

УДК 616.23

## ОЦЕНКА УПРУГОЭЛАСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

<sup>1</sup>Гайнитдинова В.В., <sup>2</sup>Шарафутдинова Л.А., <sup>1</sup>Бакиров А.Б.,

<sup>1</sup>Калимуллина Д.Х., <sup>1</sup>Аллабердина Д.У.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа, e-mail: ivv\_08@mail.ru

В режиме силовой спектроскопии выполнена количественная оценка жесткости клеточной мембраны нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Исследования поверхности клеток проводили в жидкостной ячейке на АСМ Agilent 5500. Жесткость мембраны оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца. В серии экспериментов сравнивали показатели жесткости мембраны нейтрофилов, полученных из крови здоровых доноров и больных ХОБЛ. 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 упругости. Рос-анализ показал, что чувствительность определения модуля Юнга для прогнозирования увеличения жесткости мембраны нейтрофилов составила 85%, а специфичность 75%.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, модуль Юнга, хроническая обструктивная болезнь легких, атомно-силовая микроскопия

## EVALUATION OF THE BLOODS NEUTROPHILS ELASTIC PROPERTIES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

<sup>1</sup>Gaynitdinova V.V., <sup>2</sup>Sharafutdinova L.A., <sup>1</sup>Bakirov A.B.,

<sup>1</sup>Kalimullina D.K., Allaberdina D.U.

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, Ufa;

<sup>2</sup>Bashkir state university, Ufa, e-mail: ivv\_08@mail.ru

In the mode of power spectroscopy the quantitative assessment of rigidity of a cellular membrane of neutrophils at patients with the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is executed. Researches of a surface of cages were conducted in a liquid cell on AFM Agilent 5500. Rigidity of a membrane was estimated on the Young's module who counted according to the theory of Hertz. In a series of experiments compared indicators of rigidity of neutrophils membrane received from blood of healthy donors and sick COPD. It is shown that the membrane of neutrophils of sick COPD in comparison with control group is characterized by higher values of the Young's module. The Roc-analysis showed that sensitivity of definition of the Young's module for forecasting of increase in rigidity of a membrane of neutrophils made 85%, and specificity of 75%.

**Keywords:** neutrophils, Young's module, chronic obstructive pulmonary disease, atomic force microscopy

Воспаление дыхательных путей является основным компонентом в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [1]. Согласно результатам многочисленных исследований у больных ХОБЛ имеют место изменения структуры и активация нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови [7]. При этом наблюдается нарушение функционирования циркулирующих нейтрофилов, что способствует развитию системного воспалительного ответа. Кроме того, нейтрофилы у больных ХОБЛ обладают повышенной хемотаксической реакцией, экспрессией поверхностных клеточных адгезивных молекул и усиленной способностью переваривать соединительную ткань [3].

Известно, что возникновение некоторых патологических состояний сопровождается изменением жесткости тканей [4, 6]. В некоторых случаях причиной этого является изменение упругости внеклеточного ма-

трикса, в других – жесткость тканей меняется из-за изменения твердости клеток [8].

Одним из перспективных методов изучения структурно-механических свойств клеток крови в настоящее время является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Использование АСМ открывает новые возможности в цитодиагностике, поскольку метод за короткое время (минуты) позволяет получить изображение рельефа поверхности клеток с пространственным разрешением порядка нескольких нанометров. 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. По мере

развития АСМ в диагностике стали появляться новые понятия, такие как «клеточная наномеханика», или «клеточная эластография». Методы визуализации сдвиговых упругих характеристик живых клеток считаются перспективными для медицинской диагностики различных патологий [2]. Так, A.L. Weisenhorn с соавт. показано, что нормальные клетки эпителия человека имеют модуль Юнга, величина которого на порядок превышает модуль Юнга раковых клеток [12]. А при исследовании механических свойств мембраны нейтрофилов у больных ХОБЛ с выраженной гипоксемией до и после двусторонней пересадки легких [9] выявлено, что жесткость мембраны нейтрофилов у пациентов с ХОБЛ значительно выше, чем в группе здоровых некурящих лиц. После трансплантации ригидность мембраны уменьшилась, однако существенных различий по сравнению с группой здоровых лиц обнаружено не было. В другом исследовании *in vitro* установлено повышение жесткости мембраны нейтрофилов при их активации до 7 раз [3].

**Цель настоящего исследования:** оценка упруго-эластических свойств нейтрофилов крови методом атомно-силовой микроскопии у больных хронической обструктивной болезнью легких.

#### Материал и методы исследования

Проведено местное, открытое, сравнительное исследование по изучению структурно-функциональных свойств нейтрофилов периферической крови у 15 больных с тяжелой степенью ХОБЛ в фазе обострения методом атомно-силовой микроскопии. Диагноз ХОБЛ установлен согласно рекомендациям GOLD 2010 г. Средний возраст больных составил  $53,3 \pm 5,2$  лет, средняя продолжительность заболевания составила  $8,90 \pm 3,9$  лет. Индекс курения (ИК) и индекс массы тела (ИМТ) в среднем составляли  $26,17 \pm 3,74$  и  $23,89 \pm 4,04$  соответственно.

В контрольную группу вошли 14 практически здоровых некурящих лиц без патологии органов дыхания в возрасте 40–55 лет. Группы исследования и контроля не различались по возрасту, половой принадлежности. Критериями исключения из исследования были острые формы других инфекционно-воспалительных, нагноительных заболеваний, лихорадка, злокачественные новообразования, сахарный диабет.

В комплекс обязательного обследования входил общий анализ крови в 1-е сутки поступления пациентов в стационар. ИК и ИМТ высчитывали по общепринятым формулам. Насыщение крови кислородом ( $\text{SaO}_2$ ) определялось с помощью напалечного пульсоксиметра MD300C. Спирометрия (ОФВ<sub>1</sub>, ФЖЕЛ, отношение ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ) проводилась на оборудовании Master Screen Body (Erich Jaeger, Германия).

Объект исследования – нейтрофилы периферической крови условно здоровых лиц и больных ХОБЛ. Забор крови для исследования проводился в 1-е сутки поступления пациентов в стационар. Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной (20 ед./мл) венозной крови доноров на двойном градиенте фиколиурография по методике И.В. Подосинникова и др.

[3]. Клетки дважды отмывали забуференным изотоническим раствором натрия хлорида и взвешивали в растворе Хенкса (Invitrogen).

Оценка упругих свойств мембраны нейтрофилов проводилась в режиме силовой спектроскопии. В основе метода атомно-силовой спектроскопии лежит регистрация так называемых «силовых кривых», которые отражают отклонение гибкой балки АСМ-зонда при взаимодействии вершины зонда с поверхностью в зависимости от расстояния между ними. Исследования поверхности клеток проводили в жидкостной ячейке на АСМ Agilent 5500 с использованием кремниевых зондов PPP-CONTPT (Nanosensors) и коллоидных V-образных зондов CP-PNPL-SiO-C с круглым наконечником (диаметр 6,62 мкм). Жесткость мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [5].

В серии экспериментов сравнивали показатели жесткости мембраны нейтрофилов, полученных из крови здоровых доноров и больных ХОБЛ. Для этого проводили обзорное сканирование поля размером  $60 \times 60$  мкм и выбирали для измерения не менее 10–15 клеток. Для визуализации сканируемых объектов использовали программу Pico View 1.10, при дальнейшей обработке данных – программное обеспечение Pico Image Basic 5.1.

Математико-статистическую обработку данных производили в пакете прикладных программ STATISTICA V.7.0 («StatsoftInc», США). Для всех имеющихся выборок проводили анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Поскольку распределение признаков в группах не являлось нормальным, сравнительный анализ групп проводился с помощью непараметрических методов. Для сравнения трех групп использовался ранговый анализ вариаций по Крускалу – Уоллису. В случае если нулевая гипотеза об отсутствии различий отклонялась, проводили парное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна – Уитни. Количественные данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $m$  – стандартная ошибка средней. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение

Знание микромеханических свойств нейтрофилов поможет лучше понять функции этих клеток 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. Предполагают, что процесс деформации нейтрофилов необходим для того, чтобы регулировать их адгезию к эндотелию и последующую миграцию в поврежденные ткани. Увеличение деформации клеток и площади контакта нейтрофилов с эндотелием сосудов ведет к его повреждению. Таким образом, миграция и адгезия нейтрофилов к эндоте-

лию сосудов опосредована реологией нейтрофилов [11].

С целью получения более полной информации о жесткости мембраны нейтрофилов больных ХОБЛ была проведена оценка модуля Юнга нативных клеток. 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 упругости (рис. 1). Установлено, что модуль Юнга мембраны нативных клеток контрольной группы составляет в среднем  $15,29 \pm 0,05$  кПа, тогда как у больных ХОБЛ этот показатель примерно в 2,5 раза выше и равен  $38,79 \pm 0,32$  кПа ( $p < 0,05$ ). Этот факт свидетельствует о снижении эластичности и вязкости клеточной мембраны и повышении жесткости нейтрофилов больных ХОБЛ.

Различия силовых кривых взаимодействия (подвода) зонда с поверхностью ней-

трофилов контрольной группы (а) и больных ХОБЛ (b) показаны на рис. 2.

Наклон кривой подвода кантилевера определяет упругие свойства образца (клетки). Для «мягких» образцов кривая подвода кантилевера имеет более пологий наклон. На представленном рисунке отчетливо видно, что наклон силовой кривой подвода зонда к поверхности нейтрофилов группы больных ХОБЛ (рис. 2, b) более крутой, что свидетельствует о более высокой жесткости мембраны клеток этой группы больных по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы.

Площадь под кривой ROC у больных ХОБЛ для модуля Юнга была равна 0,889 ( $p < 0,05$ ; 95% ДИ 0,774 – 1,000), что соответствовало отличному качеству построенной модели (рис. 3). Анализ показал, что чувствительность определения модуля Юнга для прогнозирования увеличения жесткости мембраны нейтрофилов составляла 85%, а специфичность 75%.

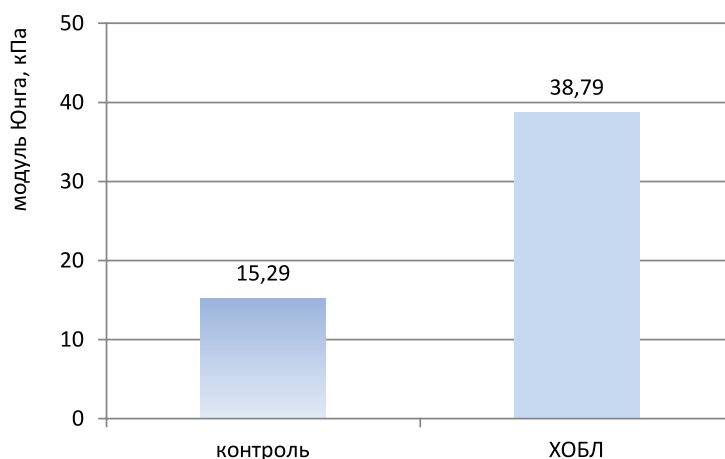


Рис. 1. Модуль Юнга (кПа) нейтрофилов доноров контрольной группы и больных ХОБЛ

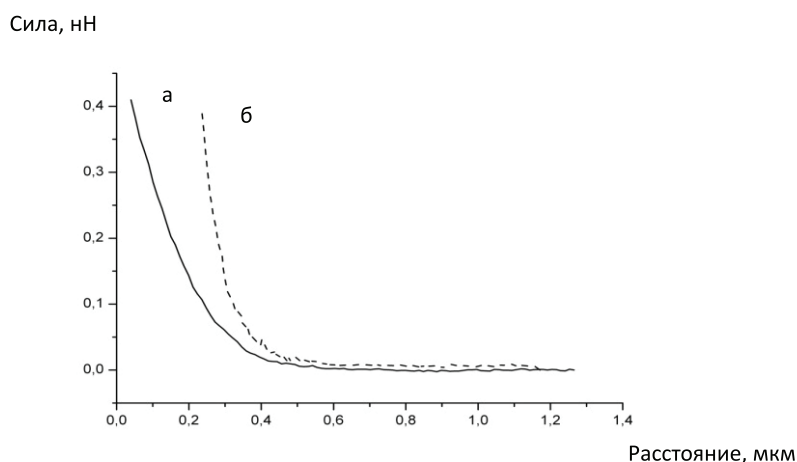


Рис. 2. Силовые кривые подвода зонда для нейтрофилов контрольной группы (a) и больных ХОБЛ (b)

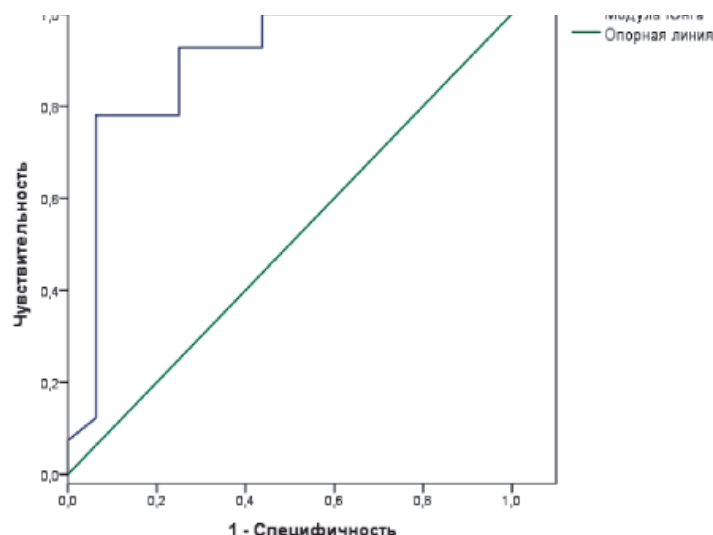


Рис. 3. ROC-кривая модуля Юнга при прогнозировании повышения жесткости мембран нейтрофилов у больных ХОБЛ

То есть диагностическая значимость положительного результата – 85% означала, что в 85% значение модуля Юнга у больных ХОБЛ превышало 42,9 нН.

#### Заключение

Таким образом, использование АСМ позволило установить изменения микромеханических свойств клеточной поверхности нейтрофилов у больных ХОБЛ. Выявленные особенности нейтрофилов могут дополнить существующие представления о системном воспалении при ХОБЛ, а также могут быть использованы в качестве индикатора степени выраженности воспаления у этой категории больных.

#### Список литературы

1. Авдеев С.Н. Ингибиторы фосфодиэстеразы-4: новые перспективы противовоспалительной терапии ХОБЛ // Фарматека. – 2013. – № 4. – С. 101–111.
2. Дрозд Е. Новый метод в биомедицинских исследованиях // Наука и инновации. – 2009. – № 10. – С. 80.
3. Подосинников И.В., Нилова Л.Г. Бабичев И.В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов // Лаб. дело. – 1981. – № 8. – С. 68–70.
4. Bucala R., Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging // Adv. Pharm. – 1992. – Vol. 23. – P. 1–34.
5. 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.
6. Castellani R.J., Harris P.R., Sayere Castellani L.M. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N (epsilon) – (carboxymethyl) lysine and hexitol – lysine // Free Rad. Biol. Med. – 2001. – Vol. 31. – P. 175–180.
7. Emiel F.M. Wouters Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Proc. Am. Thorac. – 2005. – Vol. 2. – P. 26–33.
8. Goldmann W.H., Galneder R., Ludwig Goldmann M. Differences in elasticity of vinculin-deficient F9 cells measured by magnetometry and atomic force microscopy // Exp. Cell Res. – 1998. – Vol. 239. – P. 235–242.
9. Navajas D. Nanomechanics of living cells / Book of Abstracts IV Spanish Portuguese Biophysical Congress. – Spain, 2010. – P. 33.
10. Noguera A., Batle S., Miralles C. et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease // Thorax. – 2001. – Vol. 56. – № 6. – P. 432–437.
11. Roca-Cusachs P. с колл Roca-Cusachs P., Almen-dros I., Sunyer Raimon Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy // Biophys. J. – 2006. – Vol. 91. – P. 3508–3518.

12. Weisenhorn A.L., Khorsandi M., Kasa S., Gotzos V., Butt H. // Nanotechnology. – 1993. – Vol. 4. – P. 106.

#### References

1. Avdeev S.N. Ingibitoriyi fosfodiesterazyi -4: novyye perspektivy protivovospalitel'noy terapii HOBL // Farmateka, 2013, no 4, pp. 101–111.
2. Drozd E. Novyyiy metod v biomeditsinskih issledovaniyah // Nauka i innovatsii, 2009, no. 10, pp. 80.
3. Podosinnikov I.V., Nilova L.G. Babichev I.V. Metod opredeleniya hemotaksicheskoy aktivnosti leykotsitov // Lab. delo, 1981, no.8, pp. 68–70.
4. Bucala R., Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging // Adv. Pharm., 1992, Vol. 23, pp. 1–34.
5. 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, pp. 31–38.
6. Emiel F.M. Wouters Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Proc. Am. Thorac, 2005, Vol. 2, pp. 26–33.
7. Castellani R.J., Harris P.R., Sayere Castellani L.M. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N (epsilon) – (carboxymethyl) lysine and hexitol – lysine // Free Rad. Biol. Med., 2001, Vol. 31, pp. 175–180.
8. Goldmann W.H., Galneder R., Ludwig Goldmann M. Differences in elasticity of vinculin-deficient F9 cells measured by magnetometry and atomic force microscopy // Exp. Cell Res., 1998, Vol. 239, pp. 235–242.
9. Navajas D. Nanomechanics of living cells / Book of Abstracts IV Spanish Portuguese Biophysical Congress. Spain, 2010, p. 33.
10. Noguera A., Batle S., Miralles C. et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease // Thorax, 2001, Vol. 56, no. 6, pp. 432–437.
11. Roca-Cusachs P. с колл Roca-Cusachs P., Almen-dros I., Sunyer Raimon Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy // Biophys. J., 2006, Vol. 91, pp. 3508–3518.
12. Weisenhorn A.L., Khorsandi M., Kasa S., Gotzos V., Butt H. // Nanotechnology, 1993, Vol. 4, pp. 106.

#### Рецензенты:

Шамратова В.Г., д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и зоологии, ГБОУ ВПО «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.

Работа поступила в редакцию 19.03.2015.