

**ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА  
ПРИ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ (*in vitro*)<sup>1</sup>**

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

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

\*Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
(г. Белгород)

Пуринергическая сигнальная система играет существенную роль в функционировании организма начиная с ранних этапов эмбриогенеза и затем в постнатальном периоде. При старении показано снижение экспрессии пуриновых рецепторов в нервной ткани и сосудистом эндотелии. Однако в доступной научной литературе крайне мало информации о функционировании пуринергического рецепторного комплекса на поверхности форменных элементов крови. Целью данной работы было изучить изменения ультраструктуры и функциональных свойств лимфоцитов людей пожилого возраста при активации пуринергической сигнальной системы. В проведенном исследовании при помощи механического стресса *in vitro* смоделированы условия, близкие к физиологическим в микроциркуляторном сосудистом русле. Структура и биофизические свойства клеточной мембраны, от которых зависит функционирование форменных элементов крови, были изучены на атомно-силовом микроскопе. Упруго-эластические свойства поверхности лимфоцитов анализировались по численным данным модуля Юнга. Электрические свойства плазмалеммы клеток оценивались путем измерения поверхностного потенциала в режиме зонда Кельвина. Анализ механизмов межклеточной адгезии проводился в режиме силовой спектроскопии. Исследование показало, что выброс аденозинтрифосфата (АТФ) клетками крови, индуцированный с помощью механического стресса, повлиял на структуру и биофизические параметры поверхности лимфоцитов. При моделировании условий механической деформации клеток уровень АТФ в крови увеличился в 2,6 раза по сравнению с контролем. Количество морфологических образований на плазмалемме лимфоцитов уменьшилось на фоне появления более крупных глобулярных структур. Кроме того, снизилась жесткость лимфоцитов, увеличились заряд клеточной поверхности и сила адгезии между лимфоцитом и эритроцитом. Полученные экспериментальные данные могут иметь большое значение в диагностике и лечении различных патологических состояний, сопровождающих старение организма.

---

<sup>1</sup>Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда по мероприятию «Проведение инициативных исследований молодыми учеными» (2018–2020 годы, соглашение № 18-75-00041).

**Ответственный за переписку:** Сладкова Евгения Анатольевна, адрес: 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85, корп. 10, ауд. 2-5; e-mail: [sladkova@bsu.edu.ru](mailto:sladkova@bsu.edu.ru)

**Для цитирования:** Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Изменение ультраструктуры и функциональных свойств лимфоцитов в крови людей пожилого возраста при активации пуринергической сигнальной системы (*in vitro*) // Журн. мед.-биол. исследований. 2020. Т. 8, № 3. С. 250–257. DOI: 10.37482/2687-1491-Z016

**Ключевые слова:** пуринергическая сигнальная система, лимфоцит, потенциал поверхности, модуль Юнга, адгезия, пожилой возраст.

Современные ученые полагают, что производные пуринов и пиримидинов обладают мощным внеклеточным действием посредством активации специфических мембранных рецепторов [1–3]. Показано, что аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозин служат сигнальными молекулами в период как эмбрионального, так и постнатального развития человека [4–6]. Результаты ряда исследований демонстрируют изменения в пуринергической передаче сигналов при старении организма [7]. Так, показано, что с возрастом уменьшается количество аденозиновых рецепторов А1 и А2 в нервной ткани [4, 8], что способствует возрастному снижению синаптической эффективности [9–11]. В пожилом возрасте в сосудистой системе происходит сдвиг от пуринергической сигнализации в сторону преобладания адренергической, что выражается в снижении экспрессии рецепторов P2X на миоцитах сосудистой стенки [12]. Также с возрастом было выявлено снижение экспрессии рецепторов P2Y1 и P2Y2 в церебральных микрососудах [13].

Рецепторы пуринергической сигнальной системы локализованы практически во всех клетках и тканях, в т. ч. и на мембране форменных элементов крови [1, 14, 15]. Однако исследований изменения пуринергического рецепторного аппарата клеток крови, в т. ч. и при старении организма, в доступной нам литературе крайне мало. Кроме того, известно, что возрастные изменения могут отражаться на структуре и свойствах цитоплазматической мембраны клеток, что делает ее перспективным маркером для оценки функционального состояния клеточной популяции. Четкое представление о структурно-функциональной организации плазмалеммы любой клетки позволит понять особенности ее сигнальной трансдукции, что может быть полезным в понимании

механизмов функционирования пуринергической сигнальной системы.

Целью данной работы было изучить изменения ультраструктуры и функциональных свойств лимфоцитов в крови людей пожилого возраста при активации пуринергической сигнальной системы.

**Материалы и методы.** Исследовали кровь 30 условно здоровых людей пожилого возраста (мужчины и женщины в возрасте от 60 до 74 лет). Кровь была отобрана специализированным медицинским персоналом на базе диагностической лаборатории Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Экспериментальная работа выполнена с соблюдением требований Хельсинкской декларации, было получено информированное согласие всех субъектов эксперимента.

Пуринергическую сигнальную систему форменных элементов крови активировали путем моделирования механической деформации мембран. Для этого использовали модель механического стресса *in vitro* согласно методике, разработанной в исследовании [16]. Образцы крови были разделены на опытные (моделирование механического стресса) и контрольные (интактные). Таким образом, в общей сложности было изучено 60 проб.

Методом колориметрии определяли уровень АТФ в крови. В исследуемых образцах крови измеряли оптическую плотность на фотоэлектрическом фотометре КФК-3 (Россия, 2008) при длине волны 670 нм против физиологического раствора. Концентрацию АТФ рассчитывали по разности оптических плотностей между пробиркой, в которой провели гидролиз фосфатных связей, и пробой без гидролиза.

Цельную кровь разделяли на эритроциты и лейкоциты путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 мин. Затем из лейкоцитарной суспензии с помощью магнита

для клеточной сепарации EasySep Magnet и набора EasySep/EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell) выделяли лимфоцитарную популяцию.

Структуру плазмалеммы лимфоцитов исследовали в полуконтактном режиме атомно-силового микроскопа (АСМ) «ИНТЕГРА Вита» фирмы NT-MDT (г. Зеленоград, 2009). Сканирование осуществляли с использованием кантилеверов серии NSG03 (Nanoworld, США) с радиусом закругления 10 нм. Подготовку проб выполняли способом, изложенным в работе [17]. Из каждого образца сканировали по 15 клеток. На полученных сканах изучали неоднородности клеточной поверхности на участках плазмалеммы площадью  $3 \times 3$  мкм.

Жесткость лимфоцитов определяли в режиме силовой спектроскопии (из каждого образца было отсканировано по 15 клеток). Измеряли модуль Юнга клетки модифицированным зондом, изготовленным на основе полимерных микросфер и типлесса серии CSG11 (Nanoworld, США) [18].

Электрические свойства клеточной мембраны лимфоцитов оценивали путем измерения поверхностного потенциала на АСМ в режиме зонда Кельвина. Подготовку клеточных образцов для измерения и процедуру измерения потенциала поверхности выполняли по методике, описанной в работе [19]. Применяли кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Из каждой пробы крови сканировали по 20 лимфоцитов, обработку полученных сканов осуществляли в программе Nova (NT-MDT, г. Зеленоград, 2009).

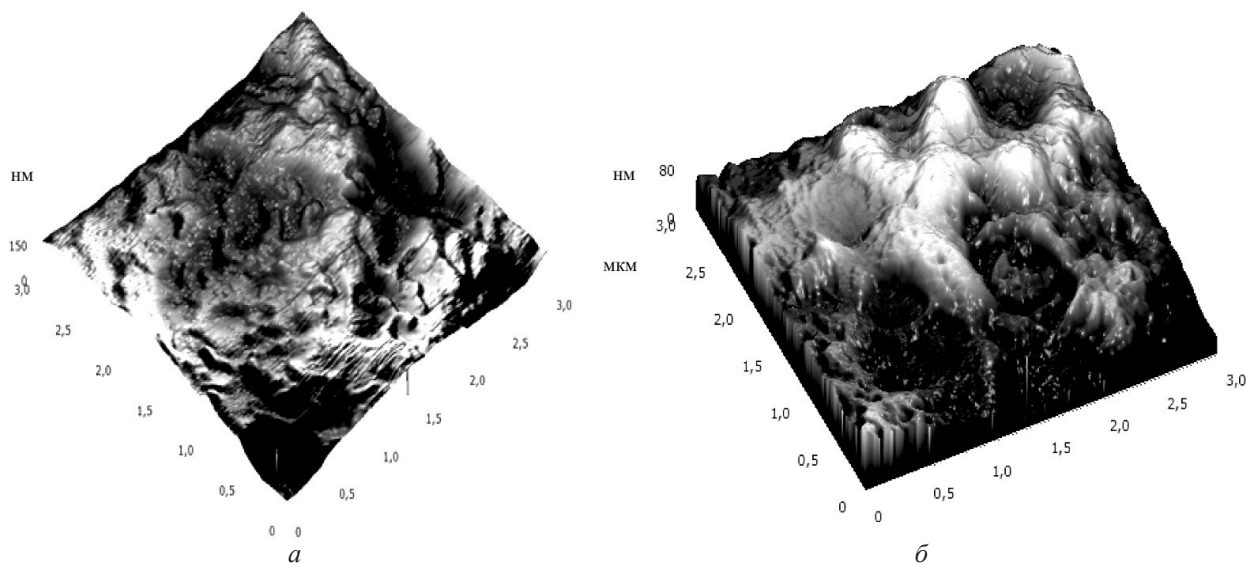
Адгезивные свойства клеток исследовали на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Биосенсорный чип для измерения сил адгезии был сконструирован на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 по методике, описанной в работе [20]. Межклеточные силы адгезии определяли в системе «эритроцит–лимфоцит», записывая силовые кривые с поверхности 20 клеток, расчет проводили с помощью программного обеспечения Nova.

Цифровые результаты исследований обрабатывали статистически, определяли выборочную среднюю величину ( $M$ ) и статистическую ошибку средней ( $m$ ). Исследуемые параметры находились в пределах нормального распределения, достоверность различий в исследуемых группах определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. За уровень статистически значимых различий принимали изменения при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В условиях активации пуринергической сигнальной системы концентрация АТФ в крови людей пожилого возраста составила  $0,021 \pm 0,001$  мкмоль/л, что в 2,6 раза выше, чем в контрольных пробах ( $0,008 \pm 0,001$  мкмоль/л).

Ультраструктура поверхности лимфоцитов в образцах крови (как после механического стресса, так и контрольных) людей пожилого возраста носила выраженный складчатый характер (см. рисунок). Однако общее число морфологических структур на поверхности клеток снизилось при активации пуринергической сигнальной системы на фоне формирования крупных глобулоподобных образований в виде скоплений разнообразной формы (табл. 1). Высота глобул и глубина углублений плазмалеммы лимфоцитов при активации пуринергической сигнальной системы увеличились соответственно на 66 и 54 % ( $p < 0,05$ ), а диаметр углублений снизился на 72 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

В условиях механического воздействия установлено изменение биофизических свойств плазмалеммы лимфоцитов. В опытных образцах крови (после моделирования механического стресса *in vitro*) заряд лимфоцитов стал более положительным – увеличился на 27 % ( $p < 0,05$ ), что привело к повышению адгезивной активности плазмалеммы (табл. 2). Сила межклеточной адгезии между эритроцитом и лимфоцитом увеличилась на 15 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными пробами. Кроме того, при механическом воздействии модуль Юнга, характеризующий жесткость поверхности лимфоцитов, снизился на 28 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.



Рельеф поверхности лимфоцитов в крови людей пожилого возраста: *a* – контрольные пробы (интактная кровь); *б* – опытные пробы (моделирование механического стресса *in vitro*)

**Обсуждение.** Механическое воздействие на клетки крови *in vitro*, аналогичное физиологическим условиям в микроциркуляторном

сосудистом русле, приводит к выбросу эритроцитами молекул АТФ [21], что согласуется с полученными в нашем исследовании

Таблица 1

**ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА ПРИ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ *in vitro* ( $M \pm m$ )**

Параметры структурных образований	Контроль (n = 30)	Опыт (n = 30)
Глобулярные образования:		
высота, нм	17,6±0,8	51,0±0,8*
число	124,0±1,1	41,0±0,2*
Углубления в плазмалемме:		
диаметр, нм	48,4±2,7	15,0±0,9*
глубина, нм	8,2±0,8	16,4±0,2*
число	41,0±2,3	29,0±0,1*

*Примечание:* \* – установлены статистически значимые различия между показателями опытных и контрольных проб по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

**ИЗМЕНЕНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЛАЗМАЛЕММЫ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА ПРИ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ *in vitro* ( $M \pm m$ )**

Показатель	Контроль (n = 30)	Опыт (n = 30)
Сила адгезии в системе «эритроцит–лимфоцит», нН	84,1±0,7	98,7±0,9*
Модуль Юнга, мкПа	5,0±0,1	3,6±0,1*
Потенциал поверхности, мВ	-39,5±0,5	-28,7±0,3*

*Примечание:* \* – установлены статистически значимые различия между показателями опытных и контрольных проб по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

данными об увеличении концентрации АТФ в 2,6 раза в опытных образцах крови людей пожилого возраста по сравнению с интактной кровью.

При активации пуринергической сигнальной системы количество морфологических образований на плазмалемме лимфоцитов уменьшается на фоне появления более крупных глобулярных структур. По данным литературы, активация сигнальных каскадов, в т. ч. и посредством пуринергического рецепторного комплекса, стимулирует синтез лимфоцитами фактора LMIF, понижающего полимеризацию актиновых филаментов [12]. В то же время локализация глобулярного актина в разных участках клетки может спровоцировать кластеризацию ее плазмалеммы [22], т. е. появление крупных глобулоподобных структур.

Активация пуринергической сигнальной системы приводит к изменению биофизических свойств лимфоцитов людей пожилого возраста. В частности, снижается жесткость лимфоцитов, увеличиваются заряд клеточной поверхности и сила адгезии между лимфоцитом и эритроцитом. В научной литературе показано, что на поверхности лимфоцитов локализованы рецепторы семейства P2X [9, 23, 24]; так, рецептор P2X4 выступает в качестве ионной поры и имеет высокую проницаемость для  $Ca^{2+}$  [25, 26]. В условиях механического воздействия происходит поток ионов  $Ca^{2+}$  внутрь клетки [27, 28], а это, в свою очередь, ведет к деполяризации плазмалеммы, что установлено в нашем исследовании.

Также в научной литературе показано, что увеличение содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в ответ на механическое воздействие приводит к снижению жесткости плазмалеммы [29, 30]. С точки зрения циркуляции и межклеточного взаимодействия в сосудистом русле в условиях запуска пуринергического сигнального каскада более «мягкие» лимфоциты легче мигрируют и сильнее адгезируют с другими клетками.

Таким образом, в нашем исследовании показано увеличение концентрации АТФ в крови, изменение биофизических свойств и рельефа плазмалеммы лимфоцитов у людей пожилого возраста при механическом стрессе *in vitro*. В условиях активации пуринергической сигнальной системы снизилась жесткость и увеличился потенциал клеточной поверхности, при этом повысились силы адгезии в системе «эритроцит–лимфоцит». Полученные данные указывают на то, что в крови людей пожилого возраста молекулы АТФ способствуют изменению структуры и биофизических свойств плазмалеммы клеток. Ввиду того, что такие заболевания, как атеросклероз, гипертония, болезни Альцгеймера и Паркинсона, тесно связаны с нарушениями передачи сигналов, опосредованными нуклеотидами и нуклеозидами аденина, полученные экспериментальные данные могут иметь большое значение в диагностике и лечении различных патологических состояний, сопровождающих старение организма.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

### Список литературы

1. Burnstock G. Purine and Pyrimidine Receptors // Cell. Mol. Life Sci. 2007. Vol. 64, № 12. P. 1471–1483.
2. Campwala H., Fountain S.J. Constitutive and Agonist Stimulated ATP Secretion in Leukocytes // Commun. Integr. Biol. 2013. Vol. 6, № 3. Art. № e23631.
3. Ita M.D., Vargas M.H., Carbajal V., Ortiz-Quintero B., López-López C. ATP Releases ATP or Other Nucleotides from Human Peripheral Blood Leukocytes Through Purinergic P2 Receptors // Life Sci. 2016. Vol. 145. P. 85–92.
4. Zimmermann H. Nucleotide Signaling in Nervous System Development // Pflugers Arch. 2006. Vol. 452, № 5. P. 573–588.
5. Dale N. Dynamic ATP Signalling and Neural Development // J. Physiol. 2008. Vol. 586, № 10. P. 2429–2436.
6. Burnstock G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential // Keio J. Med. 2013. Vol. 62, № 3. P. 63–73.
7. Bagatini M.D., Dos Santos A.A., Cardoso A.M., Mânica A., Reschke C.R., Carvalho F.B. The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases // J. Immunol. Res. 2018. Vol. 2018. Art. № 4892473.

8. Kerr M.I., Wall M.J., Richardson M.J.E. Adenosine A1 Receptor Activation Mediates the Developmental Shift at Layer 5 Pyramidal Cell Synapses and Is a Determinant of Mature Synaptic Strength // *J. Physiol.* 2013. Vol. 591, № 13. P. 3371–3380.
9. Bauman L.A., Mahle C.D., Boissard C.G., Gribkoff V.K. Age-Dependence of Effects of A1 Adenosine Receptor Antagonism in Rat Hippocampal Slices // *J. Neurophysiol.* 1992. Vol. 68. P. 629–638.
10. Verkhatsky A., Burnstock G. Biology of Purinergic Signalling: Its Ancient Evolutionary Roots, Its Omnipresence and Its Multiple Functional Significance // *BioEssays.* 2014. Vol. 36, № 7. P. 697–705.
11. Cieślak M., Czarnecka J., Roszek K. The Roles of Purinergic Signaling in Psychiatric Disorders // *Acta Biochim. Pol.* 2016. Vol. 63, № 1. P. 1–9.
12. Wallace A., Knight G.E., Cowen T., Burnstock G. Changes in Purinergic Signalling in Developing and Ageing Rat Tail Artery: Importance for Temperature Control // *Neuropharmacology.* 2006. Vol. 50, № 2. P. 191–208.
13. Thompson C.S., Kenney W.L. Altered Neurotransmitter Control of Reflex Vasoconstriction in Aged Human Skin // *J. Physiol.* 2004. Vol. 558, pt. 2. P. 697–704.
14. Burnstock G., Ralevic V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease // *Pharmacol. Rev.* 2014. Vol. 66, № 1. P. 102–192.
15. Burnstock G., Dale N. Purinergic Signalling During Development and Ageing // *Purinergic Signal.* 2015. Vol. 11. P. 277–305.
16. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of Red Blood Cell Filterability by Ca<sup>2+</sup> Influx and cAMP-Mediated Signaling Pathways // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 273. P. 1828–1834.
17. Патент 2398234 Рос. Федерация, МПК G01N 33/49. Способ исследования нативных клеток: № 2009125268/15: заявл. 01.07.2009: опубл. 27.08.2010 / Федорова М.З., Чернявских С.Д., Скоркина М.Ю., Сладкова Е.А., Забиняков Н.А. 4 с.
18. Патент 2466401 Рос. Федерация, МПК G01N 33/49. Способ определения упругости клеток крови: № 2011109741/15: заявл. 15.03.2011: опубл. 10.11.2012 / Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Забиняков Н.А., Сладкова Е.А. 5 с.
19. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина // *Биофизика.* 2014. Т. 59, вып. 2. С. 310–313.
20. Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А. Измерение сил адгезии в системе «клетка–клетка» на основе технологий атомно-силовой микроскопии // *Клеточ. технологии в биологии и медицине.* 2017. № 4. P. 213–215.
21. Evans J., Gratzer W., Mohandas N., Parker K., Sleep J. Fluctuations of the Red Blood Cell Membrane: Relation to Mechanical Properties and Lack of ATP Dependence // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, № 10. P. 4134–4144.
22. Sechi A.S., Wehland J. The Actin Cytoskeleton and Plasma Membrane Connection: PtdIns(4,5)P(2) Influences Cytoskeletal Protein Activity at the Plasma Membrane // *J. Cell Sci.* 2000. Vol. 113, pt. 21. P. 3685–3695.
23. Jimenez-Pacheco A., Diaz-Hernandez M., Arribas-Blázquez M. Transient P2X7 Receptor Antagonism Produces Lasting Reductions in Spontaneous Seizures and Gliosis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy // *J. Neurosci.* 2016. Vol. 36, № 22. P. 5920–5932.
24. North R.A. P2X Receptors // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2016. Vol. 371, № 1700. Art. № 20150427.
25. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24, № 13. P. 3413–3420.
26. Baroja-Mazo A., Barberà-Gremades H., Pelegrín P. The Participation of Plasma Membrane Hemichannels to Purinergic Signaling // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1828, № 1. P. 79–93.
27. Jarvis M.F. Characterization of P1 (Adenosine) Purinoceptors // *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2013. Vol. 62, № 1. P. 1.9.1–1.9.16.
28. Chen Y., Sumi Y.Y., Li A., To U.K., Elkhail A., Inoue Y., Woehrle T., Zhang Q., Hauser C., Junger W.G. Purinergic Signaling: A Fundamental Mechanism in Neutrophil Activation // *Sci. Signal.* 2010. Vol. 3, № 125. P. ra45.
29. Abbott R.D., Koptiuch C., Iatridis J.C., Howe A.K., Badger G.J., Langevin H.M. Stress and Matrix-Responsive Cytoskeletal Remodeling in Fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* 2013. Vol. 228, № 1. P. 50–57.
30. Helfand B.T., Chang L., Goldman R.D. Intermediate Filaments Are Dynamic and Motile Elements of Cellular Architecture // *J. Cell Sci.* 2004. Vol. 15, pt. 2. P. 133–141.

## References

1. Burnstock G. Purine and Pyrimidine Receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, vol. 64, no. 12, pp. 1471–1483.
2. Campwala H., Fountain S.J. Constitutive and Agonist Stimulated ATP Secretion in Leukocytes. *Commun. Integr. Biol.*, 2013, vol. 6, no. 3. Art. no. e23631.

3. De Ita M., Vargas M.H., Carbajal V., Ortiz-Quintero B., López-López C., Miranda-Morales M., Barajas-López C., Montaña L.M. ATP Releases ATP or Other Nucleotides from Human Peripheral Blood Leukocytes Through Purinergic P2 Receptors. *Life Sci.*, 2016, vol. 145, pp. 85–92.
4. Zimmermann H. Nucleotide Signaling in Nervous System Development. *Pflugers Arch.*, 2006, vol. 452, no. 5, pp. 573–588.
5. Dale N. Dynamic ATP Signalling and Neural Development. *J. Physiol.*, 2008, vol. 586, no. 10, pp. 2429–2436.
6. Burnstock G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential. *Keio J. Med.*, 2013, vol. 62, no. 3, pp. 63–73.
7. Bagatini M.D., Dos Santos A.A., Cardoso A.M., Mânica A., Reschke C.R., Carvalho F.B. The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases. *J. Immunol. Res.*, 2018, vol. 2018. Art. no. 4892473.
8. Kerr M.I., Wall M.J., Richardson M.J.E. Adenosine A1 Receptor Activation Mediates the Developmental Shift at Layer 5 Pyramidal Cell Synapses and Is a Determinant of Mature Synaptic Strength. *J. Physiol.*, 2013, vol. 591, no. 13, pp. 3371–3380.
9. Bauman L.A., Mahle C.D., Boissard C.G., Gribkoff V.K. Age-Dependence of Effects of A1 Adenosine Receptor Antagonism in Rat Hippocampal Slices. *J. Neurophysiol.*, 1992, vol. 68, pp. 629–638.
10. Verkhatsky A., Burnstock G. Biology of Purinergic Signalling: Its Ancient Evolutionary Roots, Its Omnipresence and Its Multiple Functional Significance. *BioEssays*, 2014, vol. 36, no. 7, pp. 697–705.
11. Cieślak M., Czarnecka J., Roszek K. The Roles of Purinergic Signaling in Psychiatric Disorders. *Acta Biochim. Pol.*, 2016, vol. 63, no. 1, pp. 1–9.
12. Wallace A., Knight G.E., Cowen T., Burnstock G. Changes in Purinergic Signalling in Developing and Ageing Rat Tail Artery: Importance for Temperature Control. *Neuropharmacology*, 2006, vol. 50, no. 2, pp. 191–208.
13. Thompson C.S., Kenney W.L. Altered Neurotransmitter Control of Reflex Vasoconstriction in Aged Human Skin. *J. Physiol.*, 2004, vol. 558, pt. 2, pp. 697–704.
14. Burnstock G., Ralevic V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.*, 2014, vol. 66, no. 1, pp. 102–192.
15. Burnstock G., Dale N. Purinergic Signalling During Development and Ageing. *Purinergic Signal.*, 2015, vol. 11, pp. 277–305.
16. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of Red Blood Cell Filterability by Ca<sup>2+</sup> Influx and cAMP-Mediated Signaling Pathways. *Am. J. Physiol.*, 1997, vol. 273, pp. 1828–1834.
17. Fedorova M.Z., Chernyavskikh S.D., Skorkina M.Yu., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. *Method for Studying Native Cells*. Patent RF no. 2398234, 2010 (in Russ.).
18. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. *Method for Determining Blood Cell Elasticity*. Patent RF no. 2466401, 2012 (in Russ.).
19. Sladkova E.A., Skorkina M.Y. Estimation of Surface Potential of Lymphocytes from Patients with Leukemia Using Kelvin Probe Mode. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 254–256.
20. Skorkina M.Yu., Shamray E.A., Sladkova E.A. Izmerenie sil adgezii v sisteme “kletka–kletka” na osnove tekhnologii atomno-silovoy mikroskopii [Measuring of Adhesion Force in the Cell–Cell System Based on Atomic Force Microscopy Technology]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*, 2017, no. 4, pp. 213–215.
21. Evans J., Gratzner W., Mohandas N., Parker K., Sleep J. Fluctuations of the Red Blood Cell Membrane: Relation to Mechanical Properties and Lack of ATP Dependence. *Biophys. J.*, 2008, vol. 94, no. 10, pp. 4134–4144.
22. Sechi A.S., Wehland J. The Actin Cytoskeleton and Plasma Membrane Connection: PtdIns(4,5)P(2) Influences Cytoskeletal Protein Activity at the Plasma Membrane. *J. Cell Sci.*, 2000, vol. 113, pt. 21, pp. 3685–3695.
23. Jimenez-Pacheco A., Diaz-Hernandez M., Arribas-Blázquez M., Sanz-Rodríguez A., Olivos-Oré L.A., Artalejo A.R., Alves M., Letavic M., Miras-Portugal M.T., Conroy R.M., Delanty N., Farrell M.A., O’Brien D.F., Bhattacharya A., Engel T., Henshall D.C. Transient P2X7 Receptor Antagonism Produces Lasting Reductions in Spontaneous Seizures and Gliosis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.*, 2016, vol. 36, no. 22, pp. 5920–5932.
24. North R.A. P2X Receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2016, vol. 371, no. 1700. Art. no. 20150427.
25. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *J. Neurosci.*, 2004, vol. 24, no. 13, pp. 3413–3420.
26. Baroja-Mazo A., Barberà-Gremades H., Pelegrín P. The Participation of Plasma Membrane Hemichannels to Purinergic Signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, vol. 1828, no. 1, pp. 79–93.
27. Jarvis M.F. Characterization of P1 (Adenosine) Purinoceptors. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, 2013, vol. 62, no. 1, pp. 1.9.1–1.9.16.

28. Chen Y., Yao Y., Sumi Y., Li A., To U.K., Elkhali A., Inoue Y., Woehrle T., Zhang Q., Hauser C., Junger W.G. Purinergic Signaling: A Fundamental Mechanism in Neutrophil Activation. *Sci. Signal.*, 2010, vol. 3, no. 125, pp. ra45.

29. Abbott R.D., Koptiuch C., Iatridis J.C., Howe A.K., Badger G.J., Langevin H.M. Stress and Matrix-Responsive Cytoskeletal Remodeling in Fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, 2013, vol. 228, no. 1, pp. 50–57.

30. Helfand B.T., Chang L., Goldman R.D. Intermediate Filaments Are Dynamic and Motile Elements of Cellular Architecture. *J. Cell Sci.*, 2004, vol. 15, pt. 2, pp. 133–141.

DOI: 10.37482/2687-1491-Z016

*Evgeniya A. Sladkova*\* ORCID: [0000-0003-3072-2402](https://orcid.org/0000-0003-3072-2402)

*Marina Yu. Skorkina*\* ORCID: [0000-0002-9441-5295](https://orcid.org/0000-0002-9441-5295)

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

### CHANGES IN THE ULTRASTRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LYMPHOCYTES IN OLDER ADULTS AT ACTIVATION OF THE PURINERGIC SIGNALLING SYSTEM (*in vitro*)

The purinergic signalling system plays a significant role in the functioning of the body from the early stages of embryogenesis through the postnatal period. It is known that with ageing, the expression of purine receptors in the nervous tissue and in the vascular endothelium decreases. However, the available literature data on the functioning of the purinergic receptor complex on the surface of blood cells is extremely scarce. This paper aimed to study the changes in the ultrastructure and functional properties of lymphocytes in older adults at activation of the purinergic signalling system. By means of mechanical stress *in vitro*, we modelled conditions close to physiological in the microvasculature. The structure and biophysical properties of the cell membrane, which determine the functioning of blood cells, were studied using an atomic force microscope. The elastic properties of the lymphocyte surface were analysed based on the Young's modulus. The electrical properties of the plasma membrane were evaluated by measuring the surface potential in the Kelvin probe mode. The mechanisms of intercellular adhesion were analysed using force spectroscopy. We found that the mechanical stress-induced release of adenosine triphosphate (ATP) by blood cells affected the structure and biophysical parameters of the lymphocyte surface. When modelling the conditions of mechanical deformation of cells, the ATP level in the blood increased by the factor of 2.6 compared with the control. The number of morphological formations on the lymphocyte plasma membrane decreased in the presence of larger globular structures. Moreover, lymphocyte stiffness decreased, while the cell surface charge and adhesion strength between lymphocyte and erythrocyte increased. The obtained experimental data can be of great importance in the diagnosis and treatment of various pathological conditions that accompany ageing.

**Keywords:** *purinergic signalling system, lymphocyte, surface potential, Young's modulus, adhesion, older adults.*

Поступила 30.03.2020

Принята 20.08.2020

Received 30 March 2020

Accepted 20 August 2020

---

**Corresponding author:** Evgeniya Sladkova, address: ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015, Russian Federation; e-mail: [sladkova@bsu.edu.ru](mailto:sladkova@bsu.edu.ru)

**For citation:** Sladkova E.A., Skorkina M.Yu. Changes in the Ultrastructure and Functional Properties of Lymphocytes in Older Adults at Activation of the Purinergic Signalling System (*in vitro*). *Journal of Medical and Biological Research*, 2020, vol. 8, no. 3, pp. 250–257. DOI: 10.37482/2687-1491-Z016