

ОСОБЕННОСТИ МИТОГЕННОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ¹

*Е.А. Сладкова**, *М.Ю. Скоркина**, *Е.А. Шамрай**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
(г. Белгород)

Проведено исследование влияния митогенов конканавалина А и фитогемагглютинина на морфологические и функциональные свойства лимфоцитов больных острым и хроническим лимфобластным лейкозом. Митогенную стимуляцию клеток осуществляли с целью создания модели интенсивной пролиферации опухолевых клеток. Впоследствии изучали особенности морфологической и функциональной организации образовавшихся популяций клеток, среди которых выделяли микроциты, нормоциты и бласты. Микроциты представляли собой субпопуляцию молодых лимфоцитов, образовавшихся в результате деления бластных форм, нормоцитами могли быть исходные клетки, не прошедшие процесса бласттрансформации, либо лимфоциты новой субпопуляции, представляющие собой выросшие микроциты. В режиме полуконтактного сканирования атомно-силового микроскопа изучали геометрические параметры и рельеф поверхности клеток крови, в контактном режиме – измеряли модуль Юнга, характеризующий упруго-эластические свойства клеточной поверхности, в режиме зонда Кельвина – измеряли потенциал поверхности лимфоцитов. Показаны существенные различия в морфологии нативных и стимулированных конканавалином А и фитогемагглютинином лимфобластов. В группе больных острым лимфобластным лейкозом наблюдалось образование крупных лимфобластов под влиянием конканавалина А, однако в пробах клеток, стимулированных фитогемагглютинином, установлено снижение площади поверхности лимфобластов на фоне увеличения объема. Изменения рельефа поверхности сопровождались увеличением инвагинаций на плазмалемме лимфобластов, стимулированных конканавалином А, и ростом глобул на поверхности клеток, стимулированных фитогемагглютинином. Установлено, что при разнонаправленном изменении потенциала поверхности под действием обоих митогенов для лимфобластов больных острым лейкозом характерно повышение жесткости клеточной мембраны, а для клеток больных хроническим лимфолейкозом – ее снижение.

Ключевые слова: митоген, атомно-силовая микроскопия, лимфоцит, пролиферация, лимфобластный лейкоз.

¹Работа выполнена при поддержке гранта на проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям социально-экономического развития Белгородской области (проект № 33-гр от 19.10.2016).

Ответственный за переписку: Сладкова Евгения Анатольевна, адрес: 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85; e-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Для цитирования: Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А. Особенности митогенного ответа лимфоцитов периферической крови больных лимфолейкозом // Журн. мед.-биол. исследований. 2018. Т. 6, № 2. С. 165–173. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.2.165

Опухолевые лимфоциты крови отличаются от нормальных по своей морфологии и функциональным параметрам. Изменения, происходящие в трансформированных клетках, сопряжены с повышением их локомоторной активности и метастатического потенциала [1], а также с потерей ими иммунологических свойств, что связывают с понижением способности таких клеток к бласттрансформации под действием фитогемагглютина (ФГА) и канавалина А (Кон А) [2]. Митогены способны вызывать в здоровых клетках трансформации, сходные с преобразованиями, происходящими при опухолевом перерождении [3]. Показано, что лейкозные клетки, независимо от типа гемобластоза, обладают сниженной восприимчивостью к действию митогенов по сравнению с лимфоцитами здоровых доноров [3], что объясняется меньшим количеством сайтов связывания для Кон А или ФГА на поверхности клеток.

Таким образом, несомненный интерес к исследованию лимфоцитов, стимулированных митогенами, обусловлен необходимостью создания модели, которая позволит изучать изменения морфофункциональных параметров клеток крови в условиях, приближенных к неопластическому процессу. Целью нашего исследования стало изучение особенностей митогенного ответа лимфоцитов периферической крови больных лимфолейкозом.

Материалы и методы. Проведено исследование воздействия митогенов Кон А и ФГА на структурную организацию и функциональные параметры лимфоцитов, выделенных из крови больных острым (ОЛЛ, 25 обследованных) и хроническим (ХЛЛ, 25 обследованных) лимфобластным лейкозом. Эксперимент проводился с соблюдением основных норм биомедицинской этики в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации. Вначале было получено информированное согласие пациентов на исследование.

Культивирование лимфоцитов с митогенами осуществляли по следующей схеме: для приготовления 1 пробы 1 мл свежевыделенной суспензии лейкоцитов соединяли с 5 мл пита-

тельной смеси и инкубировали в течение 48 ч при 37 °С в присутствии 5 %-го CO_2 . Питательная смесь содержала 3 мл среды RPMI-1640 с NEPEB-буфером («ПанЭко», Россия), 1 мл среды Хенкса 199 с глутамином и антибиотиками («ПанЭко», Россия), в 1 л которой были растворены 2,5 г канамицина сульфата, 5,0 г стрептомицина сульфата, $5 \cdot 10^6$ ед. бензилпенициллина натриевой соли, и 1 мл аутологичной плазмы. По окончании инкубации из каждой пробы отбирали 4,5 мл питательной среды, оставшуюся часть которой перемешивали с лейкоцитарной массой, находящейся на дне инкубационной пробирки. В первой серии эксперимента к культуральной среде добавляли 0,02 мл Кон А, во второй – 0,02 мл ФГА. Доза митогенов была выбрана согласно известным методикам [4]. В качестве контроля использовали лимфоциты, культивированные в среде без митогена.

Лимфоциты инкубировали с митогенами 48 ч, по истечении этого времени суспензия состояла из гетерогенной популяции клеток, которые различались по геометрическим параметрам. На основе значений диаметров лимфоциты были разделены на 3 группы: микроциты – до 5,0 мкм, нормоциты – 5,1–10,0 мкм, бласты – свыше 10,0 мкм. Микроциты представляли собой субпопуляцию молодых лимфоцитов, образовавшихся в результате деления бластных форм, трансформировавшихся из исходных клеток в результате активации митогенами. Нормоциты – исходные клетки, не прошедшие процесса бласттрансформации, либо лимфоциты новой субпопуляции, представляющие собой выросшие микроциты [5].

Геометрические параметры и микрорельеф поверхности лимфоцитов изучали в полуконтактном режиме на атомно-силовом микроскопе (АСМ) «Интегра Вита» фирмы NT-NDT (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа «Olympus IX-71»). Пробоподготовку для АСМ-исследования проводили следующим образом: суспензию лейкоцитов наносили на обезжиренное предметное стекло и помещали во влажную камеру (патент РФ № 98248). Сканирование 15 клеток каждой

субпопуляции лимфоцитов из пробы осуществляли согласно разработанному нами «Способу исследования нативных клеток» (патент РФ № 2398234). На полученных сканах измеряли геометрические параметры лимфоцитов и анализировали неоднородности их клеточной поверхности, используя при этом следующие программные продукты: для расчета высоты (h , мкм) и диаметра (d , мкм) клеток – «Nova» (NT-MDT, г. Зеленоград, Россия), для расчета площади (S , мкм²) и объема (V , мкм³) клеток – «Gwyddion» (Gwyddion.net). С целью оценки структурных неоднородностей клеточной поверхности строили кривые профиля бокового сечения. Проводили подсчет количества и измеряли линейные размеры углублений и глобулярных выступов на участке плазмалеммы площадью 3×3 мкм.

Упруго-эластические свойства лимфоцитов изучали в режиме силовой спектроскопии с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG 11, согласно «Способу определения упругости клеток крови» (патент РФ № 2466401).

Потенциал поверхности (ПП) в одиночных лимфоцитах измеряли в режиме зонда Кельвина на АСМ. Суспензию лейкоцитов для измерения ПП готовили согласно «Способу регистрации изменения поверхностного заряда эритроцитов» (патент № 2027188). Белые клетки крови отмывали изотоническим раствором хлорида натрия в течение 5 мин, затем их фиксировали 0,25 %-м раствором глутарового альдегида в течение 20 мин. По окончании указанного времени суспензию лейкоцитов дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия по 5 мин и готовили препараты на обезжиренной металлической подложке. Измерение ПП осуществляли с помощью кантилевера с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN («Nanoworld», США). Из каждой пробы сканировали по 15 клеток, обработку полученных сканов проводили в программе «Nova». На

сканах, отражающих распределение потенциала по поверхности лимфоцитов, с помощью инструмента «Point Instruments» определяли ПП в 10 участках каждой клетки, рассчитывали среднее значение для всех клеток пробы.

Миграционную активность лимфоцитов оценивали с помощью реакции торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ). Методику РТМЛ использовали в прямом капиллярном тесте с учетом жизнеспособности лимфоцитов не менее 95 % [6]. Вычисляли индекс торможения миграции лимфоцитов (ИТМЛ) митогеном в сравнении со спонтанной (без митогена) миграцией².

Статистический анализ данных выполняли с использованием критерия Стьюдента для 5 %-го уровня значимости.

Результаты. В группе больных ОЛЛ и ХЛЛ сравнительный анализ данных проводили между субпопуляциями бластных форм в условиях митогенной стимуляции и без нее (контроль). В субпопуляции лимфобластов больных ОЛЛ, стимулированных Кон А, площадь поверхности и объем клеток увеличились соответственно на 2 и 3 % ($p < 0,05$) по сравнению с нативными клетками (табл. 1, см. с. 168). Для лимфобластов из проб с ФГА было характерно снижение площади поверхности на 3 % ($p < 0,05$) и увеличение объема на 5 % ($p < 0,05$) по сравнению с клетками из контрольной группы.

ПП лимфоцитов больных ОЛЛ под влиянием Кон А увеличился на 98 % ($p < 0,05$), а под действием ФГА – уменьшился на 20 % ($p < 0,05$) по сравнению с клетками без воздействия (рис. 1а, см. с. 168). Под влиянием митогенов Кон А и ФГА жесткость лимфобластов больных ОЛЛ повысилась соответственно на 261 и 278 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Жесткость лимфобластов, стимулированных Кон А, возросла в зоне ядра и по краю цитоплазмы соответственно на 283 и 205 % ($p < 0,05$) по сравнению с нативными клетками. Жесткость бластов, стимулированных ФГА, увеличилась в области ядра на 288 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

²Новиков Д.К. Медицинская иммунология. Минск: Вышэйш. шк., 2005. 301 с.

Таблица 1

**ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ
ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ КОН А И ФГА**

Условие эксперимента	Площадь, мкм ²	Объем, мкм ³	Диаметр, мкм	Высота, мкм
<i>Острый лимфобластный лейкоз</i>				
ФГА	129,4±0,2	90,5±0,3*	12,7±1,2	0,6±0,1*
Кон А	137,4±0,2	89,1±0,3*	11,8±0,9	0,4±0,2*
Контроль (без митогена)	134,0±0,4	86,0±0,1	10,6±0,2	0,5±0,02
<i>Хронический лимфобластный лейкоз</i>				
ФГА	227,1±0,9*	99,0±0,2	11,5±0,5*	1,5±0,4
Кон А	355,9±1*	160,7±0,9*	16,6±0,8*	1,4±0,1*
Контроль (без митогена)	122,8±0,5	73,6±0,5	9,4±0,8	1,7±0,1

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольных значений по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

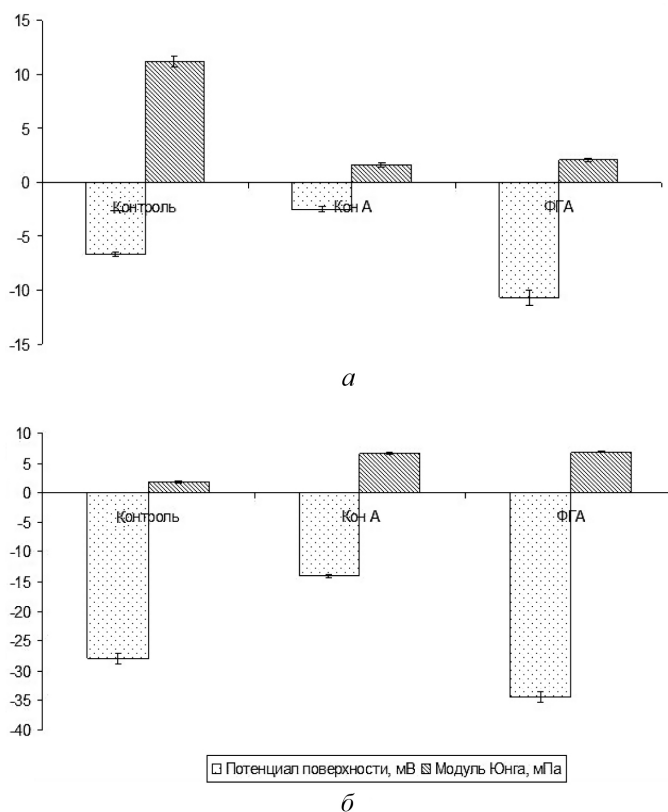


Рис. 1. Изменение свойств клеточной поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ (а) и ХЛЛ (б) под влиянием митогенов (различия значимы по t -критерию Стьюдента, $p < 0,05$)

Доля мигрировавших лимфоцитов больных ОЛЛ под влиянием как Кон А, так и ФГА снизилась соответственно на 75 и 39 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 2).

ПП лимфоцитов больных ХЛЛ под действием Кон А увеличился на 168 % ($p < 0,05$), а под действием ФГА – снизился на 39 % ($p < 0,05$) по сравнению с нативными клетками (рис. 1б).

Таблица 2

ПОКАЗАТЕЛИ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ КОН А И ФГА

Условие эксперимента	Количество лимфоцитов в 1 мкл культуральной смеси		Доля мигрировавших клеток, %	ИТМЛ, %
	до миграции	после миграции		
<i>Острый лимфобластный лейкоз</i>				
Кон А	7050,0±0,366	245,0±0,28*#	3,5±0,3#	86,2±2,9#
ФГА	7800,0±189,0	675,0±78,0*	8,7±0,8#	64,6±5,7#
Контроль (без митогена)	12000,0±756,0	1710,0±135,0	14,3±0,7	–
<i>Хронический лимфобластный лейкоз</i>				
Кон А	6200,0±0,552	257,0±0,44*	4,1±0,4#	65,0±2,9#
ФГА	5350,0±372,0	420,0±38,0*#	7,9±0,3#	37,9±7,3
Контроль (без митогена)	18667,0±2404,0	667,0±56,0	3,6±0,3	–

Примечания: * – статистически значимые отличия количества лимфоцитов до и после миграции; # – статистически значимые отличия параметров от контрольных значений.

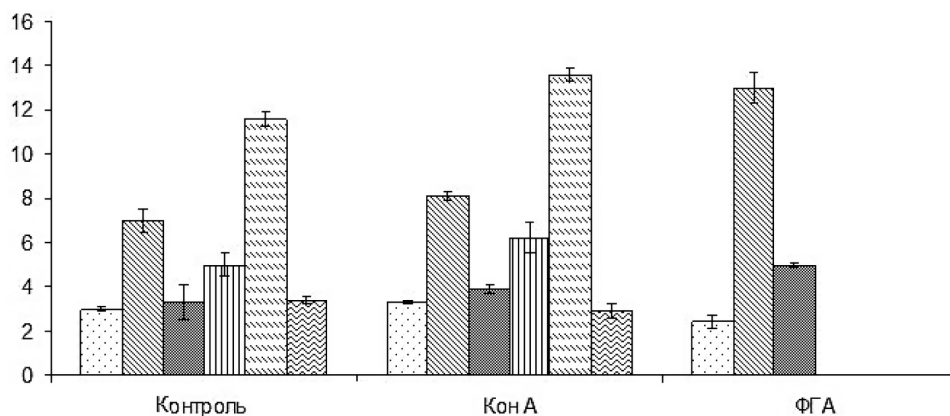
Поверхность лимфобластов больных ОЛЛ под влиянием митогенов приобрела шероховатость. В субпопуляции лимфобластов, стимулированных Кон А, установлено увеличение глубины инвагинаций плазмалеммы на 17 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 2а, см. с. 170). Высота и ширина глобулярных выступов на поверхности лимфобластов, стимулированных ФГА, возросли соответственно на 86 и 28 % ($p < 0,05$) по сравнению с нативными клетками. Статистически значимых различий в количестве морфологических образований на поверхности между экспериментальными группами не выявлено.

Под влиянием митогенов площадь поверхности и объем лимфобластов больных ХЛЛ существенно возросли по сравнению с контролем (см. табл. 1): в пробах с Кон А – на 190 и 118 % соответственно ($p < 0,05$), а с ФГА – на 29 и 35 % соответственно ($p < 0,05$).

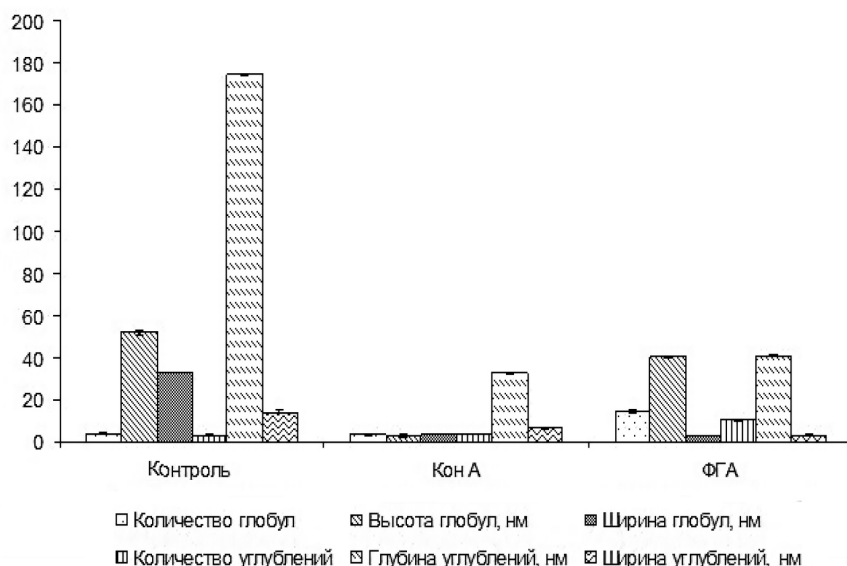
Под действием митогенов Кон А и ФГА жесткость лимфобластов больных ХЛЛ снизилась соответственно на 85 и 81 % ($p < 0,05$) по сравнению с клетками без воздействия. При этом в области ядра жесткость уменьшилась на 89 % ($p < 0,05$) у лимфобластов, стимулированных Кон А, и на 93 % – у лимфобластов из проб с ФГА ($p < 0,05$).

Под влиянием Кон А миграционная активность лимфоцитов больных ХЛЛ не изменилась, в пробах с ФГА доля мигрировавших лимфоцитов увеличилась на 120 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. табл. 2).

Рельеф поверхности бластов у больных ХЛЛ под влиянием митогенов был сглажен. В пробах с Кон А высота и ширина глобулярных выступов, а также глубина и ширина инвагинаций плазмалеммы бластов снизились соответственно на 95 и 90 % ($p < 0,05$), 81 и 54 % ($p < 0,05$) по сравнению с нативными клетками



a



b

Рис. 2. Изменение количественных показателей структурных образований на поверхности лимфоцитов крови больных ОЛЛ (*a*) и ХЛЛ (*b*) под влиянием митогенов (различия значимы по *t*-критерию Стьюдента, $p < 0,05$)

(рис. 2б). Высота и ширина глобул лимфобластов, стимулированных ФГА, снизились соответственно на 22 и 92 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, глубина и ширина инвагинаций мембраны лимфобластов уменьшились соответственно на 76 и 80 % ($p < 0,05$). Количество

глобул и инвагинаций на поверхности лимфобластов, стимулированных ФГА, увеличилось на 347 и 202 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Обсуждение. В данной работе проведен сравнительный анализ влияния Кон А и ФГА

на структурно-функциональные особенности лимфоцитов больных лейкозами. Несмотря на отсутствие различий в механизме действия Кон А и ФГА, нами установлено, что структурно-функциональные свойства лимфоцитов изменились неоднозначно.

Показаны существенные различия в организации нативных и митоген-стимулированных лимфобластов больных ОЛЛ. В пробах с Кон А наблюдалось появление крупных «жестких» лимфобластов с рифленой поверхностью, при этом в пробах ФГА-стимулированных клеток установлено снижение площади поверхности при увеличении объема. Известно влияние митогенного стимула на сшивку акто-миозиновых комплексов, в результате чего образуются клетки с более жесткой поверхностью [7]. ПП лимфоцитов больных ОЛЛ увеличился в пробах с Кон А и уменьшился в пробах с ФГА. Миграционная активность лимфобластов снижалась, причем в большей степени в пробах с Кон А.

В пробах больных ХЛЛ, как с Кон А, так и с ФГА, образовались крупные «мягкие» лимфобласты со сглаженным рельефом поверхности. Такое различие в организации мембраны лимфобластов больных ХЛЛ по сравнению с клетками других групп может указывать на принципиально иную организацию подмембранного комплекса. В частности, белок филамин участвует в образовании кортикального цитоскелета, который поддерживает механическую стабильность мембраны [8]. Данное

предположение согласуется с полученными нами данными об увеличении миграционной активности лимфобластов под влиянием митогенов. Так, филамин, взаимодействующий с ГТФазами сигнального пути активации лимфоцитов, может создавать ортогональную сеть актиновых филаментов, принимающих активное участие в формировании ламеллоподий на ведущем крае клетки [9]. Кроме того, локомоторный фенотип митоген-стимулированных лимфоцитов больных ХЛЛ мог сформироваться в результате активации Кон А и ФГА белков семейства PI3K, ведущей к повышению активности MAP-киназ [10]. MAP-киназы играют ведущую роль в полимеризации актина и подавляют транскрипцию гена E-кадгерина, что способствует разрушению межклеточных контактов и стимулирует миграцию клеток. ПП лимфоцитов больных ХЛЛ изменялся аналогично ПП клеток больных ОЛЛ – увеличивался в пробах с Кон А и снижался в пробах с ФГА.

Таким образом, на основе комплексного подхода с использованием современных методов атомно-силовой микроскопии получены новые данные о структуре и функциональных свойствах нормальных и трансформированных лимфоцитов. Установлены различия морфологии и рельефа поверхности лимфоцитов в условиях острого и хронического типов лимфобластной пролиферации. Показано, что реакция лимфоцитов на митогенную стимуляцию проявляется в образовании клеток с повышенным ПП и сниженной двигательной активностью.

Список литературы

1. Robertson M.J., Ritz J. Interleukin-12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment // *Oncologist*. 1996. Vol. 1, № 1-2. P. 88–97.
2. Brandt J.E., Srouf E.F., van Besien K., Hoffman R. Characterization of Human Hematopoietic Stem Cells // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990. Vol. 352. P. 29–36.
3. Ломакина М.Е. Изменения актинового цитоскелета и динамики клеточного края, определяющие характер клеточной миграции при трансформации фибробластов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 23 с.
4. Эшмен Р.Ф. Активация лимфоцитов // *Иммунология*. 1987. Т. 3. С. 414–469.
5. Веренинов А.А., Гусев Е.В., Казакова О.М., Клименко Е.М., Марахова И.И., Осипов В.В., Торопова Ф.В. Транспорт и распределение моновалентных катионов при бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных фитогемагглютинином // *Цитология*. 1991. Т. 33, № 11. С. 78–93.

6. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Титова Н.Д. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация. Витебск: ВГМУ, 2006. 198 с.
7. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / ed. by E.S. Jaffe. Lyon: IARC Press, 2001. 352 p.
8. Комалетдинова Ф.М., Пинаев Г.П. Роль филamina в проведении внутриклеточного сигнала // Цитология. 2006. Т. 48, № 11. С. 924–935.
9. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York, 2002. 78 p.
10. Fung M.M. IL-2 Activation of a PI3K-Dependent STAT3 Serine Phosphorylation Pathway in Primary Human T Cells // Cell. Signal. 2003. Vol. 15, № 6. P. 625–636.

References

1. Robertson M.J., Ritz J. Interleukin-12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment. *Oncologist*, 1996, vol. 1, no. 1&2, pp. 88–97.
2. Brandt J.E., Srour E.F., van Besien K., Hoffman R. Characterization of Human Hematopoietic Stem Cells. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1990, vol. 352, pp. 29–36.
3. Lomakina M.E. *Izmeneniya aktinovogo tsitoskeleta i dinamiki kletochnogo kraja, opredelyayushchie kharakter kletochnoy migratsii pri transformatsii fibroblastov* [Changes in the Actin Cytoskeleton and Cell Border Dynamics Determining the Nature of Cell Migration During Fibroblast Transformation]. Moscow, 2010. 23 p.
4. Eshmen R.F. Aktivatsiya limfotsitov [Lymphocyte Activation]. *Immunologiya*, 1987, vol. 3, pp. 414–469.
5. Vereninov A.A., Gusev E.V., Kazakova O.M., Klimenko E.M., Marakhova I.I., Osipov V.V., Toropova F.V. Transport i raspredelenie monovalentnykh kationov pri blasttransformatsii limfotsitov perifericheskoy krovi cheloveka, aktivirovannykh fitogemagglutininom [Transport and Distribution of Monovalent Cations During Blast Transformation of Human Peripheral Blood Lymphocytes Activated by Phytohaemagglutinin]. *Tsitologiya*, 1991, vol. 33, no. 11, pp. 78–93.
6. Novikov D.K., Novikov P.D., Titova N.D. *Immunokorreksiya, immunoproflaktika, immunoreabilitatsiya* [Immunocorrection, Immunoprophylaxis, Immunorehabilitation]. Vitebsk, 2006. 198 p.
7. Jaffe E.S. (ed.). *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, 2001. 352 p.
8. Komal'dinova F.M., Pinaev G.P. Rol' filamina v provedenii vnutrikletochnogo signala [The Role of Filamin in Intracellular Signalling]. *Tsitologiya*, 2006, vol. 48, no. 11, pp. 924–935.
9. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York, 2002. 78 p.
10. Fung M.M. IL-2 Activation of a PI3K-Dependent STAT3 Serine Phosphorylation Pathway in Primary Human T Cells. *Cell. Signal.*, 2003, vol. 15, no. 6, pp. 625–636.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.2.165

*Evgeniya A. Sladkova**, *Marina Yu. Skorkina**, *Elena A. Shamray**

*Belgorod National Research University
(Belgorod, Russian Federation)

MITOGENIC RESPONSE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA

This paper studied the effect of concanavalin A (ConA) and phytohaemagglutinin (PHA) on the morphological and functional properties of lymphocytes in patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Mitogenic stimulation of cells was carried out with the purpose of creating a model of intensive proliferation of tumour cells. After that we studied the

morphological and functional organization of the formed cell populations, which included microcytes, normocytes and blasts. Microcytes were a subpopulation of young lymphocytes formed as a result of the division of blast forms; normocytes were either the original cells not transformed into blasts or lymphocytes of a new subpopulation, namely grown microcytes. We used atomic force microscopy in the semi-contact scanning mode to study the geometric parameters and the surface relief of the blood cells. In the contact mode, Young's modulus was measured, characterizing the elastic properties of the cell surface. In the Kelvin probe mode, the potential of lymphocyte surface was measured. Significant differences in the morphology of native and ConA- and PHA-stimulated lymphoblasts are shown. In the group of ALL patients, we observed a formation of large lymphoblasts under the influence of stimulation with ConA. However, in PHA-stimulated cell samples, the lymphoblast surface area was reduced against the background of an increase in volume. Changes in the surface relief were accompanied by an increase in size of invaginations of the lymphoblast membrane stimulated with ConA and an increase in size of globules on the cell surface stimulated with PHA. It was found that at differently directed changes in the surface potential under the influence of both mitogens, lymphoblast membranes in patients with ALL had higher stiffness, while those in patients with CLL had lower stiffness.

Keywords: *mitogen, atomic force microscopy, lymphocyte, proliferation, lymphoblastic leukaemia.*

Поступила 15.03.2017
Received 15 March 2017

Corresponding author: Evgeniya Sladkova, address: ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015, Russian Federation; e-mail: sladkova@bsu.edu.ru

For citation: Sladkova E.A., Skorkina M.Yu., Shamray E.A. Mitogenic Response of Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Lymphocytic Leukaemia. *Journal of Medical and Biological Research*, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 165–173. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.2.165