

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ
АКТИВАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ
СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

Магистерская диссертация
обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология
очной формы обучения, группы 11001741
Тищенко Александры Юрьевны

Научный руководитель:
доцент кафедры биохимии МИ,
к.б.н. Сладкова Е.А.

Рецензент: заведующая
гематологическим отделением
ОГБУЗ «Белгородская областная
клиническая больница
Святителя Иоасафа»
к.м.н. Беляева С.С.

БЕЛГОРОД 2019

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1. Особенности строения и функционирования биомембран	6
1.1.1. Общий план организации биомембран.....	6
1.1.2. Особенности структурной организации мембран клеток крови.....	15
1.2. Пуринергическая сигнальная система	23
1.3. Характеристика функциональных параметров системы крови при развитии острого лимфобластного лейкоза	27
1.3.1. Этиология и патогенез лейкоза	27
1.3.2. Морфология и функционирование клеток крови при ОЛЛ.....	30
1.3.3. Пуринергическая сигнальная система при ОЛЛ.....	33
1.4. Методы определения заряда клеточной поверхности.....	35
Глава 2. Материал и методы исследования	41
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	48
3.1. Концентрация АТФ в крови здоровых и больных ОЛЛ людей при активации пуринергической сигнальной системы	48
3.2. Поверхностный потенциал клеток крови в норме и при остром лимфобластном лейкозе	52
3.3. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей и больных ОЛЛ в условиях механического стресса.....	54
3.4. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей и больных ОЛЛ при активации внеклеточных пуринергических сигнальных путей <i>in vitro</i>	55
3.5. Сравнительный анализ влияния механического стресса и экзогенной нагрузки с АТФ <i>in vitro</i> на форменные элементы крови	57
Выводы	61
Список использованных источников	62

Введение

Пуринергическая сигнальная система является одной из самых эволюционно древних рецепторных систем, играющих существенную роль в изменении свойств и функций различных клеток организма [Sekic, Linden, 2016]. Известно, что пуриновые рецепторы локализованы практически во всех органах и тканях, они обнаружены на мембранах кардиомиоцитов, гладких мышечных клеток, форменных элементов крои и других клеток. Краткосрочные пуринергические сигналы отмечаются при регуляции экзокринной и эндокринной секреции, агрегации-деагрегации тромбоцитов, вазодилатации, механочувствительной трансдукции. Долгосрочные пуринергические сигналы участвуют в регуляции клеточной пролиферации, дифференциации, миграции и гибели клеток, заживлении ран, старении и раке [Eltzschig, et al., 2013].

Большую актуальность в настоящее время приобретает изучение влияния эндогенного АТФ на функциональную активность лейкоцитов, формирующих иммунологическую компетентность организма, а так же тромбоцитов, способных принимать участие в реакциях антибактериального иммунитета в условиях злокачественной пролиферации лимфоидного ростка кроветворения.

Объектом исследования выступали клетки крови здоровых людей и больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

Предметом исследования являлся потенциал поверхности клеток крови в норме и условиях активации внеклеточных пуринергических сигнальных путей.

Целью данной работы было оценить поверхностный потенциал клеток крови в условиях активации внеклеточных пуринергических сигнальных путей.

В соответствии с целью были поставлены задачи:

□ оценить изменения концентрации АТФ в крови здоровых людей и больных острым лимфобластным лейкозом в условиях активации пуринергических сигнальных путей;

□ измерить поверхностный потенциал клеток крови в норме и при развитии острого лимфобластного лейкоза;

□ измерить поверхностный потенциал клеток крови в норме и при остром лимфобластном лейкозе в условиях активации пуринергических сигнальных путей посредством моделирования механического стресса *in vitro*;

□ измерить поверхностный потенциал клеток крови в норме и при остром лимфобластном лейкозе в условиях активации пуринергических сигнальных путей посредством нагрузочного теста с экзогенной АТФ;

□ провести сравнительный анализ влияния механического стресса и нагрузки с экзогенной АТФ на электрические свойства форменных элементов крови.

Новизна работы заключается в том, что впервые проведено исследование электрических свойств клеток крови при активации пуринергической сигнальной системы. Установлено что реакция клеток на молекулы АТФ проявлялась в повышении заряда плазмалеммы эритроцитов и тромбоцитов и снижении ПП лейкоцитов. В условиях лимфопролиферативных заболеваний происходит снижение экскреции молекул в АТФ во внеклеточную среду, что препятствует изменению электрических свойств клеток крови.

Магистерская диссертация изложена на 71 страницах. Она состоит из оглавления, введения, трех глав, выводов. Список использованных источников насчитывает 104 наименования. В работе представлена 1 таблица, 22 рисунка.

По теме диссертации опубликовано 3 работы:

1. Тищенко А. Ю., Сладкова Е. А. Особенности потенциала поверхности эритроцитов в норме и при лимфопролиферативном процессе в условиях механического стресса // 22-я Международная Пуцинская школа-

конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»: Тезисы докладов. 2018. С. 369.

2.Изменение функциональных характеристик форменных элементов крови людей зрелого возраста при активации пуринергических сигнальных путей / Е. А. Сладкова, М. Ю. Скоркина, Е. А. Шамрай, А. Ю. Тищенко, М. Ю. Пальчиков // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сборник материалов 7-й международной научно-практической телеконференции. 2018. С. 86–89.

3. Изменение механических свойств и заряда поверхностиформенных элементов крови в условиях активации пуринергической сигнальной системы / Е. А. Сладкова, Е. А. Шамрай, А. Ю. Тищенко, М. Ю. Скоркина // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2019. Т. 105, № 5. С. 643–649

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00032/18

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Особенности строения и функционирования биомембран

1.1.1. Общий план организации биомембран

Биомембраны представляют собой сложные молекулярные образования, отделяющие внутреннее содержимое клеток от внешнего окружения, при этом биологические мембраны создают условия для избирательного транспорта различных молекулярных компонентов, а также функционирования большого количества мембрановстроенных макромолекул (биополимеров) [Рабинович, Талис, 2017].

Биомембраны живых организмов формируют внутри клеток компартменты (отсеки), обеспечивающие функциональный барьер между внеклеточными и внутриклеточными структурами, в том числе и органеллами. Эта компартментализация позволяет разделять определенные химические реакции с целью повышения биохимической эффективности и ограниченного распространения продуктов реакции [Van Meer, et al., 2008].

В первоначально сформулированной «модели жидкой мозаики» Сингера и Николсона [Singer, Nicolson, 1972], функция клеточных мембран как высокодинамичных барьеров, состоящих из мембранных белков и фосфолипиды бислоев, заключается в контроле за движением ионов, воды и питательных веществ между компартментами. За последние десятилетия эта модель была усовершенствована путем включения липидных рафтов и цитоскелетных «ограждений» и «пикетов» как дополнительных элементов, усложняющих строение мембраны и имеющих решающее значение для функционирования мембранных белков [Nicolson, 2014; Paradigm shift..., 2005].

Мембраны не являются статичными структурами, большинство входящих в их состав молекул могут перемещаться в плоскости мембраны, создавая таким образом «текучесть» мембраны [Бойтлер, 1981].

Характерной чертой биомембран эукариотических клеток является их структурная особенность: они представляют собой объединение молекул

липидов и белков, которые удерживаются вместе нековалентными взаимодействиями. Углеводы составляют лишь около 10 % и при этом всегда входят в состав гликолипидов и гликопротеинов [Геннис, 1997]. За счет этих взаимодействий обеспечивается структурная целостность мембран.

Липидный бислои клеточных мембран представляет собой комплекс из очень большого количества липидных молекул, удерживаемых «гидрофобным эффектом», возникающим в результате совместного воздействия гидрофильных и гидрофобных взаимодействий, регулируемых структурой воды [Chandler, 2005]. В зависимости от температуры он может существовать в двух основных фазах: при низких температурах (ниже температуры плавления ($T_{пл}$)), бислои существуют в гелевой фазе, при этом липидные алкильные цепи упорядочены, и их подвижность ограничена. Выше $T_{пл}$ бислои существуют в фазе, называемой жидкокристаллической, во время этой фазы алкильные цепи являются текучими и неупорядоченными [Wisniewska et al., 2005].

В дополнение к барьерной функции, липиды обеспечивают мембранам потенциал для клеточного деления, биологического размножения и внутриклеточного переноса молекул через мембраны, а также оказывают влияние на агрегацию и сегментацию определенных мембранных белков. Также липиды могут выступать в качестве первого и второго мессенджеров в процессах передачи сигнала и молекулярного распознавания. Деградация амфипатических липидов допускает явления двухсторонней сигнализации, которая может осуществляться в мембране гидрофобными частями молекулы, а также через цитозоль растворимыми (полярными) частями молекулы [Van Meer et al., 2008].

Все мембранные липиды являются амфипатическими (амфифильные, амфиполярные), то есть они содержат как гидрофильную (водолюбивую) область (гидрофильная головка), так и гидрофобную (водоотталкивающую) область (гидрофобный хвост). Амфипатическая природа мембранных липидов означает, что они естественно могут образовывать бислои, в которых гидро-

фильные головки направлены наружу к водной среде, а гидрофобные хвосты направлены внутрь клетки [Watson, 2015].

В биологических мембранах липидную основу составляют молекулы фосфолипидов, гликолипиды и стероиды. В мембранах животных клеток более 50% всех липидов составляют фосфолипиды. Углеводородные цепи фосфолипидов различаются по числу углеродных атомов, числу двойных связей и их конфигурации. Гидрофобная часть этих молекул представлена диацилглицеролом (ДАГ), содержащим насыщенные или цис-ненасыщенные жирные ацильные цепи различной длины. Количество углеродных атомов в углеродных хвостах фосфолипидов варьируется в пределах от 14 до 24. Часто двойную связь содержат не оба, а только один из хвостов. Присутствие двойной связи в цис-конфигурации приводит к изгибу углеводородной цепи. Чем длиннее углеводородные заместители, тем длиннее неполярная часть молекулы липида [Черенкевич и др., 2008].

Фосфолипиды можно разделить на 2 большие группы:

1. Глицерофосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидная кислота.
2. Сфингофосфолипиды. К ним относятся производные церамида и сфингомиелин.

В большинстве эукариотических мембран, фосфотидилхолин составляет более 50% фосфолипидов [Van Meer et al., 2008]. Он спонтанно самоорганизуется в виде плоского бислоя, в котором каждая молекула фосфотидилхолина имеет почти цилиндрическую геометрию, с липидными хвостами, обращенными друг к другу, и полярными головными группами, взаимодействующими с водной фазой [Chandler, 2005].

Большинство молекул фосфотидилхолина имеют одну цис-ненасыщенную жирную ацильную цепь, которая делает их жидкими при комнатной температуре. Фосфатидилэтанолламин, принимает коническую молекулярную геометрию из-за относительно небольшого размера его полярной головной группы. Включение фосфатидилэтанолламина в двухслой-

ные слои фосфотидилхолина создает напряжение кривизны на мембране, которая используется для расслоения, деления и слияния [Marsh, 2007]. Невислойные липиды, такие как фосфатидилэтаноламин и кардиолипин, также могут быть использованы для размещения мембранных белков и модулирования их активности [Dowhan, 1997; Marsh, 2007]. Дополнительным фактором, который способствует напряжению кривизны в биомембранах, является асимметричное распределение различных липидов между двумя слоями [Malhotra, 2012].

Сфинголипиды составляют другой класс структурных липидов. Их гидрофобная основа – керамид (церамид). Основными сфинголипидами в клетках млекопитающих являются сфингомиелин и гликосфинголипиды, которые содержат моно-, ди- или олигосахариды на основе глюкозилцерамида и иногда галактозилцерамида [VanMeeret al, 2008]. Ганглиозиды представляют собой гликосфинголипиды с концевыми сиаловыми кислотами. Сфинголипиды имеют насыщенные (или транс-ненасыщенные) хвосты, поэтому они способны образовывать более высокие и более узкие цилиндры, чем липиды фосфодитилхолина с той же длиной цепи, и, следовательно, они более плотно упаковываются, принимая твердую «гелевую» или близкую к ней фазу; разжижаются стеролами. Стероиды являются основными неполярными липидами клеточных мембран, при этом у млекопитающих преобладающим является холестерин [Marsh, 2007].

Гликолипиды – соединения, содержащие один или несколько остатков моносахарида, связанные гликозидным соединением с гидрофобным фрагментами, такими как ацилглицерин, сфингоид, керамид. Гликолипиды представлены цереброзидами, сульфатидами и ганглиозидами. Многие ученые отмечают важную роль гликолипидов в поддержании функциональной целостности нервной системы, в том числе, их участие в различных нейродегенеративных процессах [Schneider, 2014]. Кроме того, различные гликолипиды задействованы в функциях иммунокомпетентной системы организма. Так, некоторые ганглиозиды, при определенных состояниях организма могут

являться модуляторами иммунного ответа [Болдырев и др., 2006]. Кроме того гликолипиды играют важную роль в контакте клеток друг с другом, участвуют в рецепции, а также являются маркерами клеточной дифференцировки [Chandler, 2005; Malhotra, 2012].

Стероиды в животной клетке представлены в основном холестерином, который является основным компонентом животных плазматических мембран [Lundbaeketal., 2003; Болдырев и др., 2006; Рабинович, Талис, 2017]. Холестерин влияет на физические свойства липидных бислоев, регулируя текучесть и толщину мембраны, за счет своей концентрации. Например, при высокой концентрации, холестерин повышает механическую прочность мембраны, снижает ее проницаемость и подавляет основной фазовый переход липидного бислоя. При низкой концентрации холестерин выступает в некоторой степени противоположно, вызывая смягчение бислоя и увеличение его проницаемости [The effect of cholesterol..., 1997]. В отсутствие холестерина мембраны быстро разрушаются. [Болдырев и др., 2006].

Головные части липидных молекул в физиологических условиях проявляют или отрицательный заряд (характерно для кардиолипина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита), или являются электронейтральными (то есть содержат и отрицательный и положительный заряды) (характерно для сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина) (табл. 1).

Таблица 1

Электрический заряд головной части мембранных липидов [Черенкевич и др., 2008]

Головная группа (X)	Заряд головной группы	Заряд фосфатной группы	Суммарный заряд головной части молекулы
Холин	+	–	0
Серин	+,-	–	–
Инозит	0	–	–
Глицерин	0	–	–
Этаноламин	+	–	0

Липидный бислой – это довольно динамичная структура: образующие его липиды могут вращаться, двигаться в латеральном направлении (поверхностная диффузия) и также переходить из слоя в слой (флип-флоп переход) [Болдырев и др., 1990; Pomorski, Menon, 2006].

Внутренние и внешние стороны бислоя отличаются по липидному составу. В клетках млекопитающих внешний слой плазматической мембраны содержит преимущественно фосфотидилхолин и сфингомиелин, тогда как фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин находятся на внутренней стороне. Во время запрограммированной гибели клеток – апоптоза, фосфатидилсерин переходит из внутренней стороны плазматической мембраны на внешнюю сторону под действием фермента скрамблазы [Von Heijne, 2007]. Фосфатидилсерин заряжен отрицательно, в отличие от фосфотидилхолина, у которого нет заряда, таким образом, перемещение фосфатидилсерина на внешнюю сторону изменяет заряд плазматической мембраны снаружи клетки. Изменение поверхностного заряда обозначает апоптозную клетку для фагоцитоза фагоцитарными клетками, например макрофагами [Watson, 2015]. Кроме того, транслокация липидов в цитозольный слой, вызывает дисбаланс количества липидов, который может способствовать изгибу мембраны, необходимого для образования пузырьков [Pomorski, Menon, 2006].

Асимметрия липидов в мембранах является следствием множества факторов, включая биофизические свойства, которые определяют способность липида самопроизвольно пересекать бислой, механизмы удержания липидов в одном слое бислоя и наличие транспортеров, которые помогают транслокации липидов [Paradigm shift of the plasma membrane..., 2005; Van Meer et al, 2008].

В многочисленных биохимических исследованиях была продемонстрирована специфичность липидов, было установлено, что некоторые фосфолипиды оказывают существенное влияние на активность некоторых мембранных белков [Dowhan, 1997].

Гидрофобные белки легко встраиваются в липидный бислой и являются ключевыми компонентами биологических мембран. По своей структуре они достаточно разнообразны. Их подразделяют на два типа: периферические и интегральные. Большинство биомембран содержат оба типа мембранных белков [Singer, Nicolson, 1972].

Интегральные мембранные белки, также называемые внутренними белками, имеют один или несколько сегментов, встроенных в фосфолипидный бислой. Большинство интегральных белков содержат остатки гидрофобных боковых цепей, благодаря которым происходит взаимодействие с жирными ацильными группами мембранных фосфолипидов и закрепление белка в мембране [Rietveld, Simons, 1998; Mulleretal., 2008]. Большинство интегральных белков охватывает весь фосфолипидный бислой. Степень погружения интегральных белков в липидный матрикс определяется их аминокислотным составом (количеством аминокислотных остатков с неполярными боковыми радикалами) и трехмерной пространственной структурой. Эти белки выполняют в мембране транспортную, рецепторную и ферментативную функции. К ним относят гликофорин, цитохром b, s, родопсин, бактериородопсин, ценилатцюлаза, транспортные АТФазы и др. [Артюхов, Наквасина, 2000].

Некоторые из трансмембранных белков пронизывают мембрану один раз (фермент гуанилатциклаза, гликофорин), они называются битопическими, другие имеют несколько доменов, пересекающих бислой, они называются политопическими. Так, потенциал-управляемый Ca^{2+} канал пересекает мембрану 19 раз. Наиболее часто встречаются мембранные белки с двумя-семью такими доменами [Remm, Sonnhammer, 2000; Болдырев и др., 2006].

Периферические мембранные белки, или внешние белки, не взаимодействуют с гидрофобным ядром фосфолипидного бислоя. Они способны обратимо связываться с фосфолипидным матриксом, а также перемещаться между мембраной и ее окружением и легко вымываются из мембран. Некоторые из этих белков непосредственно связываются с заряженными группами

липидов мембран за счет электростатических взаимодействий, другие через посредника, такого как, Ca^{2+} . Например, миелиновый основной белок, спектрин, протеинкиназа С, фосфолипазы. [Гринштейн, Кост, 2001].

По функциям периферические белки делятся на следующие группы:

- 1) регуляторно-сигнальные (белки экстраклеточного матрикса);
- 2) структурно-каркасные (актин-спектриновые комплексы);
- 3) белки, обеспечивающие подвижность клеток и субклеточных структур (белки микротрубочек и микрофиламентов) [Артюхов, Наквасина, 2000].

Как и мембранные липиды, мембранные белки могут вращаться вокруг оси, перпендикулярной плоскости бислоя (вращательная диффузия). Кроме того, многие мембранные белки способны перемещаться в боковом направлении в пределах мембраны (латеральная диффузия) [Chandler, 2005].

В биологических мембранах, белки, позволяют клеткам «общаться» друг с другом и регистрировать изменения в окружающей их среде. Например, мембранные белки могут служить переносчиками, чьи функции включают в себя создание и/или поддержание градиентов концентрации электролитов, воды, питательных веществ, метаболических ко-факторов и других жизненно важных молекул. Белки могут вытеснять токсичные вещества, захватывать нейромедиаторы и другие вещества [Гринштейн, Кост, 2001]. Динамическая перестройка мембранной и клеточной структуры с помощью таких процессов, как эндоцитоз, экзоцитоз и фагоцитоз – все это требует специфических мембранных белков в сочетании с большим количеством ассоциированных с мембраной вспомогательных белков [VonHeijne, 2007].

Белки в составе мембран могут функционировать как рецепторы для внеклеточных лигандов, связываясь с их внеклеточными или трансмембранными доменами и передавая сигналы через бислой (передача и прием химического сигнала). Двумя крупнейшими белковыми семействами в этой категории являются GPCR (рецепторы, сопряженные с G-белком, или семиспиральные рецепторы) и рецепторы фактора роста, такие как инсулиновый рецептор или рецептор фактора роста фибробластов [Lundbaeketal., 2003].

Мембранные белки также действуют как молекулы узнавания иммунной системы и как молекулы адгезии, которые способствуют образованию плотных контактов и прикреплению клеток друг к другу. Они также могут служить в качестве преобразователей энергии, использующих электрохимические градиенты для получения высокоэнергетических соединений, таких как АТФ [Левгов и др., 1982]. Многие мембранные белки, такие как протеазы, дегидрогеназы и редуктазы, киназы и фосфатазы, проявляют классическую каталитическую активность фермента. Такие действия могут происходить как на поверхности бислоя так и глубоко внутри него. Мембранные белки также служат в качестве структурных молекул, поддерживающих полярность, форму и размер клеток и придающих уникальные свойства, необходимые для их физиологической функции, например, позволяющие слияние и разделение мембран [von Heijne, 2007].

Углеводные компоненты биомембран находятся в составе мембранных белков (гликопротеинов и протеогликанов), липидов (гликолипидов) и мукополисахаридов [Болдырев и др., 2006]. Углеводы на поверхности клеток контролируют межклеточные взаимодействия и играют жизненно важную роль в различных физиологических процессах, выступая в качестве различных маркеров [Watson, 2015].

Локализация и структурное разнообразие углеводов на поверхности клеток обеспечивает распознавание факторов, определяющих направление межклеточных взаимодействий в ходе эмбрионального развития, связывание патогенов с тканями-мишенями и взаимодействия между клетками в иммунной системе. Кроме того, изменения экспрессии на клеточной поверхности углеводов может привести к дефектам межклеточного распознавания или к неконтролируемому росту клеток, что связано с неопластической трансформацией и метастазами [The cancer glycome..., 2015].

Таким образом, биологическая мембрана является одной из наиболее важных структур клетки. Она представляет собой оболочку с уникальным строением, обеспечивающим барьерную функцию. Низкая проницаемость

мембраны для заряженных частиц, позволяет поддерживать неравновесное распределение ионов между внеклеточной и цитоплазматической сторонами клетки, что имеет решающее значение для нормального функционирования клеток. Разрушение мембраны приведет к установлению равновесия и клеточному апоптозу.

1.1.2. Особенности структурной организации мембран клеток крови

Кровь состоит из жидкой части плазмы и взвешенных в ней форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов [Левгов и др., 1982].

Эритроциты являются самой многочисленной группой форменных элементов крови, и наиболее высокоспециализированными дифференцированными клетками. Для зрелых эритроцитов характерны гомогенная цитоплазма, отсутствие ядра и клеточных органелл [Артюхов, Наквасина, 2000]. Организация плазматической мембраны эритроцитов не отличается от организации других мембран клеток эукариот, но обладает при этом рядом специфических особенностей [Геннис, 1997].

Эритроцитарная мембрана состоит из двух доменов, представленных липидным бислоем и цитоскелетом. Липидный домен структурно аналогичен таковому у большинства клеток млекопитающих. Однако цитоскелет отличается от того, что считается цитоскелетом в других клетках, так как он не содержит структурный белок тубулин и не участвует в подвижности клеток и фагоцитозе [Боровская и др., 2010].

Липидный домен состоит из почти равных частей липидных и белковых молекул. Основными липидами являются холестерин и фосфолипиды. Хотя холестерин равномерно распределен между двумя слоями липидного бислоя, другие липиды распределены асимметрично. Гликолипиды, фосфатидилхолин и сфингомиелин находятся во внешней стороне бислоя; фосфатидилинозитолы, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин встречаются во внутреннем слое, обращенном к цитоплазме. Хотя силы и механизмы, ответ-

ственные за асимметрию, неизвестны, перераспределение мембранных фосфолипидов может иметь серьезные последствия [Dowhan, 1997].

Текучесть липидного домена определяется молярным отношением холестерина к фосфолипиду, степенью ненасыщенности ацильных цепей фосфолипида и соотношением фосфатидилхолина и сфингомиелина. Фосфатидилхолин образует очень текучие липидные области, в то время как сфингомиелин наоборот делает мембрану более жесткой [The effect of cholesterol..., 1997].

Белки в липидном домене обычно распределяются от внутренней части эритроцита к внешней. Их можно структурно разделить на внутреннюю гидрофильную часть, мембранную гидрофобную часть и внешнюю гидрофильную часть с присоединенным углеводом. Некоторые группы крови определяются структурой этих внешних углеводов [Голубков, 2014].

Цитоскелет эритроцитов состоит из нескольких белков, которые образуют нитевидную сеть под липидным бислоем. Сеть состоит из спектрина, анкирина, актина и белка 4.1 [Костюк, 2016]. Цитоскелетные белки взаимодействуют с интегральными белками и липидами бислоя, таким образом, поддерживая целостность мембраны. Цитоскелет играет важную роль в поддержании формы, гибкости и организации липидов эритроцитов. Спектрин является доминирующим мембранным белком, как по количеству копий на эритроцит, так и по размеру. Он состоит из двух белков с молекулярной массой 240 000 и 220 000 дальтон. Оба белка представляют собой длинные гибкие структуры, которые скручиваясь вместе, образуют гетеродимеры [Котык А., Яначек, 1980].

Цитоскелет эритроцитов важен с физиологической точки зрения, поскольку унаследованные дефициты любого из его белков вызывают нестабильность мембраны, потерю мембранных липидов и повышенную тенденцию к слиянию пораженных эритроцитов [VonHeijne, 2007]. Хотя конфигурация спектрина в физиологических условиях неизвестна, способность спектрина и, следовательно, цитоскелета расширяться, влияет на деформируе-

мость эритроцитов и прочность мембраны [Головко, 2010]. Деформируемость эритроцитов зависит от геометрии клетки (включая отношение поверхности к объему), вязкоупругих свойств мембраны и внутриклеточной вязкости (прежде всего концентрации гемоглобина). И деформируемость, и прочность мембраны в значительной степени зависят от цитоскелета эритроцитов [Костюк, 2016].

Нормальный двояковогнутый эритроцит человека объемом 90 мкл и площадью поверхности 140 мкм² имеет избыточную площадь поверхности на 40% по сравнению со сферой того же объема. Без отношения избыточной площади поверхности к объему, клетка не способна деформироваться, поскольку любое отклонение от сферического состояния при постоянном объеме подразумевает увеличение площади поверхности, что не позволяет осуществить липидный бислой [Dumezetal., 2004; Михайлова, 2012]. Поддержание объема клеток опосредуется различными мембранно-связанными переносчиками ионов. Потеря площади поверхности в результате везикуляции мембраны или фрагментации клеток в результате снижения механической стабильности мембраны, а также увеличения объема клетки из-за дефектных переносчиков ионов, все это ставит под угрозу способность клетки деформироваться и может привести к его преждевременному изъятию из кровообращения [Lohman et al., 2012].

Уникальной особенностью нормальной мембраны эритроцитов является ее высокая эластичность, которая позволяет клетке быстро реагировать на приложенные жидкие напряжения в циркуляции.

Во время старения нормальные эритроциты теряют площадь поверхности и объем с небольшой потерей гемоглобина и, как следствие, плотность клеток постепенно увеличивается в течение 120-дневного периода жизни эритроцитов. Показано, что изменение величины шероховатости обнаруживается при деформации эритроцита, старении и развитии диабета, действии анестетиков, а также, при наследственном сфероцитозе [Бойтлер, 1981].

Лейкоциты являются основными клеточными компонентами воспалительного и иммунного ответа, которые защищают организм от инфекции и неоплазии и помогают в восстановлении поврежденных тканей.

Различают два основных типа лейкоцитов: гранулоциты и агранулоциты. Гранулоциты включают в себя нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и тучные клетки. Их зерна содержат ферменты, которые повреждают патогены и выпускают в кровоток воспалительных посредников [Черенкевич и др., 2008; Ярлин, 2010].

Мононуклеарные лейкоциты (агранулоциты) включают лимфоциты, моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Эта группа клеток участвует как во врожденной, так и в адаптивной функции иммунной системы [Костюк, 2016].

На нейтрофилы приходится наибольшее количество среди лейкоцитов (около 60 %). Ядро нейтрофилов делится – на 2–5 сегментов и окрашивается в темно-фиолетовый цвет (многолопастное ядро). Цитоплазма бледно-розовая с мелкими розово-фиолетовыми гранулами. Размер нейтрофилов 12–16 микрометров в диаметре [Хаитов и др., 2010].

Эозинофилы составляют около 3% белых клеток крови, диаметром 14–16 микрометров. Ядро эозинофилов голубое и разделено на 2 сегмента. Цитоплазма бледно-розового цвета с крупными оранжевыми и красными гранулами [Ярлин., 2010].

Базофилы составляют самое низкое количество среди лейкоцитов (около 1%). Ядро базофилов имеет 2 доли, которые окрашивают фиолетовый цвет. Диаметр базофилов 14-16 микрометров. Цитоплазма бледно-розово-коричневая, но содержит большие фиолетовые/сине-черные гранулы из-за чего ядро не ясное [Хаитов и др., 2010].

Моноциты составляют около 6% белых клеток крови. Моноциты имеют единичное ядро (извилистой формы); в виде почки, фасоли или подковы с глубокими вмятинами и пятнами серо-голубого цвета. Цитоплазма иногда содержит вакуоли (полость, заполненная жидкостью в цитоплазме). Моно-

циты являются самыми крупными нормальными клетками крови и имеют диаметр 14-20 микрометров [Нестерова и др., 2015].

Лимфоциты являются вторыми по распространенности клетками крови (около 30%) Имеют размер 8-15 микрометров в диаметре. Лимфоциты имеют большое, круглое или овальное, темное окрашивающееся ядро и небольшой ободок цитоплазмы с бледно-голубого цвета. Иногда в цитоплазме могут встречаться фиолетово-красноватые гранулы [Хаитов и др., 2010].

Структура мембран лейкоцитов является довольно слабо изученной. Функциональное состояние лейкоцитов зависит от наличия сложных взаимодействий между мембранными белками, цитоскелетом и сигнальными сетями. Мембранно-цитоскелетная ассоциация выступает в качестве супервизора для поддержания динамической формы клетки и непрерывного повторного моделирования «сигнальной архитектуры» иммунной клетки. Конечным отражением этого динамического взаимодействия является клеточная поляризация с образованием различных морфологических и функциональных полюсов с однонаправленной ориентацией движения лейкоцитов [Болдырев и др., 1990].

Цитоскелет лейкоцитов достаточно хорошо развит. Циркулирующие лейкоциты не адгезивны, но плотно связываются с эндотелиальными клетками после активации, что регулируется, в частности, взаимодействием $\beta 2$ субъединицы цитоплазматического хвоста с актиновым цитоскелетом [Артюхов, 2000].

В покоящихся лейкоцитах $\beta 2$ интегрин конstitutивно связаны с цитоскелетом актина через белок талин. Активация клеток индуцирует протеолиз талина и диссоциацию с $\beta 2$ хвостом. Однако эта фаза является преходящей, и сопровождается присоединением актиновых нитей к интегринам, что опосредуется белком α -актинина. Ассоциация α -актинина с интегринами может стабилизировать цитоскелет и повысить прилипание к эндотелию и миграцию через него. Предлагается, что сродство α -актинина к хвосту $\beta 2$ регулируется изменением конформации хвост [Костюк, 2016].

Интегрины представляют собой гетеродимерные трансмембранные молекулы адгезии, состоящие из нековалентно связанных α и β субъединиц, которые физически связываются внеклеточными лигандами с цитоскелетом [MolecularBiology..., 2002]. Цитоплазматический домен субъединиц интегрин β связывает эти рецепторы с цитоскелетом актина. Однако актиновые нити не могут напрямую связываться с интегринными. Вместо этого интегрины косвенно связаны с актиновыми нитями через несколько актин-связывающих протеинов, включая α -актинин, талин, и филламин [VonHeijne, 2007].

Несколько интегринов, включая LFA-1 и Mac-1, имеют общую $\beta 2$ субъединицу и присутствуют исключительно на лейкоцитах. Эти интегрины лейкоцитов опосредуют адгезию клетки к лигандам эндотелия как внутриклеточные молекулы прилипания. Ассоциация цитоскелета с цитоплазматическими хвостами интегрин $\beta 2$ играет важную роль в регуляции внутриклеточных событий [Геннис, 1997]. Некоторые исследования предлагают, что в покоящихся клетках LFA-1 на лимфоцитах ограничен актином цитоскелета и что Ca^{2+} - опосредованная активация фермента кальпаина при активации лейкоцита высвобождает LFA-1 из этого ограничения [Naum, Kaplan, 1991].

Лейкоциты при нормальной циркуляции имеют сферическую форму и не расширяют цитоплазматические проекции в виде псевдоподий, поскольку такие проекции препятствовали бы прохождению клеток через мелкие кровеносные сосуды. Однако при активации лейкоциты образуют крупные псевдоподии, которые необходимы клеткам для прикрепления к эндотелию и миграции через стенки сосудов [Нестерова и др., 2015].

Поверхности лейкоцитов человека полностью покрыты субмикронными мембранными складками (микровиллами), которые имеют высоту порядка 0,2 мкм. Длина и форма складок мембраны неоднородны [Ярлин., 2010].

Инфильтрация воспаленных тканей лейкоцитами, особенно лимфоцитами и нейтрофилами, является ключевым событием в развитии и прогрессировании воспаления.

Нейтрофилы, макрофаги/моноциты и лимфоциты прилипают к эндотелию и претерпевают изменения от сферического до морфологически уплощенного. Это необходимо для прочной адгезии и является необходимым условием для трансмиграции через эндотелий, будь то путем миграции между эндотелиальными клетками или «через» эндотелиальную клетку [Хаитов и др., 2010].

Изменение морфологии требует большого расширения площади поверхности лейкоцитов, что может быть реализовано за счет экстраинвазии гранулированного содержимого. Однако, внутриклеточных пузырьков не достаточно для использования в качестве мембранного резервуара. Одна гранула диаметром $0,2 \mu\text{m}$ (1/50 диаметра нейтрофильного фагоцита) вносят только 0,04% дополнительной площади мембраны. Удвоение площади поверхности потребовало бы 2500 слияния везикул с клеткой, чего не происходит в нормально функционирующей клетке. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) показывает, что лейкоциты имеют многочисленные поверхностные морщины и складки, что означает, что фактическая площадь поверхности этих клеток значительно превышает площадь поверхности того же диаметра [Ярлин., 2010].

Тромбоциты – это очень мелкие ануклеарные клетки крови (1–4 мкм), которые играют основную роль в первичном гемостазе и механизмах свертывания. Характеристика тромбоцитов требует их подсчета, связанного с точным анализом морфологии [Хаитов и др., 2010].

Форма тромбоцитов значительно меняется, она может быть круглой, овальной или стержневидной. Тромбоциты окрашивают от светло-голубого до фиолетового цвета, содержат много зернистости. Цитоплазму тромбоцитов можно разделить на две области: хромомер и гиаломер. Хромомер расположен в центре, где гранулы имеют тенденцию к агрегации. Гиаломер окружает хромомер и образует голубую, незернистую зону [Stoltz, 1983].

Незрелые тромбоциты могут быть дифференцированы от их зрелых аналогов по определенным морфологическим признакам: они имеют тенден-

цию быть больше по размеру, и имеют сетчатую цитоплазму из-за остатков РНК.

Поверхность мембраны тромбоцита имеет сложную структуру. Наружная поверхность тромбоцита покрыта гликокаликсом, который богат гликопротеинами. В пространствах многослойной мембраны расположены микротрубочки, формирующие цитоскелет тромбоцита [Геннис, 1997].

Цитоплазматическая мембрана тромбоцитов внедряется внутрь клетки с образованием многочисленных переплетенных канальцев, которые связаны с внеклеточным пространством. Такую систему называют «открытой канальцевой системой» (ОКС) [Костюк, 2016]. В ходе экспериментов было обнаружено, что на поверхности мембраны ОКС присутствуют те же гликопротеиды, что и на внешней мембране тромбоцитов. Таким образом, ОКС значительно увеличивает активную тромбоцитарную поверхность, что играет важную роль при изменении формы тромбоцита в период его активации [Головко, 2010].

Непосредственно в подмембранном пространстве располагаются плотные микротрубочки, которые образуют особую плотную микротубулярную систему (ПМТС), не связанную с внеклеточным пространством. ПМТС развивается из мегакариоцитарного эндоплазматического ретикулума. В данной системе происходят процессы депонирования кальция и синтеза простагландинов. Кроме того, образуя концентрические субмембранные структуры, ПМТС является частью цитоскелета тромбоцитов [Stoltz, 1983].

Важным свойством мембраны интактных тромбоцитов, является разный фосфолипидный состав наружной и внутренней поверхности тромбоцита. В состав тромбоцитов входят фосфолипиды, которые делятся на 2 группы:

- 1) не обладающие прокоагулянтной активностью, холиновые: фосфатидилхолин (ФХ) и сфингомиелин (СФ);

- 2) обладающие прокоагулянтными свойствами, кислые: фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтанолламин (ФЭ) и фосфатидилинозитол (ФИ) [Артюхов, Наквасина, 2000].

Фосфолипиды первой группы находятся как на наружной, так и на внутренней поверхности клеточной мембраны не активированных тромбоцитов.

Фосфолипиды второй группы в не активированных тромбоцитах располагаются преимущественно на внутренней поверхности клеточной мембраны.

В процессе активации тромбоцита концентрация ФС, ФЭ и ФИ на наружной поверхности значительно возрастает и образует прокоагулянтную поверхность, которая необходима для фиксации, активации и взаимодействия плазменных белков гемостаза. Кроме того, такое перераспределение изменяет вязкость и плотность клеточной мембраны, что так же играет важную роль в протекании гемостатических реакций. Кислые фосфолипиды мембраны тромбоцитов – ФС, ФИ и ФЭ называют фактором 3 тромбоцитов, или тромбоцитарным тромбопластином [Костюк, 2016].

Помимо ПМТС, цитоскелет тромбоцитов образуют нити актина, спектрина и других протеинов, которые связаны с мембраной и пронизывают тромбоцит во всех направлениях.

Нарушения морфологии тромбоцитов обнаруживаются при приобретенных злокачественных гематологических заболеваниях, таких как миелопролиферативный или миелодиспластический синдромы и острый мегакариобластный лейкоз [Qian, Wen-jun, 2013].

1.2. Пуринергическая сигнальная система

Пуринергическая сигнальная сигнализация представляет собой сложную систему элементов, в которой молекула АТФ и родственные молекулы функционируют как межклеточные мессенджеры. Когда АТФ высвобождается во внеклеточное пространство, он активирует специфические рецепторы, принадлежащие к семейству P2 [Males, 1996]. Параллельно, эктонуклеотидазы превращают АТФ в его дефосфорилированные метаболиты, в том числе

аденозин, который стимулирует рецепторы P1. Активность обоих рецепторов влияет на различные клеточные процессы [Sekic, Linden, 2016].

В здоровом организме АТФ почти всегда присутствует в клетках, где он достигает нескольких миллимолярных концентраций. Во внеклеточной среде концентрация АТФ незначительна, т. е. находится в низком наномолярном диапазоне [Increased level of extracellular ATP..., 2008]. Огромный градиент внутри/внеклеточной концентрации, чрезвычайно ускоряет скорость высвобождения АТФ в ответ на открытие АТФ-проводящих путей плазматической мембраны. Кроме того, АТФ хорошо растворим в воде и, следовательно, легко диффундирует в водной внеклеточной среде и быстро разлагается множеством мощных нуклеотидаз [Di Virgilio, 2016]. Наконец, что не менее важно, практически все эукариотические клетки оснащены специфическими рецепторами внеклеточной АТФ, рецепторами P2 [Males, 1996]. Таким образом, АТФ является идеальным внеклеточным мессенджером клеточного дистресса, а P2-рецепторы – идеальными сенсорами «опасности». Некоторые ученые считают, что аденозин, наиболее важный продукт деградации АТФ, также может быть важным «сигналом опасности» [Sekic, Linden, 2016], но, учитывая его в основном иммуносупрессивную активность, этот нуклеозид с большей вероятностью будет вмешиваться на более поздних стадиях как иммунорегуляторный медиатор обратной связи.

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) [Males, 1996]. В основном все подтипы рецепторов P1 и P2 экспрессируются иммунными клетками в зависимости от типа клеток и дифференцировки. Рецепторы аденозина P1 широко экспрессируются иммунными клетками миелоидного и лимфоидного происхождения. Роль рецепторов A1 и A3 недостаточно понятна, в то время как имеются убедительные доказательства решающей роли рецепторов A2A и A2B в контроле воспаления. Из-за их связи с повышением цАМФ, рецепторы A2A и A2B в основном являются иммунодепрессантами [Sekic, Linden, 2016].

P2YR-рецепторы также широко экспрессируются в иммунных клетках, и были тщательно описаны в нейтрофилах и эозинофилах, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, Т и В-лимфоцитах. Несколько подтипов P2YR были также идентифицированы в клетках естественных киллеров (NK). Было установлено, что экспрессия рецептора P2Y6 сильно повышена на эпителиальных клетках дыхательных путей после индукции аллергического воспаления дыхательных путей [Di Virgilio, 2016]. P2Y6R также исследовали на эозинофилах, тучных клетках, моноцитах и нейтрофилах: его активация связана с высвобождением провоспалительных цитокинов. Было обнаружено, что рецептор P2Y12R играет важную роль в коагуляции, так как вызывает активацию тромбоцитов и высвобождение медиатора воспаления [Purine receptor..., 2013]. Прямым следствием этих исследований стала разработка антитромботической терапии, направленной на P2Y12R [Sekic, Linden, 2016]. Ввиду их решающей роли в ангиогенезе особое внимание было представлено характеристике рецепторов P2Y в эндотелиальных клетках. Существуют доказательства того, что P2YRs, экспрессируемые клетками CD31+, трансактивируют рецептор 2 сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR2), тем самым усиливая тубулогенез эндотелиальных клеток в микроокружении опухоли [Extracellular ATP and P2..., 2018]. Таким образом, можно с уверенностью заключить, что практически все типы иммунных клеток, а также стромальные клетки экспрессируют множественные подтипы P2YR [Lohmanetal., 2012].

Исследование P2XR в иммунных клетках началось примерно в то же время, что и P2YR, но развивалось медленнее, поскольку в течение длительного времени считалось, что ионные каналы играют незначительную роль в регуляции иммунных клеточных реакций [Di Virgilio, 2015]. Теперь эта точка зрения существенно изменилась, основная роль P2XR в иммунной регуляции была широко признана, и все больше внимание уделяется их экспрессии и функции. Человеческие нейтрофилы и эозинофилы, особенно после их активации, Т и В лимфоциты и NK-клетки экспрессируют P2X1R, P2X4R и

P2X7R [Cekic, Linden, 2016].). Экспрессия P2X5R была зарегистрирована только в Т-лимфоцитах [Lohmanetal., 2012]. Тучные клетки экспрессируют P2X1R, P2X4R и P2X7R и, возможно, P2X3R [Extracellular ATP and P2..., 2018].

Существует формальное доказательство того, что АТФ высвобождается в микромолярных количествах в местах воспаления или повреждения [Di Virgilio, 2016]. Аналогичная демонстрация для других нуклеотидов отсутствует, но разумно полагать, что их высвобождение аналогично выбросу АТФ. Оказавшись во внеклеточной среде, АТФ гидролизуется мощными нуклеотидазами плазматической мембраны (CD39 и CD73) с образованием АДФ, АМФ и аденозина, который является наиболее важным продуктом деградации АТФ [Lohman et al., 2012]. Высвобождение нуклеотидов создает градиент концентрации, достаточный для поддержки хемотаксиса клеток на основе как АТФ, так и аденозина, поскольку направленная подвижность воспалительных клеток требует тесного взаимодействия между этими двумя пуринами. Было показано, что высвобождение АТФ и образование аденозина способствуют хемотаксису, вызываемому хемотаксическими пептидами [Cekic, Linden, 2016].

Известно, что дендритные клетки смещают дифференцировку CD4 + Т-лимфоцитов в сторону фенотипа Th1, Th2, Th17 или Treg [Lohman et al., 2012]. На этот процесс влияют несколько факторов, среди которых важную роль занимает аденозин и внеклеточный АТФ [Orlov, 2007; Extracellular ATP and P2..., 2018]. Воспалительная микросреда богата внеклеточным АТФ, который в сочетании с другими провоспалительными факторами нарушает созревание дендритных клеток в сторону фенотипа Th2. Аденозин, накапливающийся в местах воспаления, помимо модуляции дифференцировки дендритных клеток, также влияет на функции макрофагов и лимфоцитов, а также на высвобождение VEGF (Факторы роста эндотелия сосудов) [Di Virgilio, 2016]. Стимуляция рецепторов A2B приводит к аномальной дифференцировке ДК в «опухолевый» фенотип, характеризующийся снижением экспрессии

CD1a, снижением продукции CXCL10, снижением перекрестной презентации опухолевого антигена и повышенной секрецией VEGF[Cekic, Linden, 2016]. Кроме того, аденозин, действующий на рецепторы A2B, способствует размножению клеток, участвующих в иммуносупрессии, таких как клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSC) [Inhibition of neutrophil..., 2007; Di Virgilio, 2016].

Внеклеточные нуклеотиды оказывают широкий спектр воздействия на иммунные клетки, что имеет важные последствия при многих заболеваниях.

Хотя первоначально считалось, что пуринергическая передача сигналов является важным и физиологически значимым сигнальным путем исключительно в нервной системе, становится все более очевидным, что она также играет значительную роль в иммунных и воспалительных процессах.

1.3. Характеристика функциональных параметров системы крови при развитии острого лимфобластного лейкоза

1.3.1. Этиология и патогенез лейкоза

Острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ) являются гетерогенной группой неопластических клональных заболеваний лимфопоэтической ткани, характеризующихся накоплением лимфобластов в костном мозге [Зуховицкая, Фиясь, 2015].

Отличительной чертой ОЛЛ являются хромосомные аномалии и генетические изменения, связанные с дифференцировкой и пролиферацией клеток-предшественников лимфоцитов. У взрослых людей в 75% случаев заболевание развивается из злокачественных предшественников В-клеточной линии, остальная часть случаев приходится на злокачественные предшественники Т-клеток [Terwilliger, Abdul-Hay, 2017].

Большинство клинических проявлений отражают накопление злокачественных, плохо дифференцированных лимфоидных клеток в костном мозге,

периферической крови и, экстрамедуллярных участках [Bloodviscosityparameter..., 1992].

Отличительной чертой ОЛЛ являются хромосомные aberrации, тем не менее, их недостаточно для возникновения лейкемии. Характерные транслокации включают t(12;21) [ETV6-RUNX1], t(1;19) [TCF3-PBX1], t(9;22) [BCR-ABL1] и перестройку MLL. Совсем недавно был идентифицирован вариант с аналогичным профилем экспрессии гена (Филадельфийская хромосома) рН-позитивный, но без перестройки BCR-ABL1 [Ladetal., 2017].

Первые попытки классификации ОЛЛ были основаны на морфологических критериях, согласно этой концепции ОЛЛ делили на 3 подтипа (L1, L2 и L3) на основании размера клеток, цитоплазмы, ядрышек, вакуолизации и базофилии. В 1997 году Всемирная организация здравоохранения предложила составную классификацию в попытке учесть морфологию и цитогенетический профиль лейкозных бластов и определила три типа ОЛЛ: В-лимфобластный, Т-лимфобластный и лейкемию Burkitt-клеток [Terwilliger, Abdul-Nay, 2017]. Позднее пересмотренная в 2008 г. лейкемия Burkitt-клеток была устранена, и больше не рассматривается отдельно от лимфомы Беркитта, а В-лимфобластный лейкоз был разделен на два подтипа: В-ОЛЛ с рецидивирующими генетическими аномалиями и В-ОЛЛ, без рецидивирующих генетических аномалий. В-ALL с рецидивирующими генетическими аномалиями дополнительно разграничивается на основе присутствующей специфической хромосомной перестройки. У взрослых В-клеточный ОЛЛ составляет приблизительно 75% случаев, остальные случаи приходятся на Т-клеточный ОЛЛ [Зуховицкая, Фиясь, 2015].

Патогенез ОЛЛ предполагает аномальную пролиферацию и дифференцировку клональной популяции лимфоидных клеток [Смирнова, Манчук, 2015]. Педиатрические исследования выявили генетические синдромы, предрасполагающие к ОЛЛ, такие как синдром Дауна, анемия Фанкони, синдром Блума, атаксия телангиэктазия и синдром Неймегена. Другие предрасполагающие факторы включают воздействие ионизирующего излучения, пести-

цидов, некоторых растворителей или вирусов, таких как вирус Эпштейна-Барра и вирус иммунодефицита человека. Однако, в большинстве случаев, ОЛЛ появляется как злокачественная опухоль *de novo* у ранее здоровых индивидуумов [Апластическое проявление..., 1989].

Макроскопические проявления различных форм ОЛЛ сходны между собой, в связи с чем, определение их типологии может быть затруднено. При развернутой картине ОЛЛ костный мозг находящийся в плоских костях окрашен в темно-красный или розово-красный цвет, жировой костный мозг в трубчатых костях замещается лейкозными разрастаниями [Lichtman, 1973]. В ряде случаев выявляется увеличение селезенки, лимфатических узлов, печени. Часто масса селезенки в два раза выше возрастной нормы. Пораженные лимфатические узлы окрашены в розово-красный цвет, мягкой консистенции, не спаяны между собой. Печень, часто увеличена незначительно, на разрезе могут быть видны мелкие серовато-белые полосы, соответствующие зонам лейкозной инфильтрации [Большая медицинская..., 2015].

В костном мозге, по данным трепанобиопсии, на первых стадиях заболевания скопления бластных клеток являются очаговыми, в достаточном количестве обнаруживаются элементы деятельного костного мозга. Прогрессирование заболевания характеризуется увеличением числа и размеров лейкозных разрастаний, их слиянием, а затем диффузной инфильтрацией ткани костного мозга [Lichtman, 1973]. Лейкозная инфильтрация ткани селезенки и лимфатических узлов сопровождается уменьшением размеров и числа фолликулов вплоть до полного их исчезновения. Лейкозная инфильтрация также может быть обнаружена в желудочно-кишечном тракте, легких, печени, сердце и др. [Зуховицкая, Фиясь, 2015].

При остром лимфобластном лейкозе этиология подавления нормального кроветворения остается неясной. Наблюдается снижение количества нормальных предшественников, недостаточное производство нормальных кроветворных факторов роста и производство ингибирующих цитокинов злока-

чественным клоном. Происходит инфильтрация негематопоетических тканей лейкозными клетками [Moore et al., 1973, Aplastic presentation..., 1989].

Появление ОЛЛ может быть неспецифическим, с сочетанием конституциональных симптомов и признаков недостаточности костного мозга (анемия, тромбоцитопения, лейкопения) [Terwilliger, Abdul-Hay, 2017].

В начальный период развития ОЛЛ анемия не всегда возникает, однако позже она достигает высокой степени, при этом содержание гемоглобина снижается до 30-60 г/л (при норме 120-160 г/л), а число эритроцитов до $1,0-1,5 \times 10^{12}$ кл/л (при норме $4,3-5,5 \times 10^{12}$ кл/л) и носит нормохромный или гиперхромный характер [Руководство..., 1985; Littlewood, Mandelli, 2002].

Количество тромбоцитов в раннем периоде заболевания часто нормальное, однако при прогрессировании заболевания число тромбоцитов снижается, а при наступлении ремиссии вновь увеличивается (Руководство..., 1985; Ковалева, 1990).

На всех стадиях ОЛЛ у больных развивается Т-клеточный иммунодефицит и уменьшение величины соотношения CD4/CD8. Особенностью рецидива ОЛЛ является увеличение содержания NK-клеток [Смирнова, Манчук, 2013].

1.3.2. Морфология и функционирование клеток крови при ОЛЛ

Морфология и объемы клеток при ОЛЛ также меняются. Было показано, что при острых лейкозах происходит увеличение диаметра и высоты эритроцитов [Скоркина и др., 2012]. Площадь поверхности, объем, и диаметр лимфоцитов больных ОЛЛ обычно увеличен [Сладкова, Скоркина, 2013].

Бластные формы клеток, обнаруживаемые при ОЛЛ в периферической крови имеют неправильные контуры цитоплазмы и ядро занимающее большую часть клетки [Скоркина и др., 2012; Клочкова и др., 2016] (рис.1.3).

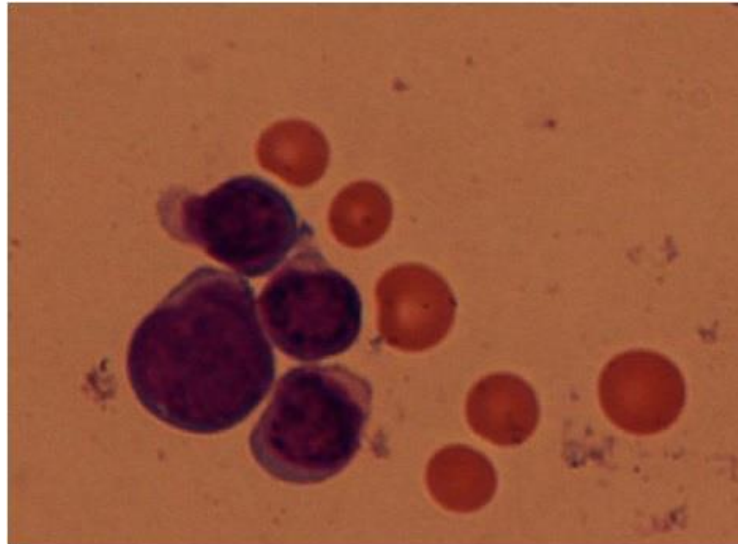


Рис. 1.3. Полиморфизм бластных форм в периферической крови в группе больных ОЛЛ [Клочкова и др., 2016]

Опухолевая трансформация клеток крови сопровождается патологией митозов на стадии метафазы, что является ключевым механизмом нарастания генетической гетерогенности клеток крови на различных этапах бластомогенеза (рис. 1.4).

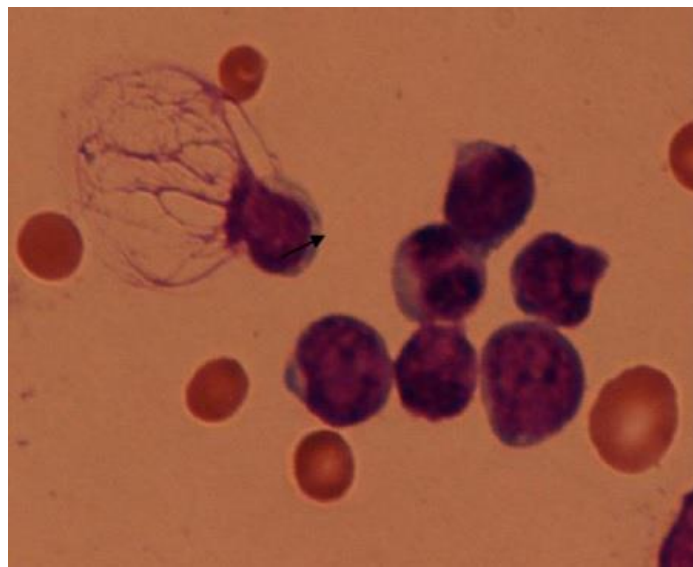


Рис. 1.4. Патология митоза – поляя метафаза [Клочкова и др., 2016]

В лейкоформуле при развитии ОЛЛ отмечается дегенеративный сдвиг влево с увеличением числа моноцитов и базофилов на фоне снижения эози-

нофилов и нейтрофилов. При ОЛЛ наблюдается снижение интенсивности внутриклеточных метаболических процессов лимфоцитов, уменьшение митохондриального транспорта, гликолиза, метаболизма лимонной кислоты. Часто наблюдаются перекисные процессы в лимфоцитах, снижение внутриклеточного катаболизма липидов при увеличении переаминирования [Смирнова, Манчук, 2015].

Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных ОЛЛ по мере прогрессирования заболевания меняется от усиления на стадии первой атаки до снижения активности на стадиях ремиссии и повторного рецидива, что вероятно обусловлено истощением внутренних резервов организма.

При ОЛЛ наблюдается гипоксическая реакция системы крови, что связывают со снижением объемной массы эритроцитов (показатель гематокрита) и уменьшением средней концентрации гемоглобина в эритроците [Клочкова и др., 2016].

Пациенты с острым лейкозом предрасположены к различным нарушениям свертывания крови. Существует несколько исследований, показывающих повышенную выработку тромбина, показанную комплексами тромбин-антитромбин (АТ) при диагностике и при начальной терапии ОЛЛ. Фактор VIII, фактор Виллебранда (vWF) и фибриноген являются положительными реагентами острой фазы. Кроме того, при ОЛЛ клетки также экспрессируют раковый прокоагулянт (РП). РП активирует фактор X напрямую, независимо от фактора VII [Lad et al., 2017].

Химиотерапия при ОЛЛ увеличивает тромбогенный потенциал. Из них L-аспарагиназа, которая истощает клетки на незаменимую аминокислоту аспарагин, также в конечном итоге истощает прокоагулянтные (фибриноген, факторы V, VII, VIII, IX, X и XI) и антикоагулянтные (АТ, плазминоген, белок C/S) белки. L-Аспарагиназа может фактически вызывать протромботическое состояние, поскольку она активирует прокоагулянтные белки раньше, чем антикоагулянтные белки [Lad et al., 2017].

Таким образом, признаки и симптомы ОЛЛ отражают расширение лейкоэмического клона в костном мозге с нарушением нормального кроветворения.

1.3.3. Пуринергическая сигнальная система при ОЛЛ

Пуринергическая сигнализация, где аденозин 5'-трифосфат (АТФ) и аденозин действуют как внеклеточные сигнальные молекулы, была впервые предложена в 1972 году [Burnstock, 2011]. Позже рецепторы пуринов и пиримидинов были клонированы и функционально охарактеризованы. В последние годы был проведен ряд исследований патофизиологической роли пуринергической сигнализации и ее терапевтического потенциала при различных заболеваниях [Eltzschigetal., 2012; Burnstock, Francesco, 2013; Yang, 2013].

Противоопухолевая активность АТФ была впервые показана в 1983 году. Было продемонстрировано, что добавление экзогенного АТФ к аденокарциномным клеткам рака поджелудочной железы и толстой кишки ингибирует рост клеток, вызывая остановку клеточного цикла в фазе S. При этом, аденозин, напротив, повышал рост опухоли [Rapaport, 1983].

Хотя общепризнано, что лечение АТФ или аналогами АТФ оказывает сильное цитотоксическое действие на несколько опухолей, также ясно, что низкие дозы АТФ (как это происходит, например, при спонтанном высвобождении этого нуклеотида практически из каждого типа клеток) оказывают стимулирующее на рост действие. В зависимости от выраженных подтипов P2-рецепторов опухолевые клетки могут быть более чувствительными к гибели или к трофическому эффекту АТФ [Burnstock, Francesco, 2013].

Различные подтипы пуринергических рецепторов P2 участвуют в реакции торможения роста, наблюдаемой в различных типах злокачественных клеток. Анти-неопластическое действие или должно привести к ингибированию пролиферации клетки, промотированию дифференцирования клетки

(приводя к ингибированию пролиферации клетки) и смерти клетки или комбинации этих 3 процессов. Вероятно, что конечный эффект обусловлен сочетанием нескольких эффектов, вызванных стимуляцией более чем одного подтипа рецепторов P2. На сегодняшний день в ингибирование роста раковых клеток в основном вовлечены пять подтипов P2-рецепторов, а именно P2X5, P2X7, P2Y 1, P2Y 2 и P2Y 11 [Burnstock, 2011], причем разные клеточные линии по-разному реагируют на стимуляцию рецепторов.

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 [Burnstock, Francesco, 2013]. Существует корреляция между уровнем АТФ в опухолевых клетках и развитием рака: АТФ-истощающие агенты могут заметно усилить терапию рака. Химиотерапия индуцирует высвобождение АТФ из опухолевых клеток, что приводит к апоптотической гибели клеток и вероятно, опосредуется через рецепторы P2X7.

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 В-клеток [The role of P2X7..., 2009]. Экспрессия рецептора P2X7 была значительно выше (по сравнению с мононуклеарными клетками костного мозга) в клетках пациентов с лимфобластным лейкозом, а также с острым и хроническим миелогенным лейкозом [Burnstock, Francesco, 2013]. Утверждалось, что опосредованное рецептором P2X7 цитотоксическое действие на клеточные линии лейкемии KG1a и J6-1 может происходить независимо от кальциевого ответа [Burnstock, 2011].

При педиатрическом остром лейкозе было показано, что рецепторы P2X1, P2X4, P2X5 и P2X7 были активированы, в то время как рецепторы P2X2, P2X3 и P2X6 отсутствовали или незначительно экспрессировались, при этом самая высокая экспрессия рецепторов P2X7 была обнаружена у ре-

цидивизирующих пациентов [AbnormalexpressionofP2X..., 2010]. Также наблюдалось значительное снижение экспрессии рецепторов P2X4, P2X5 и P2X7 после полной ремиссии при химиотерапии [DiVirgilio, 2015].

Было показано, что аденозин оказывает цитотоксическое действие на клетки лейкемии мыши L1210 [Burnstock, Francesco, 2013]. В клеточной линии лейкемии человека, U-937, цитотоксичность, вызванная АТФ, была двухфазной, первоначальный ответ был вызван АТФ, тогда как более поздний ответ был вызван аденозином после эктоэнзимного распада АТФ [ATPdepletionas..., 1980].

Пуринергические рецепторы также были идентифицированы на клетках Jurkat, клеточной линии лейкемии человека. Гуанозин и дезоксигуанозин токсичны для клеток Jurkat за счет двух механизмов: истощение АТФ, вызывающее некроз, и накопление дГТФ, приводящее к апоптозу. Было показано, что аденозин подавляет рост линии MOLT-4 лейкемических клеток Т-лимфоцитов человека [Burnstock, Francesco, 2013]. При этом, А1 и А2-подобные рецепторы оказывают противоположное влияние на высвобождение 5-гидрокситриптамина из линии опухолевых клеток мастоцитов, базальных клеток лейкемии RBL крыс [Burnstock, 2011].

Таким образом, пуринергическая сигнальная система осуществляет ведущую роль в контроле и управлении злокачественных клеток. Нуклеотиды и пуринергическая сигнализация могут использоваться в качестве биомаркеров при различных заболеваниях, а также служить потенциальными новыми терапевтическими мишенями для лечения опухолевых процессов.

1.4. Методы определения заряда клеточной поверхности

Известно, что большинство клеток животного происхождения на поверхности мембран несут определенный заряд, обусловленный присутствием ионизированных фосфатных и карбоксильных заместителей на внешней стороне поверхностных макромолекул [Stoltz, 1983; Wilson, 2001].

Для исследования поверхностного заряда клеток применяются различные методы. Наиболее распространенным методом является измерение поверхностного потенциала методом электрофореза. Так как заряд клетки определяет ее электрокинетические свойства, то методом электрофореза можно определить скорость движения зарядов в электрическом поле. При этом, при изменении рН окружающей среды, величина электрофоретической подвижности будет меняться, поскольку степень диссоциации ионогенных групп зависит от рН [Ребров, 2009].

По полученному значению средней скорости электрофореза вычисляется значение электрокинетического потенциала, по уравнению Гельмгольца-Смолуховского (формула 1)

$$U_0 = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \Delta\varphi \cdot \zeta}{k \cdot \pi \cdot \eta \cdot l} \quad (1)$$

где U_0 – скорость электрофореза, м/с;

ε – относительная диэлектрическая проницаемость среды;

ε_0 – электрическая постоянная, $8,9 \cdot 10^{-12}$ А с/В м;

$\Delta\varphi$ – разность потенциалов, В;

ζ – электрокинетический потенциал, В;

k – коэффициент, зависящий от формы частиц;

η – вязкость дисперсионной среды, Н с/м²;

l – расстояние между электродами, м.

Электрокинетический потенциал (дзета-потенциал) клеток можно измерить, непосредственно наблюдая за их движением в микроскоп (рис. 1.1).

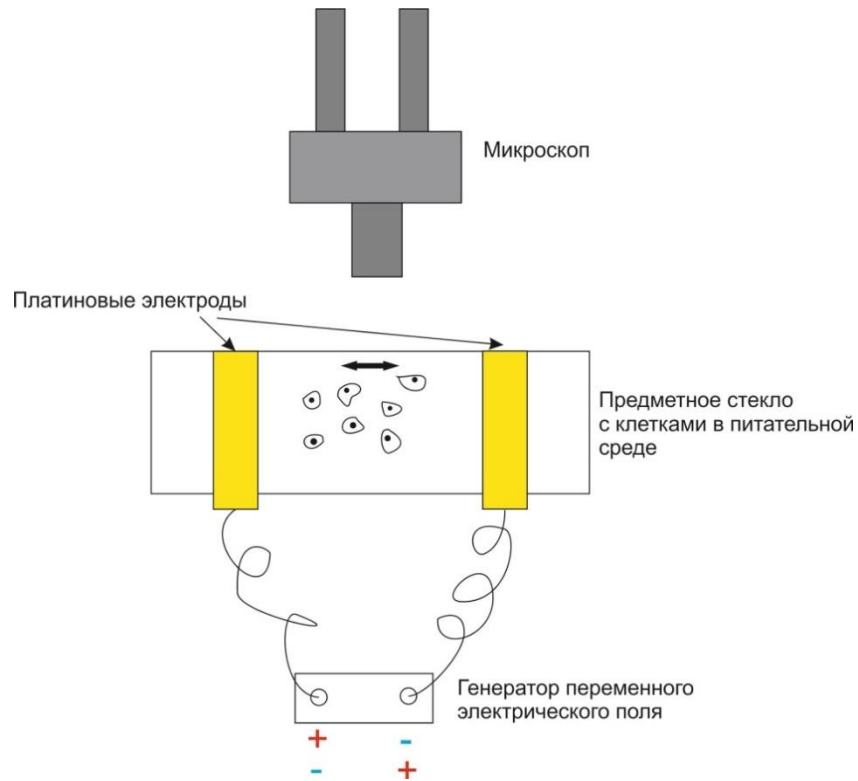


Рис. 1.1. Установка для исследования электрофоретической подвижности клеток [Скамрова, 2014]

Это достигается наложением постоянного электрического поля на взвесь клеток. При этом движение клеток идет в зависимости от знака заряда. Величину электрофоретической подвижности рассчитывают по формуле 2, при этом она прямо пропорционально величине электрического заряда клетки [Леонтьев, 2014].

$$V = \frac{S}{E \cdot t} \quad (2)$$

где V – путь клеток в сетке окуляра микрометра в одну сторону, мкм;

E – напряженность электрического поля, В/см;

t – время, в течение которого клетки проходят данное расстояние, с;

Метод микроэлектродной техники может быть использован и для измерения биоэлектрического потенциала в одиночных клетках. Недостатком

данного метода являются определенные методические трудности и большая затрата времени [Эффекты адреналина..., 2008; Сладкова, Скоркина, 2014].

Еще одним методом, позволяющим измерить мембранный потенциал клеток, является применение оптических индикаторов зондов. Регистрация биопотенциала происходит за счет либо смещения спектрального максимума, либо за счет изменения интенсивности флуоресценции [Freedman, Laris, 1981; Добрецов, 1989] (рис. 1.2).

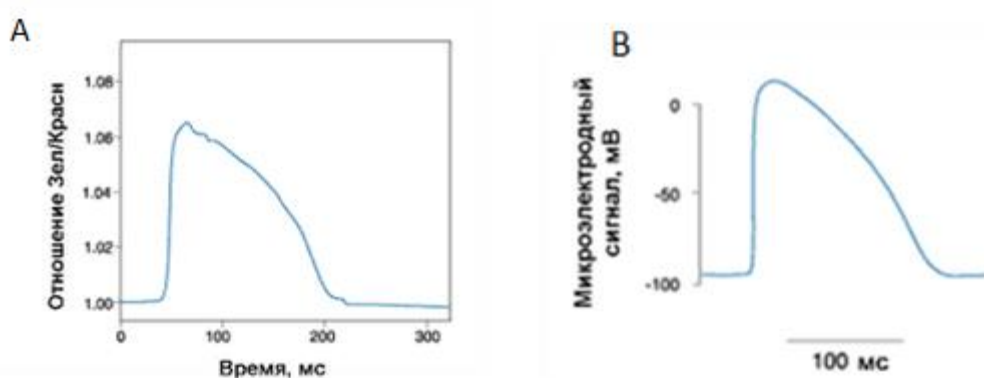


Рис. 1.2. А – Регистрация потенциала действия в мышечной клетке сердца кролика с помощью флуоресцентного потенциометрического зонда di-4-ANEPPS. В – потенциал действия, зарегистрированный с помощью микроэлектродов [Ratiometry of transmembrane..., 2000].

Метод измерения мембранного электрического заряда за счет оптической флуоресценции в окрашенной красителем биологической системе был впервые предложен в начале 1970-х годов [Salzberg et al., 1973]. С тех пор были зарегистрированы значительные успехи в разработке и производстве оптических красителей, чувствительных к электрическому заряду. Потенциометрические зонды включают катионные или цвиттерионные стирольные красители, катионные карбоцианины и родамины, анионные и гибридные оксонолы и мероцианин 540 [A large change..., 1973]. Класс красителей зависит от таких факторов, как накопление в клетках, механизма ответа и токсичности. Большое внимание заслуживает картирование мембранных электриче-

ских явлений в разных областях большой клетки или группы клеток [Ross, Krauthamer, 1984].

Недостатками применения данного метода является их неспецифическое связывание с мембранными структурами клетки, выгорание, аутофлуоресценция [Сладкова, Скоркина, 2014].

Особый интерес представляет метод измерения поверхностного потенциала эритроцитов по изменению их степени агрегации. Агрегацию при этом индуцируют хлористым лактаном [Шереметев и др., 1991] либо альциановым голубым [Bernard et al., 1988]. Определение степени агрегации осуществляется фотометрическим методом на агрометрах. После добавления агрегирующего агента идет просветление суспензии клеток вследствие образования агрегатов эритроцитов, что характеризуется падением оптической плотности. Данное явление фиксируется в виде кривой – агрегатограммы (в мм).

Суть метода основана на том, что между отрицательными зарядами клеток и положительно заряженным используемым веществом, образуются мостики, что приводит к агрегации клеток. При этом, чем больше отрицательный заряд клеток, тем больше агрегация эритроцитов, и наоборот [Шереметьев и др., 1991].

Достаточно перспективным методом измерения потенциала поверхности клеток в настоящее время является использование атомно-силовой микроскопии (АСМ) с интегрированным методом зонда Кельвина (МЗК) [Allison et al., 2010]. Для данного метода используются специализированные кантилеверы с токопроводящим покрытием. Метод основывается на двухпроходной методике. При первом проходе определяется рельеф поверхности образца с использованием полуконтактного метода АСМ-сканирования. На втором проходе этот рельеф отслеживается при прохождении зонда над образцом на некоторой высоте для определения поверхностного электрического потенциала [Руководство..., 2006].

Известно, что конечный размер наконечника в сканирующих зондовых микроскопах оказывает сильное влияние на измеряемое изображение. В си-

ловой микроскопии с использование МЗК эффект измерительного наконечника усиливается благодаря дальнедействующей электростатической силе. МЗК применяет напряжение смещения к зонду проводящего атомно-силового микроскопа (АСМ), чтобы компенсировать электростатические силы между зондом и образцом [Girard, 2001; Reconstruction of surface..., 2013].

Преимуществами данного метода являются простота технического исполнения, высокая достоверность получаемых результатов, способность одновременно анализировать большой массив клеток, а также оценивать поверхностный потенциал одиночной клетки [Сладкова, Скоркина, 2014].

Таким образом, существует несколько методов для измерения заряда клеточной поверхности, однако большинство из них характеризуются большой трудоемкостью и значительными временными затратами.

Глава 2. Материал и методы исследования

Исследования были выполнены на базе лаборатории НИУ «БелГУ» «Физиология адаптационных процессов». Объектом исследования была периферическая кровь здоровых людей ($n=60$) и людей больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) ($n=50$). 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.

Эксперимент проводили в две серии. В первой серии венозную кровь здоровых доноров ($n=30$) и больных ОЛЛ ($n=30$) делили на две части: в опытной пробирке проводили активацию пуриnergических сигнальных путей посредством модели «механического стресса», контрольную пробирку оставляли интактной. Во второй серии опытную пробу подвергали нагрузочному тесту экзогенной АТФ. Всего во второй серии было исследовано 30 проб крови здоровых людей и 20 проб крови людей, больных ОЛЛ. В опытных и контрольных пробах определяли концентрацию АТФ.

Механический стресс осуществляли согласно методу, описанному в работе [Oonishi et al., 1997]. Для этого 500 мкл цельной крови набирали в одноразовый туберкулиновый шприц (внутренний диаметр 4 мм, SF-Medical). Воздушные пузырьки при этом были тщательно удалены. Суспензию клеток пропускали через одноразовую иглу 25-го калибра (длина 30 мм и внутренний диаметр 0,5 мм; SF-Medical). Инъекцию осуществляли путем размещения груза массой 1 кг на верхнем конце вертикально закрепленного поршня шприца. Полученную кровь собирали в одноразовые 5-мл полипропиленовые центрифужные пробирки (рис. 2.1). Расстояние от кончика иглы до дна центрифужной пробирки составляло 15 мм.

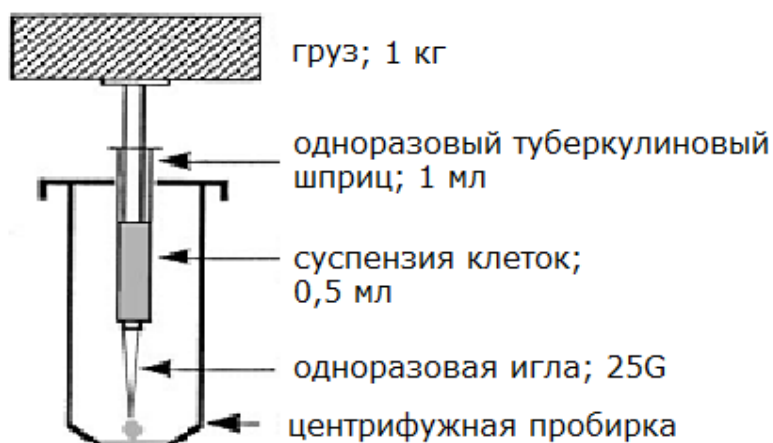


Рис. 2.1. Схематическое изображение инъекционного способа выполнения механического стресса [Oonishi et al.,1997]

Нагрузочный тест выполняли путем инкубирования крови с АТФ (1% раствор; Виал, Россия) в концентрации $10 \mu\text{M}$ в течение 15 мин при 37°C . Такая концентрация является физиологической в крови *in vivo* [Increased level of extracellular ATP..., 2008]. Кровь больных ОЛЛ людей инкубировали с АТФ в концентрации $100 \mu\text{M}$ при тех же условиях. Выбор экзогенной концентрации АТФ обусловлен данными литературы, согласно которым концентрация АТФ во внеклеточной среде при развитии опухолей значительно увеличивается до сотен микромолей [Increased level of extracellular ATP..., 2008].

Концентрацию АТФ в крови определяли колориметрическим методом [Титова и др., 2008]. 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 % раствором ТХУ (1мл) в течение 5 минут. Затем добавляли 1 мл физраствора (0,9 %), и продолжали экстракцию на холоде в течение того же периода 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 фосфорных 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 физраствора (0,9 %)

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 0,9 % физраствора. Содержимое пробирок быстро перемешивали и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 10 мин.

Контрольную и опытную пробы колориметрировали на фотометре КФК-3 (Россия, 2015) против физраствора 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 (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Зависимость оптической плотности раствора АТФ от его концентрации

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 минут 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.

Суспензию тромбоцитов получали согласно методу, описанному в работе [Таборская и др., 2016]. Для этого, кровь центрифугировали 10 минут при 2000 об/мин, затем 200 мл плазмы, богатой тромбоцитами отбирали в новую пробирку и добавляли 800 мл физиологического раствора. Центрифугировали при тех же параметрах. Супернатант удаляли и добавляли к осадку 200 мл бидистиллированной воды, получали суспензию клеток.

Исследование потенциала поверхности клеток осуществляли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT-MDT, Зеленоград, 2009). Схема работы микроскопа представлена на рисунке (рис. 2.3). В основе работы микроскопа лежит силовое взаимодействие между зондовым датчиком и поверхностью. Сила, воздействующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Регистрируя данный изгиб можно контролировать величину взаимодействия зонда с поверхностью [Миронов, 2004]. В полуконтактном режиме происходят резонансные колебания кантилевера над поверхностью образца, что позволяет значительно снизить расстояние на образец со стороны зонда [Руководство..., 2006].

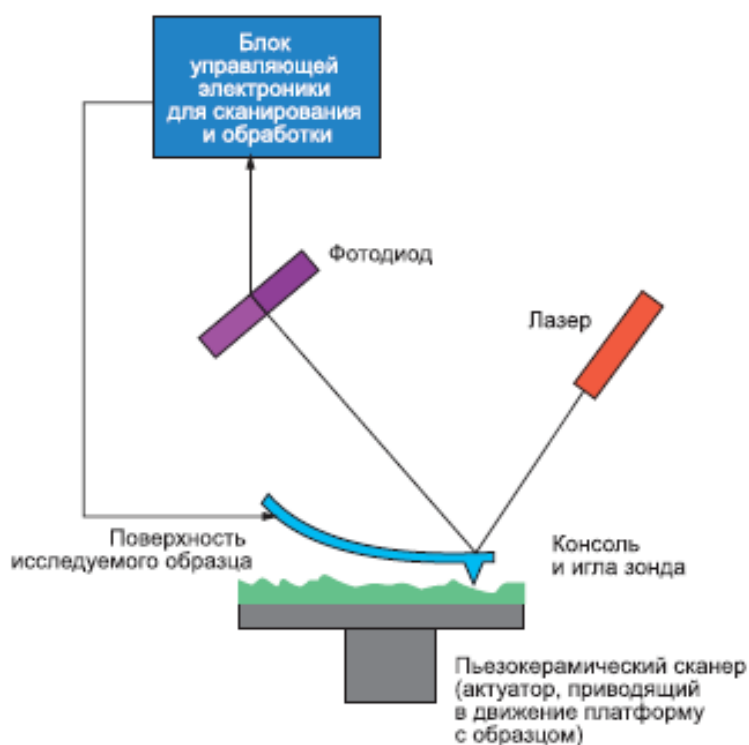


Рис. 2.3. Схема работы атомно-силового микроскопа [Самарин, 2006]

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, USA).

Метод зонда Кельвина, позволяющий изучать распределение поверхностного потенциала, обладает рядом преимуществ по сравнению с другими способами регистрации заряда клеточной поверхности. Среди них простота технического исполнения, возможность оценивать ПП в одиночной клетке, возможность сканирования большого массива клеток, а также минимальное количество факторов, снижающих достоверность получаемых результатов [Сладкова, Скоркина, 2014].

На первом проходе сканируемой строки производится отслеживание рельефа поверхности в полуконтактном режиме, при котором частота колебаний кантилевера близка к резонансной ω_0 . Во время второго прохода между зондом и образцом подается переменное, на частоте $\omega = \omega_0$, напряжение (V_{ac}) и за счет поддержания определенного расстояния (z_0), исключая

влияние рельефа, производится измерение ПП (ϕ) (рис. 2.4). Таким образом, напряжение между зондом и поверхностью образца можно представить в виде: $V_0 + V_{ac} \sin(\omega t) + \phi$ [Руководство..., 2006].

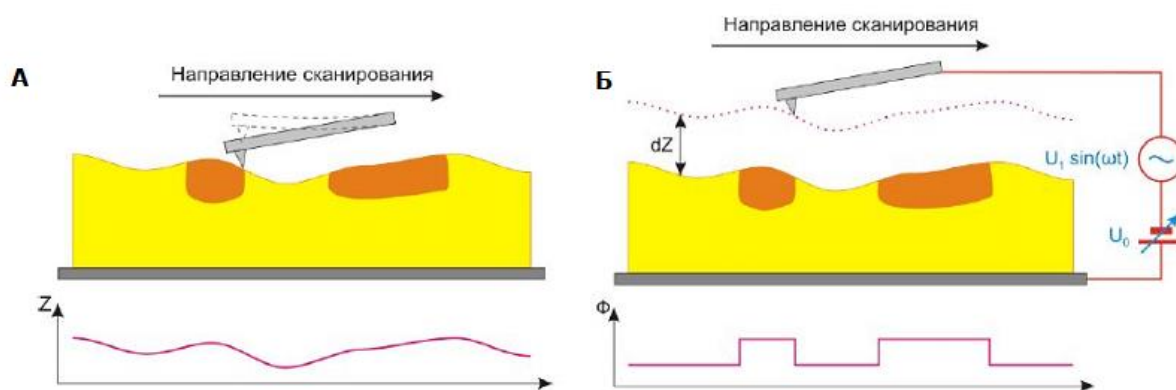


Рис. 2.4.Схема перемещения кантилевера в режиме зонда Кельвина.

А – Первый проход зонда при сканировании для получения рельефа поверхности. Б – второй проход зонда, Φ – потенциал поверхности

[Руководство..., 2006]

Пробоподготовку для исследования на АСМ проводили согласно «Способу регистрации изменения поверхностного заряда» (патент № 2027188). Фиксацию клеток крови осуществляли 0,25% глутаровым альдегидом, в течение течение 20 минут в соотношении 1:1. В исследованиях было показано, что глутаровый альдегид в низких концентрациях не изменяет заряд поверхности клеток [Голубков, 2014]. По прошествии указанного времени суспензии эритроцитов и лейкоцитов дважды отмывались изотоничным 0,9% раствором хлорида натрия, путем центрифугирования в течение 5 минут при 1500 об/мин и отбора надосадочной жидкости. Суспензия тромбоцитов отмывалась бидистиллированной водой при тех же параметрах. Затем готовили препараты на обезжиренной металлической пластине. Пластины фиксировали в специальной подложке с пружинным механизмом, имеющую электрический контакт для подачи постоянного тока и устанавливали в АСМ.

Обработку полученных АСМ-изображений проводили в программе Nova (производитель ЗАО «НТ-МДТ», Москва) с использованием инструмента «Point Instruments» (рис.2.5). На каждой клетке определяли значение ПП в 20 участках, и рассчитывали среднее значение.

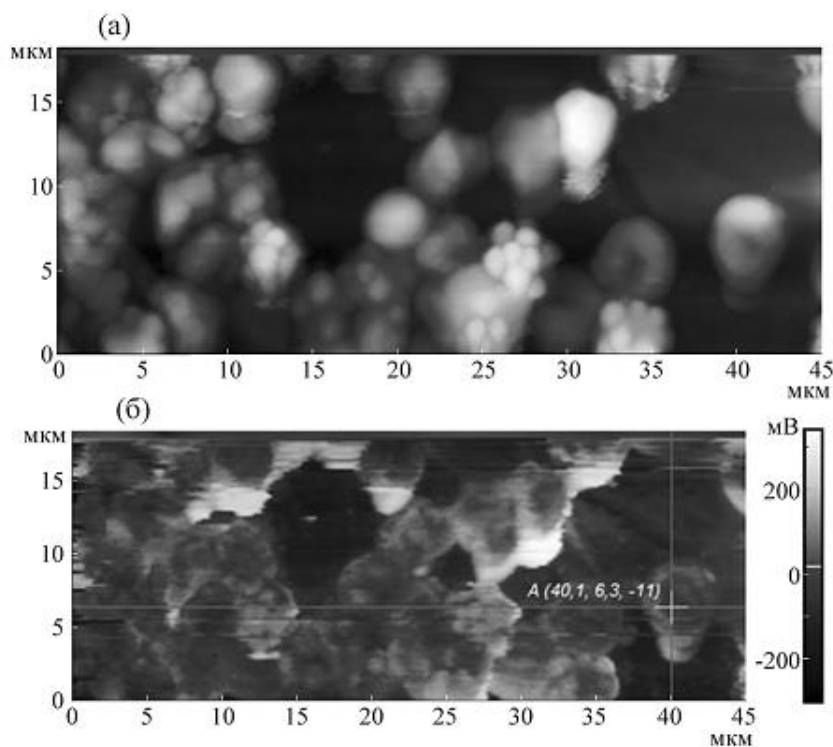


Рис 2.5. Распределение ПП по поверхности лимфоцитов:

А – скан лимфоцитов (первый проход), Б – распределение ПП по поверхности лимфоцитов (второй проход) [Сладкова, Тикунова, 2016]

Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t критерия Стьюдента при $p < 0,05$ с учетом нормального распределения данных [Лакин, 1968]. В работе приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

3.1. Концентрация АТФ в крови здоровых и больных ОЛЛ людей при активации пуринаргической сигнальной системы

В результате проведенного исследования с помощью колориметрического метода установлена концентрация АТФ в пробах крови здоровых людей и людей больных ОЛЛ. При лимфопролиферативном заболевании этот параметр составлял $32,4 \pm 2,7$ мг/моль, что в 2,2 раза ниже, чем у здоровых людей ($70,0 \pm 5,1$ мг/моль) (рис. 3.1).

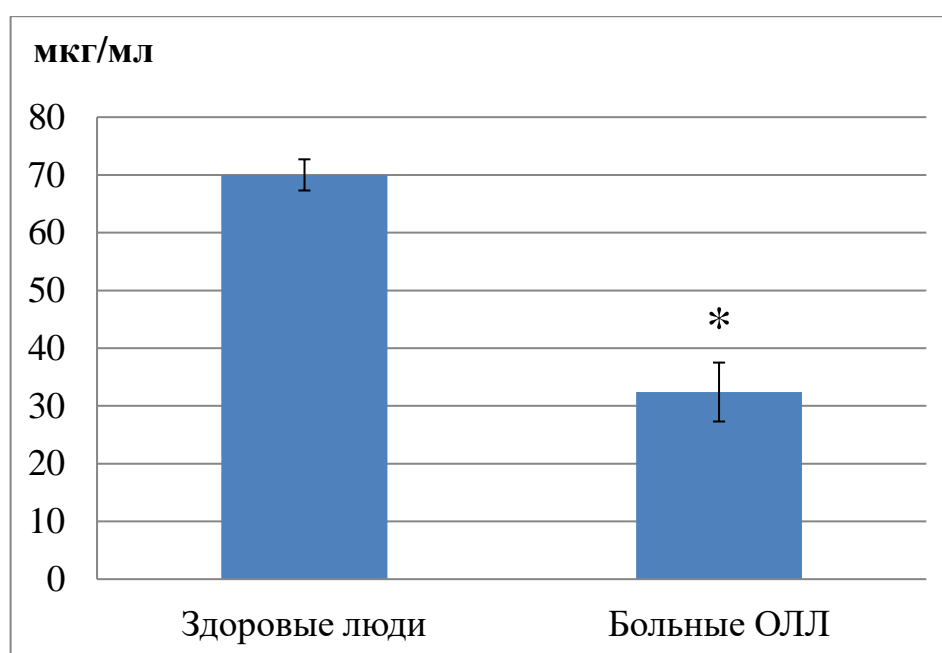


Рис. 3.1. Концентрация АТФ в интактной крови

Примечание: *статистически достоверные различия по сравнению со здоровыми людьми по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Под влиянием 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 (рис.3.2).

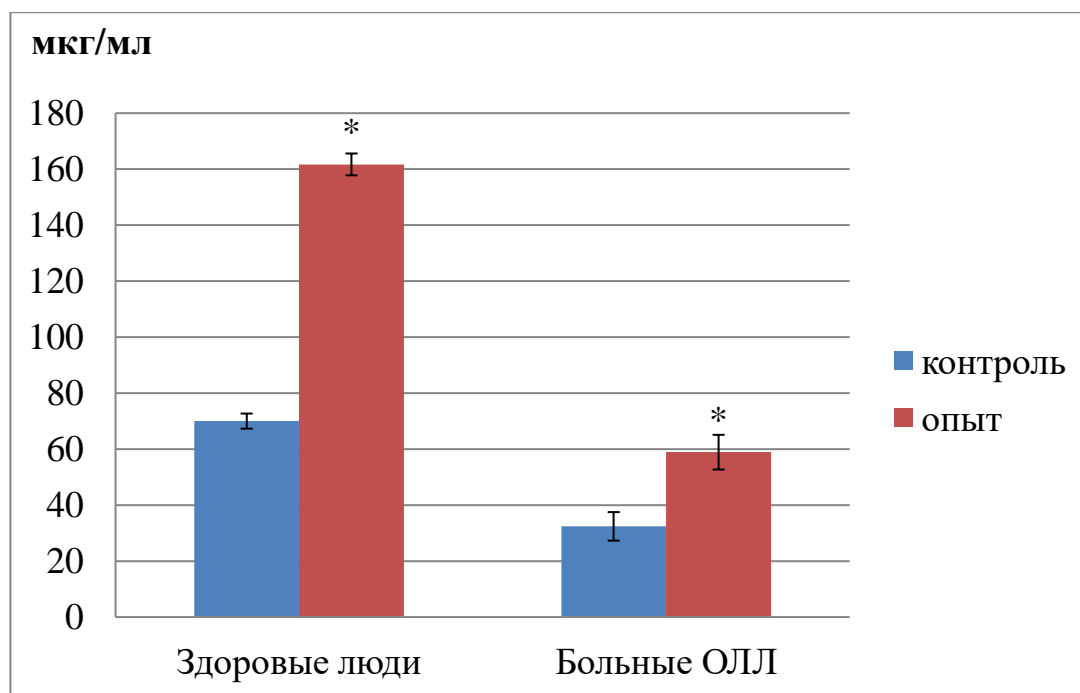


Рис. 3.2. Концентрация АТФ в крови: опыт – под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль – интактная кровь

Примечание: *статистически достоверные различия между контрольной и опытной группами по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

В условиях воздействия экзогенного АТФ на форменные элементы крови установлено повышение уровня АТФ в крови здоровых людей в 2,8 раза, у больных ОЛЛ – в 22,7 раза (рис. 3.3).

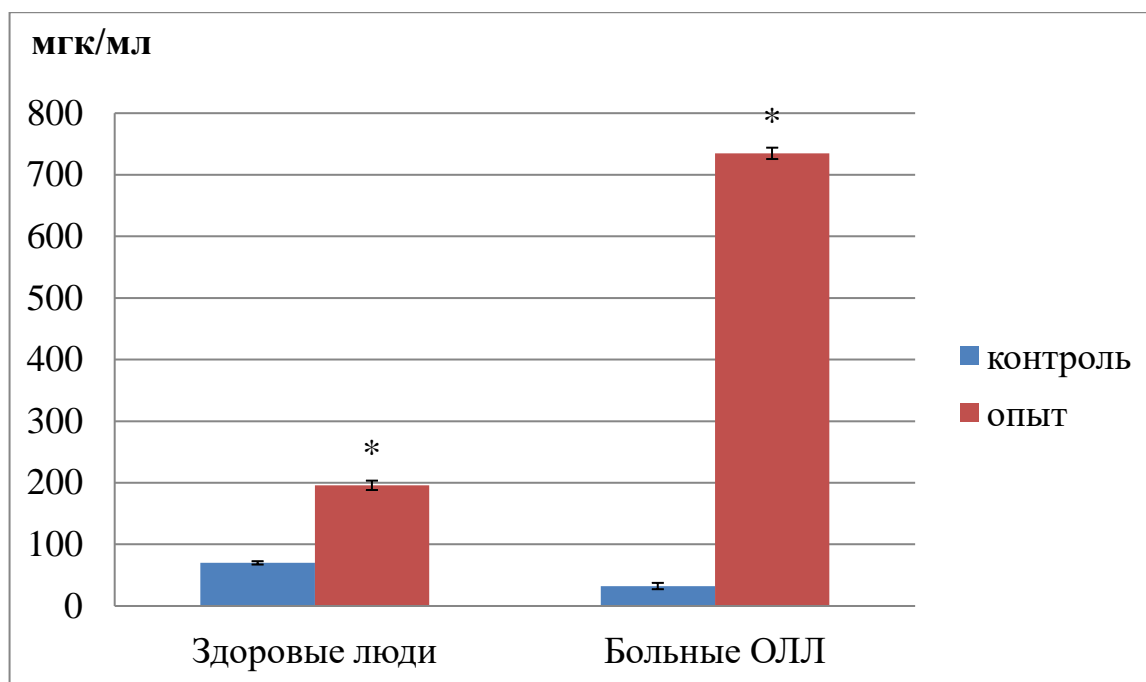


Рис. 3.3. Концентрация АТФ в крови: опыт – под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ, контроль – интактная

Примечание: *статистически достоверные различия между контрольной и опытной группой по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

При сравнении влияния механического стресса и экзогенной нагрузки с АТФ на концентрацию АТФ у здоровых и больных ОЛЛ людей установлено, что концентрация АТФ у больных людей после механического стресса была ниже в 2,7 раза по сравнению со значениями здоровых людей после аналогичной нагрузки. При этом, в условиях инкубации с внеклеточным АТФ, у больных ОЛЛ концентрация АТФ была выше в 3,8 раза по сравнению со значениями здоровых людей после аналогичной нагрузки (рис 3.4).

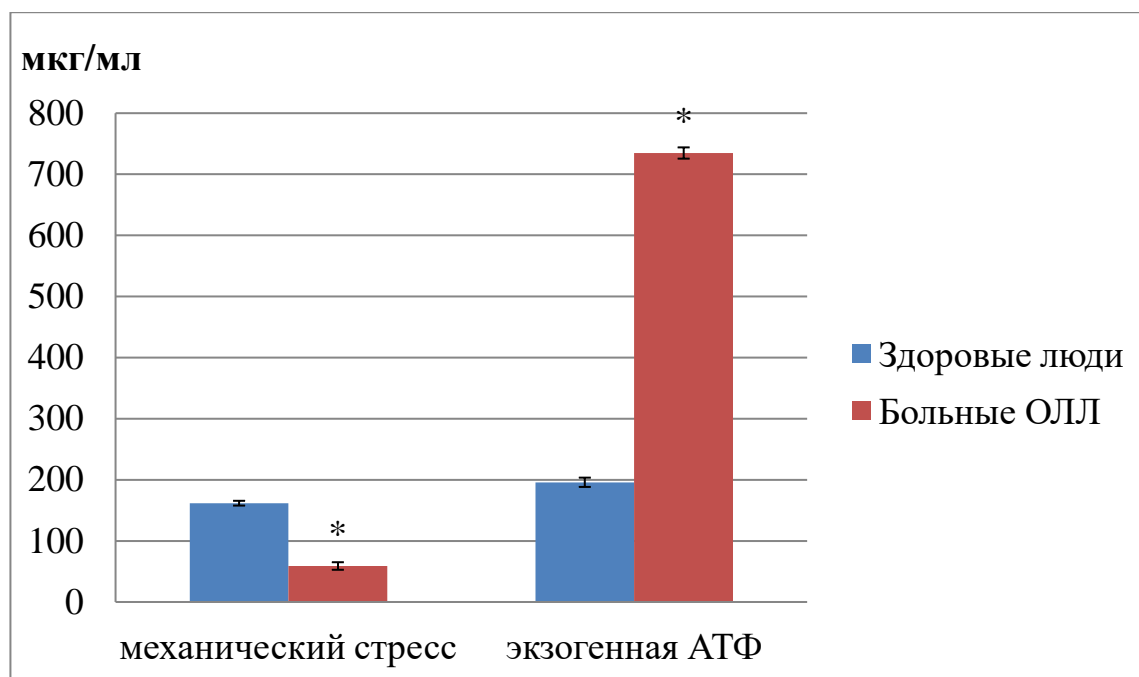


Рис. 3.4. Концентрация АТФ в крови здоровых и больных ОЛЛ людей : опыт – под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ, контроль – интактная

Примечание: *статистически достоверные различия между здоровыми и больными ОЛЛ по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Полученные данные свидетельствуют об экскреции молекул АТФ в межклеточное пространство в ответ на механическое воздействие движущихся слоев плазмы. 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.

Воздействие экзогенного АТФ приводило к увеличению количества АТФ в плазме крови как здоровых, так и больных людей.

3.2. Поверхностный потенциал клеток крови в норме и при остром лимфобластном лейкозе

Установлено, что ПП лимфоцитов людей больных ОЛЛ был более положительный по сравнению ПП клеток здоровых людей, его значение выше на 36 % ($p < 0,05$) (рис 3.5).

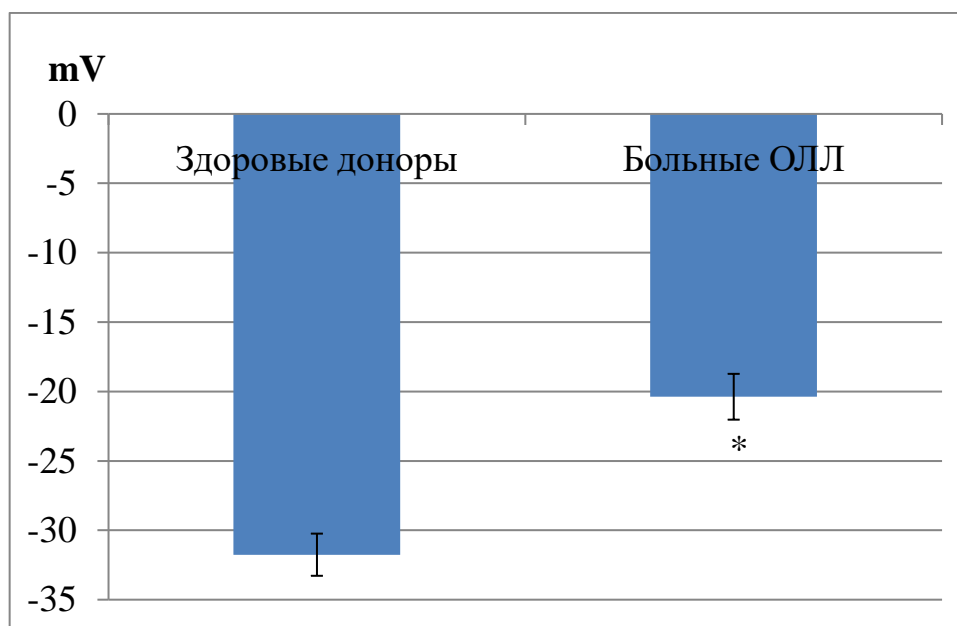


Рис.3.5. ПП лимфоцитов в норме и при ОЛЛ

Примечание: *статистически достоверные различия между значениями здоровых людей и больных ОЛЛ по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

ПП тромбоцитов людей больных острым лимфобластным лейкозом был выше на 55 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис.3.6).

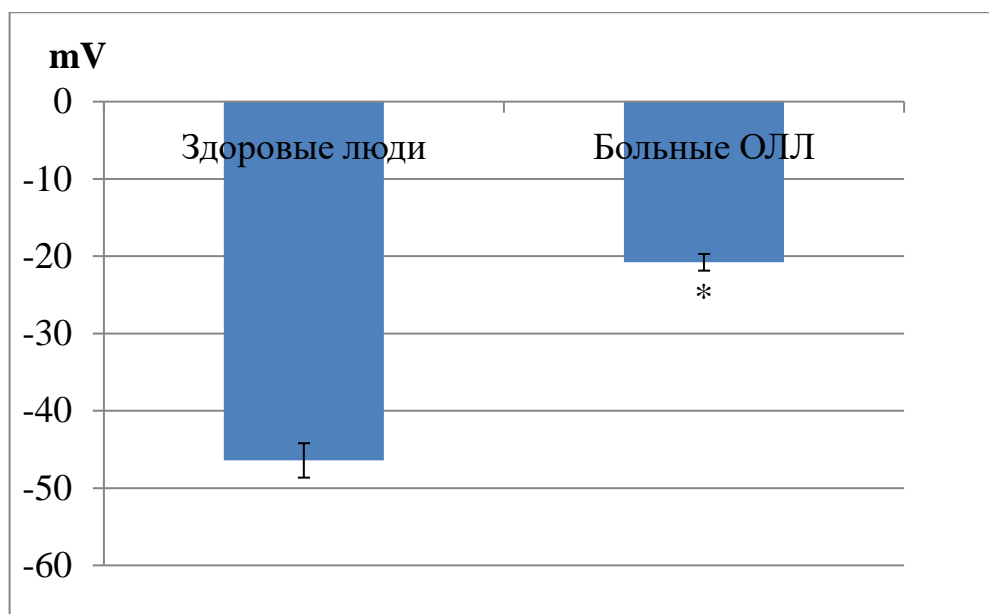


Рис.3.6. ПП тромбоцитов в норме и при ОЛЛ

Примечание: *статистически достоверные различия между значениями здоровых людей и больных ОЛЛ по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Выявленная особенность повышения ПП клеток крови при развитии лимфолейкозасогласуется с литературными данными [Сладкова, Скоркина, 2014]. Опухолевые лимфоциты являются более деполяризованными, что может быть связано с большей проницаемостью ионных каналов. Мембранная деполяризация играет функциональную роль в опухолевой прогрессии, индуцируя синтез ДНК и стимулируя митотическую активность [Staruschenko, Vedernikova, 2008]. Повышение ПП тромбоцитов может быть связано с химиотерапевтическим воздействием, которое подрывает структурную целостность тромбоцитов, вызывая чрезмерное выделение альфа и плотных гранул в периферическую кровь [Qian, Wen-jun, 2013], способствуя агрегации тромбоцитов.

3.3. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей и больных ОЛЛ в условиях механического стресса

В условиях механического стресса ПП эритроцитов и тромбоцитов стал более положительным. Значение заряда эритроцитов увеличилось на 44 % ($p < 0,05$), тромбоцитов на 40 % ($p < 0,05$). ПП лимфоцитов напротив стал более отрицательным на 47 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 3.7).

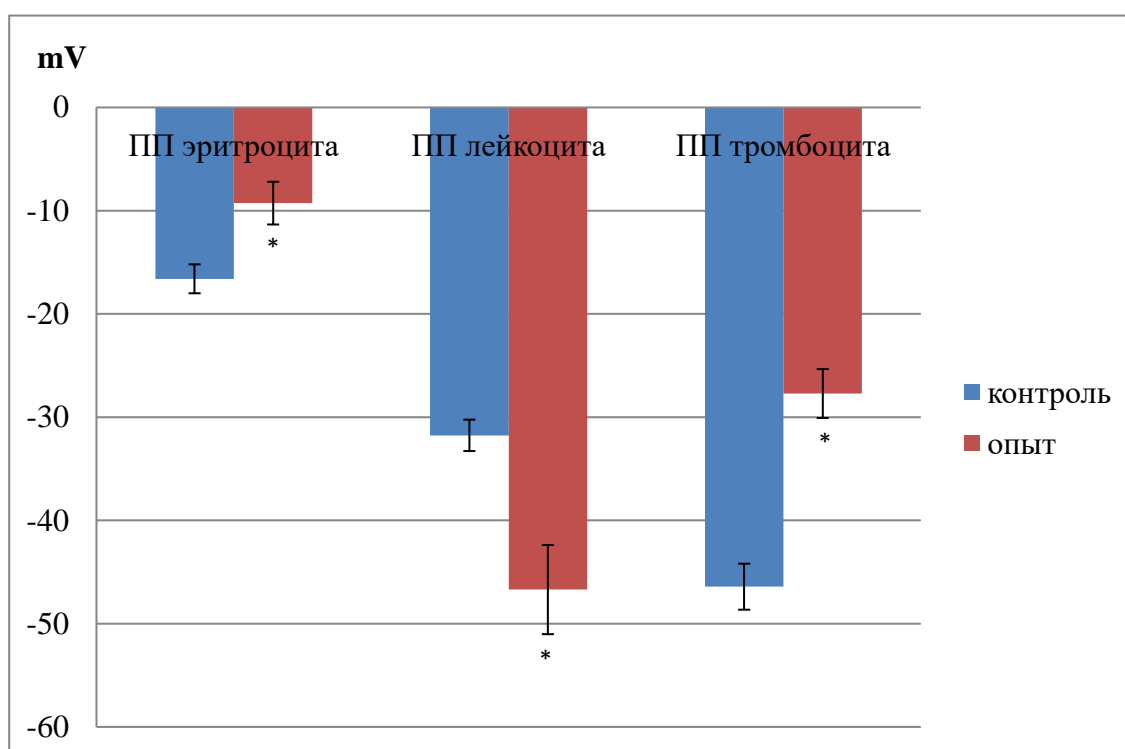


Рис. 3.7. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей. Опыт – под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль – интактная кровь

Примечание: *статистически достоверные различия между контрольной и опытной группами по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

В настоящее время доказано, что на мембране эритроцитов нет специфических P-рецепторов непосредственно для молекулы АТ, но были идентифицированы рецепторы для АДФ и аденозина [Pafundo et al., 2010]. 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. В ряде работ описаны рецепто-

ры P2X семейства, локализованные на поверхности лимфоцитов, взаимодействие молекул АТФ с этими рецепторами влечет за собой открытие Ca^{2+} -ионных каналов [Kaczmarek-Hájek, et al., 2012], что согласуется с установленным изменением потенциала поверхности лимфоцитов. Важным моментом в проведенном исследовании является установление повышения заряда поверхности тромбоцитов, возможно посредством связывания продуктов распада АТФ с P2Y-рецепторами тромбоцитов. Так, более положительно заряженная плазмалемма тромбоцитов вероятно активно взаимодействует с более отрицательно заряженной поверхностью лейкоцитов, что в свою очередь может стимулировать воспалительный ответ.

Поверхностный потенциал клеток крови людей больных ОЛЛ в условиях механического стресса достоверно не отличался от контроля. Можно предположить, что в условиях лейкоза происходит нарушение функционирования ионных каналов клеток, в том числе частичное или полное ингибирование внутренних токов кальция через ионные каналы [Staruschenko, Vedernikova, 2002; Yang, Brackenbury, 2013] в связи с этим, пуринергический сигнальный каскад, который связан с повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} не достаточно реализуется. Кроме того, мембраны лейкоцитов и тромбоцитов уже находятся на стадии деполяризации, вызванной лейкозом и применением химиотерапевтических препаратов [Qian, Wen-jun, 2013; Bose et al., 2015].

3.4. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей и больных ОЛЛ при активации внеклеточных пуринергических сигнальных путей *in vitro*

В условиях экзогенной нагрузки с АТФ у здоровых людей происходило увеличение заряда поверхности эритроцитов и тромбоцитов. ПП эритроцитов стал выше на 51 % ($p < 0,05$), тромбоцитов на 33 % ($p < 0,05$). ПП лимфоцитов

стал более отрицательным и снизился на 48 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис.3.8).

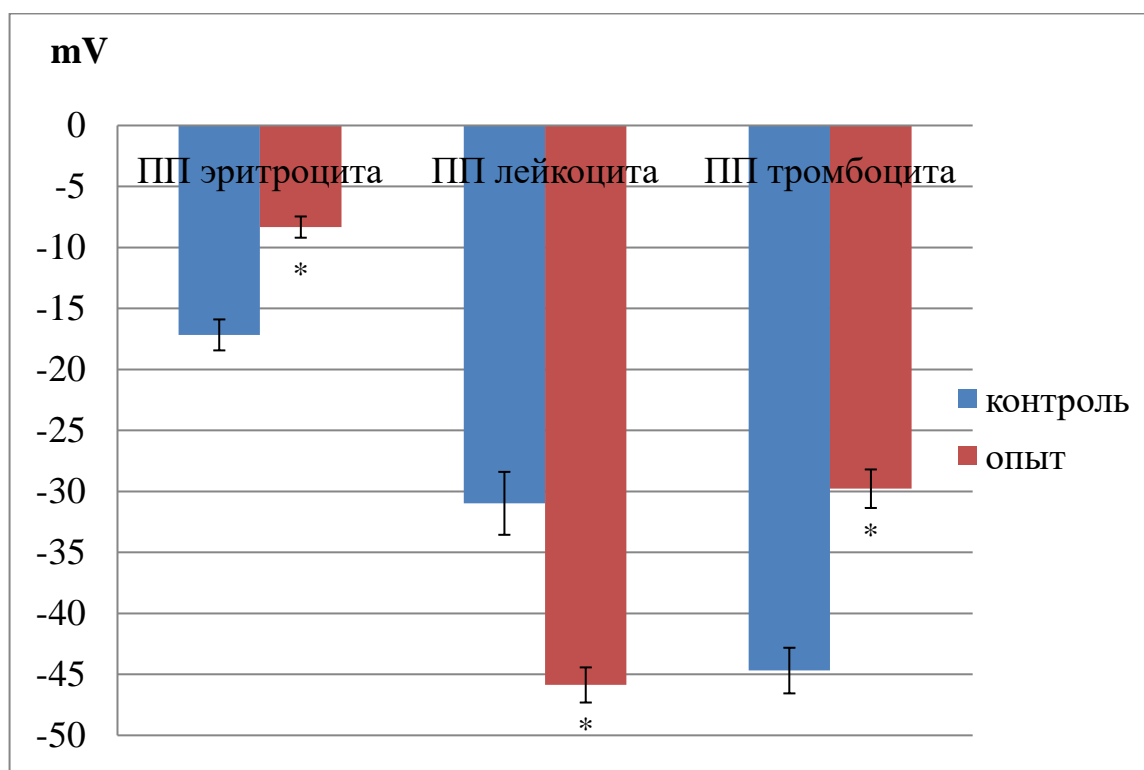


Рис.3.8. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей. Опыт – под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ, контроль – интактная кровь

Примечание: *статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

У больных ОЛЛ в условиях инкубации с экзогенной АТФ потенциал поверхности клеток крови стал более положительным по сравнению с контролем. Так, ПП эритроцитов был выше на 34 % ($p < 0,05$), лимфоцитов – на 27 % ($p < 0,05$) и тромбоцитов на 34 % ($p < 0,05$) (рис.3.9).

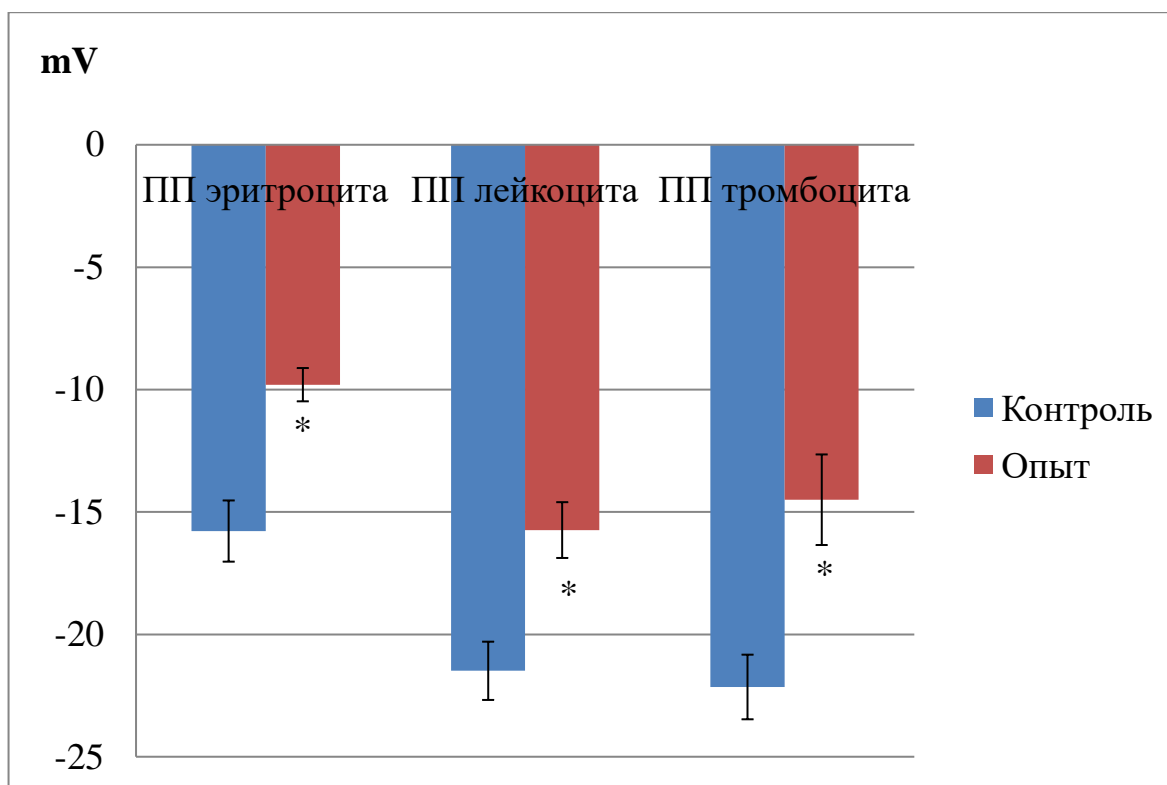


Рис. 3.9. Поверхностный потенциал клеток крови больных ОЛЛ. Опыт – под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*, контроль – интактная кровь.

Примечание: *статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таким образом, у здоровых людей, в условиях инкубирования крови с внеклеточным АТФ, изменения заряда клеток были схожи с таковыми, при механическом стрессе. У больных ОЛЛ полученные данные, возможно, связаны с большей концентрацией АТФ воздействующей на клетки. Доказано, что стимуляция P2-рецепторов оказывает различное воздействие на клетки в зависимости от внеклеточной концентрации АТФ [ExtracellularATP..., 2018].

3.5. Сравнительный анализ влияния механического стресса и экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro* на форменные элементы крови

Заряд поверхности плазмолеммы лимфоцитов и тромбоцитов после стресса у больных ОЛЛ был выше соответственно на 48 % ($p < 0,05$), и 52 %

($p < 0,05$) по сравнению с ПП лимфоцитов и тромбоцитов здоровых людей после аналогичной нагрузки (рис.3.10).

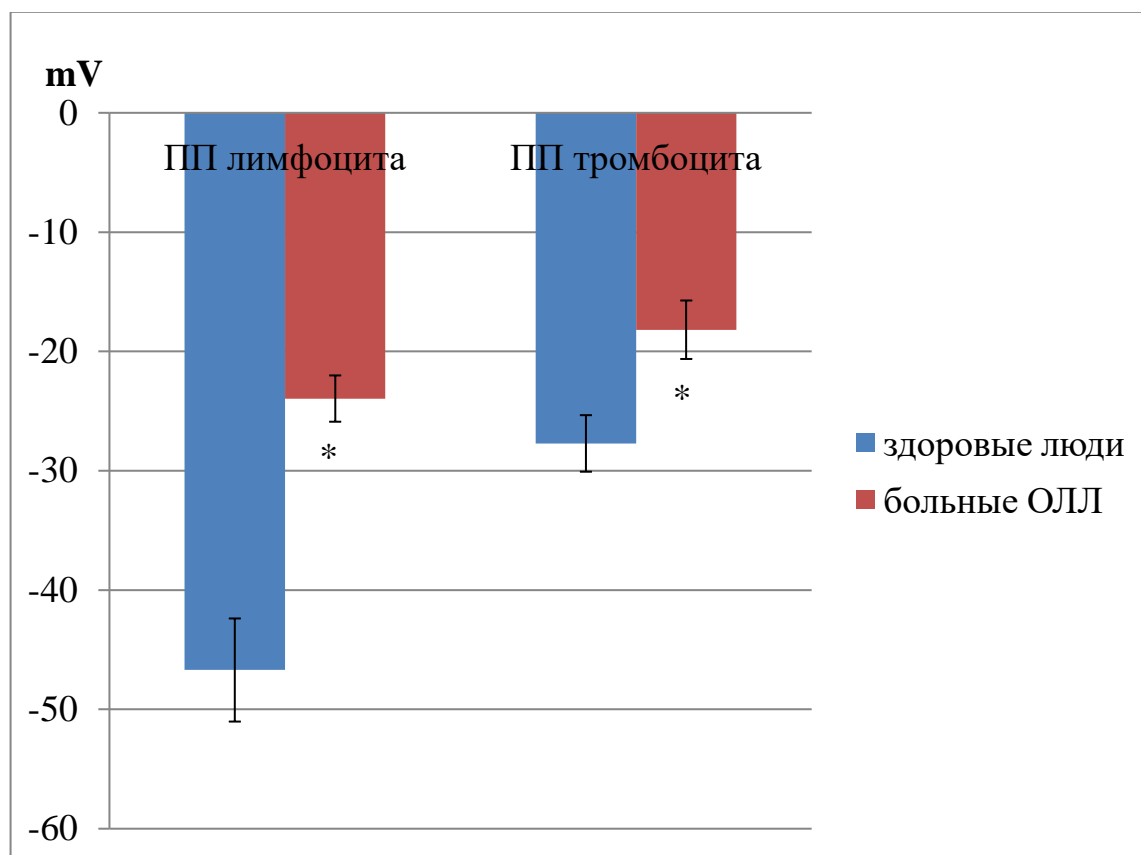


Рис. 3.10. Поверхностный потенциал клеток крови в условиях механического стресса

Примечание: *статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

В условиях инкубации с экзогенной АТФ ПП тромбоцитов и лимфоцитов больных ОЛЛ был более положительным по сравнению с зарядом клеток здоровых людей после аналогичной нагрузки на 66 % ($p < 0,05$) и 55 % ($p < 0,05$) соответственно (рис 3.11).

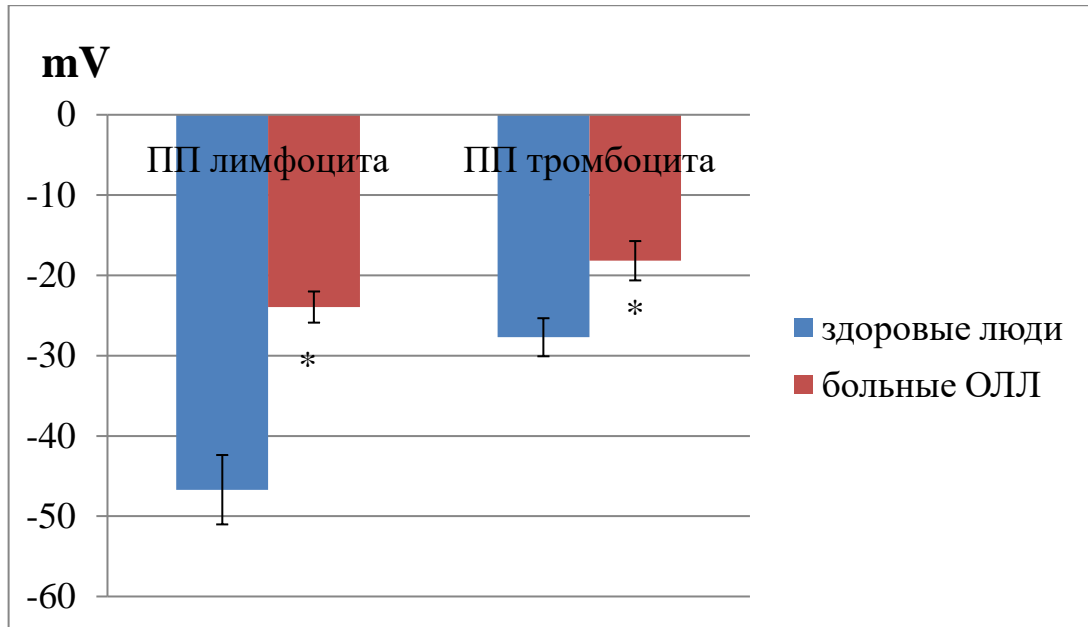


Рис. 3.11. Поверхностный потенциал клеток крови здоровых и больных ОЛЛ людей при экзогенной нагрузке с АТФ

Примечание: *статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

При сравнении влияния механического стресса и экзогенной нагрузки с АТФ у больных ОЛЛ людей обнаружен более положительный заряд у лимфоцитов на 34 % ($p < 0,05$) (рис 3.12).

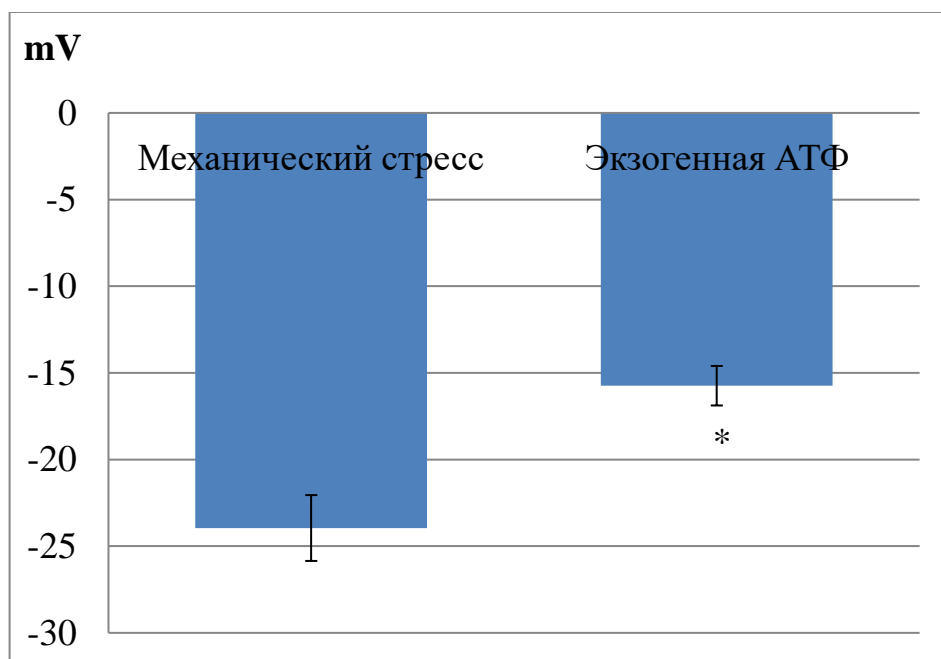


Рис. 3.12. Поверхностный потенциал лимфоцитов больных ОЛЛ

*Статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Примечание: *статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Полученные данные могут быть связаны с повышенной экспрессией рецептора P2X7R на лейкозных клетках [The role of P2X7 receptor..., 2009]. Более высокая концентрация АТФ при нагрузочном тесте способствует связыванию пуриnergического рецептора P2X7R с внеклеточным АТФ, что ведет к увеличению содержания внутриклеточного Na^+ и Ca^{2+} в лимфоцитах [Extracellular ATP..., 2018]. Увеличение заряда тромбоцитов у больных ОЛЛ при инкубации с экзогенным АТФ, может быть связано с наличием положительной обратной связи между активированной пролиферацией лейкозных клеток, вызванной тромбоцитами и активацией тромбоцитов, вызванной лейкозными клетками. Молекулы АТФ, у больных ОЛЛ, опосредуют активацию тромбоцитов за счет рецепторов P2Y12 и P2Y1, влияющих на содержание внутриклеточного кальция [Elaskalani et al., 2017].

Таким образом, полученные данные указывают на то, что молекула АТФ выступает регулятором электрических свойств плазмалеммы форменных элементов крови как у здоровых людей, так и больных острым лимфобластным лейкозом. Установленные экспериментальные данные имеют значение в изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле и могут быть учтены при поиске фармакологических регуляторных мишеней с целью поддержания функциональной активности иммунокомпетентных клеток в условиях патологического процесса.

Выводы

1. В интактной крови здоровых людей концентрация АТФ выше по сравнению с интактной кровью больных ОЛЛ. При механической нагрузке концентрация АТФ в крови, как здоровых людей, так и больных ОЛЛ повышается.

2. Установлено, что развитие острых лимфолиферативных процессов сопровождается появлением в периферической крови лимфоцитов и тромбоцитов с повышенным зарядом клеточной поверхности.

3. При активации пуринерических сигнальных путей посредством моделирования механического стресса *in vitro*, у здоровых людей установлено повышение поверхностного потенциала эритроцитов и тромбоцитов, и понижение ПП лимфоцитов.

4. В условиях экзогенной нагрузки с АТФ, у здоровых людей, поверхностный потенциал эритроцитов и тромбоцитов увеличивался, а лимфоцитов снижался. У больных ОЛЛ экзогенная нагрузка с АТФ вызывала повышение ПП всех исследуемых клеток крови.

5. В условиях механического стресса, а так же в условиях инкубации экзогенным АТФ ПП лимфоцитов и тромбоцитов людей больных ОЛЛ был более положительным по сравнению с клетками здоровых людей после аналогичных нагрузок.

Список использованных источников

1. Артюхов В. Г., Наквасина М. А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: учеб.пособ. Воронеж: ВГУ, 2000. 296 с.
2. Бойтлер Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемологическая анемия. Пер. с англ. М.: Медицина, 1981. 256 с.
3. Болдырев А. А., Котелевцев С. В., Ланио М. Введение в биомембранологию. Москва: МГУ. 1990. 208 с.
4. Болдырев А. А., Кяйвярайнен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология: учеб.пособие. Петрозаводск: Кар НЦ РАН, 2006. 226 с.
5. Большая медицинская энциклопедия / А. Г Елисеев [и др.] М.: Эксмо, 2015. 880 с.
6. Боровская М. К., Кузнецова Э. Э., Горохова В. Г. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза // ActaBiomedicaScientifica. 2010. №3. С. 334–354.
7. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. Пер. с англ. Москва: Мир, 1997. 624 с.
8. Головкин С. И. Сравнительная характеристика мембранного резерва ядерных клеток крови позвоночных Автореф. дис... канд. биол. наук. Ярославль. 2010. 15 с.
9. Голубков В. В. Зависимость риска развития ишемического инсульта от группы крови системы АВО: Дис... канд. мед.наук. Иркутск. 2014. 106 с.
10. Гринштейн С. В, Кост О. А. Структурно-функциональные особенности мембранных белков // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 77–104 .
11. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. Москва: Наука, 1989. 277с.

12. Зуховицкая Е. В., Фиясь А. Т. Острые лимфобластные лейкозы // Журнал ГрГМУ. 2015. №3 (51) С. 12–17.
13. Клочкова Г. Н., Беляева С. С., Тикунова Т. С. Гематологические показатели системы крови больных лейкозом // Научный результат. Серия «Физиология». 2016. Т. 2, № 2 (8). С. 34–40.
14. Ковалева Л. Г. Острый лейкоз. М.: Медицина, 1990. 271 с.
15. Костюк В. А. Основы клеточной физиологии: учеб.пособие. Минск: БГУ, 2016. 143 с.
16. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт: междисциплинарный подход; пер. с англ. Москва: Мир, 1980. 341 с.
17. Лакин Г. Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1968. 288 с.
18. Левгов В. А., Регирер С. А., Шадрина Н. Х. Реология крови. Москва: Медицина, 1982. 270 с.
19. Леонтьев О.В. Физиологические показатели человека при патологии СПб.: СпецЛит, 2014. 223 с.
20. Миронов В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учеб.пособ. Нижний Новгород: Российская академия наук, 2004 г. 116 с.
21. Михайлова С. Г. Вклад клеточных свойств эритроцитов в обеспечение эффективности микроциркуляции и их модификация под влиянием ионов кальция и механического стресса: Автореф. дис... канд. биол. наук. Ярославль. 2012. 25 с.
22. Нестерова И. В., Евглевский А. А., Фомичева Е. В. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислород-зависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке // Российский иммунологический журнал. 2015. № 5 (14). С. 254–261.
23. Рабинович А. Л., Талис А. Л. Неклассическая симметрия углеводородных цепей липидов биомембран (теоретические подходы и компьютерное моделирование) // сборник трудов XII Международной конференции по химии и физикохимии олигомеров «Олигомеры – 2017». 2017. С. 40–68.

24. Ребров В. Г. Исследования электрических свойств поверхности клеток: учеб.пособ. Саратов, 2009. 8 с.
25. Руководство по гематологии: В 2-х т. / Под ред. А. И. Воробьева. М.: Медицина, 1985. Т. 1. 447 с.
26. Руководство пользователя «Зондовая нанолаборатория Интегра Вита, Зеленоград: НТМДТ, 2006. 57 с.
27. Самарин А. Ю. Технология и области применения микроконтактных соединений ClawConnect // Компоненты и Технологии. 2006. №65. С. 136–142.
28. Скамрова Г. Б. КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА. Автореф. дис... канд. биол. наук. Воронеж. 2014. 28 с.
29. Скоркина М. Ю., Горлова Е. С., Капустин Р. Ф. Миело- и лимфобластный лейкоз: морфофункциональный статус периферической крови // Биологические проблемы природопользования. 2012. С. 111–113.
30. Сладкова Е. А., Скоркина М. Ю. Структурно-функциональные особенности лимфоцитов больных лимфобластным лейкозом // Цитология. 2013. Т.55, №6. С. 388-393
31. Сладкова Е. А., Скоркина М. Ю. Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина // Биофизика. 2014. Т. 59, № 2. С. 310–313.
32. Сладкова Е. А., Тикунова Т.С. Изменение потенциала поверхности лимфоцитов в условиях развития лимфопролиферативного процесса // Научный результат. Серия «Физиология». 2016. №1 (7). С. 27–30.
33. Смирнова О. В., Манчук В. Т. Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе // Медицинская иммунология. 2013. Т.15, № 6. С. 577–584.

34. Таборская К. И., Фролова М. Ю., Кулева Н. В. Сравнительный анализ содержания серотонина в тромбоцитах, сыворотке крови и головном мозге крыс при старении // Цитология. 2016. Т. 58, №2. С. 115-119.
35. Титова Н. М., Замай Т. Н., Боровкова Г. И. Биохимия и молекулярная биология: лаб. практикум. Красноярск: ИПК СФУ, 2008. 103 с.
36. Хаитов Р. М., Игнатъева Г. А., Сидорович И. Г. Иммунология. Норма и патология. М.: Медицина. 2010. 752 с.
37. Черенкевич С. Н. Мартинович Г. Г., Хмельницкий А. И. Биологические мембраны: учеб. пособ. Минск: БГУ, 2008. 184 с.
38. Шереметев Ю. А., Макин Г. И., Суслов Ф. Ю. Патент РФ 2027188 G 01N 33/49. Заявка № 4947820/14 от 26.04. 1991.
39. Эффекты адреналина на трансмембранный потенциал одиночных гепатоцитов крыс при оценке методом флуоресцентных зондов / Н. С. Кавок, М. Ю. Малюкина, И. А. Боровой, Н. Л. Погребняк // Вестн. биофизики. 2008. Вып. 21 (2). С. 45–48.
40. Ярилин А. А. Иммунология. М.: Наука. 2010. 957 с.
41. A large change in axon fluorescence that provides a promising method for measuring membrane potential // Н. V. Davila, В. М. Salzberg, L. B. Cohen, A. S. Waggoner // Nature New Biology. 1973. P. 159–160.
42. Abnormal expression of P2X Family Receptors in Pediatric Acute Leukemia Patients / G. Zheng, [et. al.] // Blood. 2010. .Vol. 114, №22. P. 498–504.
43. Allison D. P., Mortensen N. P., Sullivan K. J., Doktycz M. J. Atomic force microscopy of biological samples // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2010. Vol. 2. P. 569–702
44. Aplastic presentation of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for cellular inhibition of normal hematopoietic progenitors / Homans A.C. [et al.] // The American journal of pediatric oncology. 1989. Vol.11, №4. P. 456–462
45. ATP depletion as a consequence of adenosine deaminase inhibitor in man / M. F. Siaw, B. S. Mitchell, C. A. Koller M. S Coleman, J. J. Hutton // Pro-

ceedings of the National Academy of Sciences USA. 1980. Vol. 77, №10. P. 6157–6161.

46. Bernard A. M., Amor A. O., Lauwerys R. R. Decrease of erythrocyte and glomerular membrane negative charges in chronic cadmium poisoning // *British Journal of Industrial Medicine* 1988. Vol. 45(2). P. 112–115.

47. Blood viscosity parameter correlation with types of leukemia // K. Sharma [et al.] // *Physiological chemistry and physics and medical NMR*. 1992. Vol. 24, №2. P. 159–164.

48. Bose T., Cieslar-Pobuda A., Wiechec E. Role of ion channels in regulating Ca²⁺ homeostasis during the interplay between immune and cancer cells // *Cell death & disease*. 2015. Vol. 6, №2. P. 101–111

49. Burnstock G, Francesco D. V. Purinergic signalling and cancer // *Purinergic signalling*. 2013. Vol. 9, №4. P.491–540.

50. Burnstock G. Introductory overview of purinergic signalling // *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2011. P. 896–900.

51. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system // *Nature Reviews Immunology*. 2016. Vol. 16(3). P. 177–192.

52. Chandler D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly // *Nature*. 2005. P. 640–647.

53. Di Virgilio F. P2X receptors and inflammation // *Current Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 22. P. 866–877.

54. Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? // *Annual Review of Biochemistry*. 1997. Vol. 66. P. 232–235.

55. Dumez H., Reinhart W.H., Guetens G., Human red blood cells: rheological aspects, uptake, and release of cytotoxic drugs // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2004. Vol. 41, №2. P. 159–188.

56. Elaskalani O., Berndt M. C., Falasca M. Targeting Platelets for the Treatment of Cancer // *Cancers (Basel)*. 2017. Vol. 9, №7. P. 138–146.

57. Eltzhig H. K., Sitkovsky M. V., Robson, S. C. Purinergic signaling during inflammation // *The New England Journal of Medicine*. 2012. P. 2322–2333.
58. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour micro-environment / Di Virgilio F., Sarti A.C., Falzoni S., De Marchi E., Adinolfi E. // *Nature Reviews Cancer*. 2018. Vol. 18, № 10. P. 601–618.
59. Freedman J. C., Laris P. C. Electrophysiology of cells and organelles: studies with optical potentiometric indicators // *International Review of Cytology*. 1981. Vol. 12. P. 177–246.
60. Girard P. Electrostatic force microscopy: principles and some applications to semiconductors // *Nanotechnology*. 2001. Vol. 12, №4. P. 485–490.
61. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase / P. Pellegatti, L. Raffaghello, G. Bianchi, F. Piccardi, V. Pistoia, F. Di Virgilio // *PloS one*. 2008. Vol. 3. P. 1–9.
62. Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor / K. R Vaughan, L. Stokes, , L. R Prince, H. M Marriott, S Meis, M. U. Kassack, M. K. Whyte // *Journal of immunology*. 2007. vol. 179. P. 8544–8553.
63. Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi E, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors – recent progress and persisting challenges // *Purinergic Signal*. 2012. Vol. 8, №3. P. 375–417
64. Lad D. P., Jain A., Varma S. Complications and management of coagulation disorders in leukemia patients // *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*. 2017. Vol. 7. P. 61–72.
65. Lichtman M. A. Rheology of Leukocytes, Leukocyte Suspensions, and Blood in Leukemia. Possible Relationship to Clinical Manifestations // *The Journal of clinical investigation*. 1973. Vol. 52, № 2. 350–358.
66. Littlewood T., Mandelli F. The effects of anemia in hematologic malignancies: more than a symptom // *Seminars in Oncology*. 2002. Vol. 29. P. 40–44.

67. Lohman A. W., Billaud, M., Isakson B. E. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall // *Cardiovascular research*. 2012. Vol 95 (3). P. 269–280.
68. Lundbaek J. A., Andersen O. S., Werge T. Cholesterol-induced protein sorting: an analysis of energetic feasibility // *Biophysical journal*. 2003. Vol. 84, №3. P.2080–2089.
69. Malec D. Purinergic receptors // *Polish journal of pharmacology and pharmacy*. 1996. Vol. 48, № 5. P457–465
70. Malhotra R. Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review // *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 2012. Vol. 1. P. 1–5.
71. Marsh D. Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes // *Biophysical Journal*. Vol. 93, №11. P 3884–3899.
72. *Molecular Biology of the Cell* / B. Alberts [et al.]. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
73. Moore M. A. S., Williams N., Metcalf D. In Vitro Colony Formation by Normal and Leukemic Human Hematopoietic Cells: Interaction Between Colony-Forming and Colony-Stimulating Cells // *Journal of the National Cancer Institute*. 1973. Vol. 50, Issue. 3. P. 591–602.
74. Muller D. J., Wu N., Palczewski K. Vertebrate membraneproteins: structure, function, and insights from biophysical approaches // *Pharmacological Reviews*. 2008. Vol. 60. P. 43–78.
75. Naum C. C., Kaplan S. S. Platelets and ATP prime neutrophils for enhanced O₂- generation at low concentrations but inhibit O₂- generation at high concentrations // *Journal of Leukocyte Biology*. 1991. Vol.49. P. 83–89.
76. Nicolson G.L. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 2014. P. 1451–1466

77. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1997. Vol. 273. P. 1828–1834
78. Orlov S. N. On the history of ecto-ATPases: The role of W. A. Engelhardt // *Purinergic signalling*. 2007. Vol. 3, №3. P. 231–232.
79. Pafundo D. E. Alvarez C. I. Krumschnabel C. A. A Volume regulatory response can be triggered by nucleosides in human erythrocytes, a perfect osmometer no longer // *The Journal of Biol. Chem.* 2010. P. 6134–6144.
80. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules / A. Kusumi [et al.] // *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2005. Vol. 34. P. 351–378
81. Pomorski T., Menon A. K. Lipid flippases and their biological functions // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006. Vol. 63, № 24. P. 2908–2921
82. Purine receptor mediated actin cytoskeleton remodeling of human fibroblasts / N. Goldman, D. Chandler-Militello, H. Langevin, M. Nedergaard. T. Takano // *Cell Calcium*. 2013. Vol. 53, № 4. P. 297–301.
83. Qian X., Wen-jun L. Platelet Changes in Acute Leukemia // *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013. Vol 67, №3. P.1473–1479.
84. Rapaport E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle // *J Cell Physiol*. 1983. Vol. 114. P. 279–283.
85. Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts / S. B. Knisley, R. K. Justice, W. Kong, P. L. Johnson // *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000. Vol. 279, № 3. P. 1421–1433.
86. Reconstruction of surface potential from Kelvin probe force microscopy images / G. Cohen G. [et al.] // *Nanotechnology*. 2013. Vol 24, №29. P.24–29.

87. Remm M, Sonnhammer E. Classification of transmembrane protein families in the *Caenorhabditis elegans* genome and identification of human orthologs. *Genome research*. 2000. Vol. 10, №1. P. 1679–1689.
88. Rietveld A., Simons K. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1998. Vol. 3. P. 467–479
89. Ross W. N., Krauthamer V. Optical measurements of potential changes in axons and processes of neurons of a barnacle ganglion // *The Journal of Neuroscience*. 1984. P. 659–672.
90. Salzberg B. M., Davila H. V., Cohen L. B. Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system // *Nature*. 1973. P. 508–509.
91. Schneider J. S. Gangliosides and glycolipids in neurodegenerative disorders. *Advances in Neurobiology*. 2014. Vol. 9. P. 449–461
92. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science*. 1972. P. 720–731.
93. Staruschenko A. V., Vedernikova E. A. Mechanosensitive cation channels in human leukaemia cells: calcium permeation and blocking effect // *The Journal of physiology*. 2002. Vol. 541(Pt. 1). P. 81–90.
94. Stoltz J. F. Electrochemical properties of platelets: clinical and pharmacological applications // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983. Vol. 416. P. 720–741.
95. Terwilliger T., Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update // *Blood Cancer Journal*. 2017. P. 577–589
96. The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis / S. V. Glavey, Y. Kawano, M. Moschetta, S. Manier, S. Glavey, G. T. Görgün // *Blood Reviews*. 2015. Vol. 29. P. 269–279.
97. The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition / J. Lemmich [et al.] // *The European Biophysics Journal*. 1997. Vol 25. P 293-304

98. The role of P2X7 receptor in ATP-mediated human leukemia cell death: calcium influx-independent / X. Zhang [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009. Vol. 41. P. 362–369
99. Van Meer G, Voelker D. R., Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008. P. 112–124.
100. Von Heijne G. The membrane protein universe: what's out there and why bother? // *Journal of Internal Medicine*. 2007. P. 543–557.
101. Watson H. Biological membranes // *Essays in Biochemistry*. 2015. Vol. 59. P. 43–69.
102. Wilson W.W. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements // *Journal of Microbiological Methods*. 2001. № 43. P. 153–164
103. Wisniewska A., Draus J., Subczynski W.K. Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes // *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2003. Vol. 8, №1. P. 147–159
104. Yang M, Brackenbury W. J. Membrane potential and cancer progression // *Frontiers in physiology*. 2013. Vol. 4. P. 121–126.