

## ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА

© 2019 г. Е.А. Сладкова, Е.А. Шамрай, А.Ю. Тищенко, М.Ю. Скоркина

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

E-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 28.02.2019 г.

После доработки 14.04.2019 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

Изучены биофизические свойства лимфоцитов в условиях механической деформации клеток крови. Модель механического «стресса» *in vitro* позволяет активировать элементы пуриnergической сигнальной системы форменных элементов крови посредством АТФ-зависимых рецепторов. Установлено, что в условиях механического стресса уровень АТФ в крови увеличился в 2,3 раза по сравнению с контролем, заряд клеточной поверхности лимфоцитов снижается, жесткость увеличивается, а сила адгезии между лимфоцитом и эритроцитом возрастает. Полученные данные указывают на участие молекулы АТФ в регуляции биофизических свойств плазмалеммы лимфоцитов, что, в свою очередь, может приводить к изменению рецепторных комплексов на поверхности иммунокомпетентных клеток.

*Ключевые слова:* механический стресс, пуриnergическая сигнальная система, поверхностный потенциал, адгезия, модуль Юнга, лимфоциты.

DOI: 10.1134/S0006302919040094

В микроциркуляторном сосудистом русле форменные элементы крови подвергаются силовому воздействию со стороны смещающихся слоев движущейся плазмы. В результате чего клетки претерпевают так называемый механический «стресс» [1]. Показано, что эритроциты в условиях механической деформации освобождают молекулы аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), которые в результате взаимодействия с эндонуклеотидазами [2] образуют лиганды для пуриnergических рецепторов, локализованных на различных клеточных популяциях, в том числе и на лимфоцитах. В ряде работ показано, что на плазмалемме лимфоцитов присутствуют рецепторы пуриnergической сигнальной системы двух типов – P2X и P2Y [3], которые реагируют на экзогенные молекулы АТФ, что приводит к усилению притока ионов  $Ca^{2+}$  через мембранные каналы [2]. Кроме того, сама стимуляция P2X- и P2Y-рецепторов лимфоцитов способна вызвать высвобождение внутриклеточного АТФ через каналы, образованные паннексин-1 [4]. Эффектом такого процесса являются изменения продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками [5]. В связи с этим актуальным является изучение вопросов, связанных с изменением биофизических

свойств плазмалеммы (жесткость, заряд, адгезия) лимфоцитов в условиях активации пуриnergической сигнальной системы посредством механического стресса.

Цель работы – изучить изменение биофизических свойств лимфоцитов в условиях механического стресса.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на крови здоровых людей ( $n = 30$ ) зрелого возраста (36–59 лет), проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы Белгорода. Забор крови проводили путем венепункции с участием специализированного медперсонала. Кровь собирали в вакуумные пробирки Vacuette K3E, содержащие сухую ЭДТА·K<sub>3</sub> в концентрации 2,0 мг (0,006843 моль/литр) на 1 мл крови.

Каждую пробу крови делили на две части – контрольную и опытную. Опытные пробы крови подвергали механическому стрессу. Механический стресс *in vitro* моделировали согласно методу, описанному в работе [6]. Для этого 500 мкл цельной крови набирали в одноразовый туберкулиновый шприц с внутренним диаметром 4 мм (SF-Medical, Германия). Воздушные пузырьки при этом были тщательно удалены. Суспензию клеток

Сокращения: АТФ – аденозинтрифосфорная кислота.

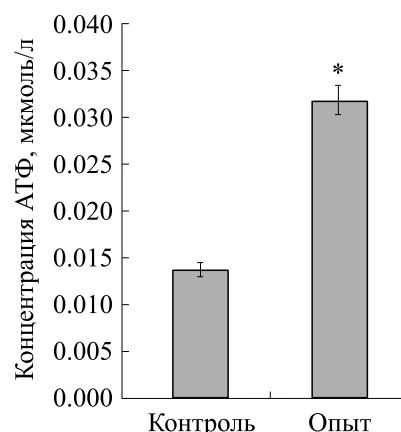
пропускали через одноразовую иглу 25-го калибра (длина 30 мм и внутренний диаметр 0,5 мм). Прохождение крови через иглу осуществляли путем размещения груза массой 1 кг на верхнем конце вертикально закрепленного поршня шприца. Кровь собирали в одноразовые пяти миллилитровые полипропиленовые центрифужные пробирки. Расстояние от конца иглы до дна пробирки составляло 15 мм. В опытных и контрольных пробах измеряли концентрацию АТФ колориметрическим методом [7].

Лейкоциты из цельной крови в опытных и контрольных пробах выделяли путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин. Затем из полученной суспензии лейкоцитов с помощью магнита для клеточной сепарации EasySep Magnet и набора для выделения лимфоцитов EasySep/EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell Technologies, Канада) выделяли популяцию лимфоцитов.

Жесткость плазмалеммы клеток крови оценивали по числовым данным модуля Юнга. В основе метода регистрации модуля Юнга лежит измерение степени деформации поверхности образца при взаимодействии его с вершиной зонда атомно-силового микроскопа [8]. В работе использованы модифицированные зонды, изготовленные коллективом авторов на основе полимерных микросфер с радиусом закругления 5 мкм. Измерение модуля Юнга осуществляли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT MDT, Зеленоград, Россия). Измерения выполнены в режиме силовой спектроскопии согласно способу, изложенному в работе [9]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток.

Электрические свойства мембраны лимфоцитов оценивали, выполняя измерения поверхностного потенциала в режиме зонда Кельвина на атомно-силовом микроскопе. Суспензию клеток для измерения поверхностного потенциала и процедуру измерения осуществляли согласно алгоритму, описанному в работе [10]. Использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Из каждой пробы сканировали по 20 лимфоцитов, проводили обработку полученных сканов в программе Nova (NT-MDT, Зеленоград, Россия).

Для измерения сил адгезии между эритроцитом и лимфоцитом конструировали биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (США) согласно способу, изложенному в работе [11]. Выбор эритроцита в качестве биосенсора основан на идее о том, что в микроциркуляторном русле популяция эритроцитов самая многочисленная и активно взаимодействует с другими клетками крови. Силу



Концентрация АТФ в крови: опыт – под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль – интактная кровь. \* – Статистически значимые различия между показателями в опытной и контрольной группах по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

межклеточной адгезии измеряли в системе «эритроцит-лимфоцит», регистрируя силовые кривые с поверхности 20 клеток. Силы адгезии рассчитывали с помощью программного обеспечения Nova.

Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента при  $p < 0,05$  с учетом нормального распределения данных. В работе приведены средние величины ( $M$ ) и величины статистической ошибки среднего ( $m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях механической деформации клеток крови *in vitro* установлено увеличение концентрации АТФ в крови в 2,3 раза по сравнению с контролем (рисунок).

При активации элементов пуринаргической сигнальной системы произошло изменение биофизических свойств плазмалеммы лимфоцитов. Модуль Юнга, характеризующий жесткость поверхности клеток, увеличился на 26% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (таблица).

В опытных пробах крови потенциал поверхности лимфоцитов стал более отрицательный – снизился на 27% ( $p < 0,05$ ), что сопровождается увеличением адгезивной активности в системе «эритроцит-лимфоцит» на 49,7% ( $p < 0,05$ ; таблица).

В представленной работе изучено влияние силового воздействия *in vitro*, моделирующего механического стресс клеток крови в микроциркуляторном сосудистом русле, на биофизические свойства плазмалеммы лимфоцитов. Установлено, что в условиях механической деформации

**Таблица 1.** Биофизические свойства клеточной поверхности лимфоцитов

Показатели	Контроль	Опыт
Сила адгезии в системе “эритроцит-лимфоцит”, нН	35.9 ± 0.2	71.5 ± 0.8*
Модуль Юнга лимфоцитов, мкПа	9.16 ± 0.01	11.56 ± 0.02*
Потенциал поверхности лимфоцитов, мВ	-19.72 ± 0.23	-27.15 ± 0.32*

клеток крови происходит выделение в межклеточное пространство молекул АТФ, что согласуется с данными работы [12].

Показано, что эффекты экзогенного АТФ заключались в изменении биофизических свойств клеточной поверхности лимфоцитов – снижении поверхностного потенциала плазмалеммы и увеличении ее жесткости, а также возрастании силы адгезии между лимфоцитом и эритроцитом. Изменение биофизических свойств клеточной поверхности может быть связано с активацией пуринергической сигнальной системы, рецепторы которой запускают целый каскад сигнальных реакций посредством механизма аутокринной обратной связи [13].

В ряде работ описаны рецепторы P2X семейства, локализованные на поверхности лимфоцитов, взаимодействие молекул АТФ с этими рецепторами влечет за собой открытие Ca<sup>2+</sup>-ионных каналов [14]. Молекулярный механизм реализации данного пути может быть связан с работой фосфолипазы С, которая активирует фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат, а он, в свою очередь, мобилизует внутриклеточный Ca<sup>2+</sup> [15], что согласуется с установленным изменением потенциала поверхности лимфоцитов.

Показанное в нашем исследовании увеличение жесткости и адгезии клеточной поверхности лимфоцитов может быть связано с функциональной активностью рецепторного комплекса иммунокомпетентных клеток и реализацией ими сигнальных каскадов. Так, в работе [16] был описан механизм двойного эффекта стимуляции рецепторов P2X7, зависящий от уровня их экспрессии на поверхности лимфоцитов. Стимуляция рецепторов P2X7 молекулами АТФ приводит к запуску MAPK-сигнальных путей и усилению транскрипции гена IL-2 [17], в то время как при избыточной экспрессии рецепторов P2X7 на поверхности лимфоцитов активация их АТФ может инициировать митоптоз, с последующей интоксикацией и гибелью клетки [16].

Таким образом, установлено увеличение концентрации АТФ в крови и изменение биофизических свойств лимфоцитов в условиях механиче-

ского стресса *in vitro*. При активации пуринергической сигнальной системы посредством механической деформации клеток крови увеличилась жесткость плазмалеммы лимфоцитов, в то же время клеточная поверхность приобрела более выраженный отрицательный заряд, что в итоге способствовало увеличению сил адгезии в системе «эритроцит-лимфоцит». Полученные данные указывают на важную роль молекулы АТФ и ее производных в регуляции работы лимфоцитов через связывание с рецепторами P2-семейства. Исследование изменений биофизических свойств лимфоцитов при активации пуринергической сигнальной системы позволит установить новые эффекты пуриновых соединений в иммунных реакциях. В том числе, полученные результаты могут быть учтены при поиске и разработке лигандов, селективных к P2-рецепторам, для терапии воспалительных заболеваний.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Sprague, A. Stephenson, and M. Ellworth, Trends Endocrin. Metabol. **18** (9), 350 (2007).
2. N. Montalbetti, M. F. L. Denis, O. P. Pignataro, et al., J. Biol. Chem. **286** (44), 38397 (2011).
3. D. H. Lee, K. S. Park, I. D. Kong, et al., BMC Immunol. **7**, 22 (2006).
4. T. Woehrle, L. Yip, M. Manohar, et al., J. Leukoc. Biol. **88** (6), 1181 (2010).
5. L. Yip, T. Woehrle, R. Corriden, et al., FASEB J. **23** (6), 1685 (2009).
6. T. Oonishi, K. Sakashita, and N. Uyesaka, J. Physiol. Soc. **273**, 1828 (1997).
7. Т. Л. Алейникова и Г. В. Рубцова, *Руководство к практическим занятиям по биохимии* (Высш. шк., М., 1988).
8. J. L. Alonso and W. H. Goldman, Life Sci. **72**, 2553 (2003).
9. М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, А. В. Муравьев и др. Клет. техн. в биол. и мед. **3**, 172 (2012).
10. Е. А. Сладкова и М. Ю. Скоркина, Биофизика **59** (2), 310 (2014).

11. М. Ю. Скоркина, Е. А. Шамрай и Е. А. Сладкова, Клет. техн. в биол. и мед. **4**, 213 (2017).
12. J. Evans, W. Gratzel, N. Mohandas, et al., Biophys. J. **94** (10), 4134 (2008).
13. W. G. Junger, Nat. Rev. Immunol. **11** (3), 201 (2011).
14. R. A. North, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **371** (1700), 20150427 (2016).
15. J. Meshki, F. Tuluc, O. Bredeteau, et al., Purinergic Signal. **2** (3), 537 (2006).
16. E. Adinolfi, M. G. Callegari, D. Ferrari, et al., Mol. Biol. Cell. **16** (7), 3260 (2005).
17. T. Woehrle, L. Yip, M. Manohar, et al., J. Leukoc. Biol. **88** (6), 1181 (2010).

## Changes in Biophysical Properties of Lymphocytes under Mechanical Stress

E.A. Sladkova, E.A. Shamray, A.Yu. Tishchenko, and M.Yu. Skorkina

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

The biophysical properties of lymphocytes under mechanical deformations were investigated. An in vitro model of mechanical “stress” provides a means to activate components of the purinergic signaling system of blood cells through the ATP-dependent receptors. It was established that under mechanical stress, the level of ATP in blood increased 2.3 times against control, cell surface charge of lymphocytes decreases, stiffness increases, and the strength of adhesion between lymphocytes and erythrocytes becomes stronger. Our findings indicate that the ATP molecules are involved in the regulation of biophysical properties of the plasma-membrane of lymphocytes that, in turn, may lead to a change in the receptor complexes on the surfaces of the immunocompetent cells.

*Keywords: mechanical stress, purinergic signaling system, surface potential, adhesion, Young's modulus, lymphocytes*