

УДК 576.32: 576.36

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*

© 2020 г. Е.А. Сладкова

Белгородский национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 18.11.2019 г.

После доработки 20.04.2020 г.

Принята к публикации 22.05.2020 г.

Изучены электрические свойства форменных элементов крови в условиях моделирования механического «стресса» *in vitro*. Показано увеличение концентрации молекул АТФ в межклеточном пространстве в ответ на механическое воздействие движущихся слоев плазмы как в крови здоровых людей, так и больных острым лимфобластным лейкозом. Установлено, что потенциал поверхности эритроцитов и тромбоцитов становится более положительным как в крови здоровых людей, так и больных лейкозом. Напротив, для лимфоцитов характерно понижение отрицательного заряда у здоровых людей и повышение в крови больных острым лимфобластным лейкозом в ответ на механический стресс.

Ключевые слова: механический стресс, пуринергическая сигнальная система, поверхностный потенциал, лимфоциты, эритроциты, тромбоциты.

DOI: 10.31857/S0006302920050087

Пуринергическая сигнализация представляет собой сложную систему элементов, в которой молекула АТФ и родственные ей молекулы функционируют как межклеточные мессенджеры. Когда АТФ высвобождается во внеклеточное пространство, он активирует специфические рецепторы, принадлежащие к семейству P2 [1]. Параллельно эктонуклеотидазы превращают АТФ в его дефосфорилированные метаболиты, в том числе аденозин, который стимулирует рецепторы P1. Активность обоих рецепторов влияет на различные клеточные процессы [2]. Известны четыре подтипа рецепторов P1 (P1R) (A1, A2A, A2B и A3), восемь подтипов P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) и семь подтипов P2X (P2X1-7) [1]. В основном все подтипы рецепторов P1 и P2 экспрессируются иммунными клетками в зависимости от типа клеток и дифференцировки и играют значительную роль в воспалительных процессах.

В последние годы был проведен ряд исследований патофизиологической роли пуринергической сигнализации и ее терапевтического потенциала при различных заболеваниях [3–5]. Имеются доказательства того, что опухолевые клетки различных видов выделяют значительное количество

АТФ в ответ на механическую деформацию, гипоксию и некоторые агенты, а также на последующий некроз и ишемию [4]. Рецепторы P2X7 были описаны в лейкозных лимфоцитах человека. Имеются данные, свидетельствующие о том, что экспрессия и функция рецепторов P2X7, которые могут опосредовать гибель или пролиферацию клеток в зависимости от уровня активации, могут коррелировать с тяжестью лимфобластного лейкоза [6].

В ряде работ показано, что при прохождении эритроцитов через узкие просветы капилляров в условиях механической деформации они освобождают молекулы АТФ, которые в межклеточном пространстве деградируют в течение нескольких секунд, расщепляясь семейством эктонуклеотидаз [7] с образованием метаболитов. АДФ и аденозин активно взаимодействуют с рецепторами А2-семейства на эритроцитарной поверхности, что приводит к еще более выраженному выбросу АТФ через канал паннексин-1 [8].

Учитывая тот факт, что механическое воздействие на клетки крови может стимулировать работу пуринергической сигнальной системы, а пуриновые рецепторы выполняют роль ионных каналов [9, 10], актуальным является изучение электрических свойств различных клеточных по-

Сокращение: ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз.

пуляций в норме и при развитии патологических процессов в условиях механического стресса.

Цель работы – изучить изменение электрических свойств форменных элементов крови в условиях механического стресса *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была периферическая кровь здоровых людей зрелого возраста ($n = 30$) и людей больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) ($n = 30$). Забор периферической крови проводили из локтевой вены с участием специализированного медперсонала лаборатории Белгородской областной клинической больницы имени Святителя Иоасафа в одноразовые стерильные вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА-К2 в концентрации 2.0 мг (0.006843 моль/литр) на 1 мл крови.

Венозную кровь здоровых доноров и больных ОЛЛ делили на две части: в опытной пробирке проводили активацию пуриnergических сигнальных путей посредством модели «механического стресса», контрольную пробирку оставляли интактной. Механический стресс осуществляли согласно методу, описанному в работе [10].

Концентрацию АТФ в крови определяли колориметрическим методом [11, 12]. Метод основан на отщеплении от АТФ двух остатков фосфорной кислоты при непродолжительном гидролизе в кислой среде. Сравнение содержания органического фосфора в пробах до и после гидролиза дает представление о количестве лабильно связанного с АТФ фосфора, находящегося в крови. Цельную кровь (0.1 мл) помещали в пробирку, стоящую на ледяной бане, гомогенизируя 2.5%-м раствором ТХУ (1 мл) в течение 5 мин. Затем добавляли 1 мл физиологического раствора (0.9%) и продолжали экстракцию на холоде в течение того же времени. В две пробирки, контрольную и опытную, отбирали по 0.5 мл полученного раствора. В опытную пробирку добавляли 1 мл 1 М раствора соляной кислоты и помещали в кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфатных связей. Затем раствор охлаждали, добавляли 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия. В контрольную пробирку (без кипячения) добавляли 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия и 1 мл 1 М раствора соляной кислоты. В обе пробирки добавляли по 7.5 мл физиологического раствора. Для проведения качественной реакции из обеих проб отбирали по 5 мл жидкости в новые пробирки. К каждой добавляли 0.5 мл 1 М раствора молибдата аммония, 0.5 мл 1%-го раствора аскорбиновой кислоты и 2 мл физиологического раствора. Содержимое пробирок быст-

ро перемешивали и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 10 мин.

Контрольную и опытную пробы колориметрировали на фотометре КФК-3 (Россия) против физиологического раствора при длине волны 670 нм. Концентрацию АТФ рассчитывали по разности оптических плотностей между раствором в контрольной пробирке (без гидролиза в кислой среде) и опытной пробирке по калибровочному графику. Калибровочный график строили, используя раствор фосфат-ионов (ГСО 7791-2000) в концентрациях от 50 до 500 мкг/мл с шагом в 50 мкг/мл. Измерение АТФ выполняли в трех повторностях для каждой пробы.

Подготовку образцов клеток крови контрольных и опытных групп выполняли по следующей схеме. Для разделения форменных элементов на эритроциты, лейкоциты и тромбоциты контрольную и опытную пробирку с кровью центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. Затем нижнюю часть плазмы и лейкоцитарное кольцо отбирали в другую пробирку и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, убирали надосадочную жидкость. Получали суспензию лейкоцитов, которую с помощью магнита для клеточной сепарации EasySep Magnet и набора для выделения лимфоцитов EasySep/EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell) (Thermo Scientific, США) разделяли на гранулоциты и лимфоциты. Суспензию тромбоцитов получали согласно методу, описанному в работе [13].

Исследование потенциала поверхности клеток осуществляли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель ЗАО «НТ-МДТ», Зеленоград). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме методом зонда Кельвина. Из каждой пробы сканировали не менее 15 клеток. Для сканирования использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Суспензию клеток для измерения потенциала поверхности и процедуру его измерения осуществляли согласно способу, изложенному в работе [14]. Обработку полученных изображений проводили в программе Nova (ЗАО «НТ-МДТ», Зеленоград) с использованием инструмента «Point Instruments». На каждой клетке определяли значение потенциала поверхности в 20 участках и рассчитывали среднее значение.

Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t -критерия Стьюдента при $p < 0,05$ с учетом нормального распределения данных. В рабо-

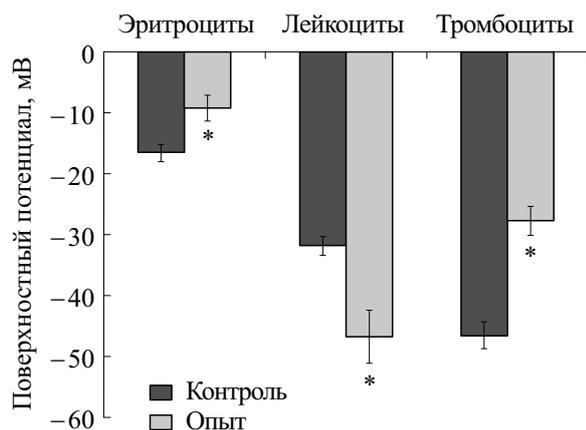


Рис. 1. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей. Опыт — под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль — интактная кровь; * — статистически достоверные различия между контрольной и опытной группами по критерию Стьюдента при $p < 0.05$.

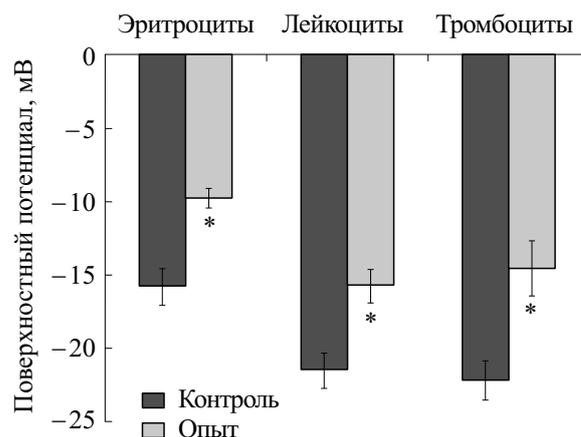


Рис. 2. Поверхностный потенциал клеток крови больных острым лимфобластным лейкозом. Опыт — под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль — интактная кровь; * — статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0.05$.

те приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условия механического стресса уровень АТФ в крови здоровых людей увеличился в 2.3 раза ($p < 0.05$) по сравнению с интактной кровью. У больных ОЛЛ в условиях сдвиговой деформации концентрация АТФ повысилась в 1.8 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой.

Показано, что при механическом воздействии потенциал поверхности эритроцитов и тромбоцитов стал более положительным. Значение заряда эритроцитов увеличилось на 44% ($p < 0.05$), тромбоцитов на 40% ($p < 0.05$). Потенциал поверхности лимфоцитов напротив стал более отрицательным на 47% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (рис. 1). У больных ОЛЛ в условиях механического воздействия потенциал поверхности клеток крови стал более положительным по сравнению с контролем. Так, потенциал поверхности эритроцитов был выше на 34% ($p < 0.05$), лимфоцитов — на 27% ($p < 0.05$) и тромбоцитов на 34% ($p < 0.05$) (рис. 2).

Установлено, что в условиях механической деформации клеток крови концентрация АТФ в крови возросла по сравнению с пробами без нагрузки. Полученные данные свидетельствуют о выделении в межклеточное пространство молекул АТФ при механической стимуляции, что согласуется с результатами, представленными рядом авторов [7, 15].

Смоделированный механоиндуцированный выброс АТФ клетками крови повлиял на их электрические свойства. Изменение потенциала клеточной поверхности мы связываем с запуском и реализацией пуринергического сигнального каскада под влиянием механического стресса [7]. В настоящее время доказано, что на мембране эритроцитов нет специфических Р-рецепторов непосредственно для молекулы АТФ, но были идентифицированы рецепторы для АДФ и аденозина [16]. Ввиду этого мы предполагаем, что продукты распада молекул АТФ могли оказать влияние на изменение электрических свойств красных клеток крови за счет входа ионизированного кальция через ионную пору [17], так как пуриновые рецепторы выполняют роль ионных каналов [9, 10]. В ряде работ описаны рецепторы P2X-семейства, локализованные на поверхности лимфоцитов, взаимодействие молекул АТФ с этими рецепторами влечет за собой открытие Ca^{2+} -ионных каналов [18], что может быть связано с установленным изменением потенциала поверхности лимфоцитов. Мы склонны предположить, что повышение заряда поверхности тромбоцитов возможно посредством взаимодействия продуктов распада АТФ с P2Y-рецепторами на их поверхности [19].

В условиях лейкоза заряд эритроцитов и тромбоцитов повышается по аналогии с клетками здоровых людей, в то время как для опухолевых лимфоцитов больных ОЛЛ характерно противоположное изменение потенциала поверхности по сравнению с клетками здоровых людей. Полученные данные могут быть связаны с повышенной

экспрессией рецептора P2X7R на поверхности лейкозных клеток [6], вероятно который может быть активирован при силовом воздействии на клетки. Увеличение концентрации АТФ способствует активации пуриnergического рецептора P2X7R, что ведет к одновременному увеличению содержания внутриклеточного Na^+ и Ca^{2+} в опухолевых лимфоцитах, а не только ионов Ca^{2+} [9]. Учитывая данный факт, мы предполагаем, что приобретение лейкозными лимфоцитами более положительного заряда может быть результатом открытия ионных каналов одновременно для Na^+ и Ca^{2+} . Увеличение заряда тромбоцитов у больных ОЛЛ может быть связано как с активацией рецепторов P2Y12 и P2Y1 посредством молекулы АТФ, так и с непосредственным влиянием метаболитических продуктов опухолевых клеток, вызывающих деполяризацию мембраны тромбоцитов [20, 21].

Таким образом, показано увеличение концентрации молекул АТФ в межклеточное пространство в ответ на механическое воздействие *in vitro*. В крови больных ОЛЛ концентрация АТФ ниже как в интактной крови, так и при механическом стрессе, что может быть связано с изменением функциональной активности эритроцитов в условиях опухолевого процесса.

Полученные данные позволяют предположить, что механическое воздействие может оказывать влияние на электрические свойства плазмалеммы форменных элементов крови как у здоровых людей, так и у больных острым лимфобластным лейкозом. Важным моментом является установление разнонаправленного изменения потенциала поверхности лимфоцитов здоровых людей и больных ОЛЛ. Так, в норме заряд поверхности лимфоцитов становится более отрицательным, а при развитии лейкоза — более положительным. Выявленные нами закономерности могут иметь значение в изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле. Также они могут быть учтены при поиске фармакологических регуляторных мишеней с целью поддержания функциональной активности иммунокомпетентных клеток в условиях патологического процесса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ по мероприятию «Проведение инициативных исследований молодыми учеными», 2018–2020 гг., соглашение № 18-75-00041.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Malec, Polish J. Pharmacol. Pharmacy **48** (5), 457 (1996).
2. C. Cekic and J. Linden, Nature Rev. Immunol. **16** (3), 177 (2016).
3. H. K. Eltzschig, M. V. Sitkovsky, and S. C. Robson, New Engl. J. Med. **367** (24), 2322 (2012).
4. G. Burnstock and D. V. Francesco, Purinergic signaling **9** (4), 491 (2013).
5. M. Yang and W. J. Brackenburg, Frontiers Physiol. **4**, 121 (2013).
6. X. Zhang, Acta Biochim. Biophys. Sin. **41**, 362 (2009).
7. N. Montalbetti, M. F. L. Denis, O. P. Pignataro, and E. Kobatake, J. Biol. Chem. **286** (44), 38397 (2011).
8. A. Baroja-Mazo, H. Barbero-Gremades, and P. Pelegrini, Biochem. Biophys. Acta **828**, 79 (2013).
9. F. Virgilio, Nature Rev. Cancer **18** (10), 601 (2018).
10. T. Oonishi, K. Sakashita, and N. Uyesaka, Am. J. Physiol. Soc. **273**, 1828 (1997).
11. Н. М. Титова, Т. Н. Замай и Г. И. Боровкова, *Биохимия и молекулярная биология: лаб. практикум* (ИПК СФУ, Красноярск, 2008).
12. Т. Л. Алейникова и Г. В. Рубцова, *Руководство к практическим занятиям по биологической химии* (Высш. школа, М., 1988).
13. К. И. Таборская, М. Ю. Фролова и Н. В. Кулева, Цитология **58** (2), 115 (2016).
14. Е. А. Сладкова и М. Ю. Скоркина, Биофизика **59** (2), 310 (2014).
15. J. Evans, W. Gratzner, N. Mohandas, et al., Biophys. J. **94** (10), 4134 (2008).
16. D. E. Pafundo, C. I. Alvarez, C. A. Krumschnabel, and P. J. Schwarzbaum, J. Biol. Chem. **285**, 6134 (2010).
17. A. Kusumi, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure **34**, 351 (2005).
18. K. Kaczmarek-Hájek, E. Lőrinczi, R. Hausmann, and A. Nicke, Purinergic Signal. **8** (3), 375 (2012).
19. S. N. Orlov, Purinergic Signal. **3** (3), 231 (2007).
20. X. Qian and L. Wen-jun, Cell Biochem. Biophys. **67** (3), 1473 (2013).
21. T. Bose, A. Cieslar-Pobuda, and E. Wiechec, Cell Death Disease **6** (2), 101 (2015).

Change of Electrical Properties of Formed Blood Elements under *in vitro* Mechanical Stress

E.A. Sladkova

Belgorod National Research University, ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015 Russia

In the present study, electrical properties of blood cells were studied by modelling *in vitro* mechanical stress. An increase in the concentration of ATP molecules in the intercellular space in response to the mechanical effect of moving plasma layers both in the blood of healthy people and patients with acute lymphoblastic leukemia has been shown. It has been established that the surface potential of red blood cells and platelets becomes more positive both in the blood of healthy people and patients with leukemia. On the contrary, lymphocytes are characterized by a decrease in the negative charge in healthy people, and its increase in the blood of patients with acute lymphoblastic leukemia in response to mechanical stress.

Keywords: mechanical stress, purinergic signaling system, surface potential, lymphocytes, red blood cells, platelets