

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЙКОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА
ПРИ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ¹**

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

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
(г. Белгород)

Особый интерес вызывает изучение роли пуринергической сигнализации форменных элементов крови при нарушениях процессов физиологической регенерации, частными случаями которых могут выступать воспалительные процессы, а также старение организма. Большое значение для качественной реализации иммунных реакций лейкоцитами имеет функциональное состояние их плазмалеммы, основными характеристиками которой являются жесткость, потенциал поверхности и сила межклеточной адгезии. В выполненном исследовании с целью активации элементов пуринергической сигнальной системы использована модель механического стресса *in vitro*. Функциональные свойства лейкоцитов определяли методами атомно-силовой микроскопии – полуконтактного сканирования и силовой спектроскопии, а также с помощью тестов на миграционную активность лейкоцитов. При моделировании условий механической деформации клеток уровень аденозинтрифосфата в крови увеличился в 2,3 раза по сравнению с контролем. Заряд клеточной поверхности и жесткость гранулоцитов снизились. Жесткость лимфоцитов увеличилась, потенциал их поверхности стал более отрицательным по сравнению с контролем. Миграционная активность гранулоцитов значительно возросла. Увеличилась сила адгезии между эритроцитами и лейкоцитами. Таким образом, исследование показало, что молекула аденозинтрифосфата и ее производные могут оказывать влияние на изменение функциональных свойств лейкоцитов посредством ауто- и паракринной регуляции. Полученные экспериментальные данные расширяют имеющиеся знания о механизмах взаимодействия между гранулоцитами и лимфоцитами в сосудах периферического русла, что может быть полезно в коррекции нарушений иммунного ответа при старении организма.

Ключевые слова: *пуринергическая сигнальная система, форменные элементы крови, потенциал поверхности, модуль Юнга, сила адгезии, миграционная активность, старение организма.*

¹Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда по мероприятию «Проведение инициативных исследований молодыми учеными» (2018–2020 годы, соглашение № 18-75-00041).

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., Шамрай Е.А., Тищенко А.Ю., Скоркина М.Ю. Функциональная характеристика лейкоцитов периферической крови людей зрелого возраста при активации пуринергической сигнальной системы // Журн. мед.-биол. исследований. 2019. Т. 7, № 3. С. 272–279. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.3.272

Изучение пуринергической сигнальной системы, рецепторные комплексы которой и ассоциированные с ними лиганды выступают паракринными и внутриклеточными регуляторами функциональной активности различных клеток организма, вызывает особый интерес. Краткосрочные пуринергические сигналы отмечаются при регуляции экзокринной и эндокринной секреции, агрегации-деагрегации тромбоцитов, вазодилатации, механочувствительной трансдукции [1]. Долгосрочные пуринергические сигналы участвуют в регуляции клеточной пролиферации, дифференциации, миграции и гибели клеток, заживлении ран, старении и канцерогенезе [2]. Такие сигналы обусловлены наличием пуриновых рецепторов на мембране клеток практически всех органов и тканей, в т. ч. и на плазмалемме форменных элементов крови [3, 4].

Известно, что во время прохождения через узкие просветы капилляров эритроциты, механически деформируясь, освобождают молекулы аденозинтрифосфата (АТФ), производные которых в виде аденозиндифосфата и аденозина активно взаимодействуют с рецепторами P₂-семейства на эритроцитарной поверхности, что приводит к еще более выраженному выбросу АТФ [5]. В межклеточном пространстве молекулы АТФ в результате эктонуклеотидазного каскада реакций [6] расщепляются на нуклеотиды, активно взаимодействующие с пуриновыми рецепторами на иммунных клетках.

Цель работы – изучить функциональные свойства лейкоцитов периферической крови людей зрелого возраста при активации пуринергической сигнальной системы.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены с использованием периферической венозной крови практически здоровых людей-добровольцев (I группа здоровья) зрелого возраста (от 36 до 59 лет, $n = 30$, женского и мужского пола), проходивших диспансериза-

цию на базе областной клинической больницы г. Белгорода. Забор крови осуществляли из локтевой вены с участием специализированного медперсонала. Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинкской декларации (с изменениями 2013 года), было получено информированное согласие всех субъектов эксперимента.

Активацию пуринергических сигнальных путей форменных элементов крови осуществляли путем моделирования механической деформации мембран. Для этой цели была использована модель механического стресса *in vitro* согласно методике, описанной в работе [7]. Каждый образец крови был разделен на опытную и контрольную пробы. Опытные пробы крови подвергали механическому стрессу, контрольные оставляли без воздействия.

Концентрацию АТФ, вырабатываемого эритроцитами при моделировании механического стресса *in vitro*, в исследуемых пробах определяли колориметрическим методом², используя фотометр фотоэлектрический КФК-3 (Россия, 2008), по разности оптических плотностей между пробиркой, в которой проводили гидролиз фосфатных связей, и пробой без гидролиза фосфатных связей при помощи калибровочного графика. Калибровочный график строили, используя раствор фосфат-ионов (ГСО 7791–2000) в концентрациях от 50 до 500 мкг/мл с шагом 50 мкг/мл. Измерение концентрации АТФ выполняли в трех повторностях для каждой пробы.

Цельную кровь разделяли на эритроцитарную и лейкоцитарную массы путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 мин. Лейкоцитарное кольцо отбирали в отдельную пробирку, полученную суспензию лейкоцитов с помощью магнита для клеточной сепарации EasySep Magnet и набора для выделения лимфоцитов EasySep/EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell) разделяли на гранулоциты и лимфоциты.

²Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. М.: Высш. шк., 1988. 238 с.

Биофизические свойства поверхности форменных элементов крови изучали с использованием атомно-силового микроскопа (АСМ) «ИНТЕГРА Вита» (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT-MDT, г. Зеленоград, 2009). Электрические свойства мембраны гранулоцитов и лимфоцитов оценивали, выполняя измерения поверхностного потенциала (ПП) в режиме зонда Кельвина на АСМ. Подготовку суспензии клеток для измерения ПП и процедуру измерения ПП осуществляли согласно способу, изложенному в работе [8]. Для исследования использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Из каждой пробы сканировали по 20 клеток каждой популяции, обработку полученных сканов осуществляли в программе Nova (NT-MDT).

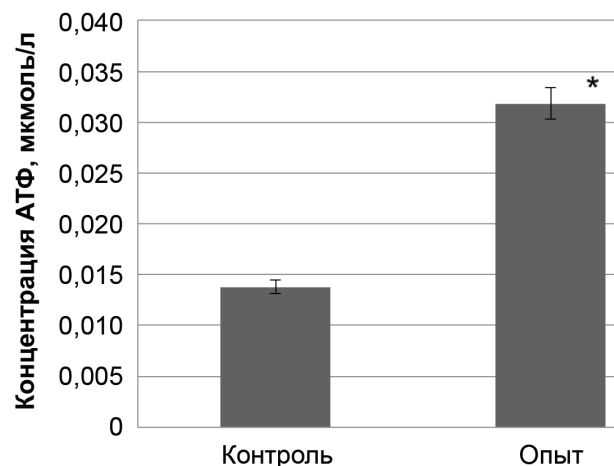
Жесткость клеточной поверхности оценивали по числовым данным модуля Юнга. В основе метода регистрации модуля Юнга лежит измерение степени деформации поверхности образца при взаимодействии его с вершиной зонда АСМ. В работе использованы модифицированные АСМ-зонды, изготовленные коллективом авторов на основе полимерных микросфер с радиусом закругления 5 мкм [9]. Измерение модуля Юнга осуществляли на АСМ «ИНТЕГРА Вита» в режиме силовой спектроскопии, согласно алгоритму, описанному в работе [10]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток каждой популяции.

Для измерения сил адгезии в системах «эритроцит–гранулоцит» и «эритроцит–лимфоцит» применяли биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (США) согласно способу, изложенному в работе [11]. Силу межклеточной адгезии измеряли, регистрируя силовые кривые с поверхности 20 клеток, и рассчитывали с помощью программного обеспечения Nova.

Миграционную активность лейкоцитов оценивали в прямом капиллярном тесте с учетом жизнеспособности лимфоцитов не менее 95 % [12].

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Статистическую значимость различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента при критическом уровне значимости $p < 0,05$ и нормальном распределении. Данные представлены в виде среднего значения (M) и статистической ошибки (m).

Результаты. При активации пуринергической сигнальной системы установлено увеличение концентрации АТФ в крови в 2,3 раза по сравнению с контролем (см. рисунок).



Изменение концентрации АТФ в крови людей зрелого возраста под влиянием механического стресса *in vitro*: * – установлены статистически значимые различия между показателями в опытной и контрольной группах по критерию Стьюдента ($p < 0,05$)

В условиях механического стресса показано изменение биофизических свойств лейкоцитов. В опытных пробах крови заряд гранулоцитов снизился на 47 % ($p < 0,05$), что повлекло за собой увеличение адгезивной активности клеточной поверхности (табл. 1). Сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом возросла на 18 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, модуль Юнга, характеризующий жесткость поверхности, снизился на 16,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*
НА БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ
В КРОВИ ЛЮДЕЙ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА ($M \pm m$)**

Показатель	Контроль	Опыт
<i>Гранулоциты</i>		
Сила адгезии в системе «эритроцит–гранулоцит», нН	35,9±0,2	43,9±1,1*
Модуль Юнга, мкПа	4,16±0,01	3,56±0,02*
Потенциал поверхности, мВ	-31,76±1,52	-46,7±4,32*
<i>Лимфоциты</i>		
Сила адгезии в системе «эритроцит–лимфоцит», нН	35,9±0,2	71,5±0,8*
Модуль Юнга, мкПа	9,16±0,01	11,56±0,02*
Потенциал поверхности, мВ	-19,72±0,23	-27,15±0,32*

Примечание: * – установлены статистически значимые различия между показателями по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

При активации элементов пуриnergической сигнальной системы произошло изменение биофизических свойств плазмалеммы лимфоцитов. Модуль Юнга увеличился на 26 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 1). В опытных пробах крови заряд лимфоцитов снизился на 27 % ($p < 0,05$), что сопровожда-

лось увеличением адгезивной активности клеточной поверхности на 49,7 % ($p < 0,05$).

При моделировании механического стресса изменилась миграционная активность клеток (табл. 2). Так, доля мигрировавших гранулоцитов повысилась в 2,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*
НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ
В КРОВИ ЛЮДЕЙ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА ($M \pm m$)**

Показатель	Контроль	Опыт
<i>Гранулоциты</i>		
Количество клеток в 1 мкл: до миграции	5290,0±186,1	4660,0±212,7*
после миграции	746,7±43,9	1700,0±92,4*
Доля мигрировавших клеток, %	12,5±0,5	36,2±0,7*
<i>Лимфоциты</i>		
Количество клеток в 1 мкл: до миграции	1893,3±100,0	726,7±55,5*
после миграции	786,7±37,1	313,3±26,6*
Доля мигрировавших клеток, %	42,0±0,9	43,3±1,5

Примечание: * – установлены статистически значимые различия между показателями по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Обсуждение. Смоделированные в данном эксперименте условия механического стресса *in vitro*, максимально приближенные к физиологическим параметрам микроциркуляторного русла, привели к активации пуринергической сигнальной системы [13]. Проведенное исследование установило повышение концентрации АТФ в пробах крови, подвергшихся механическому стрессу, практически в 2,5 раза. Полученные данные подтверждают факт экскреции в межклеточное пространство молекул АТФ эритроцитами в ответ на силовое воздействие со стороны смещающихся слоев плазмы [14].

Паракринные влияния эндогенного АТФ наблюдались в снижении жесткости и ПП плазмалеммы гранулоцитов, в увеличении силы адгезии между гранулоцитом и эритроцитом. Подобные изменения могут быть связаны с запуском и реализацией пуринергического сигнального каскада под влиянием механического воздействия [6]. Преобладающими подтипами рецепторов пуринергической сигнальной системы на плазмалемме гранулоцитов являются P2Y1, 2, 4, 6, 11 [15]. В ряде работ показано, что рецептор P2Y2, локализованный на поверхности нейтрофилов, отвечает за полимеризацию актина и, как следствие, за ориентацию клеток и их движение в ответ на хемотаксические стимулы [16]. Кроме того, на поверхности гранулоцитов обнаружен А2-рецептор к аденозину, который посредством аутокринной регуляции обеспечивает миграцию клеток [17], что согласуется с установленным в нашей работе повышением миграционной активности гранулоцитов при механическом стрессе.

Выявлено, что выброс молекул АТФ клетками крови приводит к увеличению жесткости лимфоцитов и силы адгезии в системе «эритроцит–лимфоцит», при этом плазмалемма клеток приобретает более отрицательный заряд. В ряде работ описаны рецепторы P2X- и P2Y-семейств, локализованные на поверхности лимфоцитов и представляющие собой мембранные ионные каналы [18]. Возможно, высвобождение молекул АТФ во время механического

стресса запускает пуринергическую сигнальную систему за счет повышения концентрации цитозольного Ca^{2+} [19, 20]. Молекула АТФ может являться средством взаимодействия Т- и В-популяций лимфоцитов. Так, В-клетки могут гидролизовать внеклеточный АТФ до аденозина, А2-рецепторы к которому обнаружены на поверхности Т-лимфоцитов [21].

Таким образом, в условиях механической деформации клеток крови показано увеличение концентрации АТФ и изменение биофизических свойств плазмалеммы лейкоцитов в крови людей зрелого возраста. При активации пуринергической сигнальной системы ПП гранулоцитов и лимфоцитов стал более отрицательным. Под влиянием механического стресса модуль Юнга лимфоцитов увеличился, а гранулоцитов – снизился. В то же время силы адгезии в системах «эритроцит–гранулоцит» и «эритроцит–лимфоцит» возросли. Миграционная активность гранулоцитов повысилась. Результаты исследования указывают на то, что молекула АТФ оказывает значительное влияние на изменение биофизических свойств плазмалеммы как гранулоцитов, так и лимфоцитов.

Полученные экспериментальные данные о влиянии факторов внеклеточных пуринергических сигнальных путей на функциональные свойства форменных элементов крови людей зрелого возраста существенно расширяют знания о механизмах взаимодействия между гранулоцитами, как основными клетками, формирующими первую линию защиты от чужеродных микроорганизмов посредством фагоцитарной активности, и лимфоцитами, обеспечивающими гуморальные иммунные реакции. Результаты данной работы будут использованы для дальнейших исследований форменных элементов крови людей пожилого возраста, что позволит проследить изменение функциональных свойств лейкоцитов при нарушении иммунных реакций, сопровождающем старение организма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Список литературы

1. Burnstock G. Purinergic Signalling // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 147, suppl. 1. P. S172–S181.
2. Burnstock G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential // Keio J. Med. 2013. Vol. 62, № 3. P. 63–73.
3. Коваленко С.С., Юсупович А.И., Паршина Е.Ю., Максимов Г.В. Роль пуринергических рецепторов эритроцита в регуляции конформации и способности гемоглобина переносить кислород и оксид азота (II) // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 2. С. 170–173.
4. Wang L., Olivercrona G., Götberg M., Olsson M.L., Sörhede Winzell M., Erlinge D. ADP Acting on P2Y₁₃ Receptors Is a Negative Feedback Pathway for ATP Release from Human Red Blood Cells // Circ. Res. 2005. Vol. 96, № 2. P. 189–196.
5. Baroja-Mazo A., Barberà-Gremades H., Pelegrín P. The Participation of Plasma Membrane Hemichannels to Purinergic Signaling // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1828, № 1. P. 79–93.
6. Montalbetti N., Denis M.F.L., Pignataro O.P., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarzbaum P.J. Homeostasis of Extracellular ATP in Human Erythrocytes // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 44. P. 38397–38407.
7. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of Red Blood Cell Filterability by Ca²⁺ Influx and cAMP-Mediated Signaling Pathways // Am. J. Physiol. 1997. Vol. 273, № 6. P. C1828–C1834.
8. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина // Биофизика. 2014. Т. 59, вып. 2. С. 310–313.
9. Способ определения упругости клеток крови: пат. РФ № 2466401, МПК G01N33/49 / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Н.А. Забияков, Е.А. Сладкова. Заявл. 15.03.2011, опубл. 10.11.2012, Бюл. № 31.
10. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Муравьев А.В., Сладкова Е.А. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 3. С. 172–175.
11. Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А. Измерение сил адгезии в системе «клетка–клетка» на основе технологий атомно-силовой микроскопии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 4. С. 213–215.
12. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Титова Н.Д. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммуно-реабилитация. Витебск: ВГМУ, 2006. 198 с.
13. Ellsworth M., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. Erythrocytes: Oxygen Sensor and Modulators of Vascular Tone // Physiology (Bethesda). 2009. Vol. 24. P. 107–116.
14. Olivieri A., Pala M., Gandini F., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Woodward S.R., Grugni V., Battaglia V., Semino O., Achilli A., Richards M.B., Torroni A. Mitogenomes from Two Uncommon Haplogroups Mark Late Glacial/ Postglacial Expansions from the Near East and Neolithic Dispersals Within Europe // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 7. Art. № e70492.
15. Li J., Fountain S.J. Fluvastatin Suppresses Native and Recombinant Human P2X₄ Receptor Function // Purinergic Signal. 2012. Vol. 8, № 2. P. 311–316.
16. De Ita M., Vargas M.H., Carbajal V., Ortiz-Quintero B., López-López C., Miranda-Morales M., Barajas-López C., Montaña L.M. ATP Releases ATP or Other Nucleotides from Human Peripheral Blood Leukocytes Through Purinergic P2 Receptors // Life Sci. 2016. Vol. 145. P. 85–92.
17. Junger W.G. Purinergic Regulation of Neutrophil Chemotaxis // Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65, № 16. P. 2528–2540.
18. North R.A. P2X Receptors // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2016. Vol. 371, № 1700. Art. № 20150427.
19. Goldman N., Chandler-Mittelto D., Langevin H.M., Nedergaard M., Takano T. Purine Receptor Mediated Actin Cytoskeleton Remodeling of Human Fibroblasts // Cell Calcium. 2013. Vol. 53, № 4. P. 297–301.
20. Chen Y., Yao Y., Sumi Y., Li A., To U.K., Elkhali A., Inoue Y., Woehrle T., Zhang Q., Hauser C., Junger W.G. Purinergic Signaling: A Fundamental Mechanism in Neutrophil Activation // Sci. Signal. 2010. Vol. 3, № 125. P. ra45.
21. Yip L., Cheung C.W., Corriden R., Chen Y., Insel P.A., Junger W.G. Hypertonic Stress Regulates T-Cell Function by the Opposing Actions of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine // Shock. 2007. Vol. 27, № 3. P. 242–250.

References

1. Burnstock G. Purinergic Signalling. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, vol. 147, suppl. 1, pp. S172–S181.
2. Burnstock G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential. *Keio J. Med.*, 2013, vol. 62, no. 3, pp. 63–73.
3. Kovalenko S.S., Yusipovich A.I., Parshina E.Yu., Maksimov G.V. Role of Purinergic Receptors of Erythrocytes in the Regulation of Conformation and Oxygen- and NO-Transporting Capacity of Hemoglobin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, vol. 159, no. 2, pp. 213–216.
4. Wang L., Olivercrona G., Göteborg M., Olsson M.L., Sörhede Winzell M., Erlinge D. ADP Acting on P2Y₁₃ Receptors Is a Negative Feedback Pathway for ATP Release from Human Red Blood Cells. *Circ. Res.*, 2005, vol. 96, no. 2, pp. 189–196.
5. Baroja-Mazo A., Barberà-Gremades H., Pelegrín P. The Participation of Plasma Membrane Hemichannels to Purinergic Signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, vol. 1828, no. 1, pp. 79–93.
6. Montalbetti N., Leal Denis M.F., Pignataro O.P., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarzbach P.J. Homeostasis of Extracellular ATP in Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 44, pp. 38397–38407.
7. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of Red Blood Cell Filterability by Ca²⁺ Influx and cAMP-Mediated Signaling Pathways. *Am. J. Physiol.*, 1997, vol. 273, no. 6, pp. C1828–C1834.
8. Sladkova E.A., Skorkina M.Yu. Estimation of Surface Potential of Lymphocytes from Patients with Leukemia Using Kelvin Probe Mode. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 254–256.
9. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. *Sposob opredeleniya uprugosti kletok krovi* [Method for Determining Blood Cell Elasticity]. Patent RF no. 2466401, 2011.
10. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Murav'ev A.V., Sladkova E.A. Ispol'zovanie nanomekhanicheskogo sensora dlya izucheniya morfofunktsional'nykh svoystv limfotsitov zdorovykh donorov i bol'nykh khronicheskim limfoblastnym leykozom [The Use of a Nanomechanical Sensor to Study the Morphofunctional Properties of Lymphocytes from Healthy Donors and Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*, 2012, no. 3, pp. 172–175.
11. Skorkina M.Yu., Shamray E.A., Sladkova E.A. Izmerenie sil adgezii v sisteme “kletka–kletka” na osnove tekhnologii atomno-silovoy mikroskopii [Measuring of Adhesion Force in the Cell–Cell System Based on Atomic Force Microscopy Technology]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*, 2017, no. 4, pp. 213–215.
12. Novikov D.K., Novikov P.D., Titova N.D. *Immunokorreksiya, immunoprofilaktika, immunoreabilitatsiya* [Immunocorrection, Immunoprophylaxis, Immunorehabilitation]. Vitebsk, 2006. 198 p.
13. Ellsworth M., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. Erythrocytes: Oxygen Sensor and Modulators of Vascular Tone. *Physiology (Bethesda)*, 2009, vol. 24, pp. 107–116.
14. Olivieri A., Pala M., Gandini F., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Woodward S.R., Grugni V., Battaglia V., Semino O., Achilli A., Richards M.B., Torroni A. Mitogenomes from Two Uncommon Haplogroups Mark Late Glacial/ Postglacial Expansions from the Near East and Neolithic Dispersals Within Europe. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 7. Art. no. e70492.
15. Li J., Fountain S.J. Fluvastatin Suppresses Native and Recombinant Human P2X₄ Receptor Function. *Purinergic Signal.*, 2012, vol. 8, no. 2, pp. 311–316.
16. De Ita M., Vargas M.H., Carbajal V., Ortiz-Quintero B., López-López C., Miranda-Morales M., Barajas-López C., Montaña L.M. ATP Releases ATP or Other Nucleotides from Human Peripheral Blood Leukocytes Through Purinergic P2 Receptors. *Life Sci.*, 2016, vol. 145, pp. 85–92.
17. Junger W.G. Purinergic Regulation of Neutrophil Chemotaxis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, vol. 65, no. 16, pp. 2528–2540.
18. North R.A. P2X Receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2016, vol. 371, no. 1700. Art. no. 20150427.
19. Goldman N., Chandler-Militello D., Langevin H.M., Nedergaard M., Takano T. Purine Receptor Mediated Actin Cytoskeleton Remodeling of Human Fibroblasts. *Cell Calcium*, 2013, vol. 53, no. 4, pp. 297–301.
20. Chen Y., Yao Y., Sumi Y., Li A., To U.K., Elkhali A., Inoue Y., Woehrle T., Zhang Q., Hauser C., Junger W.G. Purinergic Signaling: A Fundamental Mechanism in Neutrophil Activation. *Sci. Signal.*, 2010, vol. 3, no. 125, pp. ra45.
21. Yip L., Cheung C.W., Corriden R., Chen Y., Insel P.A., Junger W.G. Hypertonic Stress Regulates T-Cell Function by the Opposing Actions of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine. *Shock*, 2007, vol. 27, no. 3, pp. 242–250.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.3.272

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

*Belgorod National Research University
(Belgorod, Russian Federation)

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN PEOPLE AGED 36–59 YEARS AT ACTIVATION OF THE PURINERGIC SIGNALLING SYSTEM

It is of particular interest to study the role of purinergic signalling of blood cells in cases of disturbed physiological regeneration, such as inflammatory processes and ageing. For leukocytes to realize their immune responses properly, the functional state of their plasma membrane is important, its main characteristics being stiffness, surface potential and strength of intercellular adhesion. To activate the elements of the purinergic signalling system, we applied a model of mechanical stress *in vitro*. Erythrocyte functional properties were studied using the methods of atomic force microscopy, namely, tapping mode and force spectroscopy, as well as tests for leukocyte migration activity. At simulated mechanical cell deformation, the level of adenosine triphosphate (ATP) in the blood increased by the factor of 2.3 as compared with the control. The cell surface charge and granulocyte stiffness decreased. Lymphocyte stiffness increased, while their surface potential became more negative, compared to the control. Granulocyte migration activity increased significantly. Moreover, a greater strength of adhesion between erythrocytes and leukocytes was detected. Thus, the findings indicate that the ATP molecule and its derivatives can affect leukocyte functional properties through auto- and paracrine regulation. The obtained experimental data expand the existing knowledge about the mechanisms of intercellular interaction between granulocytes and lymphocytes in the peripheral vessels, which can be of use when correcting abnormal immune response at ageing.

Keywords: *purinergic signalling system, blood cells, surface potential, Young's modulus, adhesive strength, migration activity, ageing.*

Поступила 12.03.2019

Принята 16.05.2019

Received 12 March 2019

Accepted 16 May 2019

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

For citation: Sladkova E.A., Shamray E.A., Tishchenko A.Yu., Skorkina M.Yu. Functional Characteristics of Peripheral Blood Leukocytes in People Aged 36–59 Years at Activation of the Purinergic Signalling System. *Journal of Medical and Biological Research*, 2019, vol. 7, no. 3, pp. 272–279. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.3.272