

УДК 612.112 /576.54/57.053.4

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41

М. Ю. СКОРКИНА, Т. С. ШЕВЧЕНКО, Н. И. ЖЕРНАКОВА

Микромеханические свойства и функциональная активность гранулоцитов при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования Российской Федерации, г. Белгород, Россия
Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85
E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Статья поступила в редакцию 02.12.20; принята к печати 22.01.21

Резюме

Микромеханические свойства лейкоцитов вносят определенный вклад в скорость кровотока в микроциркуляторном русле, при этом сами изменяются под действием сложной сети пуринергических сигналов. Цель работы – изучить микромеханические свойства и функциональную активность гранулоцитов в норме и у больных острым лимфобластным лейкозом при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ в опытах *in vitro*. *Материалы и методы.* Выделяли лейкоциты из крови больных острым лимфобластным лейкозом и здоровых людей. Каждую пробу делили на опытную и контрольную. В опытных пробах моделировали нагрузку с АТФ *in vitro*, лейкоциты контрольных проб инкубировали в культуральной среде без добавления АТФ. Модуль Юнга и силу адгезии измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. Потенциал поверхности клеток измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме моды Кельвина. Для оценки функциональной активности гранулоцитов использовали гипоосмотические тесты *in vitro* и определение миграционной активности. *Результаты.* В тестах с экзогенной АТФ, как в пробах здоровых людей, так и больных острым лимфобластным лейкозом, установлено снижение жесткости и потенциала поверхности плазмалеммы, усиление адгезивных свойств лейкоцитов и миграционной активности. При этом ответы гранулоцитов на осмотическую нагрузку различались: так, в группе здоровых людей нагрузка с АТФ вызывала сжатие клетки и снижение использования мембранного резерва клеткой в гипотонической среде, а у пациентов больных ОЛЛ – увеличение объема и более интенсивное использование мембранного резерва в регуляции объема. *Заключение.* 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, может способствовать развитию воспаления в сосудистой стенке.

Ключевые слова: гранулоциты, модуль Юнга, адгезия, потенциал поверхности, мембранный потенциал, мембранный резерв, миграция

Для цитирования: Скоркина М. Ю., Шевченко Т. С., Жернакова Н. И. Микромеханические свойства и функциональная активность гранулоцитов при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):34–41. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41.

UDC 612.112 /576.54/57.053.4

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41

M. Yu. SKORKINA, T. S. SHEVCHENKO, N. I. ZHERNAKOVA

Micromechanical properties and functional activity of granulocytes when simulating exogenous loading with ATP *in vitro*

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia
Russia, Belgorod, Pobedy str., 85
E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Received 02.12.20; accepted 22.01.21

Summary

The micromechanical properties of leukocytes make a certain contribution to the blood flow velocity in the microcirculatory bed, while the micromechanical properties themselves change under the influence of a complex network of purinergic signals. The aim of the work was to study the micromechanical properties and functional activity of granulocytes in normal conditions and in patients with acute lymphoblastic leukemia when simulating exogenous loading with ATP *in vitro*. *Materials and methods.* Leukocytes were isolated from the blood of patients with acute lymphoblastic leukemia and healthy people. Each sample was divided into a test sample and a control sample. In the test samples, the loading with ATP *in vitro* was simulated. Leukocytes of the control samples were incubated in the culture medium without the addition of ATP. Young's modulus and adhesion force were measured using an atomic force microscope in the force spectroscopy mode. The cell surface potential was measured in an atomic force microscope in the Kelvin mode. To assess the functional activity of granulocytes, hypoosmotic tests *in vitro* and determination of migration activity were used. *Results.* In tests with exogenous ATP, both in samples from healthy people and from patients with acute lymphoblastic leukemia, a decrease in the rigidity and potential of the plasma membrane surface, an increase in the adhesive

properties of leukocytes and migration activity were found. At the same time, the responses of granulocytes to the osmotic loading were different: for example, in the group of healthy people, the loading with ATP caused cell contraction and a decrease in the use of the membrane reserve by the cell in a hypotonic environment, and in patients with acute lymphoblastic leukemia, it caused an increase in the volume and more intensive use of the membrane reserve in volume regulation. *Conclusion.* The revealed effects indicate the leading role of the ATP molecule in the signal transduction mechanisms between blood cells in the microvasculature. The increase in the adhesive properties of the cell surface of granulocytes revealed in the study, in parallel with the increase in their migration activity under the influence of the ATP molecule, can contribute to the development of inflammation in the vessel wall.

Keywords: *granulocytes, Young's modulus, adhesion, surface potential, membrane potential, membrane reserve, migration*

For citation: *Skorkina M. Yu., Shevchenko T. S., Zhernakova N. I. Micromechanical properties and functional activity of granulocytes when simulating exogenous loading with ATP in vitro. Regional blood circulation and microcirculation. 2021;20(1):34–41. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41.*

Введение

В микроциркуляторном русле гранулоциты являются непосредственными участниками межклеточных взаимодействий. Физиологическая активность гранулоцитов в большинстве случаев зависит от свойств плазмалеммы и компетентности их рецепторного аппарата, который реагирует на сложную сигнальную сеть, включающую комбинированное воздействие пуринаргических сигналов [1]. Микромеханические свойства лейкоцитов вносят определенный вклад в скорость кровотока в микроциркуляторном русле, при этом изменяются под влиянием регуляторных ауто- и паракринных сигналов [2]. Доказано, что увеличение в перфузате скорости потока является существенным механическим стимулом для высвобождения АТФ из эритроцитов во время ишемии [3], механического стресса, воздействия β -адренергических агонистов, аналогов простаглиннов, при ацидозе или набухании клетки [4]. В этой связи одной из фундаментальных задач является изучение функциональных свойств плазмалеммы гранулоцитов в условиях активации элементов внутриклеточных и внеклеточных пуринаргических сигнальных путей в норме и при развитии злокачественных процессов в системе крови, поскольку молекулы АТФ выступают ключевыми мессенджерами в межклеточной коммуникации между опухолевыми и здоровыми клетками. Известно, что рост злокачественных опухолей сопровождается выраженной воспалительной реакцией, формированием диффузных некротических очагов в результате накопления АТФ во внеклеточной среде [5].

Цель работы – изучить микромеханические свойства (жесткость, адгезию, потенциал поверхности) и функциональную активность гранулоцитов (миграционную активность и осморегуляторные реакции) в норме и у больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ в опытах *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнена на венозной крови пациентов больных ОЛЛ, проходивших обследование и лечение в гематологическом отделении Белгородской областной клинической больницы им. Святителя Иоасафа. Было сформировано две группы проб: в первую отбирали кровь больных ОЛЛ ($n=10$) на стадии первичной постановки диагноза до лечения. Возраст пациентов – 20–46 лет, в периферической крови присутствовали бластные формы лимфоидного ростка кроветворения $86,3 \pm 0,8$ %. Вторая группа проб – кровь здоровых пациентов ($n=30$) в возрасте 20–45 лет, проходивших диспансеризацию.

Кровь получали методом венепункции при непосредственном участии специализированного медперсонала больницы. Образцы крови собирали в вакуумные пробирки Vacuette К3Е (*Greiner Bio-One*, Австрия), с сухим напылением ЭДТА K_3 в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови.

Цельную кровь центрифугировали при 1500 об./мин в течение 15 мин, отбирали кольцо лейкоцитов и ресуспендировали клетки в культуральной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия). Каждую пробу лейкоцитарной суспензии делили на две части – контрольную и опытную (10^6 кл/мл).

В опытных пробах крови пациентов больных ОЛЛ моделировали нагрузку с АТФ *in vitro*, добавляя к клеточной суспензии 100,0 μ M аденозин-5-трифосфата динатриевую соль тригидрата (АТФ- $Na_2 \cdot x3H_2O$) (*Sigma*, США) к клеточной суспензии, в группе здоровых людей – 10,0 μ M аденозин-5-трифосфата динатриевую соль тригидрата (АТФ- $Na_2 \cdot x3H_2O$) (*Sigma*, США). Выбор концентраций АТФ основан на данных литературы [6], согласно которым, при развитии опухолей концентрация АТФ во внеклеточной среде находится в микромолярном диапазоне, тогда как в здоровых тканях не превышает субмикромолярные количества.

Контрольные пробы, в группах как пациентов, больных ОЛЛ, так и здоровых, включали в себя лейкоцитарную суспензию в среде RPMI 1640 без добавления препарата. Инкубацию всех проб проводили в течение 15 мин при 37 °С.

При изучении функциональных свойств плазмалеммы использовали метод атомно-силовой микроскопии. Модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности, рассчитывали исходя из силовых кривых подвода и отвода. Силовые кривые получали на атомно-силовом микроскопе (АСМ) «ИНТЕГРА ВИТА» (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71) в режиме силовой спектроскопии. Для сканирования конструировали модифицированные АСМ-зонды, приготовленные на основе типлесса и полимерных микросфер (с радиусом закругления 5 мкм). Силу взаимодействия между биосенсорным чипом и клеточной поверхностью рассчитывали согласно алгоритму, изложенному в работе [7]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток.

Потенциал клеточной поверхности измеряли на АСМ в режиме зонда Кельвина. Лейкоцитарную суспензию отмывали изотоническим раствором хлорида натрия («ПанЭко», Россия) в течение 5 мин, затем фиксировали 0,25 %-м раствором глутарового альдегида (*MERCK*, Германия) в течение 20 мин, дважды отмывали изотоническим раствором хлорида

Функциональные свойства гранулоцитов под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*

Table 1

Functional properties of granulocytes under of the influence of exogenous loading with ATP *in vitro*

Измеряемый показатель	Группа больных ОЛЛ		Группа сравнения, здоровые люди	
	контроль (интактные пробы)	опыт (нагрузка с АТФ)	контроль (интактные пробы)	опыт (нагрузка с АТФ)
Модуль Юнга, μPa	1,846 \pm 0,024	0,246 \pm 0,001*	4,549 \pm 0,042	2,971 \pm 0,031*
Потенциал поверхности, mV	-15,60 \pm 0,68	-26,43 \pm 1,10*	-30,98 \pm 2,58	-45,87 \pm 1,44*
Сила межклеточной адгезии, nN	48,8 \pm 2,1	99,5 \pm 4,2**	30,7 \pm 0,5	54,2 \pm 0,7**
Миграционная активность гранулоцитов, %	25,12 \pm 0,9	33,3 \pm 4,2*	10,4 \pm 0,2	41,3 \pm 0,8*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями контрольной и опытной проб по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия между показателями по U-критерию Манна – Уитни ($p < 0,05$).

натрия по 5 мин и готовили препараты на обезжиренной металлической подложке. Сканирование выполняли кантилеверами с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (*Nanoworld*, США). Из каждой пробы сканировали по 20 гранулоцитов. Полученные сканы обрабатывали с помощью инструмента «Point Instruments» в программе «Nova» (*NT-MDT*, Россия), измеряя потенциал в 10 участках поверхности каждой клетки.

Силу межклеточной адгезии измеряли на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Во время сканирования конструировали биосенсорный чип на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (США) согласно способу, изложенному в работе [8]. Силу межклеточной адгезии измеряли между эритроцитом и гранулоцитом, регистрируя силовые кривые с поверхности 20 клеток. Полученные силовые кривые обрабатывали с использованием программного обеспечения «Nova» (*NT-MDT*, Россия).

Для оценки функциональной активности гранулоцитов использовали гипоосмотические тесты *in vitro* и определение миграционной активности. При выполнении гипоосмотической нагрузки суспензию лейкоцитов, как в опытных, так и в контрольных группах, делили на 2 части (по 0,5 мл). К первой части добавляли 0,5 мл аутологичной плазмы, ко второй – 0,5 мл гипотонического раствора хлорида натрия (0,45 %). В стерильные чашки Петри со стеклянным дном (*Eppendorf*, Германия) вносили 0,1 мл клеточной суспензии из соответствующей опытной и контрольной пробы. Полученные суспензионные препараты микроскопировали, регистрируя изображения нативной суспензии лейкоцитов, с интервалом каждые 30 с на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Nikon (*ТокуоБуоке*, Япония, 2011). Длительность гипоосмотической нагрузки составила 5 мин. На полученных изображениях измеряли диаметр 50 клеток из каждой пробы, используя программное обеспечение Nis-Elements Documentation (ver. 2.32 ТокуоБуоке, Япония). На основе промеров диаметров рассчитывали объем клетки и мембранный резерв, заложенный в складчатости плазмалеммы и используемый клетками в регуляции объема клеток при гипоосмотической нагрузке, согласно формуле:

$$MP = \frac{S_{\Gamma} - S_{\Pi}}{V_{\Pi}},$$

где MP – мембранный резерв клетки, мкм^{-1} ; S_{Γ} – площадь поверхности клетки в гипотонической среде, мкм^2 ; S_{Π} – площадь поверхности клетки в аутологичной плазме, мкм^2 ; V_{Π} – объем клетки в аутологичной плазме, мкм^3 .

Для оценки миграционной активности лейкоцитов в работе применен прямой капиллярный тест под агарозой. С предварительной оценкой жизнеспособности клеток не менее 95 %. Жизнеспособность клеток определяли с помощью счетчика и анализатора жизнеспособности клеток Countress II Automated Cell Counter (*Thermo, Life Technologies*, США, 2019 г.), добавляя к 1 мкл клеточной суспензии 5 мкл 0,4 %-го раствора трипанового синего (*Invitrogen*, США). Подсчет мигрировавших клеток в 1 мкл среды проводили в 25 больших квадратах сетки счетной камеры Горяева под большим увеличением (окуляр $\times 20$, объектив $\times 40$).

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами в случае нормального распределения признака определяли с использованием t-критерия Стьюдента при $p < 0,05$, для непараметрических данных применяли U-критерий Манна – Уитни при $p < 0,05$. Данные представляли в виде средних значений (M) и их средних статистических ошибок (m).

Результаты исследования и их обсуждение

В группе пациентов больных ОЛЛ под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ установлено снижение модуля Юнга и потенциала поверхности соответственно на 86,7 и 40,9 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными пробами (табл. 1).

Под влиянием АТФ в группе больных ОЛЛ увеличилась сила адгезии в системе «эритроцит – гранулоцит» и миграционная активность гранулоцитов соответственно на 50,9 и 24,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными пробами.

В группе сравнения у здоровых доноров наблюдали аналогичные реакции гранулоцитов на экзогенную

Объем гранулоцитов и мембранный резерв, задействованный ими в тестах с гипосмотической нагрузкой *in vitro* (в группе пациентов больных ОЛЛ)

Table 2

Granulocytes volume and membrane reserve used in tests with hypoosmotic loading *in vitro* (in the group of patients with ALL)

Время инкубации, с	Контроль		Нагрузка с АТФ	
	$V_{\text{гипо}}$, мкм ³	MR, %	$V_{\text{гипо}}$, мкм ³	MR, %
0	547,2±30,8	25,7±2,0	563,0±40,1	30,2±1,2
30	524,1±29,0	17,3±3,6*	578,1±30,8	36,4±8,9
60	524,4±30,4	23,3±1,4	631,2±43,9	50,2±1,7*
90	491,3±18,6	12,8±2,05*	627,2±30,4	59,5±2,2*
120	488,9±15,5	19,1±3,9	647,8±41,9	51,8±1,2*
150	487,2±25,8	21,6±1,2	675,4±50,0	51,8±1,2*
180	485,1±23,5	17,2±3,9*	705,4±50,0*	33,2±7,3
210	563,6±32,6	28,2±0,4	769,7±44,7*	65,9±1,2*
240	609,2±31,7	45,9±1,5*	679,8±54,9	51,8±1,4*
270	527,9±30,3	33,4±5,9*	766,5±31,2*	57,9±1,5*
300	523,5±35,5	22,7±1,0	735,5±47,7*	71,5±1,9*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями в начале инкубации (0 с) и последующими временными интервалами по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$); $V_{\text{гипо}}$ – объем клетки в гипотонической среде; MR – мембранный резерв клетки.

нагрузку с АТФ. Так, согласно данным табл. 1, в опытных пробах модуль Юнга снижен на 53,2 %, при этом миграционная активность клеток увеличилась на 74,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Заряд клеточной поверхности стал более отрицательным – потенциал поверхности снижен на 32,5 % ($p < 0,05$), а сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом увеличилась на 43,3 % по сравнению с контролем.

В группе больных ОЛЛ под влиянием нагрузки с АТФ установлено более интенсивное использование мембранного резерва в осморегуляторных реакциях (табл. 2).

Согласно данным табл. 2, под влиянием АТФ объем гранулоцитов в гипотонической среде увеличивался в течение 210 с инкубации, затем наблюдали 30-секундную фазу уменьшения объема с 201-й по 240-ю с и далее до конца инкубации (к 300-й с) объем клетки вновь возрастал на 23,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации (0 с). На 60-й с инкубации отмечали достоверное увеличение величины мембранного резерва на 39,8 % ($p < 0,05$), задействованного гранулоцитами в регуляции их объема, по сравнению с началом инкубации. На 180-й с величина мембранного резерва клетки возвращалась практически к исходным значениям до инкубации, а затем, начиная с 210-й с и до конца инкубации, возрастала. На 300-й с мембранный резерв, используемый гранулоцитами, увеличился на 57,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации.

В контроле у больных ОЛЛ не выявили достоверных изменений объема гранулоцитов в гипотонической среде (табл. 2). Установлены периоды снижения использования мембранного резерва клеткой, так на 30-й, 90-й и 180-й с величина мембранного резерва снижена соответственно на 48,5, 50 и 49,4 % ($p < 0,05$)

по сравнению с началом инкубации. С 210-й и по 270-ю с величина мембранного резерва увеличилась, максимальный прирост зафиксирован на 270-й с на 23 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации. К 300-й с объем клетки и величина мембранного резерва достоверно не отличались от исходных значений (0 с).

В группе здоровых людей под влиянием АТФ в гипотонической среде была установлена фаза регуляторного сокращения объема в первые 60 с инкубации, затем клетка восстанавливала свой объем к 90-й с до значений, характерных до инкубации (табл. 3). В интервале 120–150 с инкубации регистрировали фазу регуляторного сокращения объема клетки, которая сменилась коротким 30-секундным периодом регуляторного увеличения объема к 180 с. В интервале 210–240 с был установлен 30-секундный период уменьшения объема, который длился до конца инкубации. К 300-й с объем клетки снижен и не восстановился до исходных значений.

В контрольной группе проб в гипотонической среде в первые 30 с инкубации объем гранулоцитов увеличился, затем сменился длительной фазой регуляторного сокращения объема в период с 90-ю по 300-ю с инкубации. Под влиянием внеклеточной АТФ использование мембранных структур в регуляции клеточного объема было снижено на протяжении всего времени инкубации по сравнению с начальной точкой (0 с). Достоверное снижение величины мембранного резерва установлены на 90-й и 120-й с соответственно на 39,1 и 53,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации (см. табл. 2).

Полученные в работе данные указывают на ведущую регуляторную роль молекулы АТФ в изменении микромеханических и функциональных

Объем гранулоцитов и мембранный резерв, задействованный ими в тестах с гипосмотической нагрузкой *in vitro* (в группе здоровых людей)

Table 3

Granulocytes volume and membrane reserve used in tests with hypoosmotic loading *in vitro* (in the group of healthy people)

Время инкубации, с	Контроль		Нагрузка с АТФ	
	$V_{\text{гипо}}$, мкм ³	MR, %	$V_{\text{гипо}}$, мкм ³	MR, %
0	652,4±12,4	54,6±4,0	752,7±15,9	50,0±4,7
30	669,9±13,6*	58,2±4,3	751,7±18,3	41,1±5,1
60	642,7±12,2*	44,0±3,8	722,8±15,9*	39,9±4,0
90	636,5±12,9*	39,1±3,0*	752,7±18,1	39,2±3,7
120	613,2±11,3*	35,6±2,9*	729,4±16,7*	40,3±3,9
150	626,8±12,3*	48,9±3,4	728,4±15,3*	37,7±3,5*
180	623,8±12,6*	46,2±3,7	740,2±17,8*	39,8±3,7
210	627,4±13,4*	53,5±4,2	714,1±16,2*	37,1±4,1*
240	623,5±11,2*	46,1±3,5	703,1±14,2*	32,9±3,1*
270	622,4±12,3*	51,8±3,8	746,9±15,5	41,5±3,3
300	614,9±12,6*	47,8±3,6	719,8±15,7*	46,7±4,1

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями в начале инкубации (0 с) и последующими временными интервалами по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$). $V_{\text{гипо}}$ – объем клетки в гипотонической среде, MR – мембранный резерв клетки.

свойств гранулоцитов, как в норме, так и у больных ОЛЛ. Внеклеточный АТФ является мощным хемотаксическим стимулом для нейтрофилов, которые участвуют в реализации воспалительных реакций в организме [9]. В группах здоровых людей и больных ОЛЛ установлена высокая степень корреляции между параметрами модуля Юнга и миграционной активностью клетки ($r=1$), а также между потенциалом поверхности и силой межклеточной адгезии ($r=1$), что указывает на тесную взаимосвязь между свойствами плазмалеммы и функциональной активностью клетки. Чем ниже значения модуля Юнга, а значит, жесткость поверхности, тем выше миграционная активность клеток, при этом отрицательный заряд к поверхности гранулоцитов играет определенную роль в увеличении силы межклеточной адгезии между эритроцитом и гранулоцитом.

Учитывая, что микрореологические свойства клетки контролируются цитоскелетом [10], установленное в эксперименте снижение жесткости клеточной поверхности гранулоцитов в условиях экзогенной нагрузки с АТФ, как в норме, так и у больных ОЛЛ, указывает на реализацию сигнального каскада с участием ионов Ca^{2+} . Согласно данным литературы, активация P2-рецепторов на клеточной поверхности индуцируют увеличение внутриклеточного Ca^{2+} в нейтрофилах человека [11] и способствует разборке полимеризованного актина [12], что приводит к снижению концентрации актинсшивающих белков [13]. С точки зрения микроциркуляции, снижение жесткости поверхности гранулоцитов будет способствовать усилению миграционной активности клетки, так как им легче деформироваться в мелких сосудах.

В выполненном исследовании доказано непосредственное влияние внеклеточной АТФ на усиление

миграционной активности гранулоцитов в обеих исследованных группах. Полученные данные согласуются с рядом данных, в которых доказана регулирующая функция внеклеточной АТФ, посредством влияния ее на P2X7-рецептор, который изменяет активность селектина и миграцию нейтрофилов [14]. При этом некоторые работы указывают на активацию P2Y2-рецептора, усиливающего хемотаксис нейтрофилов посредством передачи сигнала на mTOR-сигнальный путь на переднем крае клетки [15].

Влияние АТФ на осморегуляторные реакции проявлялось по-разному. Так, в норме у здоровых людей под влиянием АТФ в гипотонической среде наблюдали фазу регуляторного снижения объема. Вероятно, сжатие клетки и уменьшение ее объема связано с увеличением оттока K^+ и Cl^- . В литературе представлены данные, согласно которым, в нейтрофилах повышение Ca^{2+} увеличивает активность Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов и Cl^- -каналов, что приводит к сжатию клетки и развитию фазы регуляторного снижения объема [16].

У гранулоцитов пациентов больных ОЛЛ под влиянием АТФ в гипотонической среде регистрировали длительную фазу регуляторного увеличения объема и более интенсивное использование мембранного резерва в реакциях осморегуляции. Наблюдаемый эффект мы связываем с работой TRPV4-катионного канала. TRPV4-канал функционирует как мульти-модальный датчик и может быть активирован кальмодулином и ионами Ca^{2+} [17]. Кроме того, TRPV4 задействован в миграции иммунных клеток [18]. При анализе миграционной активности гранулоцитов интактных проб (контроль) между группами здоровых и больных ОЛЛ видно что миграционная активность гранулоцитов больных ОЛЛ повышена почти в 2 раза.

Можно полагать, что, контактируя с опухолевыми лимфоцитами в гранулоцитах, могут быть реактивированы программы экспрессии промигранционных генов [19], в связи с чем у них изначально до воздействия нагрузки с АТФ миграционная активность повышена.

Заключение

Таким образом, при стимуляции пуринергического сигнального пути (*in vitro*) в смоделированном нагрузочном тесте с экзогенной АТФ, как в пробах здоровых людей, так и больных ОЛЛ, установлено снижение жесткости и потенциала поверхности плазмалеммы, усиление адгезивных свойств и миграционной активности гранулоцитов. При этом ответы гранулоцитов на осмотическую нагрузку различались: так, в группе здоровых людей нагрузка с АТФ вызывала сжатие клетки и снижение использования мембранного резерва клеткой в гипотонической среде, а у пациентов, больных ОЛЛ, – увеличение объема и более интенсивное использование мембранного резерва в регуляции объема. 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, может способствовать развитию воспаления в сосудистой стенке.

Финансирование / Acknowledgements

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00032\20. / The reported study was funded by the Russian Foundation of Basic Research (RFBR) according to the research project № 18-015-00032\20.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики / Compliance with ethical principles

Работа выполнена с соблюдением требований Хельсинской декларации, получено предварительное информированное согласие участников исследования в соответствии с рекомендациями, изложенными в Декларации по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52 Генеральной Ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь, 2000 г. (в редакции 2013 г.). / The study was carried out in compliance with the requirements of Declaration of Helsinki, the preliminary informed consent of the study participants was obtained in accordance with the guidelines set out in the Declaration on Ethical Principles for Medical Research in which people participate, as adopted by the 52nd WMA General Assembly, Edinburg, October 2000 (as amended in 2013).

Литература / References

1. Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signaling and immune cells. *Purinergic Sign.* 2014;(10):529–564. Doi: 10.1007/s11302-014-9427-2.
2. Erlinge P, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Sign.* 2008;(4):1–20. Doi: 10/1007/s11302-007-9092-9.
3. Sprague RS, Stephenson AH, Ellsworth ML. Impaired release of ATP from red blood cells of human with primary pulmonary hypertension. *Exp Biol and Med.* 2001;226(5):434–439. Doi: 10.1177/153537020122600507.
4. Leal Denis MF, Incicco JJ, Espelt MV, Verstraeten SV, Pignataro OP, Lazarowski ER, Schwarzbaum PJ. Kinetics of extracellular ATP in mastoparan 7-activated human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4692–4707. Doi: 10/1016/j.bbagen.2013.05.033.
5. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 2012;72(21):1–7. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1600.
6. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* 2008;3(7):2599. Doi: 10/1371/journal.pone.0002599.
7. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, А. В. Муравьев, Е. А. Сладкова // *Клет. техн. в биол. и мед.* – 2012. – № 3. – С. 172–175. [Skorkina MYu, Fedorova MZ, Muravyov AV, Sladkova EA. Using a nanomechanical sensor to study the morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia. *Cell technol. in biol. and med.* 2012;(3):172–175. (In Russ.)].
8. Скоркина М. Ю., Шамрай Е. А., Сладкова Е. А. Измерение сил адгезии в системе «клетка-клетка» на основе технологий атомно-силовой микроскопии // *Клет. техн. в биол. и мед.* – 2017. – № 4. – С. 213–215. [Skorkina MYu, Shamray EA, Sladkova EA. Measurement of adhesion forces in the «cell-cell» system based on atomic force microscopy technology. *Cell technol. in biol. and med.* 2017;(4):213–215. (In Russ.)].
9. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal” *Sci. Signal* 2009;2(56):6. Doi: 10.1126/scisignal.256pe6.
10. Verdier C, Couzon C, Duperray A, Singh P. Modeling cell interactions under flow. *J. of Mathematical Biology.* 2009;(58):235–259. Doi: 10.1007/s00285-008-0164-4.
11. Chen Yu, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi, Zinjenagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 2006;314(5806):1792–1795. Doi: 10.1126/science.1132559.
12. Goldman N, Chandler-Militello D, Langevin H, Nedergaard M, Takano T. Purine receptor mediated actin cytoskeleton remodeling of human fibroblasts. *Cell Calcium* 2013;53(4):297–301. Doi: 10.1016/j.ceca.2013.01.004.
13. Yap B, Kamm RD. Cytoskeletal remodeling and cellular activation during reformation of neutrophils into narrow channels. *J. Appl. Physiol.* 2005;99(6):2323–2330. Doi: 10.1152/jappphysiol.00503.2005.
14. Ley K, Laudanna C, Cynulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;(7):678–689. Doi: 10.1038/nri2156.
15. Bao Y, Ledderose C, Graf AF, Brix B, Birsak T, Lee A, Zang J, Junger WG. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J. cell Biol.* 2015;210(7):1153–1164. Doi: 10/1083/jcb.201503066.

16. Hoffman EK, Lambert LH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* 2009; 89(1):193–277. Doi: 10/1152/physrev.00037.2007.

17. Vrenken KS, Jalink K, van Leeuwen FN, Middelbeek J. Beyond ion-conduction: Channel-dependent and –independent roles of TRP channels during development and tissue homeostasis. *Biochem. and Biophys. Acta.* 2016;1863(6):1436–1446. Doi: 10/1016/j.bbamcr.2015.11.008.

18. Scheraga RG, Abraham S, Niese KA, Southern BD, Grove LM, Hite RD, McDonald C, Hamilton TA, Olman MA. TRPV4 mechanosensitive ion channel regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage phagocytosis. *J. Immunol.* 2016;196(1):428–436. Doi: 10.4049/jimmunol.1501688.

19. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011;331(6024):1559–1564. Doi: 10.1126/science.1203543.

Информация об авторах

Скоркина Марина Юрьевна – д-р биол. наук, доцент, зав. кафедрой биохимии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, г. Белгород, Россия, e-mail: skorkina@bsu.edu.ru.

Шевченко Татьяна Сергеевна – канд. биол. наук, доцент, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, г. Белгород, Россия, e-mail: ts_shevchenko@bsu.edu.ru.

Жернакова Нина Ивановна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой семейной медицины, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, г. Белгород, Россия, e-mail: zhernakova@bsu.edu.ru.

Information about authors:

Skorkina Marina Yu. – Doctor of Biological science, docent, Head of Department of Biochemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: skorkina@bsu.edu.ru.

Shevchenko Tatyana S. – Candidate of Biological science, Docent of Department of Biochemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: ts_shevchenko@bsu.edu.ru.

Zhernakova Nina I. – Doctor of Medical science, Professor, Head of Department of Family Medicine, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: zhernakova@bsu.edu.ru.