



Гайнитдинова В.В. ¹, Шарафутдинова Л.А. ², Камалтдинов И.М. ², Авдеев С.Н. ³

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ НЕЙТРОФИЛОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ С ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

²ГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»,

Центр микро- и наномасштабной динамики дисперсных систем,

³ФГУ НИИ пульмонологии ФМБА России

Gaynitdinova V.V. ¹, Sharafutdinova L.A. ², Kamaltdinov I.M. ², Avdeev S.N. ³

ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE WITH PULMONARY HYPERTENSION

¹Institute of additional professional education of Bashkir State Medical University,

²The Center of micro- and nanoscale dynamics of disperse systems Bashkir State University,

³Federal Institution "Institute of Pulmonology" Federal Medical and Biological Agency of Russia

РЕЗЮМЕ

Методом атомно-силовой микроскопии проведен анализ морфофункционального состояния (морфометрия, сила адгезии и жесткость мембраны) нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких в зависимости от наличия легочной гипертензии. В режиме силовой спектроскопии выполнена количественная оценка модуля упругости (модуля Юнга) клеточной мембраны и силы адгезии нейтрофилов. Проведенное исследование показало, что у больных хронической обструктивной болезнью легких с легочной гипертензией наблюдается активация нейтрофилов (уменьшение размеров клетки, клеточного ядра, увеличение количества и высоты гранул в цитоплазме), значимое повышение жесткости мембраны (увеличение значения модуля Юнга) и силы адгезии нейтрофилов по сравнению с контролем и больными ХОБЛ без легочной гипертензии.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, легочная гипертензия, атомно-силовая микроскопия, нейтрофилы, морфометрия, жесткость мембраны, сила адгезии.

SUMMARY

Using atomic force microscopy performed morphofunctional state analysis (morphometry, adhesion strength and stiffness of the membrane) of neutrophils in patients with chronic obstructive pulmonary disease, depending on the presence of pulmonary hypertension. In mode power spectroscopy performed quantification of elastic modulus (Young's modulus) and strength of a cell membrane adhesion of neutrophils. The study showed that in patients with chronic obstructive pulmonary disease with pulmonary hypertension observed neutrophil activation (reduction in cell size, cell nucleus, increasing the number and height of the granules in the cytoplasm), a significant increase in the stiffness of the membrane (increase in the Young modulus) and strength of adhesion of neutrophils compared with the control and COPD patients without pulmonary hypertension

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary hypertension, atomic force microscopy, neutrophils, morphometry, the stiffness of the membrane, the adhesive force.

Сведения об авторах:

Шарафутдинова
Люция Ахтямовна

к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и зоологии биологического факультета БашГУ, 450076, Россия, Уфа, ул. 3. Валиди, 32, +7 (347) 229-96-71, e-mail: sharafila@yandex.ru;
Ph.D, Assistant Professor of the Department of Human Physiology and Zoology, Faculty of Biology Bashkir State University, 450076, Russia, Ufa, Z. Validi st., 32

Камалтдинов Ильнур Маккиевич	к.т.н., лаборант-исследователь Центра микро- и наномасштабной динамики дисперсных систем БашГУ, 450076, Россия, Уфа, ул. З. Валиди, 32, +7 (347) 229-97-26, e-mail: kamil@fizfaka.net; Ph.D., Assistant Researcher of the Center of micro- and nanoscale dynamics of disperse systems Bashkir State University, 450076, Russia, Ufa, Z. Validi st., 32
Авдеев Сергей Николаевич	д.м.н., профессор, руководитель клинического отдела ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, 105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, к. 4, +7(495)465-52-64, e-mail: serg_avdeev@list.ru; MD, Professor, Head of the Clinical Department of Federal Institution "Institute of Pulmonology" Federal Medical and Biological Agency of Russia, 105077, Moscow, 11th Park st., 32
Автор, ответственный за контакты с редакцией: Гайнитдинова Вилия Вилевна	к.м.н., доцент кафедры терапии и клинической фармакологии ИПО БашГМУ, 450000, Россия, Уфа, ул. Ленина, 3, +7(347)272-23-85, ivv_08@mail.ru; Ph.D, Assistant Professor of Department of therapy and clinical pharmacology of Institute of additional professional education of Bashkir State Medical University, 450000, Russia, Ufa, Lenin st., 3

Воспаление дыхательных путей является основным компонентом в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [1,2]. Согласно результатам многочисленных исследований у больных ХОБЛ имеют место изменения структуры и активация одних из основных эффекторных клеток воспаления – нейтрофилов периферической крови [3]. Нейтрофилы у больных ХОБЛ секретируют сериновые протеазы, обладают повышенной хемотаксической реакцией, вырабатывают активные формы кислорода [4] и экспрессируют поверхностные клеточные адгезивные молекулы [5]. Наряду с этим, у больных ХОБЛ усиливается высвобождение нейтрофилов из костного мозга, увеличивается их миграция в условиях потока, происходит нарушение их функции и способности к деформации по сравнению с аналогичными процессами у лиц без ХОБЛ. Данные изменения приводят к секвестрации нейтрофилов в микроциркуляторном русле легких [3].

Наличие легочной гипертензии (ЛГ) резко ухудшает прогноз у больных ХОБЛ. Патогенез легочной гипертензии при ХОБЛ является сложным и многогранным. Ведущую роль в развитии легочной гипертензии у больных ХОБЛ играет артериальная гипоксемия. Однако другие механизмы, вероятно, также участвуют в патогенезе усиления легочного сосудистого сопротивления в этой когорте, включая динамическую легочную гиперинфляцию, паренхиматозную деструкцию легких, легочно-сосудистое ремоделирование, эндотелиальную дисфункцию и воспаление [6,7]. Несмотря на многочисленные исследования, проведенные в последние десятилетия, в развитии ЛГ, ассоциированной с ХОБЛ, существует на удивление мало данных о причинно-следственной связи между многими из этих факторов [8].

Исследование структурных и вязкоупругих особенностей нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией поможет лучше понять роль воспаления в развитии ЛГ у этой категории больных. Одним из современных методов клеточной биологии, который дает возможность при высоком разрешении молекулярной визуализации клеточных мембран изучить наномеханические свойства мембран, определяющие течение физиологических и патологических процессов в клетке, является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [9,10].

В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение особенностей ультраструктуры и вязкоупругих свойств нейтрофилов (морфологии, жесткости мембраны,

силы адгезии) периферической крови у больных ХОБЛ с легочной гипертензией с помощью атомно-силовой микроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено сравнительное исследование по изучению структурно-реологических свойств нейтрофилов периферической крови у 38 больных с тяжелой степенью ХОБЛ методом атомно-силовой микроскопии. В зависимости от наличия легочной гипертензии пациенты разделены на две группы: 1-я группа (n=18) – без признаков легочной гипертензии, 2-я группа (n=20) – с легочной гипертензией. Критерием легочной гипертензии с учетом параметров доплер-эхокардиографии было увеличение СДЛА > 40 мм рт. ст. в покое (ESC, ERS 2015 г.). Средний возраст больных в исследуемых группах составил 53,3±5,2 и 52,3±4,6 лет, соответственно. Средняя продолжительность заболевания составила 8,90±3,9 лет и 9,70±3,4 лет, частота обострений в течение года – 2,5±0,12 и 3,05±0,14, соответственно. Индекс курения и индекс массы тела (ИМТ) в среднем составляли 26,2±2,74 пачка-лет и 23,9±4,04 кг/м² в группе больных ХОБЛ без ЛГ, в группе с ЛГ – 26,5±2,20 пачка-лет и 24,1±5,03 кг/м², соответственно. Выраженность одышки по шкалам mMRC и CAT составляла 2,9±0,42 баллов и 25,9±4,53 баллов в группе больных без ЛГ; 3,8±0,34 баллов и 31,5±3,75 – в группе больных ХОБЛ с легочной гипертензией. Уровень СДЛА в исследуемых группах в среднем составил 27,7±4,19 мм рт. ст. и 44,2±5,69 мм рт. ст., соответственно (табл. 1). В контрольную группу вошли 15 практически здоровых некурящих лиц без патологии органов дыхания в возрасте 40-55 лет.

Критериями исключения из исследования были острые формы и обострения хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, бронхоэктатическая болезнь, 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 (SaO₂) определялось с помощью напалечного пульсоксиметра MD300C. Спирометрия (ОФВ1, ФЖЕЛ, отношение ОФВ1/ФЖЕЛ) проводилась на оборудовании Master Screen Body (Erich Jaeger, Германия). Эхокардио-

графическое исследование сердца проводилось на аппарате «Philips En Visor CHD» (Голландия), изучались стандартные параметры гемодинамики, СДЛА определяли с помощью непрерывно-волновой доплерографии.

Специальные методы: для исследования нейтрофилов с помощью атомно-силовой микроскопии забор крови проводился в 1-е сутки поступления пациентов в стационар до назначения антибактериальной терапии, системных глюкокортикостероидов (СГКС). Нейтрофилы выделяли по методике Подосинникова И.В. и соавт. (1981 г.). Для измерения морфологических параметров нейтрофильные гранулоциты фиксировали на твердой подложке с использованием фиксирующего агента глutarового альдегида (1,5%). АСМ-исследования фиксированных клеток проводили по методике Плесковой С.Н. с соавт. (2005 г.). Сканирование поверхности фиксированных препаратов проводилось в полуконтактном режиме на воздухе. Измерялись следующие морфометрические показатели: высота клетки (нм), максимальная высота гранул цитоплазмы (нм), диаметр клетки (нм), площадь ядра (нм²), площадь клетки (нм²).

Для оценки структурных неоднородностей клеточной поверхности строились кривые профиля бокового сечения, на которых подсчитывали количество сегментов ядра и высоту гранул цитоплазмы (рис.1).

Для оценки функциональных свойств мембраны нативных нейтрофилов использовался режим силовой спектроскопии. Жесткость мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывался согласно теории Герца [Bukharaev A.A., 2003 г.]. Исследования поверхности клеток проводились в жидкостной ячейке на атомно-силовом аппарате «Agilent 5500» с использованием кремниевых зондов PPP-CONTPt (Nanosensors) с жесткостью 43 Н/м и резонансной частотой 185 кГц. В серии экспериментов сравнивали показатели жесткости мембраны нейтрофилов, полученных из крови здоровых доноров и больных ХОБЛ. Для этого проводили обзорное сканирование поля размером 60х60 мкм и выбирали несколько клеток для измерения. Для визуализации сканируемых объектов использовали программу PicoView 1.10, при дальнейшей обработке данных – программное обеспечение PicoImage Basic 5.1.

Сила адгезии нейтрофилов определялась в режиме атомно-силовой спектроскопии. Использовали коллоидные V-образные зонды CP-PNPL-SiO-C с круглым наконечником (диаметр 6,62 мкм) [14].

Статистическая обработка данных производилась с ис-

пользованием пакета прикладных программ Statistica V.7.0 (Statsoft Inc, США). Для всех имеющихся выборок проводился анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае если распределение признаков в группах соответствовало нормальному закону распределения, для сравнения групповых средних использовался параметрический t-критерий Стьюдента. В противном случае сравнительный анализ групп проводился с помощью непараметрических методов. Для сравнения 3 групп использовался ранговый анализ вариаций по Краскеллу–Уоллису. В случае, если нулевая гипотеза об отсутствии различий отклонялась, проводилось парное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна–Уитни. Количественные данные представлены в виде Mean (M)±SD и в абсолютных числах с указанием процентов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Зависимость количественных показателей оценивалась с помощью корреляционного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спирометрические показатели у исследуемых больных соответствовали III (тяжелой) степени по спирометрической классификации ХОБЛ (GOLD 2013 г.), однако в группе больных с легочной гипертензией ФЖЕЛ и ОФВ1 статистически значимо были ниже, чем у больных без ЛГ ($p=0,001$, $p=0,001$).

В периферической крови у пациентов обеих групп был выявлен умеренный нейтрофильный лейкоцитоз до $9,2 \pm 0,14 \times 10^9/\text{л}$ и $10,8 \pm 1,44 \times 10^9/\text{л}$. Более значимое увеличение количества циркулирующих нейтрофилов отмечалось в группе больных ХОБЛ с легочной гипертензией: по сравнению с группой больных ХОБЛ без легочной гипертензии на 30,9% ($p=0,05$); по сравнению с контрольной группой на 54,6% ($p=0,001$). Количество тромбоцитов находилось в пределах нормы в обеих группах. У больных с ЛГ их уровень был статистически значимо выше, чем у больных без легочной гипертензии ($p=0,04$).

Определение концентрации СРБ и фибриногена показало их увеличение в обеих группах больных ХОБЛ. У пациентов без ЛГ содержание СРБ и фибриногена в среднем составило $14,7 \pm 2,80$ мг/л и $4,8 \pm 0,47$ г/л, у пациентов ХОБЛ с ЛГ – $24,5 \pm 2,16$ мг/л и $5,4 \pm 1,03$ г/л ($p=0,001$, $p=0,05$).

Рис. 1. Кривая бокового профиля нейтрофила, фиксированного на подложке, полученная с помощью программного обеспечения PicoImage Basic 5.1 (а – высота ядра, б – высота гранул цитоплазмы)

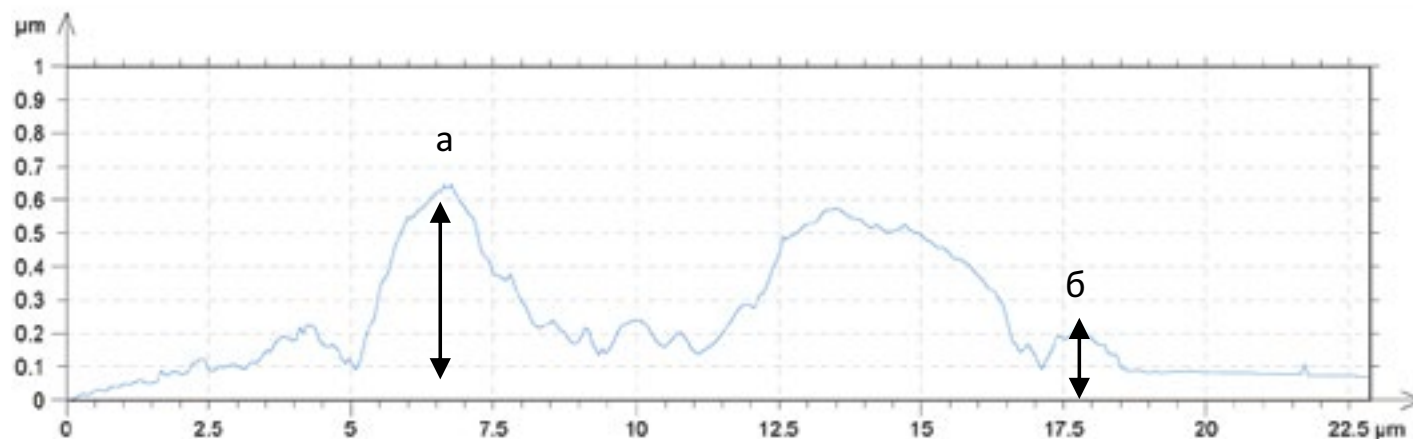


Таблица 1. Клиническая характеристика больных ХОБЛ

Показатель	ХОБЛ (n=18)	ХОБЛ+ЛГ (n=20)	p
Возраст, лет	53,3±5,2	52,3±4,6	0,11
Длительность ХОБЛ, лет	8,9±3,9	9,7±3,4	0,83
Частота обострений/год	2,5±0,12	3,05±0,14	0,05
ИК, пачек/лет	26,2±2,74	27,5 ±2,20	0,04
ИМТ, кг/м ²	23,9±4,04	24,1±5,03	0,01
mMRC, баллы	2,9±0,42	3,8±0,34	0,05
САТ, баллы	25,9±4,53	31,5±3,75	0,002
ФЖЕЛ, %	74,4±11,07	54,9±10,45	0,001
ОФВ ₁ , %	49,9±7,72	37,9±8,01	0,001
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ	47,1±7,59	55,1±10,17	0,09
SpO ₂ , %	94,1±3,44	91,5±4,31	0,05
СДЛА, мм рт.ст.	27,7±4,19	44,2±5,69	0,003
Лейкоциты, х 10 ⁹ /л	9,2±1,40	10,8±1,44	0,05
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	241,1±15,98	301,3±19,72	0,05
СРБ, мг/л	14,7±2,80	24,5±2,16	0,01
Фибриноген, г/л	4,8±0,47	5,4±1,03	0,04

Морфологические особенности нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией

Сканирование нейтрофилов с использованием АСМ позволило получить изображения отдельно лежащих нейтрофи-

лов. В режиме 3D были получены трехмерные изображения нейтрофилов, на которых отчетливо выявлялись контуры ядра и многочисленные гранулы, находящиеся в цитоплазме (рис. 2).

Рисунок 2. Скан поверхности (а) и фото (б) сегментоядерного нейтрофила (контроль), фиксированного на стеклянной подложке, полученного методом АСМ, в - 3D-изображение

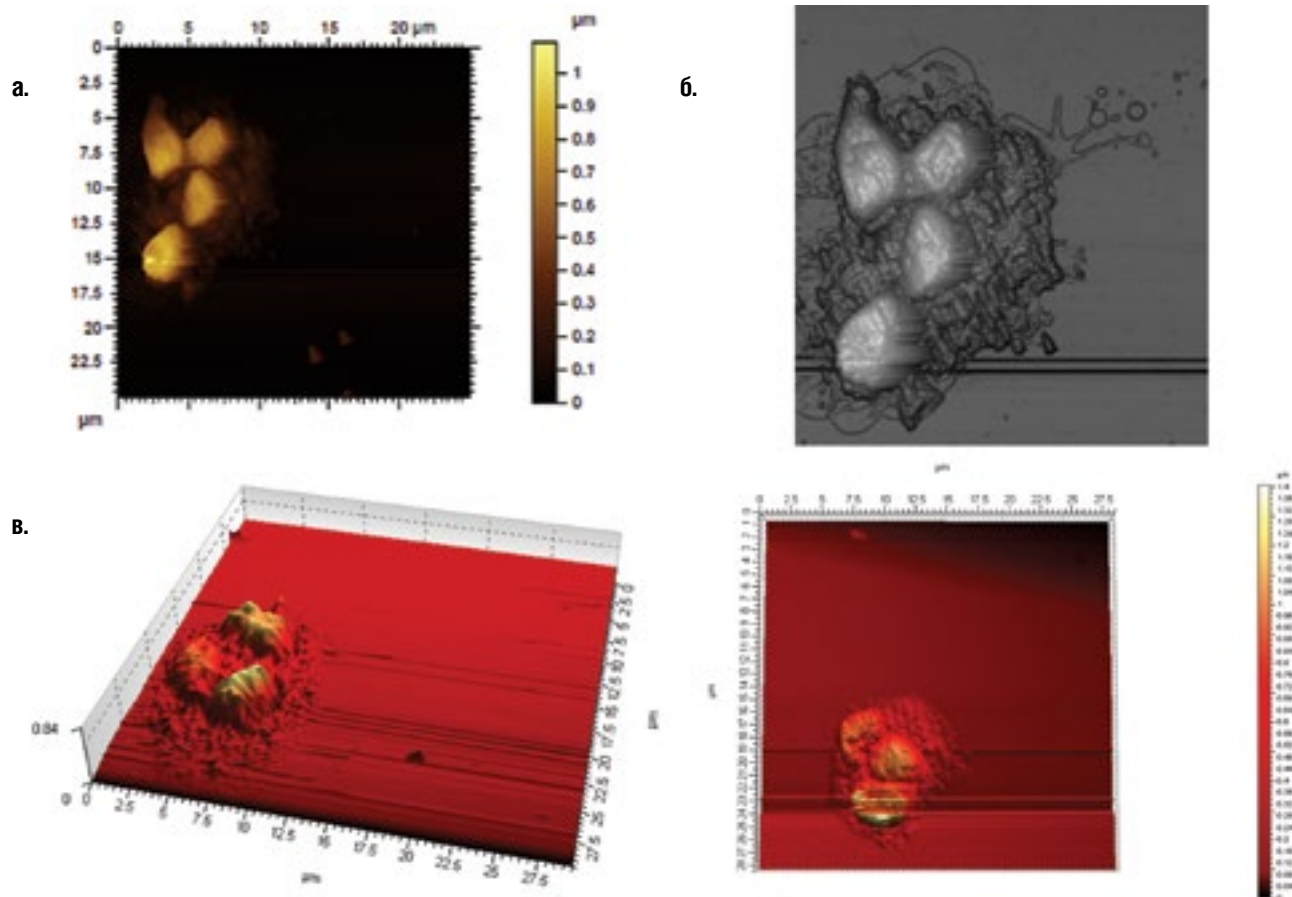
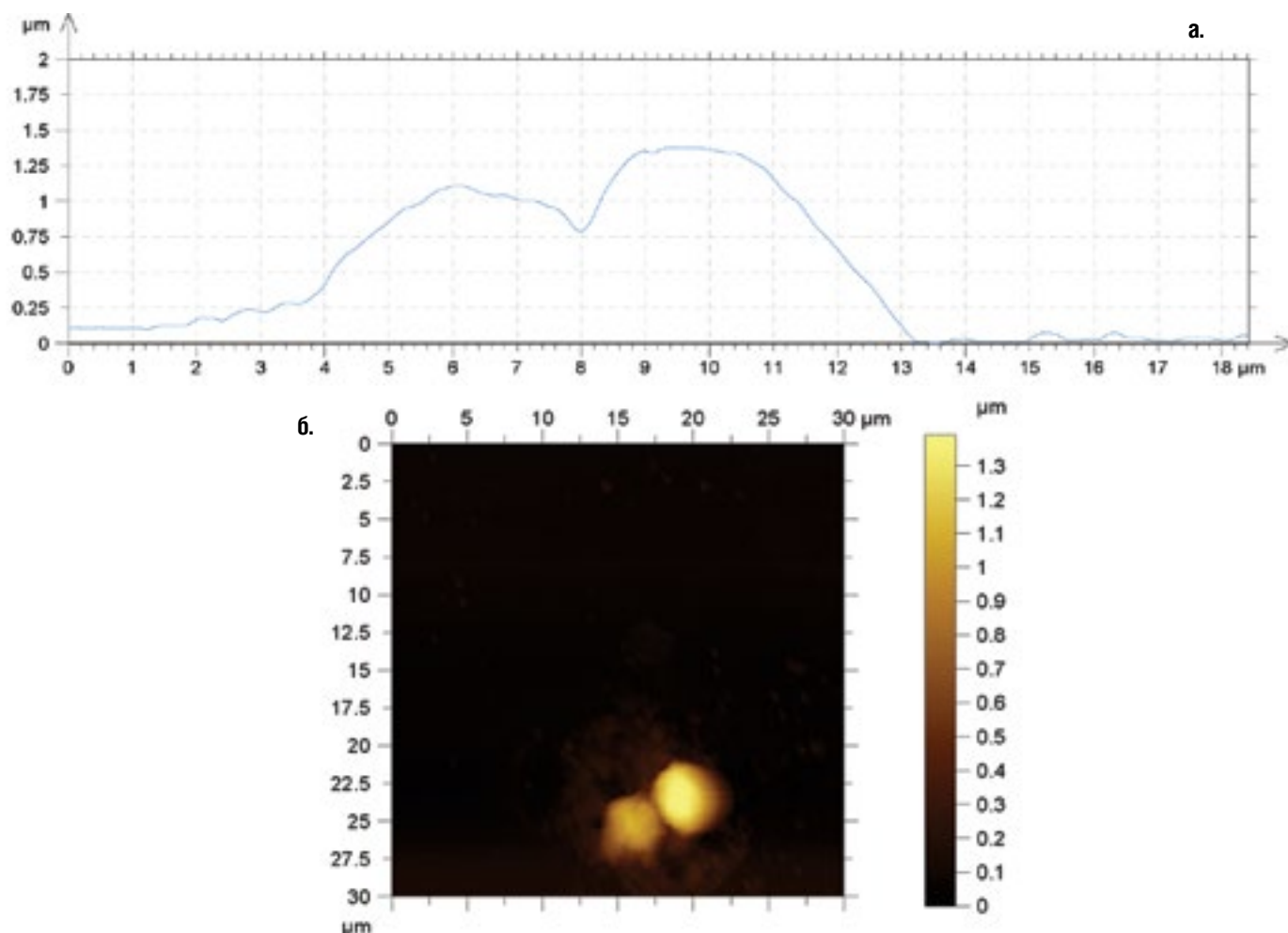


Рисунок 3. Профиль (а) и скан (б) сегментоядерного нейтрофила больного ХОБЛ (а), фиксированного на стеклянной подложке, полученного методом АСМ



В крови больных ХОБЛ как с легочной гипертензией, так и без нее на площади сканирования выявлено больше нейтрофилов, отличающихся от нейтрофилов лиц контрольной группы меньшим количеством сегментов ядра (рис. 3).

Другой характерной особенностью нейтрофилов пациентов с ХОБЛ является большая фазовая высота клетки (табл. 2). В группе больных ХОБЛ независимо от наличия легочной гипертензии фазовая высота клетки была в среднем в 1,3 раза выше контроля ($p_{1-3}=0,009$, $p_{2-3}=0,01$): у пациентов без легочной гипертензии высота клетки достигала $1,16 \pm 0,23$ нм, у пациентов с ХОБЛ и легочной гипертензией – $1,18 \pm 0,21$ нм.

Изучение топографических особенностей нейтрофилов на 3D изображениях показало, что в группе ХОБЛ с легочной гипертензией значение максимальной высоты гранул в цитоплазме нейтрофилов было статистически значимо ($p_{2-3}=0,02$) больше, чем у больных ХОБЛ без легочной гипертензии и составило в среднем $1,41 \pm 0,19$ нм, тогда как у больных ХОБЛ без ЛГ данный показатель в среднем составлял $1,34 \pm 0,19$ нм.

Показатели площади ядра, площади клетки сегментоядерных нейтрофилов группы больных ХОБЛ с легочной гипертензией были статистически значимо меньше относительно группы больных ХОБЛ без легочной гипертензии ($p_{2-3}=0,05$, $p_{2-3}=0,04$) и составили в среднем $30,38 \pm 10,43$ и $112,77 \pm 13,64$ нм², соответственно (табл. 2).

Известно, что проявлением высокой реактивности лейкоцитов является изменение топографии поверхности и общей

морфологии клеток. Повышенная активность нейтрофилов при сканировании с помощью АСМ выявляется в виде увеличения количества и высоты гранул, которые группируются в различных участках цитоплазмы.

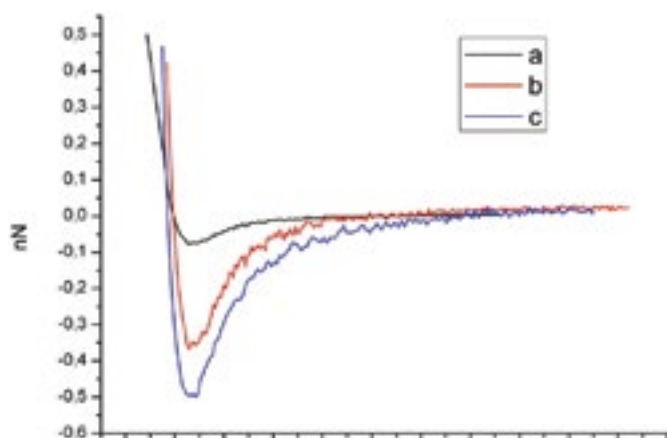
С целью получения более полной информации о вязко-упругих особенностях клеточной мембраны нейтрофилов больных ХОБЛ была проведена количественная оценка модуля Юнга нативных (живых, нефиксированных) нейтрофилов. Анализ результатов атомно-силовой спектроскопии упругих деформаций нейтрофилов позволил выявить, что клеточная мембрана нейтрофилов больных ХОБЛ с легочной гипертензией по сравнению с группой больных ХОБЛ характеризуется более высокими значениями модуля Юнга (табл. 2). При ХОБЛ с легочной гипертензией жесткость мембраны нейтрофилов составила в среднем $52,75 \pm 2,15$ кПа, что в 3,4 раза выше, чем у лиц контрольной группы ($15,29 \pm 0,22$ кПа, $p_{1-3}=0,001$) и в 1,35 раза выше, чем у больных ХОБЛ без ЛГ ($38,79 \pm 1,43$ кПа, $p_{2-3}=0,001$).

Силу адгезии нейтрофилов определяли по силовым кривым отвода зонда от поверхности субстрата (клетки). На рисунке 4 представлены силовые кривые, полученные при удалении зонда от поверхности нейтрофилов доноров контрольной группы (а), больных ХОБЛ без легочной гипертензии (б) и с легочной гипертензией (в).

Таблица 2. Морфометрические показатели нейтрофилов у больных ХОБЛ

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ХОБЛ		p	
		СДЛА<40 мм рт. ст. (n=18)	СДЛА>40 мм рт. ст. (n=20)	1-3	2-3
	1	2	3		
Высота клетки, нм	0,91±0,22	1,16±0,23	1,18±0,21	0,009	0,01
Максимальная высота гранул, нм	1,01±0,02	1,34±0,19	1,41±0,19	0,01	0,02
Площадь ядра, нм ²	39,16±7,47	31,82±12,52	30,38±10,43	0,01	0,05
Площадь клетки, нм ²	124,78±23,26	121,48±20,83	112,77±13,64	0,02	0,04
Модуль Юнга, кПа	15,29±0,22	38,79±1,43	52,75±2,15	0,001	0,001
Сила адгезии, nN	0,076±0,0009	0,36±0,022	0,48±0,04	0,001	0,01

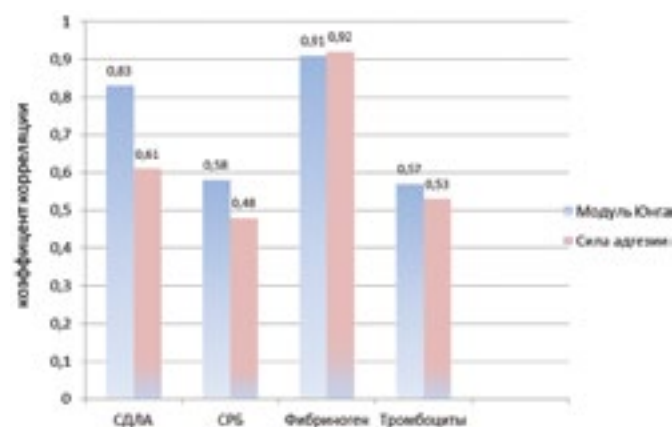
Рисунок 4. Силловые кривые отвода зонда от поверхности нейтрофилов контрольной группы (а), больных ХОБЛ (b) и больных ХОБЛ с легочной гипертензией (с)



Как видно из представленных графиков, характерной особенностью кривых, зарегистрированных при отводе зонда от поверхности нейтрофилов больных ХОБЛ в отличие от кривых контрольной группы, является наличие пика – зуба (b, c). По максимальному значению пика вычисляли силу адгезии, которую нужно приложить, чтобы вывести из контакта поверхности зонда и субстрата (клетки). Установлено, что максимальная величина адгезионного взаимодействия была зарегистрирована у нейтрофилов, выделенных из периферической крови больных ХОБЛ с легочной гипертензией ($0,48 \pm 0,04$ nN). Сила адгезии для нейтрофилов в группе больных ХОБЛ была равна $0,36 \pm 0,022$ nN ($p_{2-3}=0,01$), у лиц контрольной группы – $0,076 \pm 0,0009$ nN ($p_{1-3}=0,001$), тогда как у больных ХОБЛ с легочной гипертензией сила адгезии клеточной мембраны нейтрофилов оказалась выше контроля в 6,3 раза и группы больных ХОБЛ без легочной гипертензии – в 1,3 раза.

При изучении корреляционных взаимоотношений выявлена тесная связь между модулем Юнга нейтрофилов и уровнем СДЛА ($r=0,83$, $p=0,05$), содержанием СРБ ($r=0,59$, $p=0,01$), фибриногена ($r=0,91$, $p=0,03$), количеством тромбоцитов ($r=0,57$, $p=0,04$); силой адгезии нейтрофилов и уровнем СДЛА ($r=0,61$, $p=0,01$), содержанием СРБ ($r=0,48$, $p=0,01$), фибриногена ($r=0,92$, $p=0,02$), количеством тромбоцитов ($r=0,53$, $p=0,05$). Наглядно характер взаимоотношений биомаркеров системного воспаления и функциональных свойств нейтрофилов представлен на следующей диаграмме (рис. 5).

Рисунок 5. Корреляционные взаимосвязи модуля Юнга и силы адгезии нейтрофилов с биомаркерами системного воспаления и СДЛА у больных ХОБЛ



ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе методом атомно-силовой микроскопии были изучены структурные и вязкоупругие характеристики нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией.

Нейтрофилы играют одну из ведущих ролей в воспалении при ХОБЛ, результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют об их активации и увеличении их цитотоксических эффектов. В формирование воспаления при ХОБЛ также вносят свой вклад макрофаги, Т-лимфоциты, эозинофилы и эпителиальные клетки, усиливающих нейтрофильное воспаление [15].

Изучение морфологии нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией выявило статистически значимое увеличение фазовой высоты клетки, уменьшение площади клетки, ядра, увеличение количества и высоты гранул по сравнению с аналогичными показателями нейтрофилов у больных ХОБЛ без ЛГ. Обращал на себя внимание более шероховатый рельеф поверхности нейтрофилов. Известно, что фазовая высота клетки и цитоплазматическая гранулированность (зернистость) являются критериями функциональной активности нейтрофилов [16]. Уменьшение размеров нейтрофилов при воспалении можно объяснить тем, что нейтрофилы больших размеров первыми уходят в ткани (очаги воспаления), а в крови остаются клетки меньших размеров. Уменьшение размеров нейтрофилов также связывают с компенсаторной реакцией организма на резкое увеличение количества лейко-

цитов, направленной на сохранение реологических свойств крови, предупреждение повышения вязкости крови, сохранение нормальной скорости кровотока в капиллярном русле. Проведенные исследования доказывают, что даже умеренный лейкоцитоз понижает среднюю скорость кровотока в капиллярном русле, изменяет реологические свойства крови и условия ее течения по микрососудам [16]. При сравнении других морфометрических показателей выявлено уменьшение площади ядра, тела клетки в группе больных ХОБЛ. Наиболее существенные сдвиги морфометрических показателей нейтрофилов по сравнению с группой здоровых лиц наблюдались у больных ХОБЛ с легочной гипертензией. Существует мнение, что уменьшение размеров нейтрофилов при воспалении можно объяснить тем, что нейтрофилы больших размеров первыми уходят в ткани (очаги воспаления), а в крови остаются клетки меньших размеров [17].

Основные перестройки цитоскелета нейтрофилов, которые имеют место во время активации, оказывают важное воздействие на вязкоэластичность нейтрофилов. В своем исследовании Roca-Cusachs P. с коллегами (2006 г.) в эксперименте показал, что активация нейтрофилов повышает жесткость мембраны этих клеток до 7 раз. 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 может способствовать адгезии нейтрофилов к эндотелию сосудов и последующему его повреждению. Миграция и адгезия нейтрофилов к эндотелию сосудов опосредована реологией нейтрофилов [10,11].

В работе Navajas D. (2010 г.) с помощью АСМ сравнивались наномеханические (вязкоупругие) свойства нейтрофилов у больных ХОБЛ с выраженной гипоксемией до и после двусторонней пересадки легких и у здоровых некурящих лиц. Результаты исследования показали, что жесткость мембраны нейтрофилов у пациентов ХОБЛ исходно была значительно выше, чем в контрольной группе. После трансплантации легких изучаемый показатель, без существенных различий с группой здоровых некурящих лиц, уменьшился [18].

В нашем исследовании результаты атомно-силовой спектроскопии показали, что увеличение жесткости мембран нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией было значимо выше, чем у больных ХОБЛ без ЛГ. Этот факт свидетельствует о значимом снижении эластичности и вязкости клеточной мембраны и повышении жесткости мембраны нейтрофилов больных ХОБЛ с ЛГ.

Существует мнение, что увеличение жесткости мембраны нейтрофилов у больных ХОБЛ, может быть связано с патологическим воспалительным ответом легких. Уменьшение модуля Юнга (жесткости мембраны) нейтрофилов после пересадки легких может свидетельствовать об уменьшении легочного воспаления и системных ответов [18].

Повышение адгезивности имеет большое значение в патогенезе дисфункции эндотелия при воспалении, атеросклерозе, септическом шоке и других патологических процессах. Процесс адгезии нейтрофилов к эндотелию и последующая их миграция в поврежденную ткань из легочных микрокапилляров не зависит от вращения (скольжения вдоль эндотелия),

но на этот процесс (адгезии) влияет способность нейтрофила к деформации [19]. Нейтрофилы, попадая в микрокапилляры, замедляют свое движение, деформируются, и в связи с этим, становится возможным их устойчивое прилипание к эндотелию и его повреждение [11].

В данной работе методом прямых измерений с использованием АСМ определены адгезионные силы между поверхностью зонда и поверхностью нейтрофила. Установлено, что сила адгезии нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией значительно превышает эти показатели нейтрофилов у лиц контрольной группы и больных ХОБЛ без легочной гипертензии.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что характерные для воспалительного процесса изменения структурных и реологических (наномеханических) свойств нейтрофилов (уменьшение площади ядра и клетки, увеличение ее фазовой высоты, увеличение количества гранул цитоплазмы, повышение силы адгезии и жесткости мембраны) более выражены у больных ХОБЛ с легочной гипертензией. Изменения ультраструктуры и вязкоупругих свойств клеточной поверхности нейтрофилов больных ХОБЛ с легочной гипертензией могут быть использованы в качестве индикатора степени выраженности воспаления.

Исследование поддержано грантом
Министерства Образования РФ 11.G.34.31.0040

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc. (revised 2013).*
2. *Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких / Российское Респираторное Общество. – М., 2013. / Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniju hronicheskoy obstruktivnoj bolezni legkih / Rossijskoe Respiratornoe Obshhestvo. – М., 2013.*
3. *Emiel F.M. Wouters Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Proc. Am. Thorac. – 2005. – Vol. 2. – P. 26–33.*
4. *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.*
5. *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.*
6. *Авдеев С.Н. Современные подходы к диагностике и терапии легочной гипертензии у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Пульмонология, 2009;1; 90-101 / Avdeev S.N. Sovremennye podhody k diagnostike i terapii legochnoj gipertenzii u pacientov s hronicheskoy obstruktivnoj bolezni'u legkih. Pul'monologija, 2009;1; 90-101*
7. *Peinado VI, Barbera JA, Abate P, et al. Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. Am J RespirCrit Care Med 1999; 159:1605–1611*
8. *Wrobel J.P., Thompson B.R., Williams T.J. et al. Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic*

- obstructive pulmonary disease: A pathophysiologic review // *J. Heart Lung Transplant.* – 2012. – Vol. 31, № 6. – P. 557-563.
9. Roca-Cusachs P., Almendros I., Sunyer R. et al. Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 2006; 91: 3508–3518.
10. Lee Yong J, Patel D., Park S. Local Rheology of Human Neutrophils Investigated Using Atomic Force Microscopy. *Int J Biol Sci* 2011; 7(1):102-111.
11. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology and of the European Respiratory Society / J.-L. Vachiery, S. Gibbs, I. Lang [et al.] – www.escardio.org/guidelines 2015.
12. Подосинников И.В., Нилова Л.Г. Бабичев И.В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. *Лаб. дело* 1981; 8: 68 -70. / Podosinnikov I.V., Nilova L.G. Babichev I.V. Metod opredelenija hemotaksicheskoj aktivnosti lejkocitov. *Lab. delo* 1981; 8: 68 -70.
13. Гущина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии. *Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования* 2005; 1: 48-53. / Gushhina Ju.Ju., Pleskova S.N., Zvonkova M.B. Issledovanie razlichij morfologicheskikh parametrov kletok krvi cheloveka metodom skanirujushhej zondovoj mikroskopii. *Poverhnost'. Rentgenovskie, sinhronnye i nejtronnye issledovanija* 2005; 1: 48-53.
14. 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; 31—38.
15. Черняев А.Л., Самсонова М.В. Воспаление при хронической обструктивной болезни легких: молекулярные основы патогенеза *Consilium medicum Ukraina* 2011;1: 9-14 / Chernjaev A.L., Samsonova M.V. Vospalenie pri hronicheskoy obstruktivnoj bolezni legkih: molekulyarnye osnovy patogeneza *Consilium medicum Ukraina* 2011;1: 9-14
16. Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г., Музафарова Д.А. Изменение параметров объема лейкоцитов крови при заболеваниях органов дыхания *Пульмонология* 2000; 3: 38 / Matjushichev V.B., Shamratova V.G., Muzafarova D.A. Izmenenie parametrov ob#ema lejkocitov krvi pri zabolevanijah organov dyhanija *Pul'monologija* 2000; 3: 38
18. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. Клетки крови – современные технологии их анализа. М.: Триада-Фарм; 2002. 4-27. / Kletki krvi – sovremennye tehnologii ih analiza. M.: Triada-Farm; 2002. 4-27.
19. Navajas D. Nanomechanics of living cells. *Book of Abstracts IV Spanish Portuguese Biophysical Congress, Spain* 2010; с 33.
20. Doerschuk, C.M. Mechanisms of leucocyte sequestration in inflamed lungs / C.M. Doerschuk // *Microcirculation.* – 2001. – № 8. – P. 71-88.