

КОНТАКТНАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ С ЧАСТЫМИ ОБОСТРЕНИЯМИ

Гайнитдинова В.В.¹, Шарафутдинова Л.А.², Бакиров А.Б.¹, Калимуллина Д.Х.¹

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия (450000, Уфа, ул. Ленина, 3), e-mail: ivv_08@mail.ru

²ГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет, e-mail: ivv_08@mail.ru

С использованием метода атомно-силовой микроскопии проведено исследование вязко-упругих свойств (жесткости мембраны, силы адгезии) нейтрофилов периферической крови у больных с частыми обострениями хронической обструктивной болезни легких. В режиме силовой спектроскопии выполнена количественная оценка модуля упругости (модуля Юнга) клеточной мембраны и силы адгезии нейтрофилов. В серии экспериментов сравнивались показатели жесткости и силы адгезии мембраны нейтрофилов, полученных из крови здоровых доноров и больных ХОБЛ. Установлено, что клеточная мембрана нейтрофилов больных ХОБЛ с частыми обострениями по сравнению с контрольной группой и группой больных с редкими обострениями характеризуется более высокой жесткостью, характеризуемой высокими значениями модуля Юнга и повышенной силой адгезии нейтрофилов. Выявлена зависимость исследуемых от показателей функции внешнего дыхания и частоты обострений.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, частые обострения, атомно-силовая микроскопия, жесткость мембраны нейтрофилов, сила адгезии нейтрофилов.

CONTACT ATOMIC FORCE SPECTROSCOPY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE WITH FREQUENT EXACERBATIONS

Gainitdinova V.V.¹, Sharafutdinova L.A.², Bakirov A.B.¹, Kalimullina D.H.¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: ivv_08@mail.ru

²Bashkir state university, Ufa, sharafla@yandex.ru

With use of a method of atomic and power microscopy research of visco-elastic properties (rigidity of a membrane, adhesion force) of neutrophils of peripheral blood at patients with frequent exacerbations of a chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is conducted. In the mode of power spectroscopy the quantitative assessment of the module of elasticity (the module the Ship's boy) a cellular membrane and force of adhesion of neutrophils is executed. In a series of experiments indicators of rigidity and force of adhesion of a membrane of the neutrophils received from blood of healthy donors and sick COPD were compared. It is established that the cellular membrane of neutrophils of sick COPD with frequent aggravations in comparison with control group and group of patients with rare aggravations is characterized by higher rigidity characterized by high values of the module the Ship's boy and increased by force of adhesion of neutrophils. Dependence investigated from indicators of function of external breath and frequency of aggravations is revealed.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, frequent exacerbations, atomic force microscopy, the stiffness of the membrane of neutrophils, neutrophil adhesion force.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется прогрессирующим не полностью обратимым ограничением потока воздуха [10,12]. Выраженность симптомов при ХОБЛ варьирует в зависимости от фазы течения заболевания (стабильное течение или обострение). Обострения ухудшают функцию внешнего дыхания, а частота обострений напрямую влияет на продолжительность жизни больных и требует индивидуального подхода к лечению [3,11].

Воспаление дыхательных путей является основным компонентом в патогенезе ХОБЛ [1]. Согласно результатам многочисленных исследований у больных ХОБЛ имеют место

изменения структуры и активация нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови [8]. При этом наблюдается нарушение функционирования циркулирующих нейтрофилов, что способствует развитию системного воспалительного ответа. Кроме того, нейтрофилы у больных ХОБЛ обладают повышенной хемотаксической реакцией, усиленной способностью переваривать соединительную ткань [13] и повышенной экспрессией поверхностных клеточных адгезивных молекул [6]. Системное воспаление, в свою очередь, может способствовать развитию системных проявлений ХОБЛ, включая сердечно-сосудистые заболевания, рак легких, потерю веса, остеопороз и диабет [4,5,9].

Одним из перспективных методов изучения структурно-механических свойств клеток крови в настоящее время является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Важными преимуществами АСМ по сравнению с другими методами исследования клеток крови являются возможность изучения реальной поверхности клетки без применения специальных методов подготовки образцов и использование АСМ в качестве наномеханического сенсора, позволяющего изучать механические (упругие) и адгезионные свойства биоматериалов [14].

В связи с вышесказанным, целью работы явилось исследование вязко-упругих свойств (жесткости мембраны, силы адгезии) нейтрофилов периферической крови у больных с частыми обострениями ХОБЛ с помощью атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 24 пациента ХОБЛ. Из них 12 человек с частыми обострениями (2 или более обострения в год, или 1 и более обострений, приведших к госпитализации, GOLD 2014 г), 12 человек с редкими обострениями (0-1 обострений в год, GOLD 2014 г). Группы статистически значимо не различались ($p > 0,05$) по возрасту, половой принадлежности, тяжести заболевания (GOLD 2014г), частоте обострения за последние 2-3 года. Диагноз ХОБЛ установлен согласно рекомендациям GOLD 2013г. Средний возраст больных в исследуемых группах составил $53,3 \pm 5,2$ и $52,3 \pm 1,6$ лет. Средняя продолжительность заболевания - $8,90 \pm 3,9$ лет и $9,70 \pm 3,4$ лет, частота обострений $0,98 \pm 0,11$ и $2,88 \pm 0,7$ в год соответственно. Выраженность одышки по mMRS и CAT в среднем составляла $2,87 \pm 1,74$ баллов и $26,89 \pm 4,04$ баллов в группе больных с редкими обострениями, в группе больных с частыми обострениями - $3,03 \pm 2,20$ баллов и $28,06 \pm 5,03$ баллов соответственно. В контрольную группу вошли 14 условно здоровых лиц без патологии органов дыхания в возрасте 45-55 лет. Критерии исключения из исследования были острые формы других инфекционно-воспалительных, нагноительных заболеваний, лихорадка, злокачественные новообразования.

В комплекс обязательного обследования входили общие исследования крови при поступлении. Для определения выраженности одышки использовали шкалу CAT (COPD assessment test) и опросник mMRC (Medical Research Council). Индексы курения (ИК) и массы

тела (ИМТ) высчитывали по общепринятым формулам. Насыщение крови кислородом (SaO_2) определялось с помощью напалечного пульсоксиметра MD300C. Всем пациентам проведено функциональное исследование респираторной, сердечно-сосудистой систем, определен уровень СДЛА. Спирометрия (ОФВ₁, ФЖЕЛ, отношение ОФВ₁/ФЖЕЛ), бодиплетизмография (ООЛ, ОЕЛ, ДСЛ, АВ) проводились на оборудовании MasterScreenBody (ErichJaeger, Германия). **Специальные методы:** Объектом исследования послужили нейтрофилы периферической крови больных ХОБЛ. Забор крови проводился в 1-е сутки поступления пациентов в стационар до назначения антибактериальной терапии, системных глюкокортикостероидов (СГКС). Нейтрофилы выделялись из гепаринизированной (20 ед / мл) венозной крови доноров на двойном градиенте фиколлурографина по методике И.В. Подосинникова и соавт. [2]. Клетки дважды отмывались забуференным изотоническим раствором натрия хлорида и взвешивались в растворе Хенкса. Оценка упругих свойств мембраны нативных нейтрофилов проводилась в режиме силовой спектроскопии. Исследования поверхности клеток проводилось в жидкостной ячейке на АСМ Agilent 5500 с использованием кремниевых зондов PPP-CONTPt (Nanosensors, Швейцария). Жесткость мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывался согласно теории Герца [7]. В серии экспериментов сравнивались показатели жесткости мембраны нейтрофилов, полученных из крови здоровых доноров и больных ХОБЛ. Для этого проводили обзорное сканирование поля размером 60x60 мкм и выбирали для измерения не менее 15 клеток в каждом случае. Для визуализации сканируемых объектов использовалась программа PicoView 1.10, при дальнейшей обработке данных – программное обеспечение PicoImageBasic 5.1. Сила адгезии нейтрофилов определялась в режиме атомно-силовой спектроскопии. Использовались коллоидные V-образные зонды CP-PNPL-SiO-C с круглым наконечником (диаметр 6,62 мкм).

Статистическая обработка данных производилась в пакете прикладных программ StatisticaV.7.0 (StatsoftInc, США). Сравнение групп проводилось с помощью непараметрического теста Манна – Уитни, нулевая гипотеза об отсутствии различий групп отвергалась при $p < 0,05$. Степень тесноты связи параметров оценивалась с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования. При изучении картины периферической крови отмечалось увеличение количества циркулирующих нейтрофилов у больных ХОБЛ по сравнению с группой условно здоровых лиц ($p < 0,05$). Статистически значимого различия количества циркулирующих нейтрофилов в зависимости от частоты обострений не наблюдалось ($p > 0,05$).

С целью получения более полной информации о жесткости мембраны нейтрофилов больных ХОБЛ была проведена оценка модуля Юнга нативных нейтрофилов. Анализ результатов атомно-силовой спектроскопии упругих деформаций нейтрофилов позволил выявить, что клеточная мембрана нейтрофилов больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой характеризуется более высокими значениями модуля Юнга. Модуль Юнга нейтрофилов у больных ХОБЛ с редкими обострениями превышает этот показатель контрольной группы в 2,5 раза.

Результаты исследования показали, что жесткость мембраны нативных клеток контрольной группы составляет в среднем $15,29 \pm 0,05$ кПа. У больных ХОБЛ с редкими обострениями этот показатель равен $35,15 \pm 0,28$ кПа. У больных ХОБЛ с частыми обострениями жесткость мембраны нейтрофила составила в среднем $51,18 \pm 0,36$ кПа, что в 3,3 раза выше, чем у контрольной группы лиц и ($p < 0,05$) и в 1,45 раза выше, чем у больных ХОБЛ с редкими обострениями ($p < 0,05$).

Результаты серий экспериментов по определению силы адгезии показали, что значение силы адгезии для нейтрофилов, выделенных у доноров контрольной группы, составляет $0,076 \pm 0,0002$ нН, тогда как в группе больных ХОБЛ с редкими обострениями этот показатель равен $0,33 \pm 0,004$ нН. Максимальная величина адгезионного взаимодействия была зарегистрирована у нейтрофилов, выделенных из периферической крови больных ХОБЛ с частыми обострениями $0,49 \pm 0,006$ нН.

Таким образом, методом прямых измерений с использованием АСМ нами определены адгезионные силы между поверхностью зонда и поверхностью нейтрофила. Показано, что сила адгезии нейтрофилов больных ХОБЛ с редкими обострениями выше, чем у нейтрофилов доноров контрольной группы в 4,34 раза. У больных ХОБЛ с частыми обострениями этот показатель выше контроля в 6,44 раза и группы больных ХОБЛ с редкими обострениями в 1,48 раза.

Изучение корреляционных взаимоотношений выявило обратную связь модуля Юнга и силы адгезии от показателей функции внешнего дыхания – ФЖЕЛ ($r = -0,45$, $p < 0,05$ и $r = -0,53$, $p < 0,05$), ООЛ ($r = -0,38$, $p < 0,05$), прямую зависимость от частоты обострений ($r = 0,72$, $p < 0,05$ и $r = 0,68$, $p < 0,05$ соответственно) (рис. 1,2).

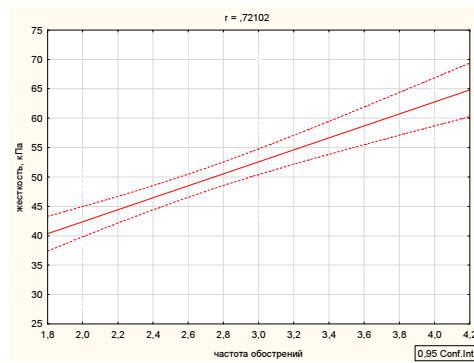


Рис. 1. Корреляционная связь между частотой обострений и жесткостью мембраны нейтрофилов у больных ХОБЛ.

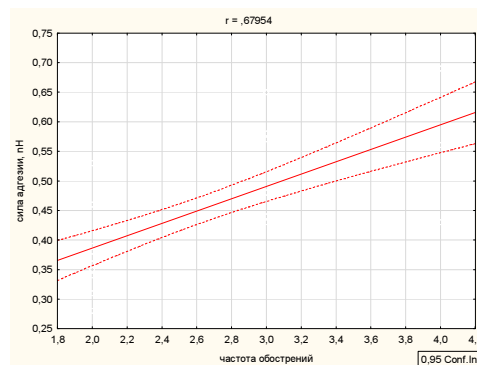


Рис. 2. Корреляционная связь между частотой обострений и силой адгезии мембраны нейтрофилов у больных ХОБЛ.

Обсуждение результатов. В нашей работе методом атомно-силовой микроскопии были изучены функциональные характеристики нейтрофилов у больных ХОБЛ с частыми обострениями. Нейтрофилы, секретирова сериновые протеазы (нейтрофильную эластазу, катепсин G и протеиназу-3), приводят к деструкции альвеолярной стенки и играют одну из ведущих ролей в воспалении при ХОБЛ [1, 5]. Знание наномеханических (жесткость мембраны и сила адгезии) свойств нейтрофилов поможет лучше понять функции нейтрофилов в микроциркуляторном русле. Отвечая на инфекционные и воспалительные сигналы, нейтрофилы быстро достигают места инфекции и воспаления за счет микрососудистой, трансэндотелиальной и трансэпителиальной миграции. В ходе этого процесса нейтрофилы подвергаются динамической деформации и восстановлению. Увеличение деформации клеток (жесткости цитоплазматической мембраны) и площади контакта нейтрофилов с эндотелием способствует адгезии к эндотелию сосудов и ведет к его повреждению. В исследовании *invitro*, при их активации нейтрофилов, установлено повышение жесткости их мембраны до 7 раз [14].

В нашем исследовании анализ результатов атомно-силовой спектроскопии показал увеличение жесткости мембран нейтрофилов у больных ХОБЛ. Установлено, что клеточная мембрана нейтрофилов больных ХОБЛ с частыми обострениями по сравнению с контрольной группой и группой больных с редкими обострениями характеризуется более высокой жесткостью, характеризуемой высокими значениями модуля Юнга и повышенной силой адгезии нейтрофилов. Выявлена зависимость исследуемых от показателей функции внешнего дыхания, характеризующих наличие эмфиземы легких и частоты обострений.

Таким образом, использование АСМ позволило установить значимое увеличение жесткости мембраны и силы адгезии нейтрофилов у больных ХОБЛ с частыми обострениями, которые могут быть использованы в качестве индикатора степени выраженности воспаления. Выявленные особенности вязко-упругих свойств нейтрофилов больных ХОБЛ имеют особое значение и вносят вклад в существующие представления о роли системного воспаления в развитии ХОБЛ.

Список литературы

1. Авдеев С.Н. Ингибиторы фосфодиэстеразы - 4: новые перспективы противовоспалительной терапии ХОБЛ // Фарматека. – 2013. - № 4. – С. 101-111.
2. Подосинников И.В., Нилова Л.Г. Бабичев И.В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов // Лаб. Дело. - 1981. - № 8. - С. 68-70.
3. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. – М., 2013.
4. Bailey, K.L. The Role of Systemic Inflammation in COPD / K.L.Bailey, J. Goraya, S.L. Rennard// Chronic Obstructive Pulmonary Disease Co-Morbidities and Systemic Consequences Series/ eds.L.Nici, R. ZuWallack. –Humana Press, 2012.–Vol. XII. - 288 p.
5. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD// EurRespir J. - 2009. Vol.-33. – P. 1165–1185
6. Blidberg K., Palmberg L., Jameet A. Adhesion molecule sin subjects with COPD and healthynon-smokers: a cross sectional parallel group study // Respir. Res. – 2013. Vol. 14. – P. 47.
7. Bukharaev A.A., Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Ovchinnikov D.V. Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by AFM // Physic of low-dimension structures. - 2003. – P. 31—38.
8. Emiel F.M. Wouters Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Proc. Am. Thorac. – 2005. Vol. 2. – P. 26–33.

9. Fritz M.E. Ter-Minassian Franssen and Carolyn L. Rochester, Comorbidity in patients with chronic obstructive lung disease and pulmonary rehabilitation: do they matter?// Eur Respir J. - 2014. Vol. 131. - P 131-141.
10. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report. – URL: www.goldcopd.org (Last updated 2014).
11. Hoogendoorn M., Hoogenveen R.T., Rutten-van Moelken M.P., Vestbo J., Feenstra T.L., Case fatality of COPD exacerbations: a meta-analysis and statistical modeling approach// Eur Respir J. - 2011. Vol. 37. – P. 508–515.
12. Navessa P. Tania, Martina Schmidt and Reinoud Gosens Activin-A: active in inflammation in COPD// Eur Respir J. – 2014. Vol. 43. – P. 954–955.
13. Noguera A., Batle S., Miralles C. et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease // Thorax. – 2001. Vol. 56, N 6. – P. 432–437.
14. Roca-Cusachs P., Almendros I., Sunyer Raimon et al. Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy // Biophys. J. – 2006. Vol. 91. – P. 3508–3518.

Рецензенты:

Шамратова В.Г., д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и зоологии, Башкирский государственный университет, г. Уфа;

Никуличева В.И., д.м.н., профессор кафедры терапии и общей практики с курсом гериатрии ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ», г. Уфа.