

10. Adderley S.P., Dufaux E.A., Sridharan M., Bowles E.A., Hanson M.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S. 2009. Probst- and isoproterenol-induced increases in cAMP are regulated by different phosphodiesterases in erythrocytes of both rabbits and humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296. H1617-624.

УДК 576.54

*М.Ю. Скоркина, Т.С. Шевченко,
А.С. Зеленцова, А.С. Тараненко*

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ АТФ НА СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ
ПОВЕРХНОСТИ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ
ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

Аннотация. Под влиянием экзогенной АТФ жесткость и заряд поверхности гранулоцитов снизились соответственно на 71,4% ($p<0,05$) и 43% ($p<0,05$), сила адгезии между эритроцитом и лейкоцитом и процент мигрировавших гранулоцитов увеличились по сравнению с контролем. Полученные экспериментальные данные имеют значение в изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле при развитии лейкоза.

Ключевые слова: гранулоциты, модуль Юнга, потенциал поверхности, адгезивные свойства биомембран.

*M.Yu. Skorkina, T.S. Shevchenko,
A.S. Zelentsova, A.S. Taranenko*

**EFFECT EXOGENOUS ATP THE PROPERTIES OF THE CELL
SURFACE OF GRANULOCYTES IN THE PATIENTS WITH
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA**

Abstract. Under influence of exogenous ATP, the stiffness and charge of the granulocytes surface were reduced according to the 74.4 % ($p<0.05$) and 43% ($p<0.05$), the adhesion force between erythrocyte and granulocyte and percentage of the migration granulocytes were increased compared with control.

© Скоркина М.Ю., Шевченко Т.С., Зеленцова А.С., Тараненко А.С., 2021

cytes was increased as compared to the control. Obtained data are important in studying the mechanisms of intercellular interaction in the microvasculature during the development of leukaemia.

Keywords: granulocytes, Young' module, the surface potential, adhesive properties of biomembrane.

Введение

В микроциркуляторном русле гранулоциты функционируют в условиях механического «стресса» – силового воздействия со стороны смещающихся слоев движущейся плазмы. Известно, что в ответ на механический «стресс», эритроцитами и клетками эндотелия, в межклеточное пространство экскретируются молекулы АТФ, которые выступают ключевыми участниками межклеточных взаимодействий и регуляторами иммунной активности лейкоцитов, посредством активации пуринергических рецепторов, локализованных на мембранах клеток [1]. Установлено, что пуринергические рецепторы семейства P2X, открытие которых запускает молекула АТФ, участвуют в высвобождении провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 β [2]. Подтипы рецепторов P2X семейства, в частности P2X7, играют существенную роль в организации воспаления и функционировании раковых клеток [3]. В этой связи, актуальным является изучение свойств мембран гранулоцитов при развитии острых лейкозов, которые характеризуются циркуляцией в русле лейкоэмических клонов клеток с измененными свойствами клеточных мембран [4].

Целью работы явилось – изучить свойства (механические, адгезивные и электрические) гранулоцитов больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) при стимуляции элементов пуринергических сигнальных путей на модели экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*.

Методика

В эксперимент отбирали кровь больных ОЛЛ (n=20) в возрасте от 25 до 45 лет (11 женщин, 9 мужчин), поступивших на лечение в гематологическое отделение областной клинической больницы г. Белгорода. Постановку диагноза и взятие крови осуществляли при непосредственном участии врачей клиници-

стов. Больным был поведен стандартный курс химиотерапии, бластные формы в периферической крови отсутствовали. При проведении работы были соблюдены требования Хельсинской декларации, получено предварительное информированное согласие участников экспериментов соответствии с рекомендациям [136]. Образцы крови собирали в вакуумные пробирки Vacuette K3E (Greiner Bio-One, Австрия), с сухим напылением ЭДТА К₃ в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови. Суспензию гранулоцитов получали путем центрифугирования цельной крови при 1500 об./мин в течение 15 мин. Клетки отбирали и ресуспендировали в культуральной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия). Каждую пробу делили на две части – контрольную и опытную. В опытных пробах моделировали экзогенную нагрузку с АТФ *in vitro*, добавляя 100,0 μ M аденозин-5-трифосфат динатриевая соль тригидрат (АТФ- $\text{Na}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma) к суспензии гранулоцитов. Инкубацию с препаратом проводили в течение 15 мин при 37⁰C. Контрольные пробы включали лейкоцитарную суспензию в среде RPMI 1640 без добавления препарата. Инкубацию всех проб проводили в течение 15 мин. при 37⁰C.

Свойства гранулоцитов изучали с использованием метода атомно-силовой микроскопии. Упруго-эластические свойства плазмалеммы гранулоцитов оценивали по числовым данным модуля Юнга. Электрические свойства мембраны гранулоцитов оценивали, выполняя измерения потенциала поверхности (ПП) в режиме зонда Кельвина. Измерение сил межклеточной адгезии выполнено на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Конструировали биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (USA) согласно способу, изложенному в работе [5]. Миграционную активность гранулоцитов изучали в прямом капиллярном тесте. Предварительно проводили оценку жизнеспособности клеток, используя счетчик и анализатор жизнеспособности клеток Countress II Automated Cell Counter (Thermo, Life Technologies, USA, 2019). Для теста использовали пробы с учетом жизнеспособности клеток не менее 95%.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с

использованием t критерия Стьюдента при $p < 0,05$ в случае нормального распределения признака и U-критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$ для непараметрических данных. В работе приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

Результаты и обсуждение

В условиях экзогенной нагрузки с АТФ жесткость гранулоцитов снизилась на 71,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица).

Таблица
Функциональные свойства гранулоцитов больных острым лимфобластным лейкозом

Параметр	Контроль (n = 400)	Опыт (n = 400)
Модуль Юнга гранулоцитов, мПа	$2,441 \pm 0,056$	$0,699 \pm 0,015^*$
Сила адгезии «эритроцит-гранулоцит», нН	$52,8 \pm 1,3$	$184,5 \pm 9,8^{**}$
Потенциал поверхности лейкоцитов, мВ	$-21,49 \pm 1,19$	$-37,74 \pm 1,14^*$
% мигрировавших гранулоцитов	$8,9 \pm 0,5$	$37,3 \pm 1,2^*$

Примечание: n – число просканированных клеток, * статистически значимые различия между показателями по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$); **статистически значимые различия между показателями по U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом в опытной группе возросла в 3,5 раза, при этом заряд клеточной поверхности стал более отрицательным и снизился на 43% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Существенное изменение биофизических свойств плазмалеммы отразилось на их миграционной активности. Согласно данным таблицы процент мигрировавших гранулоцитов в условиях экзогенной нагрузки с АТФ увеличился на 76,14 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым внеклеточная молекула АТФ является мощным хемотаксическим стимулом для гранулоцитов, запускает изменение свойств плазмалеммы, что в конечном итоге отражается на реа-

лизации воспалительных реакций в организме. Учитывая, что микрореологические свойства клетки контролируются цитоскелетом, установленное в эксперименте снижение жесткости клеточной поверхности гранулоцитов в условиях экзогенной нагрузки с АТФ у больных ОЛЛ, указывает на реализацию сигнального каскада с участием ионов Ca^{2+} . Согласно данным литературы, активация пуринергических рецепторов способствует разборке полимеризованного актина [6] и снижению концентрации актин сшивающих белков [7]. Имеются данные о том, что внеклеточная АТФ регулирует функцию селектина и миграцию нейтрофилов посредством P2X7 рецептора [8]. В литературе представлены данные об усилении хемотаксиса нейтрофилов под влиянием внеклеточной АТФ посредством активации, опосредованной P2Y2 рецептором, передающим сигнал на mTOR сигнальный путь на переднем крае клетки [9]. Отмечается, что нейтрофильные эктонуклеотидазы гидролизуют АТФ до аденозина, который, через рецепторы A3, также способствует миграции клеток. Хемотаксис нейтрофилов требует возбуждающих сигналов на лидирующем крае клетки и ингибирующих сигналов в задней части. Рецепторы P2Y2, а также A3-рецепторы, вносят вклад в возбуждающие сигналы спереди, в то время как аденозин, воздействуя на A2A-рецепторы, вносит вклад в ингибирующий сигнал в задней части клетки [10]. С точки зрения микроциркуляции снижение жесткости поверхности гранулоцитов будет способствовать усилению миграционной активности клетки, так как им легче деформироваться в мелких сосудах.

Таким образом, при стимуляции пуринергического сигнального пути (*in vitro*), в смоделированном нагрузочном тесте с экзогенной АТФ у больных ОЛЛ, установлено снижение жесткости и потенциала поверхности плазмалеммы, усиление адгезивных свойств и миграционной активности гранулоцитов. Выявленные эффекты указывают на ведущую роль молекулы АТФ в механизмах сигнальной трансдукции между клетками крови в микроциркуляторном русле. Установленное в исследовании увеличение адгезивных свойств клеточной поверхности гранулоцитов, параллельно с усилением их миграционной активности под влиянием молекулы АТФ, могут способствовать развитию воспаления в сосудистой стенке.

Библиографический список

1. Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocyte // *Endocrinol. Metab. Trends.* – 2007. – Vol. 18. P. 350-355.
2. North R.A. P2X receptors // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2016. – Vol. 37, No. 1700. P. pii 20150427.
3. Di Virgilio F., Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth // *Oncogene.* – 2017. – Vol. 36. P. 293-303.
Lam A.W., Rosenbluth M.J., Fletcher D.A. // *Blood.* 2007. V. 109, No. 8. P. 3505–3508.
5. Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2017. № 4. С. 213–215.
6. Goldman N., Chandler-Militello D., Langevin H., Nedergaard M., Takano T. Purine receptor mediated actin cytoskeleton remodeling of human fibroblasts // *Cell Calcium.* – 2013. – Vol. 53, No. 4. P. 297-301.
7. Yap B., Kamm R.D. Cytoskeletal remodeling and cellular activation during reformation of neutrophils into narrow channels // *J Appl Physiol.* – 2005. – Vol. 99. P. 2323-2330.
8. Ley K., Laudanna C., Cynulsky M.I., Noursharg S., Getting to the site of inflammation the leukocyte adhesion cascade updated // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – Vol. 7. P. 678-689.
9. Bao Y., Ledderose C., Graf A.F., Brix B., Birbak T., Lee A. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis // *J Cell Biol.* – 2015. – Vol. 210. P. 1153-1164.
10. Bao Y., Ledderose C., Seier T., Graft A.F., Brix. B., Chang E., Junger W.C. Mitochondria regulate neutrophil activation by generating ATP for autocrine purinergic signaling // *The J. of Biological chemistry.* – 2014. – Vol. 289, No. 39. P. 26794–26803.