0,41^
	глубина погружения кантилевера, нм	1035,20 ± 7,32	258,01 ± 31,07*	973,76 ± 16,45*^

В условиях адреналиновой нагрузки модуль Юнга лимфоцитов здоровых доноров увеличился на 57 % ($p < 0,05$), а глубина погружения кантилевера в мембрану уменьшилась на 45 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Под влиянием обзидана модуль Юнга снизился на 20 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, при этом глубина погружения кантилевера возросла на 73,7 % ($p < 0,05$).

Под влиянием блокатора β -адренорецепторов высота глобулярных образований возросла примерно в 4 раза, при этом их количество снизилось на 24 % ($p < 0,05$) по сравнению с адреналиновой нагрузкой (см. табл. 1). В пробах с обзиданом количество углублений в мембране увеличилось в 1,7 раза, при этом их диаметр и глубина возросли соответственно на 73 и 142 % ($p < 0,05$) по сравнению с адреналиновой нагрузкой. В условиях блокады β -адренорецепторов улучшились упруго-эластические свойства мембран, модуль Юнга снизился на 21 % ($p < 0,05$), глубина погружения кантилевера возросла на 202 % ($p < 0,05$) по сравнению с клетками, проинкубированными с адреналином.

Лимфоциты больных ХЛЛ. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХЛЛ под влиянием адреналина (рис. 2а) и обзидана (рис. 2б) был менее структурирован по сравнению с контролем (лимфоциты больных ХЛЛ в аутологичной плазме; рис. 2в).

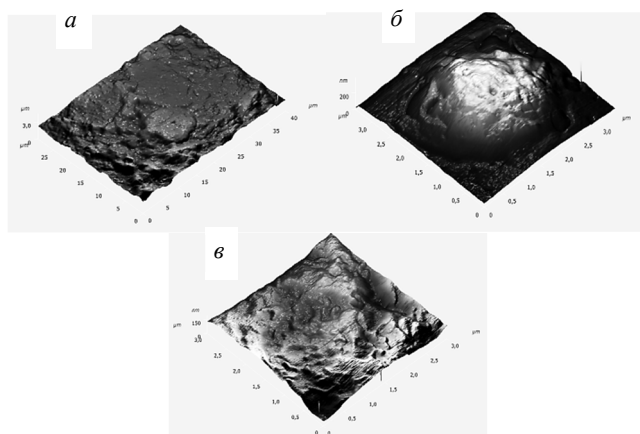


Рис. 2. Рельеф поверхности мембраны лимфоцитов больных ХЛЛ:

а – в условиях адреналиновой нагрузки; б – при обработке клеток обзиданом; в – в аутологичной плазме

В условиях адреналиновой нагрузки число глобулярных структур снизилось на 79,2 % ($p < 0,05$), а под влиянием обзидана – на 80,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Однако высота глобулярных образований на поверхности клетки под влиянием адреналина увеличилась в 4 раза, в то время как под влиянием обзидана их высота достоверно не отличалась от значений контроля (табл. 2).

Модуль Юнга лимфоцитов больных ХЛЛ под влиянием адреналина увеличился на 133 % ($p < 0,05$), в то же время при инкубации клеток с обзиданом достоверной разницы с контролем не выявлено. Глубина погружения кантилевера в мембрану под влиянием адреналина и обзидана снизилась соответственно на 75 и 6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В условиях блокады β -адренорецепторов высота глобулярных образований на мембране лимфоцитов больных ХЛЛ уменьшилась на 78 % ($p < 0,05$), при этом их число находилось в пределах недостоверных различий по сравнению с пробами после адреналиновой нагрузки. Под влиянием обзидана диаметр, глубина и число углублений в мембране уменьшились соответственно на 90,5, 58 и 25 % ($p < 0,05$) по сравнению с адреналиновой нагрузкой. В условиях блокады β -адренорецепторов упруго-эластические свойства мембран улучшились, глубина погружения кантилевера возросла в 3,7 раза, а модуль Юнга снизился на 61,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с адреналиновой нагрузкой.

Анализируя влияние агониста (адреналина) и антагониста (обзидана) бета-адренергических рецепторов на рельеф и упруго-эластические свойства мембран лимфоцитов видно, что поверхность клеток больных ХЛЛ более «мягкая» по сравнению с лимфоцитами доноров. В условиях адреналиновой нагрузки жесткость лимфоцитов больных ХЛЛ снижена на 23,7 % ($p < 0,05$), при этом глубина погружения кантилевера увеличена на 39,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с клетками доноров.

Под влиянием обзидана достоверных различий в значениях модуля Юнга между пробами крови доноров и больных лейкозом не выявлено, однако в группе больных глубина погружения кантилевера возросла на 107,8 % ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мембрана лимфоцитов здоровых доноров в условиях функциональной нагрузки включающей инкубацию клеточных суспензий с адреналином, обзиданом *in vitro* приобретала рифленость по сравнению с контролем (плазма). В то же время высота глобулярных образований увеличивалась в условиях блокады и уменьшалась в условиях стимуляции β -адренорецепторов лимфоцитов доноров по сравнению с контролем. Влияние агониста и антагониста β -адренорецепторов на структурно-функциональные свойства мембран лимфоцитов доноров различно.

Рельеф мембран лимфоцитов больных ХЛЛ в условиях функциональной нагрузки был менее структурирован по сравнению с рельефом мембран лимфоцитов в плазме. Число глобулярных выступов мембраны сократилось как в условиях блокады, так и в условиях стимуляции β -адренорецепторов лимфоцитов больных ХЛЛ по сравнению с контролем.

В выполненном исследовании доказаны однонаправленные изменения упруго-эластических свойств поверхности как в группе здоровых, так и больных ХЛЛ. Под действием антагониста бета-адренорецепторов (обзидана) увеличивается глубина погружения кантилевера и снижается модуль Юнга клеточной мембраны по сравнению с действием агониста бета-адренорецепторов (адреналина). Выявленные изменения в структуре и свойствах поверхности свидетельствуют о регуляторной роли элементов адренергической сигнальной системы в механизмах реорганизации белков цитоскелета посредством фосфорилирования актин связывающих доменов в подмембранном пространстве [9]. С физиологической точки зрения, выявленные изменения необходимо учитывать при проведении терапии ХЛЛ, так как клетки с повышенным модулем Юнга (более жесткие) могут нарушать микроциркуляцию в мелких сосудах и формировать очаги лейкостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РФ на изобретение № 2466401. Способ определения упругости клеток крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Е.А. Сладкова, Н.А. Забиняков. БелГУ, заявка № 2011109741, 15.03.2011.
2. Патент РФ на полезную модель № 98248. Влажная камера для исследования нативных клеток крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, С.Д. Чернявских. БелГУ, заявка № 2010105541, 16.25.2010.
3. Скоркина М.Ю. Морфология и упруго-эластические свойства поверхности эритроцитов лягушек // Научный результат. Серия: Физиология. – 2014. – Т. 1, № 1 (1). – С. 5–11.
4. Скоркина М.Ю., Беляева С.С., Ключкова Г.Н., Салих А.М.С. Влияние адреналина на структуру и механические свойства поверхности лимфоцитов человека // Научный результат. Серия: Физиология. – 2015. – Т. 1, № 1 (3). – С. 5–10.

5. Cai X., Xing X., Cai J., Chen Q., Wu S., Haung F. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study // PMID. – 2010. – Vol. 41 (3). – P. 257–262.
6. Capella B., Dieter G. Force-distance curves by atomic force microscopy // Surf. Sci. Rep. – 1999. – Vol. 34. – P. 1–104.
7. Debeir O., Adanaja I., Kiss R., Decaestecker C. // The motile system and health and disease // Transworld Research Netnork. – 2008. – P. 123–156.
8. Krause M., Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2014. – № 15. – P. 577–90. doi: 10.1038/nrm3861.
9. Loïc Dupré, Raïssa Houmadi, Catherine Tang, Javier Rey-Barroso. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors image // Front. Immunol. – 2015. – № 6. – P. 586.

REFERENCES

1. Patent RF na izobretenie № 2466401. Sposob opredeleniya uprugosti kletok krovi [The method of determining the elasticity of blood cells]. M.YU. Skorkina, M.Z. Fedorova, E.A. Sladkova, N.A. Zabinyakov. BelGU, zayavka № 2011109741, 15.03.2011.
2. Patent RF na poleznuyu model' № 98248. Vlazhnaya kamera dlya issledovaniya nativnyh kletok krovi [Wet chamber for the study of native blood cells]. M.YU. Skorkina, M.Z. Fedorova, S.D. Chernyavskih. BelGU, zayavka № 2010105541, 16.25.2010.
3. Skorkina M.YU. Morfologiya i upругo-elasticheskie svoystva poverhnosti eritrocitov lyagushek [Morphology and elastic properties of the surface of red blood cells of frogs]. *Nauchnyj rezul'tat. Seriya: Fiziologiya* [Scientific result. Series: Physiology], 2014, Vol. 1, no. 1 (1), pp. 5–11. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Skorkina M.YU., Belyaeva S.S., Klochkova G.N., Salih A.M.S. Vliyaniye adrenalina na strukturu i mekhanicheskie svoystva poverhnosti limfocitov cheloveka [Effect of adrenaline on the structure and mechanical properties of the surface of human lymphocytes]. *Nauchnyj rezul'tat. Seriya: Fiziologiya* [Scientific result. Series: Physiology], 2015, Vol. 1, no. 1 (3), pp. 5–10.
5. Cai X., Xing X., Cai J., Chen Q., Wu S., Haung F. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study. PMID, 2010, Vol. 41 (3), pp. 257–262.
6. Capella B., Dieter G. Force-distance curves by atomic force microscopy. Surf. Sci. Rep, 1999, Vol. 34, pp. 1–104.
7. Debeir O., Adanaja I., Kiss R., Decaestecker C. The motile system and health and disease. Transworld Research Netnork, 2008, pp. 123–156.
8. Krause M., Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 2014, no. 15, pp. 577–90. doi: 10.1038/nrm3861.
9. Loïc Dupré, Raïssa Houmadi, Catherine Tang, Javier Rey-Barroso. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors image. Front. Immunol, 2015, no. 6, pp. 586.

Контактная информация

Скоркина Марина Юрьевна – д. б. н., доцент, зав. кафедрой биохимии, Медицинский институт, Белгородский государственный национальный исследовательский университет; e-mail: skorkina@bsu.edu.ru