

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОМЕМБРАН ГРАНУЛОЦИТОВ
В НОРМЕ И У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА (*in vitro*)¹**

М.Ю. Скоркина* ORCID: [0000-0002-9441-5295](https://orcid.org/0000-0002-9441-5295)

Е.А. Сладкова* ORCID: [0000-0003-3072-2402](https://orcid.org/0000-0003-3072-2402)

Н.И. Жернакова* ORCID: [0000-0001-7648-0774](https://orcid.org/0000-0001-7648-0774)

М.Ю. Пальчиков* ORCID: [0000-0002-2426-1307](https://orcid.org/0000-0002-2426-1307)

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
(г. Белгород)

Функциональные свойства биологических мембран, такие как жесткость, заряд, адгезия, во многом определяют иммунорегуляторную активность гранулоцитарной популяции лейкоцитов. Целью работы явилось изучение функциональных (механических, адгезивных и электрических) свойств биомембран гранулоцитов в группе здоровых людей и больных острым лимфобластным лейкозом на модели механического стресса *in vitro*. В качестве естественной модели опухолевого процесса выбран острый лимфобластный лейкоз, при котором в системе крови повреждается лимфоидное звено адаптивного иммунитета и циркулируют бласты. С использованием модели механического стресса изучено влияние элементов пуринергической сигнальной системы на функциональные свойства биомембран гранулоцитов. Установлено повышение концентрации аденозинтрифосфата (АТФ) в крови под влиянием механического стресса: у здоровых людей – в 2,3 раза, у больных лейкозом – в 1,8 раза по сравнению с интактными пробами. В условиях механической деформации клеток крови в группе здоровых людей жесткость и заряд клеточной поверхности снизились соответственно на 16,8 % ($p < 0,05$) и 47 % ($p < 0,05$), при этом сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом увеличилась на 18 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными пробами. В пробах крови больных острым лимфобластным лейкозом жесткость поверхности снизилась на 54,4 % ($p < 0,05$), сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом увеличилась на 30,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными пробами. Таким образом, результаты исследования позволяют рассматривать молекулу АТФ как паракринный регуляторный элемент в межклеточной сигнализации. Полученные экспериментальные данные могут быть применены в области физиологии микроциркуляции для изучения механизмов взаимодействия между клетками крови в норме и при развитии лейкоза.

Ключевые слова: гранулоциты, механический стресс, функциональные свойства биомембран, атомно-силовая микроскопия, острый лимфобластный лейкоз.

¹Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-015-00032\19.

Ответственный за переписку: Скоркина Марина Юрьевна, адрес: 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85; e-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Для цитирования: Скоркина М.Ю., Сладкова Е.А., Жернакова Н.И., Пальчиков М.Ю. Изменение функциональных свойств биомембран гранулоцитов в норме и у больных острым лимфобластным лейкозом при моделировании механического стресса (*in vitro*) // Журн. мед.-биол. исследований. 2020. Т. 8, № 2. С. 157–165. DOI: 10.37482/2542-1298-Z006

Иммунорегуляторная активность гранулоцитарной популяции лейкоцитов во многом зависит от функциональных свойств их плазмалеммы. В частности, взаимодействия между нейтрофилами и другими иммунными клетками регулируют воспалительные процессы [1], онкогенез [2], кооперации с Т-клетками путем представления им противоопухолевых антигенов [3, 4]. Кроме того, гранулоциты рекрутируют и активируют Т-клетки посредством секреции соответствующих цитокинов [5]. Особую роль в высвобождении провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 β , играют пуринергические рецепторы семейства P2X. Открытие P2X-рецепторов – ионных каналов – запускает молекула аденозинтрифосфата (АТФ) [6]. Подтипы рецепторов семейства P2X, в частности P2X7, участвуют в организации воспаления [7, 8] и функционировании раковых клеток [9]. В связи с этим актуально изучение влияния пуринергической сигнализации на функциональные свойства мембран гранулоцитов в норме и при развитии острых лейкозов, которые характеризуются циркуляцией в русле лейкоэмических клонов клеток с измененными биофизическими свойствами клеточных мембран [10].

Цель работы – изучить функциональные (механические, адгезивные и электрические) свойства биомембран гранулоцитов у здоровых людей и больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) на модели механического стресса *in vitro*. В качестве естественной модели опухолевого процесса выбран ОЛЛ, при котором в системе крови повреждается лимфоидное звено адаптивного иммунитета и циркулируют бласты. В этой ситуации гранулоциты являются полноценными клетками, поддерживающими реализацию иммунных реакций в микроциркуляторном русле и непосредственно участвующими в межклеточных коммуникациях как со здоровыми, так и опухолевыми клетками крови.

Материалы и методы. В эксперименте использована кровь больных ОЛЛ ($n = 30$), которая получена из гематологического отделения Белгородской областной клинической

больницы Святителя Иоасафа (БОКБ). Возраст пациентов – 18–45 лет. Забор венозной крови был проведен у всех пациентов, прошедших стандартный курс химиотерапии. В крови отсутствовали бластные формы лимфоцитов. В качестве группы сравнения взята кровь здоровых людей ($n = 30$) в возрасте 20–45 лет, проходивших диспансеризацию на базе БОКБ. Взятие крови проводили из вены при непосредственном участии медицинских работников. Кровь собирали в вакуумные пробирки (Vacuette K3E), содержащие в качестве антикоагулянта сухую 3-замещенную калиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА К₃) в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови (0,006843 моль/л). Исследования выполнены в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации. Перед экспериментом получено предварительное информированное согласие участников.

Пробы крови из каждой исследуемой группы делили на две части – контрольную и опытную. С целью активации элементов пуринергических сигнальных путей в эксперименте использована инъекционная модель механического стресса *in vitro*, описанная в работе [11]. Данная модель выбрана для создания условий, которые максимально приближены к физиологическим параметрам микроциркуляторного русла [12]: 0,5 мл цельной крови помещали в одноразовый туберкулиновый шприц объемом 1 мл; пузырьки воздуха были тщательно убраны. Затем суспензию клеток пропускали через 25-миллиметровую одноразовую иглу. Инъекцию выполняли путем размещения веса в 1 кг на верхнем конце внутреннего поршня шприца, который был закреплен вертикально. Кровь выпрыскивали в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл. Расстояние от кончика иглы до дна пробирки составило 15 мм, напряжение сдвига стенки находилось в пределах 6600 дин/см². Средняя скорость в игле достигала 5100 см/с, а время прохождения форменных элементов составило 0,6 мс. Следовательно, клетки подвергались воздействию относительно высокого напряже-

ния в течение очень короткого времени. Опытные пробы крови подвергались механическому стрессу, контрольные – оставались интактными.

В опытных и контрольных пробах измеряли концентрацию АТФ, используя фотоэлектрический фотометр КФК-3 (Россия) при длине волны 670 нм против физиологического раствора. Использовали колориметрический метод количественного определения макроэргических соединений, измерения проводили в трех повторностях для каждой пробы. Концентрацию АТФ определяли при проведении цветной реакции с молибдатом аммония с добавлением аскорбиновой кислоты. Количество АТФ рассчитывали по разности оптических плотностей между пробирками с гидролизом фосфатных связей и без гидролиза, используя калибровочный график. Калибровочный график строили с применением раствора фосфат-ионов (ГСО 7791–2000) в концентрациях от 50 до 500 мкг/мл с шагом в 50 мкг/мл.

Функциональные свойства плазмалеммы гранулоцитов изучали с применением метода атомно-силовой микроскопии (АСМ). Упруго-эластические свойства плазмалеммы клеток крови оценивали по числовым данным модуля Юнга. Перед сканированием гранулоцитов конструировали модифицированные АСМ-зонды, приготовленные на основе типлесса и полимерных микросфер (с радиусом закругления 5 мкм) [13]. Полученные силовые кривые подвода к/отвода от клеточной поверхности использовали для вычисления силы взаимодействия зонда и образца согласно алгоритму, описанному в работе [14]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток.

Заряд мембраны гранулоцитов оценивали, осуществляя измерения потенциала поверхности (ПП) на АСМ, для чего использовали режим зонда Кельвина. Сканирование выполняли кантилеверами с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Суспензию клеток для измерения ПП готовили способом, изложенным в работе [15]. Лейкоциты крови отмывали изотоническим раствором хлорида натрия в течение 5 мин. Фиксацию

осуществляли 0,25 %-м раствором глутарового альдегида в течение 20 мин. Далее суспензию гранулоцитов дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия по 5 мин и готовили препараты на обезжиренной металлической подложке. Из каждой пробы сканировали по 20 гранулоцитов. Обработку полученных сканов проводили в программе Nova (NT-MDT, Россия, г. Зеленоград). ПП рассчитывали в 10 участках поверхности с помощью инструмента «Point Instruments».

Измерение сил межклеточной адгезии выполняли на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Конструировали биосенсорный чип на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (США) способом, изложенным в работе [16]. Выбор эритроцита в качестве биосенсора основан на том факте, что в микроциркуляторном русле популяция эритроцитов самая многочисленная и активно взаимодействует с другими клетками крови, более того – клеточная поверхность эритроцита несет множество антигенных детерминант, которые могут быть представлены для распознавания лейкоцитам при контакте плазмалемм. Силу межклеточной адгезии измеряли между эритроцитом и гранулоцитом, регистрируя силовые кривые с поверхности 20 клеток. На основе полученных силовых кривых рассчитывали силы адгезии с помощью программного обеспечения Nova.

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.

Функциональные свойства поверхности гранулоцитов в контрольных пробах. Первоначально в исследовании проанализированы отличия функциональных свойств биомембран гранулоцитов в контрольных пробах здоровых

людей и больных ОЛЛ на стадии лечения. Модуль Юнга клеточной поверхности гранулоцитов больных ОЛЛ оказался снижен на 74,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным параметром в группе здоровых людей. Потенциал поверхности гранулоцитов больных ОЛЛ был выше на 50,6 % ($p < 0,05$), а сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом – на 37,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с данными группы здоровых людей (см. таблицу).

Таким образом, при развитии ОЛЛ функциональные свойства плазмалеммы гранулоцитов

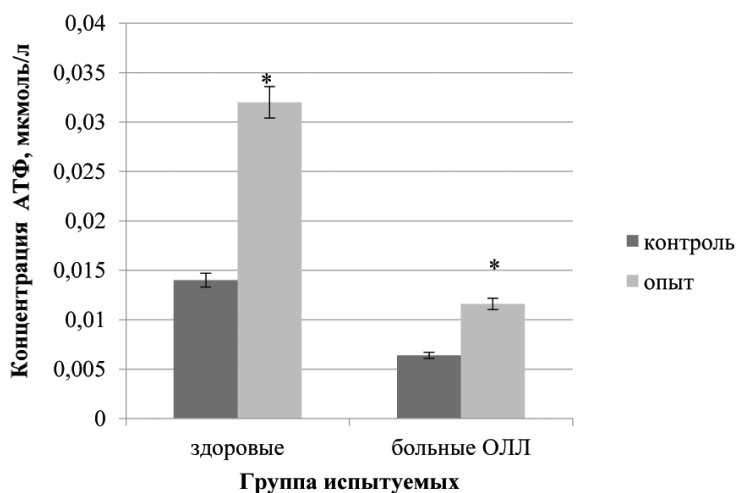
существенно изменены: жесткость поверхности снижена, при этом заряд и адгезивная активность увеличены по сравнению с аналогичными клетками здоровых людей.

Функциональные свойства поверхности гранулоцитов в условиях стимуляции элементов пуриnergических сигнальных путей. При моделировании механического стресса *in vitro* установлено увеличение концентрации АТФ как в группе здоровых людей, так и у больных ОЛЛ (см. рисунок): в опытных пробах крови здоровых людей концентрация АТФ возросла в

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОМЕМБРАН ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*

Параметр	Здоровые люди		Больные ОЛЛ	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Модуль Юнга, мПа	4,16±0,01	3,56±0,02*	2,38±0,01^	1,54±0,01*^
Сила адгезии «эритроцит–гранулоцит», нН	35,9±0,2	43,9±1,1*	57,1±0,3^	82,5±0,6*^
Потенциал поверхности, мВ	-31,76±1,52	-46,70±4,32*	-21,08±1,70^	-24,82±1,80^

Примечание. Установлены статистически значимые различия (U -критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$) между показателями: * – опытной и контрольной групп; ^ – здоровых людей и больных ОЛЛ.



Изменение концентрации АТФ в крови здоровых людей и больных ОЛЛ при моделировании механического стресса *in vitro*: опыт – моделирование механического стресса *in vitro*; контроль – интактная кровь; * – установлены статистически значимые различия между показателями опытной и контрольной групп по U -критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$)

2,3 раза, в пробах больных ОЛЛ – в 1,8 раза по сравнению с контролем.

Под влиянием механического стресса в пробах крови как здоровых, так и больных ОЛЛ людей модуль Юнга снизился соответственно на 16,8 % ($p < 0,05$) и 54,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. таблицу).

Заряд плазмалеммы гранулоцитов в крови здоровых людей стал более отрицательным – снизился на 47 % ($p < 0,05$), что повлекло за собой увеличение силы адгезии между эритроцитом и гранулоцитом на 18 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В группе больных ОЛЛ статистически значимых различий по заряду плазмалеммы между опытной и контрольной пробам не установлено, однако сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом увеличилась на 30,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. таблицу).

Обсуждение. В ходе исследования проанализированы изменения функциональных свойств биомембран гранулоцитов в норме и при развитии патологического процесса в системе крови. Установлено, что функциональные свойства биологических мембран (жесткость, заряд, адгезия) существенно различаются между группами здоровых людей и больных ОЛЛ. Развитие ОЛЛ сопровождается снижением жесткости клеточной поверхности на фоне увеличения заряда и ее адгезивных свойств, что позволяет гранулоцитам легче деформироваться и проникать через мелкие сосуды микроциркуляторного русла. Не исключено, что в гранулоцитах больных ОЛЛ на стадии лечения под влиянием стандартных схем химиотерапии происходит реорганизация актинового цитоскелета, что существенно отражается на механических и адгезивных свойствах клеточной поверхности. Рядом работ показано, что некоторые химиотерапевтические препараты, такие как антрациклины и циклофосфамиды, инициируют высвобождение АТФ из опухолевых клеток в межклеточную среду [17]. В свою очередь, активация пуриnergических рецепторов посредством сигнальной молекулы АТФ вызывает разборку полимеризованного актина

за счет увеличения концентрации цитозольного Ca^{2+} [18], что лежит в основе динамических изменений упруго-эластических свойств клеток. С точки зрения реологии крови, снижение модуля Юнга гранулоцитов больных ОЛЛ указывает на улучшение деформационных свойств клеточной поверхности, что является важной компенсаторно-приспособительной реакцией со стороны клеток крови при циркуляции лимфобластов, способствующих формированию очагов лейкостаза в мелких сосудах.

Смоделировав условия механического «стресса» *in vitro* в эксперименте, удалось зафиксировать высвобождение молекул АТФ, подобно физиологическим процессам микроциркуляторного русла [11]. Реакция клеток крови в норме и при развитии ОЛЛ была однотипной – повышение концентрации АТФ в опытных пробах по сравнению с интактными. Однако в пробах крови больных ОЛЛ высвобождение молекул АТФ было менее интенсивным по сравнению с группой здоровых людей. Не исключено, что наблюдаемая особенность связана с химиотерапевтическими воздействиями не только на опухолевые, но и здоровые клетки крови. У лиц с ОЛЛ, смоделировав механическую нагрузку *in vitro*, мы инициировали высвобождение АТФ главным образом из эритроцитов и гранулоцитов. Согласно данным литературы, при физиологической деформации нейтрофилов в процессе прохождения клеток через узкие капилляры во время миграции на переднем крае высвобождается АТФ, что усиливает хемотаксис клеток [19]. Кроме того, известно, что при деформации эритроцитов в микроциркуляторном русле, а также при ишемии АТФ высвобождается из эритроцитов [20]. Внеклеточная молекула АТФ связывается с P2X7-рецепторами на поверхности гранулоцитов и опухолевых клеток, что в итоге приводит к активации воспалительной реакции и секреции интерлейкина- 1β , а также интерферона- γ как CD8⁺-клетками, так и нейтрофилами [21]. Кроме того, внеклеточная АТФ является мощным хемотаксическим стимулом для гранулоцитов, запускает изменение функциональных

свойств плазмалеммы, что в итоге отражается на реализации воспалительных реакций в организме [12].

Смоделировав механо-индуцированный выброс АТФ клетками крови, в эксперименте доказали однонаправленное изменение функциональных свойств биомембран гранулоцитов как в норме, так и при развитии ОЛЛ. В частности, снизились жесткость и заряд клеточной поверхности, увеличилась сила адгезии между гранулоцитом и эритроцитом. Изменение функциональных свойств клеточной плазмалеммы гранулоцитов, вероятно, связано с запуском и реализацией пуринергического сигнального каскада, что приводит к увеличению концентрации цитозольного Ca^{2+} , необходимого для ремоделирования элементов цитоскелета [22]. Данный механизм активируется посредством открытия рецептор-ионного канала P2X₄, экспрессированного на поверхности иммунных клеток и имеющего высокую проницаемость для Ca^{2+} [23]. На модели фибробластов установлено повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в ответ на механическую стимуляцию, что приводит к снижению жесткости клеточной поверхности и тканевого напряжения, вызванного растяжением ткани [24]. Кроме того, изменение

адгезивных свойств гранулоцитов и увеличение силы адгезии в системе «эритроцит–гранулоцит» как в норме, так и при развитии ОЛЛ указывают на непосредственное участие эритроцитов в усилении адгезивной функции лейкоцитов. Доказано непосредственное взаимодействие между эритроцитами и лейкоцитами («обтекание» лейкоцитов эритроцитами), которое необходимо для создания крутящего момента в процессе роллинга лейкоцитов по поверхности эндотелиальной стенки в сосудах микроциркуляторного русла [25].

Результаты исследования позволяют рассматривать молекулу АТФ как паракринный регуляторный элемент в межклеточной сигнализации. Полученные экспериментальные данные могут быть полезны при изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле в норме и при развитии лейкоза, а также могут быть учтены при разработке новых фармакологических иммунокорректоров, направленных на поддержание функциональной активности здоровой популяции лейкоцитов, осуществляющих иммунные реакции у больных ОЛЛ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. *Rosales C.* Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9. Art. № 113.
2. *Jablonska J., Lang S., Sionov R.V., Granot Z.* The Regulation of Pre-Metastatic Niche Formation by Neutrophils // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 67. P. 112132–112144.
3. *Eruslanov E.B., Bhojnagarwala P.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Ranganathan A., Deshpande C., Akimova T., Vachani A., Litzky L., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Feldman M., Albelda S.M., Singhal S.* Tumor-Associated Neutrophils Stimulate T Cell Responses in Early-Stage Human Lung Cancer // *J. Clin. Invest.* 2014. Vol. 124, № 12. P. 5466–5480.
4. *Potter N.S., Harding C.V.* Neutrophils Process Exogenous Bacteria via an Alternate Class I MHC Processing Pathway for Presentation of Peptides to T Lymphocytes // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167, № 5. P. 2538–2546.
5. *Mishalian I., Bayuh R., Eruslanov E., Michaeli J., Levy L., Zolotarov L., Singhal S., Albelda S.M., Granot Z., Fridlender Z.G.* Neutrophils Recruit Regulatory T-Cells into Tumors via Secretion of CLL 17 – a New Mechanism of Impaired Antitumor Immunity // *Int. J. Cancer.* 2014. Vol. 135, № 5. P. 1178–1186.
6. *North R.A.* P2X Receptors // *Philosoph. Trans. Soc. B.* 2016. Vol. 371. Art. № 20150427.
7. *Di Virgilio F.* P2X Receptors and Inflammation // *Curr. Med. Chem.* 2015. Vol. 22, № 7. P. 866–877.

8. Di Virgilio F., Vuerich M. Purinergic Signaling in the Immune System // *Auton. Neurosci.* 2015. Vol. 191. P. 117–123.
9. Giannuzzo A., Pedersen S.F., Novak I. The P2X7 Receptor Regulates Cell Survival, Migration and Invasion of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells // *Mol. Cancer.* 2015. Vol. 14. Art. № 203.
10. Lam W.A., Rosenbluth M.J., Fletcher D.A. Chemotherapy Exposure Increases Leukemia Cell Stiffness // *Blood.* 2007. Vol. 109, № 8. P. 3505–3508.
11. 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.
12. Trautmann A. Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a “Danger Signal” // *Sci. Signal.* 2009. Vol. 2, № 56. P. E6.
13. Патент 2466401 Рос. Федерация, МПК G01N 33/49. Способ определения упругости клеток крови: № 2011109741/15: заявл. 15.03.2011; опубл. 10.11.2012 / Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Забияков Н.А., Сладкова Е.А. 9 с.
14. 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.
15. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина // *Биофизика.* 2014. Т. 59, вып. 2. С. 310–313.
16. 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.
17. Mittal D., Gubin M.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases – Elimination, Equilibrium and Escape // *Curr. Opin. Immunol.* 2014. Vol. 27. P. 16–25.
18. Goldman N., Chandler-Militello D., Lamgevin H.M., Nedergaard M., Takano T. Purine Receptor Mediated Actin Cytoskeleton Remodeling of Human Fibroblasts // *Cell Calcium.* 2013. Vol. 53, № 4. P. 297–301.
19. Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P.A., Junger W.G. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors // *Science.* 2006. Vol. 314, № 5806. P. 1792–1795.
20. Olearczyk J.J., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S. Nitric Oxide Inhibits ATP Release from Erythrocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 309, № 3. P. 1079–1084.
21. Sistigu A., Yamazaki T., Vacchelli E., Chaba K., Enot D.P., Adam J., Vitale I., Goubar A., Baracco E.E., Remédios C., et al. Cancer Cell-Autonomous Contribution of Type I Interferon Signaling to the Efficacy of Chemotherapy // *Nat. Med.* 2014. Vol. 20, № 11. P. 1301–1309.
22. 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, № 44. P. 38397–38407.
23. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24, № 13. P. 3413–3420.
24. Abbott R.D., Koptiuch C., Iatridis J.C., Howe A.K., Badger G.J., Langevin H.M. Stress and Matrix-Responsive Cytoskeletal Remodeling in Fibroblasts // *J. Cell Physiol.* 2013. Vol. 228, № 1. P. 50–57.
25. Migliorini C., Qian Y., Chen H., Brown E.B., Jain R.K., Munn L.L. Red Blood Cells Augment Leukocyte Rolling in a Virtual Blood Vessel // *Biophys. J.* 2002. Vol. 83, № 4. P. 1834–1841.

References

1. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.*, 2018, vol. 9. Art. no. 113.
2. Jablonska J., Lang S., Sionov R.V., Granot Z. The Regulation of Pre-Metastatic Niche Formation by Neutrophils. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 67, pp. 112132–112144.
3. Eruslanov E.B., Bhojnagarwala P.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Ranganathan A., Deshpande C., Akimova T., Vachani A., Litzky L., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Feldman M., Albelda S.M., Singhal S. Tumor-Associated Neutrophils Stimulate T Cell Responses in Early-Stage Human Lung Cancer. *J. Clin. Invest.*, 2014, vol. 124, no. 12, pp. 5466–5480.

4. Potter N.S., Harding C.V. Neutrophils Process Exogenous Bacteria via an Alternate Class I MHC Processing Pathway for Presentation of Peptides to T Lymphocytes. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, no. 5, pp. 2538–2546.
5. Mishalian I., Bayuh R., Eruslanov E., Michaeli J., Levy L., Zolotarov L., Singhal S., Albelda S.M., Granot Z., Fridlender Z.G. Neutrophils Recruit Regulatory T-Cells into Tumors via Secretion of CLL 17 – a New Mechanism of Impaired Antitumor Immunity. *Int. J. Cancer*, 2014, vol. 135, no. 5, pp. 1178–1186.
6. North R.A. P2X Receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2016, vol. 371, no. 10700. Art. no. 20150427.
7. Di Virgilio F. P2X Receptors and Inflammation. *Curr. Med. Chem.*, 2015, vol. 22, no. 7, pp. 866–877.
8. Di Virgilio F., Vuerich M. Purinergic Signaling in the Immune System. *Auton. Neurosci.*, 2015, vol. 191, pp. 117–123.
9. Giannuzzo A., Pedersen S.F., Novak I. The P2X7 Receptor Regulates Cell Survival, Migration and Invasion of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Mol. Cancer*, 2015, vol. 14. Art. no. 203.
10. Lam W.A., Rosenbluth M.J., Fletcher D.A. Chemotherapy Exposure Increases Leukemia Cell Stiffness. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 8, pp. 3505–3508.
11. 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.
12. Trautmann A. Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a “Danger Signal”. *Sci. Signal.*, 2009, vol. 2, no. 56, p. E6.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Mittal D., Gubin M.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases – Elimination, Equilibrium and Escape. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, vol. 27, pp. 16–25.
18. Goldman N., Chandler-Militello D., Lamgevin 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.
19. Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P.A., Junger W.G. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science*, 2006, vol. 314, no. 5806, pp. 1792–1795.
20. Olearczyk J.J., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S. Nitric Oxide Inhibits ATP Release from Erythrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, vol. 309, no. 3, pp. 1079–1084.
21. Sistigu A., Yamazaki T., Vacchelli E., Chaba K., Enot D.P., Adam J., Vitale I., Goubar A., Baracco E.E., Remédios C., et al. Cancer Cell-Autonomous Contribution of Type I Interferon Signaling to the Efficacy of Chemotherapy. *Nat. Med.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1301–1309.
22. Montalbeti N., Leal Denis M.F., Pignataro O.P., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarzbaum P.J. Homeostasis of Extracellular ATP in Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 44, pp. 38397–38407.
23. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *J. Neurosci.*, 2004, vol. 24, no. 13, pp. 3413–3420.
24. Abbott R.D., Koptiuch C., Iatridis J.C., Howe A.K., Badger G.J., Langevin H.M. Stress and Matrix-Responsive Cytoskeletal Remodeling in Fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, 2013, vol. 228, no. 1, pp. 50–57.
25. Migliorini C., Qian Y., Chen H., Brown E.B., Jain R.K., Munn L.L. Red Blood Cells Augment Leukocyte Rolling in a Virtual Blood Vessel. *Biophys. J.*, 2002, vol. 83, no. 4, pp. 1834–1841.

DOI: 10.37482/2542-1298-Z006

*Marina Yu. Skorkina** ORCID: [0000-0002-9441-5295](https://orcid.org/0000-0002-9441-5295)
*Evgeniya A. Sladkova** ORCID: [0000-003-3072-2402](https://orcid.org/0000-003-3072-2402)
*Nina I. Zhernakova** ORCID: [0000-0001-7648-0774](https://orcid.org/0000-0001-7648-0774)
*Mikhail Yu. Pal'chikov** ORCID: [0000-0002-2426-1307](https://orcid.org/0000-0002-2426-1307)

*Belgorod State National Research University
(Belgorod, Russian Federation)

CHANGES IN THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF GRANULOCYTE BIOMEMBRANES IN HEALTH AND IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA AT MECHANICAL STRESS MODELLING (*in vitro*)

Functional properties of biomembranes such as stiffness, charge, and adhesion largely determine the immunoregulatory activity of the granulocyte population. This paper aimed to investigate the functional (mechanical, adhesive and electrical) properties of granulocyte biomembranes in healthy people and patients with acute lymphoblastic leukaemia using a mechanical stress model *in vitro*. As a natural model of neoplastic process we chose acute lymphoblastic leukaemia, which involves dysfunction of the lymphoid link of the adaptive immune system and circulation of blasts. Using the mechanical stress model, the paper studied the effect produced by the elements of the purinergic signalling system on the functional properties of granulocyte biomembranes. Under the influence of mechanical stress, adenosine triphosphate (ATP) concentrations increased by the factor of 2.3 in healthy subjects and by the factor of 1.8 in patients with leukaemia, as compared with intact samples. At mechanical deformation of blood cells, in the group of healthy subjects the surface stiffness and charge decreased by 16.8 % ($p < 0.05$) and 47 % ($p < 0.05$) respectively, as compared with intact samples. In patients with acute lymphoblastic leukaemia, the surface stiffness decreased by 54.4 % ($p < 0.05$) while the adhesive force between erythrocyte and leukocyte increased by 30.7 % ($p < 0.05$) as compared with intact samples. Thus, the obtained data allow us to consider the ATP molecule as a paracrine regulatory element of intercellular signalling. Our findings can be used in the physiology of microcirculation to study the mechanisms of intercellular interaction in health and in developing leukaemia.

Keywords: *granulocytes, mechanical stress, functional properties of biomembranes, atomic force microscopy, acute lymphoblastic leukaemia.*

Поступила 11.11.2019
Принята 10.02.2020
Received 11 November 2019
Accepted 10 February 2020

Corresponding author: Marina Skorkina, *address:* ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015, Russian Federation; *e-mail:* skorkina@bsu.edu.ru

For citation: Skorkina M.Yu., Sladkova E.A., Zhernakova N.I., Pal'chikov M.Yu. Changes in the Functional Properties of Granulocyte Biomembranes in Health and in Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia at Mechanical Stress Modelling (*in vitro*). *Journal of Medical and Biological Research*, 2020, vol. 8, no. 2, pp. 157–165. DOI: 10.37482/2542-1298-Z006