

ОСОБЕННОСТИ БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*

© 2020 г. Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина

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

E-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 21.04.2020 г.

Принята к публикации 20.05.2020 г.

Изучены особенности биофизических свойств форменных элементов крови людей пожилого возраста в условиях механического стресса *in vitro*, который, согласно литературным данным, запускает сигнальный каскад пуриnergической рецепторной системы. Установлено, что жесткость клеточной поверхности эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов при этом снизилась, а потенциал поверхности стал более положительным. Полученные экспериментальные данные могут играть роль в расширении знаний о влиянии механической деформации на лейкоциты и тромбоциты, которые являются основными регуляторами гомеостатических процессов в микроциркуляторном русле, так и на эритроциты, участвующие в регуляции сосудистого тонуса артериол и оксигенации тканей у лиц пожилого возраста.

Ключевые слова: механический стресс, пуриnergическая сигнальная система, форменные элементы крови, потенциал поверхности, модуль Юнга.

DOI: 10.31857/S0006302920060101

Старение организма в преобладающем большинстве случаев сопровождается развитием сердечно-сосудистых заболеваний, во многом обусловленных молекулярно-клеточными возрастными изменениями эндотелия [1], а также реологических показателей крови [2]. Подобные нарушения могут быть связаны с изменением в функционировании пуриnergических рецепторов форменных элементов крови и клеток эндотелия. В ряде исследований приведены данные о значительной роли пуриnergической сигнализации в развитии различных сердечно-сосудистых патологий – инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, гипертензии, инсульта, тромбоза [3]. Кроме того, у людей пожилого и старческого возраста значительно повышается вероятность развития инфекционных заболеваний. В первую очередь это связано со снижением функциональной активности иммунной системы. Важную роль в механизмах старения иммунной системы играет пуриnergическая регуляция иммунокомпетентных клеток, отвечающих за воспалительные реакции в организме [4].

Было показано, что в условиях механической деформации эритроциты высвобождают молеку-

лы АТФ [5], в результате чего запускаются пара- и аутокринные сигнальные механизмы [6]. В межклеточном пространстве молекула АТФ распадается до АДФ, АМФ и аденозина [7], которые являются агонистами пуриnergических рецепторов, широко представленных на форменных элементах крови.

В связи с вышеизложенным целью работы явилось изучение особенностей биофизических свойств форменных элементов крови людей пожилого возраста в условиях механического стресса *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на крови здоровых людей-добровольцев пожилого возраста (от 60 до 75 лет, $n = 30$), проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы г. Белгорода. Забор крови осуществляли из локтевой вены с участием специализированного медперсонала.

Модель механического стресса *in vitro* осуществляли согласно методике, описанной в работе [8]. Данная модель позволяет создать условия, которые максимально приближены к физиологическим параметрам микроциркуляторного русла

Сокращение: АСМ – атомно-силовая микроскопия.

[9]. В одноразовый туберкулиновый шприц (объемом 1 мл) помещали 0.5 мл цельной крови, пузырьки воздуха были тщательно убраны. Затем суспензию клеток пропускали через 25-миллиметровую одноразовую иглу. Инъекцию выполняли путем размещения груза массой 1 кг на верхнем конце внутреннего поршня шприца, который был закреплен вертикально. Выпрыскивали кровь в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл. Расстояние от кончика иглы до дна пробирки составляло 15 мм, напряжение сдвига стенки находилось в пределах 6600 дин/см^2 . Средняя скорость в игле достигала 5100 см/с , а время прохождения форменных элементов равнялось 0.6 мс. Следовательно, клетки подвергались воздействию относительно высокого напряжения в течение очень короткого времени. Опытные пробы крови подвергали механическому стрессу, контрольные оставляли без воздействия.

С целью оценки концентрации макроэргических соединений при проведении механического стресса *in vitro* измеряли их содержание в исследуемых пробах колориметрическим методом [10], используя фотометр КФК-3 (ЗОМЗ, Сергиев Посад, Россия). Концентрацию соединений рассчитывали по разности оптических плотностей содержимого пробирки, в которой провели гидролиз фосфатных связей, и пробой без гидролиза фосфатных связей, используя для этого калибровочный график. 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 концентрации макроэргических соединений выполняли в трех повторностях для каждой пробы.

Цельную кровь разделяли на эритроцитарную, лейкоцитарную и тромбоцитарную массы путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирали плазму, обогащенную тромбоцитами, и дополнительно центрифугировали при 2500 об/мин в течение 15 мин, при этом получали чистую взвесь тромбоцитов. 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 Technologies, США) разделяли на гранулоциты и лимфоциты.

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, Зеленоград, Россия). Электрические свойства мембраны эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов оценивали, выполняя на АСМ измерения поверх-

ностного потенциала в режиме зонда Кельвина. Готовили суспензию клеток для измерения поверхностного потенциала и осуществляли процедуру его измерения согласно способу, изложенному в работе [11]. Для работы использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Из каждой пробы сканировали по 20 клеток каждой популяции, обработку полученных сканов проводили в программе Nova (NT-MDT, Зеленоград, Россия).

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 [12]. Измерение модуля Юнга осуществляли на АСМ ИНТЕГРА Вита в режиме силовой спектроскопии, согласно алгоритму, описанному в работе [13]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток каждой популяции.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента при $p < 0.05$ и нормальном распределении. В работе приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки среднего (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании сдвиговой деформации клеток крови концентрация макроэргических соединений в крови составила $0.021 \pm 0.001 \text{ мкмоль/л}$, что в 2.6 раза выше по сравнению с контролем ($0.008 \pm 0.001 \text{ мкмоль/л}$).

В условиях механического стресса показано изменение биофизических свойств форменных элементов крови. Так, потенциал поверхности эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов стал более положительным – увеличился соответственно на 30, 32.2, 27.5 и 54.3% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

При механическом воздействии на клетки модуль Юнга форменных элементов крови людей пожилого возраста снизился: эритроцитов на 22% ($p < 0.05$), гранулоцитов на 19% ($p < 0.05$), лимфоцитов на 23% ($p < 0.05$) и тромбоцитов на 40% ($p < 0.05$) по сравнению со значениями в контроле (табл. 2).

В нашем исследовании воспроизведены условия механического «стресса» *in vitro*, которые, согласно литературным данным, могут быть приближены к физиологическим характеристикам

Таблица 1. Потенциал поверхности форменных элементов крови

Клеточная популяция	Контроль, мВ	Опыт, мВ
Эритроциты	-15.2 ± 0.8	$-10.7 \pm 1.2^*$
Гранулоциты	-25.8 ± 1.2	$-17.5 \pm 0.6^*$
Лимфоциты	-39.6 ± 0.2	$-28.7 \pm 0.3^*$
Тромбоциты	-16.2 ± 1.3	$-7.4 \pm 1.1^*$

Примечание. * – Статистически значимые различия между показателями по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

Таблица 2. Модуль Юнга форменных элементов крови

Клеточная популяция	Контроль, мВ	Опыт, мВ
Эритроциты	4.2 ± 0.01	$3.3 \pm 0.01^*$
Гранулоциты	6.3 ± 0.01	$5.1 \pm 0.01^*$
Лимфоциты	4.7 ± 0.02	$3.6 \pm 0.01^*$
Тромбоциты	4.5 ± 0.03	$2.7 \pm 0.02^*$

Примечание. * – Статистически значимые различия между показателями по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

микроциркуляторного русла и способствуют активации пуринергической сигнальной системы форменных элементов крови [8, 9, 14, 15]. В пробах крови, подвергшихся механическому «стрессу», установлено повышение концентрации макроэргических соединений в 2.6 раза, что может быть связано с экскрецией эритроцитами молекул АТФ в межклеточное пространство в ответ на силовое воздействие со стороны смещающихся слоев плазмы [1].

Влияние механического стресса наблюдали в изменении биофизических свойств форменных элементов периферической крови людей пожилого возраста. В частности, увеличение заряда мембраны и снижение жесткости эритроцитов может быть связано с воздействием таких макроэргических соединений, как АТФ и ее производных на P2Y₁₃-рецепторы на клеточной поверхности за счет изменения работы ионных каналов, селективных по отношению к Ca²⁺ [16]. Активация этих рецепторов на мембране эритроцита может сопровождаться не только изменениями их функций, но и морфологии клетки, ионного состава цитоплазмы и состояния белков цитоскелета [17]. Аналогичный механизм изменения биофизических свойств под действием макроэргических соединений может быть характерен и для лимфоцитов. На поверхности этих клеток локализованы рецепторы семейства P2X, которые представляют собой мембранные ионные каналы [18], контролируемые концентрацию цитозольного Ca²⁺ [19].

При повышении концентрации макроэргических молекул наблюдали также снижение жесткости и увеличение поверхностного потенциала

плазмалеммы гранулоцитов. Рядом работ показано, что рецепторы к пуриновым соединениям на поверхности гранулоцитов, доминирующими подтипами которых являются P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ и P2Y₁₁ [20], необходимы для ориентации клеток и движения в ответ на хемотаксические стимулы [19, 21]. Важным моментом в нашем исследовании является установление повышения заряда поверхности тромбоцитов, возможно посредством связывания продуктов распада макроэргических соединений с P2Y-рецепторами тромбоцитов [20]. Известно, что тромбоциты принимают активное участие в формировании внеклеточных ловушек нейтрофилов. Так, увеличение поверхностного потенциала как гранулоцитов, так и тромбоцитов может ухудшать процессы взаимодействия между собой их поверхностей, что в свою очередь приведет к снижению воспалительного ответа иммунокомпетентными клетками в крови людей пожилого возраста.

Таким образом, при моделировании механического стресса *in vitro* показано увеличение концентрации макроэргических соединений в крови людей пожилого возраста. Вместе с тем под влиянием механического стресса произошло снижение модуля Юнга и увеличение заряда плазмалеммы у всех четырех популяций форменных элементов крови. Полученные экспериментальные данные играют важную роль в расширении знаний о влиянии механической деформации на лейкоциты и тромбоциты, которые являются основными регуляторами гомеостатических процессов в микроциркуляторном русле, и на эритроциты, участвующие в регуляции реологических показателей и снабжении тканей кислородом.

Дальнейшее изучение морфологии и функциональных свойств форменных элементов крови в условиях сдвиговой деформации мембран может дать возможность подойти к решению проблем по коррекции патологических состояний (нарушение иммунных реакций, нарушение микроциркуляции в сосудистом русле, прогрессирующие сердечно-сосудистых патологий), сопровождающих старение организма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда 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

Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации, было получено информированное согласие всех субъектов эксперимента в соответствии с рекомендациями (Декларация по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52-й Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь 2000 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Olivieri, M. Pala, and F. Gandini, PLoS One **8** (7), 34 (2013).
2. Е. В. Узикова, М. Ю. Милорадов и В. Н. Левин, Ярославский педагогич. вестн. **3** (3), 108 (2011).
3. G. Burnstock, Keio J. Med. **62**, 63 (2013).
4. D. Erlinge and G. Burnstock, Purinergic Signalling **1**, 1 (2008).
5. R. Sprung, R. Sprague, and D. Spence, Anal. Chem. **74** (10), 2274 (2002).
6. A. Baroja-Mazo, H. Barbera-Gremades, and P. Pelegrini, Biochim. Biophys. Acta **1828** (1), 79 (2013).
7. G. G. Yegutkin, Biochim. Biophys. Acta **1783** (5), 673 (2008).
8. T. Oonishi, K. Sakashita, and N. Uyesaka, Am. J. Physiol. Soc. **273**, 1828 (1997).
9. A. Trautmann, Sci. Signal. **2** (56), ре6 (2009).
10. Т. Л. Алейникова и Г. В. Рубцова, *Руководство к практическим занятиям по биохимии* (Высшая школа, М., 1988).
11. Е. А. Сладкова и М. Ю. Скоркина, Биофизика **59** (2), 310 (2014).
12. М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, Е. А. Сладкова и Н. А. Забиняков, Патент РФ № 2466401, Бюл. № 31. Опубликовано 10.11.2012.
13. М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, А. В. Муравьев и др., Клет. технол. в биол. и мед. **3**, 172 (2012).
14. M. Ellworth, C. Ellis, and D. Goldman, Physiology **24**, 107 (2009).
15. J. Evans, W. Gratzner, N. Mohandas, and K. Parker, J. Sleep, Biophys. J. **94**(10), 4134 (2008).
16. D. H. Lee, K. S. Park, I. D. Kong, et al., BMC Immunol. **7**, 22 (2006).
17. L. Wang, G. Olivercrona, and M. Götberg, Circ. Res. **96** (2), 189 (2005).
18. R. A. North, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **371** (1700), 20150427 (2016).
19. W. G. Junger, Nat. Rev. Immunol. **11** (3), 201 (2011).
20. E. R. Lazarowski, Purinergic Signalling **8**, 359 (2012).
21. M. D. Ita and M. H. Vargas, Life Sci. **145** (5), 85 (2016).

Peculiarities of Biophysical Properties of the Formed Elements in the Blood of the Elderly under Mechanical Stress *in vitro*

E.A. Sladkova and M.Yu. Skorkina

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

This study explores the peculiarities of biophysical properties in blood cells of the elderly under mechanical stress, applied *in vitro*, which, according to the literature data, triggers the signaling pathways engaged by purinergic receptor activation. Along with it, we detected a decrease in the stiffness of the cell surface of red blood cells, granulocytes, lymphocytes and platelets and the surface potential became more positive. Our findings could increase knowledge about the effect of mechanical deformation on leukocytes and platelets, which are the main regulators of homeostatic processes in the microvasculature, and on red blood cells involved in the regulation of vascular tone of arterioles and tissue oxygenation in the elderly.

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