

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМАЛЕММЫ ГРАНУЛОЦИТОВ**

© 2019 г. Е. А. Шамрай¹, *, М. Ю. Скоркина¹, Е. А. Сладкова¹, Е. Н. Зинакова¹,
О. В. Черкашина², М. Ю. Пальчиков¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

²Белгородская областная клиническая больница им. Св. Иоасафа, Белгород, Россия

*E-mail: elenashamray@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.11.2018 г.

После доработки 12.12.2018 г.

Принята к публикации 13.12.2018 г.

Пуринергическая сигнальная система выполняет ключевую роль в регуляции межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле. Практически все типы клеток осуществляют выброс молекулы АТФ, которая активирует клеточную поверхность гранулоцитов через семейство пуринергических рецепторов и обеспечивает эффективное функционирование клеток на различных этапах иммунного воспаления. В выполненном исследовании с целью активации элементов пуринергической сигнальной системы использована модель механического стресса *in vitro*. При моделировании условий механической деформации клеток уровень АТФ в крови увеличился в 2.3 раза по сравнению с контролем, заряд клеточной поверхности и жесткость снизились соответственно на 47 и 16.8% ($p < 0.05$), а сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом возросла на 18% ($p < 0.05$). Смоделировав осмотическую нагрузку на клетку после механического стресса нам удалось опосредованно доказать везикулярный выход АТФ из гранулоцитов с использованием части запасов мембранного резерва, в результате чего относительный мембранный резерв, задействованный гранулоцитами в регуляции своего объема, был снижен примерно в 1.5 раза по сравнению с контролем. Полученные данные указывают на ведущую регуляторную роль молекулы АТФ, которая выступает паракринным регулятором биофизических свойств плазмалеммы гранулоцитов в условиях стимуляции механической деформации клеток крови и аутокринным регулятором в механизмах регуляции клеточного объема. Полученные экспериментальные данные имеют значение в изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле и могут быть учтены при поиске и разработке фармакологических регуляторных мишеней с целью поддержания функциональной активности иммунных клеток.

Ключевые слова: гранулоцит, модуль Юнга, заряд поверхности, относительный мембранный резерв, сила межклеточной адгезии, пуринергическая сигнальная система

DOI: 10.1134/S0869813919020092

Пуринергическая сигнальная система является эволюционно древним механизмом межклеточной коммуникации, который, посредством изменения свойств плазмалеммы клеток крови, запускает физиологические и патофизиологические

ответы, такие как воспаление [1], миграция [2], дифференцировка [3] и пролиферация лейкоцитов [4], регуляция апоптоза [5].

Известно, что при прохождении эритроцитов через узкие просветы капилляров в условиях механической деформации они освобождают молекулы АТФ, активно взаимодействующие с рецепторами P2Y-семейства на эритроцитарной поверхности, что приводит к еще более выраженному выбросу АТФ через канал паннексин-1 [6]. В межклеточном пространстве молекула АТФ деградирует в течение нескольких секунд, расщепляясь семейством эктонуклеотидаз [7] с образованием метаболитов, которые являются агонистами пуринергических рецепторов, широко представленных на различных клеточных типах, в том числе и на иммунных клетках. Согласно работе M.D. Ita [8] на плазмалемме всех полиморфноядерных лейкоцитов экспрессированы рецепторы пуринергической сигнальной системы подтипов P2Y. Это семейство рецепторов связано с G-белками [9] и активируется АТФ, АДФ, УТФ, УДФ и УДФ-глюкозой [10].

Семейство пуринергических рецепторов на плазмалемме гранулоцитов активно участвует в механизмах сигнальной трансдукции, в частности, позволяет им реагировать на сигнальные молекулы, продуцируемые, например, эритроцитами [11], тромбоцитами [12] при реализации своих функций. Вместе с тем, при реализации гранулоцитами физиологических функций при миграции и формировании псевдоподий и фагосом [13], в процессах деформации при прохождении клеток крови через капилляры [14] клетки используют дополнительные мембранные структуры, залеженные в складчатости плазмалеммы. Эти структуры формируют мембранный резерв клетки, который задействован ею в процессах жизнедеятельности. В связи с этим актуальным является изучение вопросов, связанных с участием активации элементов пуринергической сигнальной системы и их влиянием на биофизические свойства плазмалеммы (упругость, заряд) и регуляторные возможности мембраны, задействованные в регуляции объема клетки. Цель исследования – изучить влияние элементов пуринергической сигнальной системы на биофизические свойства плазмалеммы и использование мембранного резерва гранулоцитами в механизмах регуляции объема на моделях механического и осмотически индуцированного стресса *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте использовали кровь здоровых людей ($n = 30$) в возрасте от 25 до 45 лет, проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы г. Белгорода. Забор крови проводили путем пункции вены с участием специализированного медперсонала. Кровь собирали в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА К₃ в концентрации 2.0 мг (0.006843 моль/л) на 1 мл крови. Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации, получено предварительное информированное согласие участников эксперимента в соответствии с рекомендациями (Декларация по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52-ой Генеральной Ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь, 2000 г.).

Каждую пробу крови делили на две части – контрольную и опытную. Опытные пробы крови подвергали механическому стрессу, контрольные – оставались интактными. Механический стресс *in vitro* моделировали согласно методу, описанному в работе [15]. В опытных пробах измеряли концентрацию АТФ колориметрическим методом [16]. В исследуемых пробах измеряли оптическую плотность, используя фотометр фотоэлектрический КФК-3 (Россия, 2008) при длине волны 670 нм против физиологического раствора. Уровень АТФ рассчитывали по разности опти-

ческих плотностей между пробиркой, в которой провели гидролиз фосфатных связей, и пробой без гидролиза фосфатных связей, используя калибровочный график. Для построения калибровочного графика использовали 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.

Функциональная активность клеточной поверхности гранулоцитов тесно связана с биофизическими свойствами плазмалеммы, которые изучали с использованием подходов атомно-силовой микроскопии. Количественно механические свойства 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 АСМ [17]. В работе использованы модифицированные АСМ-зонды, изготовленные коллективом авторов на основе полимерных микросфер с радиусом закругления 5 мкм. Измерение модуля Юнга осуществляли на атомно-силовом микроскопе (АСМ) ИНТЕГРА ВИТА (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT MDT, Зеленоград, 2009). Измерения выполнены в режиме силовой спектроскопии согласно алгоритму, описанному в работе [18]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток, таким образом, общая выборка клеточной популяции в крови здоровых людей составила по 600 клеток в каждой опытной и контрольной группах.

Электрические свойства мембраны гранулоцитов оценивали, выполняя измерения поверхностного потенциала (ПП) в режиме зонда Кельвина на АСМ. Суспензию клеток для измерения ПП и процедуру измерения осуществляли согласно способу, изложенному в работе [19]. Использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Из каждой пробы сканировали по 20 гранулоцитов, проводили обработку полученных сканов в программе Nova (NT-MDT, Россия).

Изучение механизмов межклеточной адгезии выполнено на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Для измерения сил адгезии между эритроцитом и гранулоцитом конструировали биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (США) согласно способу, изложенному в работе [20]. Выбор эритроцита в качестве биосенсора основан на идее о том, что в микроциркуляторном русле популяция эритроцитов играет ключевую роль в процессе маргинации гранулоцитов к сосудистой стенке [21] и их дальнейшей экстравазации через сосудистую стенку [22]. Силу межклеточной адгезии измеряли в системе «эритроцит–гранулоцит», регистрируя силовые кривые с поверхности 20 клеток, таким образом, в исследовании выполнено 600 измерений. Силы адгезии рассчитывали с помощью программного обеспечения Nova (NT-MDT, Зеленоград, 2009).

Учитывая тот факт, что в мембранах гранулоцитов обнаружены механо-осмотические датчики в виде каналов TRPV4 [23], которые трансформируют физические раздражители в Ca^{2+} -зависимое высвобождение АТФ [24], в выполненном исследовании была использована модель гипоосмотической нагрузки, приложенной к гранулоцитам после механического стресса. Используемая модель, с одной стороны, позволила оценить осморегуляторные реакции клетки по длительности периода регуляторного увеличения объема клетки и возможности клетки восстанавливать свой объем до исходных значений, а с другой стороны пронаблюдать аутокринные эффекты освобожденной молекулы АТФ в ходе набухания.

Лейкоциты из цельной крови в опытных и контрольных пробах выделяли путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 мин. Проводили нагрузочные гипоосмотические тесты *in vitro*. Суспензию лейкоцитов в опытных и контрольных пробах делили на 2 части: к первой добавляли равное количество аутологичной плазмы, ко второй – гипотонического раствора хлорида натрия (0.45%).

Формировали суспензионные препараты из каждой пробы, в которых через каждые 30 с регистрировали изображения нативной суспензии лейкоцитов с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon (TokyoByoke, 2011), используя программное обеспечение Nis-Elements Documentation (ver. 2.32). Длительность гипоосмотической нагрузки составила 5 мин. На полученных изображениях измеряли диаметр 50 клеток из каждой пробы. На основе промеров диаметров рассчитывали объем клетки по формуле (1):

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3, \quad (1)$$

где V – объем клетки, мкм^3 ; R – радиус клетки, мкм .

Рассчитывали относительный мембранный резерв, заложенный в складчатости плазмалеммы и используемый клетками в регуляции объема при гипоосмотической нагрузке, согласно формуле (2):

$$M_{\text{отн.}} = \frac{S_r - S_n}{V_n}, \quad (2)$$

где $M_{\text{отн.}}$ – относительный мембранный резерв клетки, мкм^{-1} ; S_r – площадь поверхности клетки в гипотонической среде, мкм^2 ; S_n – площадь поверхности клетки в аутологичной плазме, мкм^2 ; V_n – объем клетки в аутологичной плазме, мкм^3 .

Интенсивность использования относительного мембранного резерва клеткой оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва, используемого клеткой от потенциального мембранного резерва, принимаемого за 100%.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t критерия Стьюдента при $p < 0.05$ в случае нормального распределения признака и U -критерия Манна–Уитни при $p < 0.05$ для непараметрических данных. В работе приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При активации элементов пуринергической сигнальной системы в условиях механической деформации клеток крови *in vitro* установлено увеличение концентрации АТФ в крови в 2.3 раза по сравнению с контролем (рис. 1).

В условиях механической стимуляции установлено изменение биофизических свойств плазмалеммы гранулоцитов. В опытных пробах крови, подвергнутых механическому стрессу *in vitro*, заряд гранулоцитов стал более отрицательный – 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, в условиях механического стресса

Таблица 1. Биофизические свойства клеточной поверхности гранулоцитов

Показатели	Контроль	Опыт
Сила адгезии в системе “эритроцит–гранулоцит”, нН	35.9 ± 0.2	$43.9 \pm 1.1^*$
Модуль Юнга гранулоцитов, мкПа	4.16 ± 0.01	$3.56 \pm 0.02^*$
Потенциал поверхности гранулоцитов, мВ	-31.76 ± 1.52	$-46.7 \pm 4.32^*$

Примечание. * – статистически значимые различия между показателями по U -критерию Манна–Уитни ($p < 0.05$).

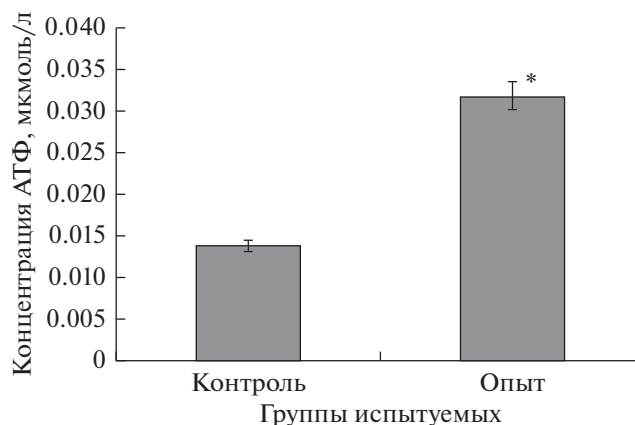


Рис. 1. Концентрация АТФ в крови. Опыт – под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль – интактная кровь. * – статистически значимые различия между показателями в опытной и контрольной группах по критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

модуль Юнга, характеризующий жесткость поверхности, снизился на 16.8% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

В тестах с осмотической нагрузкой установлено увеличение объема клеток на протяжении всего времени инкубации, по сравнению с клетками, помещенными в аутологичную плазму как в опытных, так и в контрольных пробах. Кроме того, отмечено регуляторное сокращение объема клеток в исследуемых пробах к концу по сравнению с начальными секундами инкубации (табл. 2).

При сравнении изменения объема в гипотонической среде между опытной и контрольной группами установлено, что фаза регуляторного увеличения объема гранулоцитов в первые 30 с инкубации менее выражена в условиях активации эле-

Таблица 2. Объем гранулоцитов в тестах с осмотической нагрузкой *in vitro*

Время, с	Контроль		Модель механического стресса	
	Иплазма, мкм ³	Игипо, мкм ³	Иплазма, мкм ³	Игипо, мкм ³
0	443.7 ± 5.1	602.4 ± 7.1*	476.8 ± 4.7	596.6 ± 5.7*
30	452.0 ± 5.0	600.4 ± 6.6*	481.3 ± 4.7	585.4 ± 5.4*
60	451.7 ± 4.8	581.2 ± 6.4*	484.4 ± 4.6	589.1 ± 5.3*
90	447.1 ± 4.7	578.3 ± 6.1*	486.3 ± 4.2	568.9 ± 5.2*
120	446.4 ± 5.0	565.4 ± 6.0*	479.5 ± 4.1	566.0 ± 5.2*
150	452.5 ± 5.0	565.5 ± 6.0*	485.8 ± 4.5	553.4 ± 4.9*
180	450.1 ± 4.9	556.9 ± 5.8*	478.3 ± 4.3	555.9 ± 4.9*
210	446.4 ± 4.7	544.1 ± 6.0*	484.4 ± 4.6	553.5 ± 4.9*
240	454.6 ± 4.7	543.8 ± 5.5*	492.6 ± 4.4	561.1 ± 4.8*
270	451.2 ± 4.7	540.9 ± 5.6*	484.6 ± 4.3	555.9 ± 4.9*
300	451.4 ± 4.6	533.0 ± 5.5*	482.5 ± 4.3	551.7 ± 4.8*

Примечание. * – статистически значимые различия между показателями в плазме и гипотонии по критерию Стьюдента ($p < 0.05$). *V* – объем клетки, мкм³.

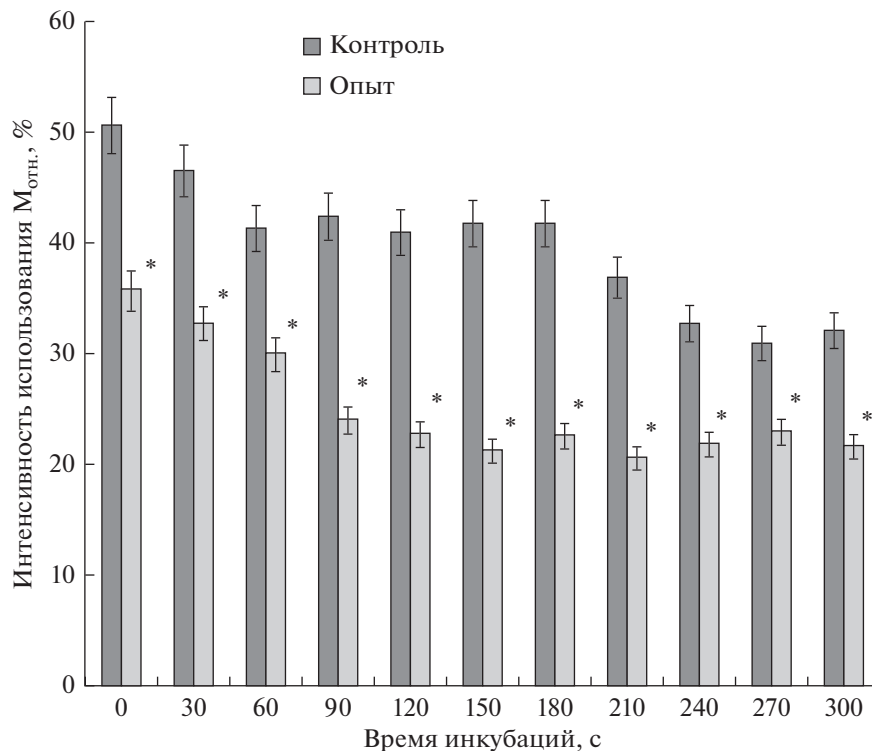


Рис. 2. Интенсивность использования относительного мембранного резерва гранулоцитами в гипотоническом тесте (*in vitro*).

Опыт – под влиянием механического стресса *in vitro*; контроль – интактная кровь; $M_{\text{отн.}}$ – относительный мембранный резерв клетки, $\mu\text{км}^{-1}$.

* – статистически значимые различия между показателями по критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

ментов пуринергических сигнальных путей. Выявленная особенность подтверждена данными по использованию относительного мембранного резерва гранулоцитами в гипотонической среде (рис. 2).

При анализе динамики изменения объема гранулоцитов и использования ими относительного мембранного резерва в реакциях осморегуляции видно, что в условиях стимуляции элементов пуринергической сигнальной системы вовлечение дополнительных мембранных структур в механизмы регуляции объема снижено по сравнению с контролем примерно в 1.5 раза, а в середине инкубации (через 150–180 с) – в 2 раза по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В выполненном исследовании изучено влияние элементов пуринергической сигнальной системы на биофизические свойства плазмалеммы гранулоцитов и их способность поддерживать свой объем за счет мембранного резерва в условиях гипотонического стресса *in vitro*. Установлено, что в условиях механической деформации клеток крови концентрация АТФ в крови возросла в 2.3 раза по сравнению с пробами без нагрузки. Полученные данные свидетельствуют об экскреции в

межклеточное пространство молекул АТФ при механической стимуляции, что согласуется с результатами, представленными рядом авторов [7, 25].

Смоделированный механо-индуцированный выброс АТФ клетками крови повлиял на биофизические свойства поверхности гранулоцитов. В частности, снизились жесткость и заряд клеточной поверхности, увеличилась сила адгезии между лейкоцитом и эритроцитом. Изменение биофизических свойств клеточной поверхности мы связываем с запуском и реализацией пуриnergического сигнального каскада под влиянием механического стресса, что приводит к увеличению концентрации цитозольного Ca^{2+} , необходимого для ремоделирования элементов цитоскелета [7]. В настоящее время рядом работ описаны P2X рецепторы, которые представляют собой мембранные ионные каналы, открывающиеся в течение миллисекунд в ответ на связывание с АТФ [26]. Рецептор P2X4, экспрессированный на поверхности иммунных клеток, имеет высокую проницаемость для Ca^{2+} [27]. 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 [28, 29].

Смоделировав осмотическую нагрузку на клетку после механического стресса нам удалось опосредованно доказать везикулярный выход АТФ из гранулоцитов с использованием части запасов мембранного резерва. Согласно полученным нами результатам относительный мембранный резерв, задействованный гранулоцитами в регуляции своего объема, был снижен примерно в 1.5 раза по сравнению с контролем. Согласно данным литературы в лейкоцитах функционирует TRPV4-катионный канал в качестве датчика, трансформирующего осмотические стимулы в Ca^{2+} -зависимое высвобождение АТФ посредством везикулярного транспорта с участием паннексина-1 [10]. Полученные результаты указывают на то, что в условиях осмотического напряжения в гранулоцитах запускается отток цитозольных нуклеотидов в виде везикул с поверхности мембраны, что в итоге снижает доступный мембранный резерв, задействованный клетками в механизмах регуляции объема.

С точки зрения физиологии микроциркуляции выявленные изменения биофизических свойств плазмалеммы гранулоцитов в условиях запуска пуриnergического сигнального каскада позволяют более “мягким” клеткам легче мигрировать и сильнее адгезировать за счет более отрицательного заряда клеточной поверхности к клеткам эндотелия, что обеспечивает их эффективное функционирование.

Таким образом, в условиях стимуляции механической деформации клеток крови (модель механического стресса *in vitro*) доказано увеличение концентрации АТФ в крови, изменение биофизических свойств плазмалеммы гранулоцитов и снижение относительного мембранного резерва, задействованного в регуляции клеточного объема. Под влиянием механического стресса снизилась жесткость клеточной поверхности, при этом она приобрела более выраженный отрицательный заряд, что в итоге способствовало увеличению сил адгезии в системе “эритроцит–гранулоцит”. Полученные данные указывают на ведущую регуляторную роль молекулы АТФ, которая выступает паракринным регулятором биофизических свойств плазмалеммы гранулоцитов в условиях стимуляции механической деформации клеток крови и аутокринным регулятором в механизмах регуляции клеточного объема. Полученные экспериментальные данные имеют значение в изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле и могут быть учтены при поиске и разработке фармакологических регуляторных мишеней с целью поддержания функциональной активности иммунных клеток.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00032.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Campwala H., Fountain S.J.* Constitutive and agonist stimulated ATP secretion in leukocytes. *Commun. Integr. Biol.* 6(3): e23631. 2013.
2. *Chen Y., Sumi Y.Y., Li A., To U.K., Elkhali A., Inoue Y., Woehrle T., Zhang Q., Hause C., Junger W.G.* Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci. Signal.* 3(125): ra45. 2014.
3. *Di V.F., Vuerich M.* Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci.* 191: 117–123. 2015.
4. *Kaebisch C., Schipper D., Tobiasch E.* The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computat. Struct. Biotechnol. J.* 13: 75–84. 2015.
5. *Qu Y., Misaghi S., Newton K., Gilmour L.L., Louie S., Cupp J.E., DUBYAK G.R., Hackos D., Dixit V.M.* Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J. Immunol.* 186: 6553–6561. 2011.
6. *Baroja-Mazo A., Barbero-Gremades H., Pelegrini P.* The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochem. Biophys. Acta.* 828: 79–93. 2013.
7. *Montalbetti N., Denis M.F.L., Pignataro O.P., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarbaum P.J.* Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 286(44): 38397–38407. 2011.
8. *Ita M.D., Vargas M.H., Carbajal V., Ortiz-Quintero B., Lopez-Lopez C.* ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. *Life Sci.* 145(5): 85–92. 2016.
9. *Burnstock G., Boeynaems J.-M.* Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signalling.* 10: 529–564. 2014.
10. *Lazarowski E.R.* Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signalling.* 8: 359–373. 2012.
11. *Ellworth M., Ellis C., Goldman D.* Erythrocytes: oxygen sensor and modulators of vascular tone. *Physiology.* 24: 107–116. 2009.
12. *Clark S.R., Ma A.C., Tavenor S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devvinev R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Med.* 13: 463–469. 2007.
13. *Федорова М.З., Левин В.Н.* Использование мембранного резерва лимфоцитами крови при деформации и в условиях гипотонии. *Биол. мембраны.* 18(14): 306–311. 2001. [*Fedorova M.Z., Levin V.N.* Use of membrane reserve by blood lymphocytes during deformation and under hypotonia. *Biol. membrany.* 18(14): 306–311. 2001. (In Russ.)].
14. *Федорова М.З., Надеждин С.В., Головкин С.В., Зубарева Е.В.* Сравнительная оценка “мембранного резерва” клеток крови земноводных и млекопитающих. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* 43(5): 419–422. 2007. [*Fedorova M.Z., Nadezhdin S.V., Golovko S.V., Zubareva E.V.* Comparative evaluation of the “membrane reserve” of amphibian and mammalian blood cells. *Zhurn. evol. biokhim. i fiziol.* 43(5): 419–422. 2007. (In Russ.)].
15. *Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N.* Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am. J. Physiol. Soc.* 273: C1828–C1834. 1997.
16. *Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В.* Руководство к практическим занятиям по биохимии. М. Высшая школа. 1988. [*Aleynikova T.L., Rubtsova G.V.* Rucovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po biokhimii. [Guide to practical classes in biochemistry]. Moscow. Vysshaya shkola. 1988].
17. *Alonso J.L., Goldman W.H.* Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci.* 72: 2553–2560. 2003.
18. *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. *Клет. техн. в биол. и мед.* 3: 172–175. 2012. [*Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Muravev A.V., Sladkova E.A.* Using a nanomechanical sensor to study the morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia. *Klet. tehn. v biol. i med.* 3: 172–175. 2012. (In Russ.)].
19. *Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю.* Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина. *Биофизика.* 59(2): 310–313. 2014. [*Sladkova E.A., Skorkina M.Yu.* Evaluation of the surface potential of lymphocytes in patients with leukemia using the Kelvin probe method. *Biofizika.* 59(2): 310–313. 2014. (In Russ.)].
20. *Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А.* Измерение сил адгезии в системе “клетка–клетка” на основе технологий атомно-силовой микроскопии. *Клет. техн. в биол. и мед.* 4:

- 213–215. 2017. [Skorkina M. Yu., Shamray E.A., Sladkova E.A. Measurement of adhesion forces in the “cell–cell” system based on atomic force microscopy technology. Klet. tehn. v biol. i med. 4: 213–215. 2017. (In Russ.)].
21. Hussain M.A., Merchant S.N., Mombasawala L.S., Puniyani R.R. A decrease in effective diameter of rat mesenteric venules due to leukocyte margination after a bolus injection of pentoxifylline—digital image analysis of an intravital microscopic observation. *Microvasc. Res.* 67(3): 237–244. 2004.
 22. Verdier C., Couzon C., Duperray A., Singh P. Modeling cell interactions under flow. *J. of Mathematical Biology.* 58: 235–259. 2009.
 23. Yin J., Michalik L., Tang C., Tabuchi A. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in neutrophil activation and acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54(3): 370–383. 2016.
 24. Sprung R., Sprague R., Spence D. Determination of ATP release from erythrocytes using micro-bore tubing as a model of resistance vessels *in vivo*. *Anal. Chem.* 74(10): 2274–2278. 2002.
 25. Evans J., Gratzner W., Mohandas N., Parker K., Sleep J. Fluctuations of the red blood cell membrane: relation to mechanical properties and lack of ATP dependence. *Biophys J.* 94(10): 4134–4144. 2008.
 26. North R.A. P2X receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* 371 (1700): 20150427. 2016.
 27. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci.* 24(13): 3413–20. 2004.
 28. Abbott R.D., Koptiuch C., Iatridis J.C., Howe A.K., Badger G.J. Stress and matrix-responsive cytoskeletal remodeling in fibroblasts. *Cell. Physiol.* 228(1): 50–57. 2013.
 29. Helfand B.T., Chang L., Goldman R.D. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J. Cell Sci.* 15: 133–141. 2004.

Elements Purinergic Signalling System Affects Functional Properties of Granulocyte’s Plasmalemma

E. A. Shamray^{a, *}, M. Yu. Skorkina^a, E. A. Sladkova^a, E. N. Zinakova^a,
O. V. Cherkashina^b, M. Yu. Palchikov^a

^aBelgorod State National Research University, Belgorod, Russia

^bBelgorod Regional Hospital St. Ioasaf, Belgorod, Russia

*e-mail: elenashamray@yandex.ru

Abstract—The purinergic signaling system plays a key role in the regulation of intercellular interactions in the microvasculature. Almost all cell types release ATP which activates the cell surface of granulocytes through purinergic receptors and provide effective functioning of cells on the various stages of immune inflammation. In the study, in order to activate the elements of the purinergic signaling system, an *in vitro* model of mechanical stress was used. When simulating the conditions of mechanical cell deformation, the level of ATP in the blood increased by 2.3 times compared with the control, the cell surface charge and stiffness decreased by 47% and 16.8% ($p < 0.05$), respectively, and the adhesion force between the erythrocyte and granulocyte increased by 18% ($p < 0.05$). In performed experiments, we were able to indirectly prove the vesicular release of ATP from granulocytes using the part of membrane reserve, as a result of which the relative membrane reserve used by granulocytes in regulating its volume was decreased approximately by 1.5 times as compared with control during the osmotic load. The obtained data indicate the leading regulatory role of the ATP molecule, which acts as a paracrine regulator of the biophysical properties of the granulocyte plasmalemma under conditions of stimulation of the mechanical deformation of blood cells and the autocrine regulator in the mechanisms of cell volume regulation. These data are important in the investigation of the intercellular interaction mechanisms in the microvasculature and can be taken into account in the searching and developing of pharmacological regulatory targets in order to maintain the functional activity of immune cells.

Keywords: granulocytes, Yong’s module, charge surface, relative membrane reserve, intercellular adhesive force, purinergic signaling system