

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.24-007.272-036.11-07:616.155.34

Гайнитдинова В.В.¹, Шарафутдинова Л.А.², Камалтдинов И.М.², Авдеев С.Н.³**АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ В ФАЗЕ ОБОСТРЕНИЯ**

ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, 450000, Россия; Центр микро- и наномасштабной динамики дисперсных систем ГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», 450076, Россия; ФГУ НИИ пульмонологии ФМБА России, 105077, г. Москва

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) проведен анализ структурно-функциональных особенностей (морфологии, силы адгезии и жесткости мембраны) нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в фазе обострения. В режиме силовой спектроскопии выполнена количественная оценка модуля упругости (модуль Юнга) клеточной мембраны и силы адгезии нейтрофилов. Установлены уменьшение размера нейтрофилов, увеличение зернистости цитоплазмы, повышение модуля Юнга и силы адгезии у больных ХОБЛ в фазе обострения.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких; обострение; атомно-силовая микроскопия; морфология; жесткость мембраны; сила адгезии нейтрофилов.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(5): 17–22.

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

THE ATOMIC-FORCE MICROSCOPY STUDY OF STRUCTURAL FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASES IN PHASE OF EXACERBATION

¹The Bashkir state medical university of Minzdrav of Russia, 450000 Ufa, Russia; ²The centre of micro- and nano-scaling dynamics of dispersion systems of the Bashkir state medical university of Minzdrav of Russia, 450076 Ufa, Russia; ³The research institute of pulmonology of the Federal medical biological agency of Russia, 105077 Moscow, Russia

The technique of atomic-force microscopy was applied to analyze the structural functional characteristics (morphology, force of adhesion, rigidity of membrane) of neutrophils in patients with chronic obstructive disease of lungs in phase of exacerbation. The regimen of force spectroscopy was applied to implement quantitative evaluation of module of elasticity (Young module) of cell membrane and force of adhesion of neutrophils. The study established decreasing of size of neutrophils, increasing of granularity of cytoplasm, increasing of Young module and force of adhesion in patients with chronic obstructive disease of lungs in phase of exacerbation.

Key words: chronic obstructive disease of lungs; exacerbation; atomic-force microscopy; morphology; rigidity of membrane; force of adhesion; neutrophil

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya diagnostika. 2015; 60(5): 17–22.*

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – заболевание, характеризующееся нарушением вентиляционной функции по обструктивному типу, частично обратимому, которое обычно прогрессирует и связано с повышенным хроническим воспалительным ответом легких на действие патогенных частиц или газов [1]. Важнейшую роль в развитии ХОБЛ играют нейтрофилы. В формировании воспаления также вносят свой вклад макрофаги, Т-лимфоциты, эозинофилы и эпителиальные клетки. Макрофаги скапливаются в местах повреждения межальвеолярных перегородок, участвуют в регуляции воспаления путем секреции медиаторов (фактор некроза опухоли α , интерлейкин-8, ЛТ-В4), усиливающих нейтрофильное воспаление [2]. В многочисленных исследованиях показано не только увеличение количества нейтрофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа,

мокроте, биоптатах бронхов и крови [3–6], но и изменения в их структуре [7, 8].

Учитывая, что воспалительный процесс при ХОБЛ локализован не только в легких, ХОБЛ сегодня рассматривают как системное заболевание [9]. Развитию системного воспалительного ответа у больных ХОБЛ способствует нарушение функционирования циркулирующих нейтрофилов. Для них характерны выделение большого количества активных форм кислорода (АФК), увеличение хемотаксической реакции, повышенная способность переваривать соединительную ткань и повышенная экспрессия поверхностных клеточных адгезивных молекул. Системный оксидативный стресс также может повышать экспрессию молекул адгезии [10]. Нейтрофилы, отвечая на инфекционные и воспалительные сигналы, 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 (жесткость, регидность) и площади контакта нейтрофилов с

Для корреспонденции: Гайнитдинова Вилия Вилевна, ivv_08@mail.ru

For correspondence: Gaynitdinova V.V., ivv-08@mail.ru

эндотелием способствует адгезии клеток и эндотелию сосудов и ведет к его повреждению [11].

Изучение структурно-функциональных особенностей нейтрофилов поможет восполнить имеющиеся данные о жесткости, эластичности и вязкости клеточной мембраны нейтрофилов у больных с тяжелым течением ХОБЛ в фазе обострения.

Одним из перспективных методов изучения структурно-механических свойств клеток крови в настоящее время становится атомно-силовая микроскопия (АСМ), которая позволяет с высоким разрешением оценивать структурные особенности и функциональную активность клеток. Преимуществом АСМ по сравнению с традиционным методом исследования субклеточных структур (просвечивающая электронная микроскопия) являются использование менее трудоемких методик подготовки препаратов и проведение измерений в жидких средах и на живых объектах [11].

В связи с вышесказанным целью работы стало исследование структурно-функциональных особенностей нейтрофилов (морфология, жесткость мембраны, сила адгезии) периферической крови у больных ХОБЛ в фазе обострения с помощью АСМ.

Материалы и методы. Провели местное, открытое, сравнительное исследование по изучению структурно-функциональных свойств нейтрофилов периферической крови у 15 больных с тяжелой ХОБЛ с помощью АСМ, находившихся на стационарном лечении по поводу обострения заболевания (основная группа). Диагноз ХОБЛ устанавливали согласно рекомендациям GOLD (2014). Средний возраст больных $52,3 \pm 1,6$ года. Средняя продолжительность заболевания $9,70 \pm 3,4$ года. Индекс курения (ИК) и индекс массы тела (ИМТ) в среднем составляли $26,17 \pm 3,74$ и $23,89 \pm 4,04$. Частота обострений (по данным медицинской документации за последние 2–3 года) в среднем составила $2,26 \pm 0,8$. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых лиц без патологии органов дыхания в возрасте 45–55 лет. Основная и контрольная группы не различались по возрасту, половой принадлежности. Критериями исключения из исследования стали острые формы других инфекционно-воспалительных, нагноительных заболеваний, лихорадка, злокачественные новообразования, сахарный диабет.

В комплекс обязательного обследования входили общий анализ крови при поступлении, спирометрия (ОФВ₁, ФЖЕЛ, отношение ОФВ₁/ФЖЕЛ на оборудовании Master Screen Body (Erich Jaeger, Германия)), определение выраженности одышки с использованием шкалы САТ (COPD Assessment test), опросника MRC (Medical Research Council). ИК и ИМТ вычисляли по общепринятым формулам. Насыщение крови кислородом (SaO₂) определяли с помощью напалечного пульсоксиметра MD300C.

Специальные методы. Объектом исследования стали нейтрофилы периферической крови пациентов. Забор крови проводили в 1-е сутки поступления пациентов в стационар до начала антибактериальной, противовоспалительной терапии. Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной (20 ед./мл) венозной крови доноров

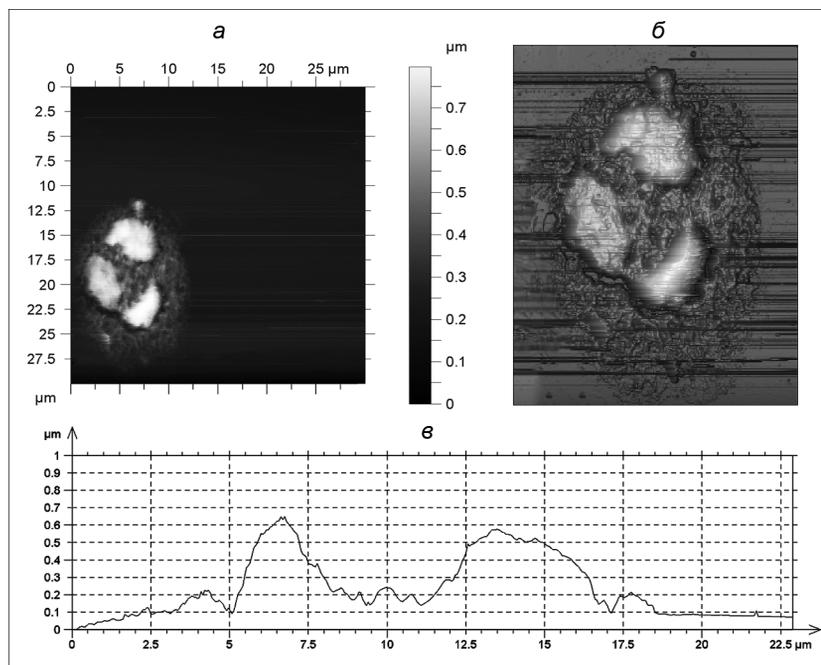


Рис. 1. Результаты сканирования сегментоядерного нейтрофила (контроль). Изображение сегментоядерного нейтрофила (контроль), фиксированного на стеклянной подложке, полученное методом АСМ (а–б); в – профиль клетки.

на двойном градиенте фикоколл-урографина по методике И.В. Подосинникова и соавт. [12]. Клетки дважды отмывали забуференным изотоническим раствором хлорида натрия и взвешивали в растворе Хенкса.

Для измерения морфологических параметров нейтрофильные гранулоциты фиксировали на твердой подложке с использованием фиксирующего агента глутарового альдегида (1,5%). АСМ-исследования фиксированных клеток проводили по методике С.Н. Плесковой и соавт. [13]. Сканирование поверхности фиксированных препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе. Использовали кремниевые зонды PPP-CONTPt (Nanosensors) с жесткостью 43 Н/м и резонансной частотой 185 кГц. Провели измерение следующих морфометрических показателей: высоту клетки (в нм), максимальную высоту гранул цитоплазмы (в нм), диаметр клетки (в нм), площадь ядра (в нм²), площадь клетки (в нм²). Для оценки структурных неоднородностей клеточной поверхности строили кривые профиля бокового сечения, на которых подсчитывали количество сегментов ядра и высоту гранул цитоплазмы. Для оценки функциональных свойств мембраны нативных нейтрофилов использовали метод силовой спектроскопии. Жесткость мембран оценивали по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [14]. Исследования поверхности клеток проводили в жидкостной ячейке на АСМ Agilent 5500 с использованием кремниевых зондов PPP-CONTPt (Nanosensors).

В серии экспериментов сравнивали показатели жесткости мембраны нейтрофилов, полученных из крови здоровых лиц, и больных ХОБЛ. Для этого проводили обзорное сканирование поля размером 60×60 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. Силу адгезии нейтрофилов определяли в режиме атомно-силовой спектроскопии. Использовали коллоидные V-образные зонды CP-PNPL-SiO-C с круглым наконечником (диаметр 6,62

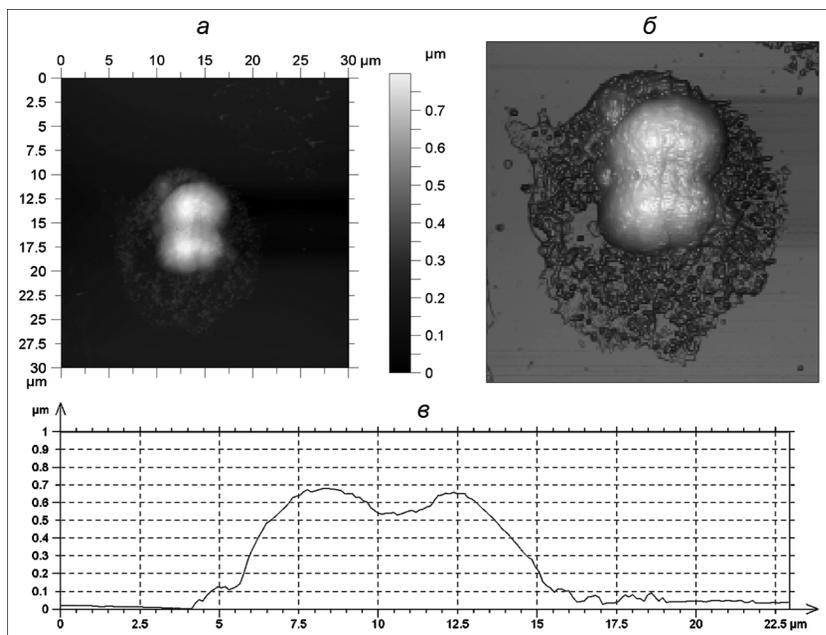


Рис. 2. Результаты сканирования палочкоядерного нейтрофила (контроль). Изображение палочкоядерного нейтрофила (контроль), фиксированного на стеклянной подложке, полученное методом АСМ (а-б); в – профиль клетки.

мкм). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica V.6.0 (Statsoft Inc, США). Использовали ранговый дисперсионный анализ по Фридмену, непараметрический тест Вилкоксона, непараметрический метод корреляционного анализа Спирмена. Нулевую гипотезу об отсутствии различий групп отвергали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В периферической крови у больных с обострением ХОБЛ выявили умеренный нейтрофильный лейкоцитоз – до $10,81 \pm 0,34 \cdot 10^9/\text{л}$. Ко-

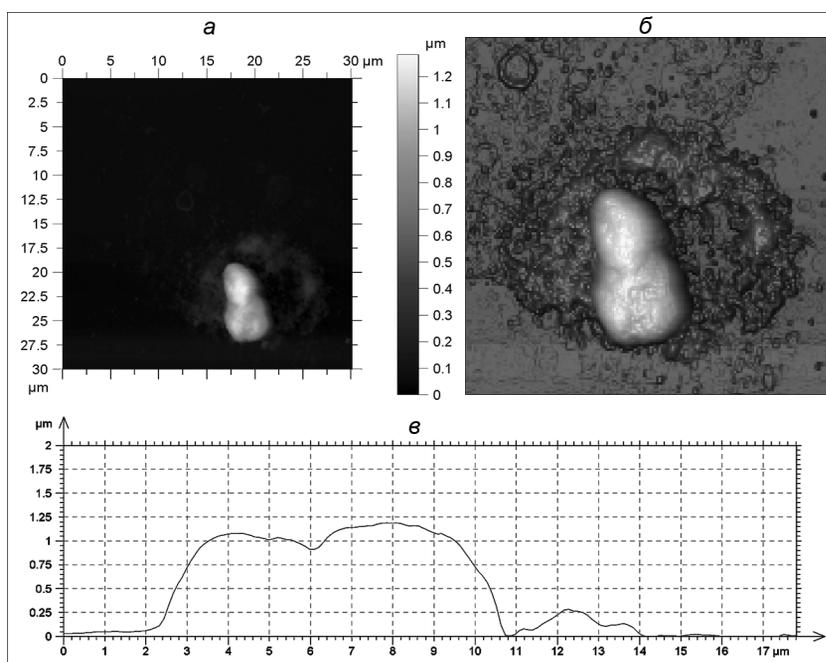


Рис. 3. Результаты сканирования палочкоядерного нейтрофила (ХОБЛ). Изображение палочкоядерного нейтрофила (ХОБЛ), фиксированного на стеклянной подложке, полученное методом АСМ (а-б); в – профиль клетки.

личество нейтрофилов у пациентов с ХОБЛ было выше, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$).

Морфометрическое исследование нейтрофилов методом АСМ. Методом АСМ исследовали цитоархитектонику нейтрофилов периферической крови у лиц контрольной группы и больных ХОБЛ в фазе обострения. На рис. 1, 2 представлены результаты сканирования фиксированных нейтрофилов в контрольной группе. На рис. 1,а показан нейтрофил, у которого четко определяется сегментированное ядро, состоящее из четырех сегментов. Наглядно наличие сегментов можно увидеть на боковом сечении профиля клетки (см. рис. 1, в), где три выступа соответствуют трем сегментам, расположенным вдоль одной длинной оси клетки. Овальной формы клетка имеет четко очерченные границы. Цитоплазма нейтрофила имеет микровыrostы и неравномерно заполнена мелкой зернистостью.

На рис. 2, а, б продемонстрирован палочкоядерный нейтрофил, выделенный из периферической крови у лиц контрольной группы, имеющий ядро с небольшим вырезом в контуре. Это выявляется и на боковом сечении клетки (см. рис. 2, в).

В отличие от лиц в контрольной группе у больных ХОБЛ чаще встречали палочкоядерные нейтрофилы (рис. 3, а, б). Однако от аналогичных вышеописанных нейтрофилов контрольной группы они отличались большей фазовой высотой клетки. Этот факт нашел отражение в изменении морфометрических показателей нейтрофилов у больных ХОБЛ (табл. 1). Так, если высота клетки относительно подложки у лиц контрольной группе составила $0,91 \pm 0,05$ нм, то у больных ХОБЛ – в среднем $1,16 \pm 0,05$ нм, причем обнаруженная разница оказалась статистически высокодо-стоверной ($p < 0,05$). Кроме того, обращает внимание более заметная шероховатость цитоплазмы нейтрофилов у больных ХОБЛ. Максимальная высота гранул нейтрофилов у больных ХОБЛ была увеличена относительно таковой в контроле и составила в среднем $1,34 \pm 0,01$ и $1,01 \pm 0,01$ нм соответственно ($p < 0,05$). Дополнительный выступ на кривой профиля клетки наглядно показывает наличие в цитоплазме крупных гранул (рис. 3, в).

Палочкоядерные нейтрофилы у больных ХОБЛ как более молодые клетки имеют намечающиеся перетяжки, которые наглядно продемонстрированы на боковом сечении клетки (рис.4, а-в). При сравнении других морфометрических показателей выявили, что при ХОБЛ площадь ядра клетки снижается. Так, если у лиц в контрольной группе средняя площадь ядра нейтрофилов составила $39,16 \pm 1,67$ нм², то у больных ХОБЛ – $31,82 \pm 2,80$ нм² ($p < 0,05$).

Функциональные особенности нейтрофилов при ХОБЛ в фазе обострения. Силовая спектроскопия и измерение жесткости (модуль Юнга) мембран нейтрофилов. С целью получения более полной информации о структурно-функциональных особенностях нейтрофилов у больных ХОБЛ

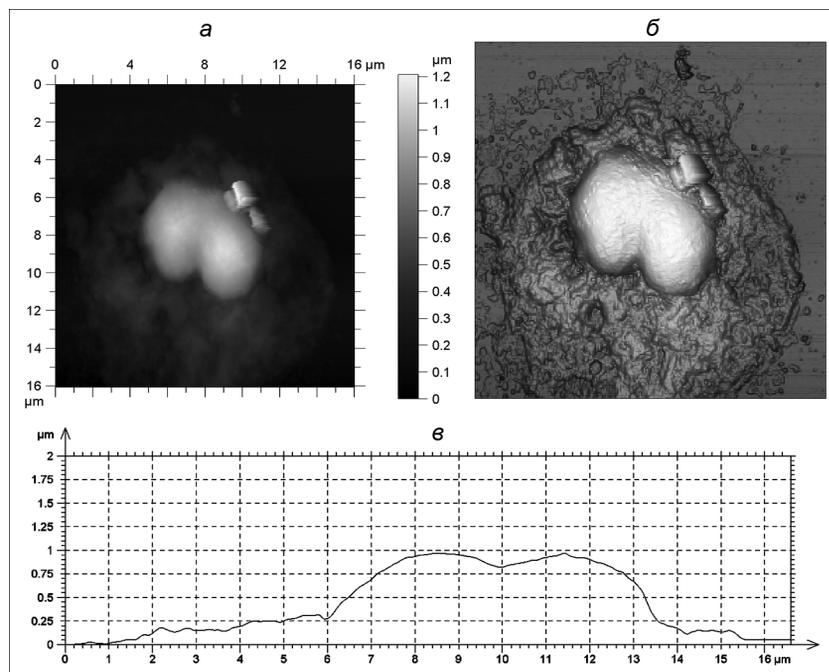


Рис. 4. Результаты сканирования палочкоядерного нейтрофила (ХОБЛ). Изображение палочкоядерного нейтрофила (ХОБЛ), фиксированного на стеклянной подложке, полученное методом АСМ (а-б); в – профиль клетки.

провели оценку модуля Юнга нативных нейтрофилов. При анализе результатов атомно-силовой спектроскопии упругих деформаций нейтрофилов выявили, что клеточная мембрана нейтрофилов у больных ХОБЛ по сравнению с таковой у лиц контрольной группы характеризуется более высокими значениями модуля Юнга (табл. 2). Модуль Юнга нейтрофилов у больных ХОБЛ превышает в 2,5 раза данный показатель контрольной группы. Результаты исследования показали, что жесткость мембраны нативных клеток в контрольной группе составляет в среднем $15,29 \pm 0,05$ кПа. У больных ХОБЛ этот показатель равен $38,79 \pm 0,32$ кПа ($p < 0,05$). Этот факт свидетельствует о снижении эластичности и вязкости клеточной мембраны и повышении жесткости нейтрофилов у больных ХОБЛ.

Таблица 1

Морфометрические показатели нейтрофилов у больных ХОБЛ в фазе обострения

Показатель	Контроль (n = 15)	ХОБЛ (n = 15)
Высота клетки, нм	$0,91 \pm 0,05$	$1,16 \pm 0,05^*$
Максимальная высота гранул, нм	$1,01 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,01^*$
Площадь ядра, нм ²	$39,16 \pm 1,67$	$31,82 \pm 2,80^*$
Площадь клетки, нм ²	$124,78 \pm 10,73$	$122,48 \pm 4,65$

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – различия достоверны по сравнению с показателями в контрольной группе ($p < 0,05$).

Таблица 2

Модуль Юнга и сила адгезии нейтрофилов у больных ХОБЛ в фазе обострения

Показатель	Контроль группа (n = 15)	ХОБЛ (n = 15)
Модуль Юнга, кПа	$15,29 \pm 0,05$	$38,79 \pm 0,32^*$
Сила адгезии, нН	$0,076 \pm 0,0002$	$0,36 \pm 0,005^*$

Различия силовых кривых взаимодействия (подвод) зонда с поверхностью нейтрофилов у лиц в контрольной группе (а) и у больных ХОБЛ в фазе обострения (б) показаны на рис. 5. Наклон кривой подвода кантилевера определяет упругие свойства образца (клетка). Для «мягких» образцов кривая подвода кантилевера имеет более пологий наклон. На рис. 5 отчетливо видно, что наклон силовой кривой подвода зонда к поверхности нейтрофилов у больных ХОБЛ (см. рис. 5, б) более крутой, что свидетельствует о более высокой жесткости мембраны клеток у больных ХОБЛ по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе.

Силовая спектроскопия и измерение силы адгезии нейтрофилов. Силу адгезии нейтрофилов определяли по силовым кривым отвода зонда от поверхности субстрата (клетка). На рис. 6 представлены силовые кривые, полученные при удалении зонда от поверхности нейтрофила у лиц контрольной группы (а), больных ХОБЛ в фазе обострения (б).

Как видно из рис. 6, а, б, характерной особенностью кривых, зарегистрированных при отводе зонда от поверхности нейтрофилов у больных ХОБЛ, в отличие от

кривых контрольной группы является наличие пика – зуба (б). По максимальному значению пика вычисляли силу адгезии, которую нужно приложить, чтобы вывести из контакта поверхность зонда и субстрата (клетка). Установили, что сила адгезии для нейтрофилов, выделенных у лиц контрольной группы, составляет $0,076 \pm 0,0002$ нН, тогда как у больных ХОБЛ в фазе обострения наблюдали статистически значимое повышение этого показателя до $0,42 \pm 0,005$ нН ($p < 0,05$).

Таким образом, методом прямых измерений с использованием АСМ мы определили адгезионные силы между поверхностью зонда и поверхностью нейтрофила. Показали, что сила адгезии нейтрофилов у больных с обострением ХОБЛ выше, чем у лиц контрольной группы, в 5,52 раза.

В нашей работе с помощью метода АСМ изучали структурно-функциональные характеристики нейтро-

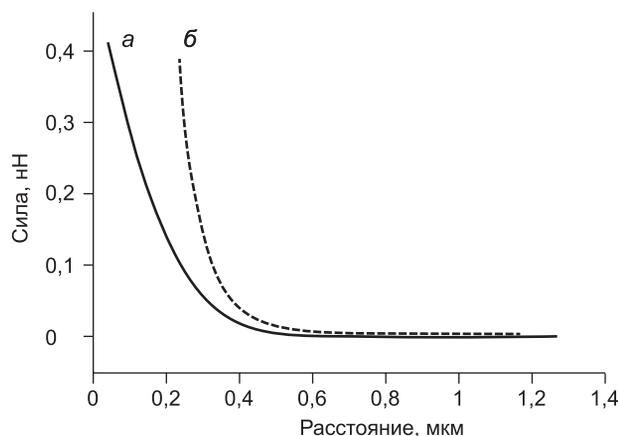


Рис. 5. Силовые кривые подвода зонда для нейтрофилов контрольной группы (а) и больных ХОБЛ (б).

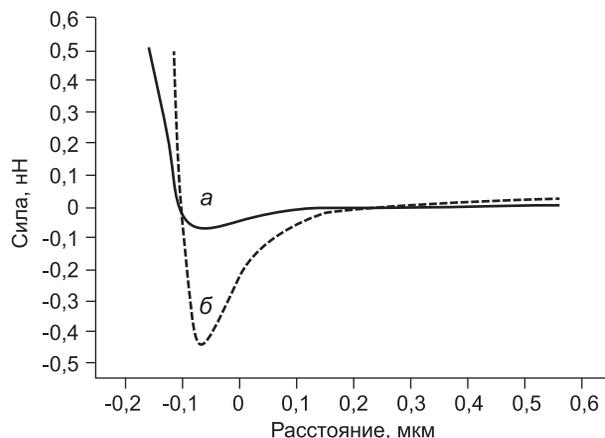


Рис. 6. Силовые кривые отвода АСМ-зонда от поверхности нейтрофилов. *а* – контроль, *б* – ХОБЛ.

филов у больных ХОБЛ в фазе обострения. Нейтрофилы играют одну из ведущих ролей в воспалении при ХОБЛ. Результаты проведенных исследований свидетельствуют об активации нейтрофилов и увеличении их митотических эффектов при ХОБЛ. Секретируя сериновые протеазы (нейтрофильную эластазу, катепсин G и протеиназу-3), нейтрофилы приводят к разрушению альвеолярной стенки [15]. В нашем исследовании при изучении морфологии нейтрофилов у больных ХОБЛ чаще встречали палочкоядерные нейтрофилы, отличавшиеся от нейтрофилов у здоровых лиц большей фазовой высотой клетки. Обращало внимание более заметная шероховатость цитоплазмы нейтрофилов у больных ХОБЛ, характеризующая наличие в цитоплазме крупных гранул. Фазовая высота клетки и цитоплазматическая гранулированность (зернистость) являются критериями функциональной активности нейтрофилов [16]. При сравнении других морфометрических показателей выявили уменьшение площади ядра, тела клетки, диаметра нейтрофилов у больных ХОБЛ, т. е. у больных ХОБЛ отметили тенденцию к уменьшению размера нейтрофилов.

Существует мнение, согласно которому уменьшение размера нейтрофилов при воспалении можно объяснить тем, что нейтрофилы большего размера первыми уходят в ткани (очаги воспаления), а в крови остаются клетки меньшего размера [17]. Также, возможно, уменьшение размера нейтрофилов связано с компенсаторной реакцией организма на резкое увеличение количества лейкоцитов, направленной на сохранение реологических свойств крови, предупреждение повышения вязкости крови, сохранение нормальной скорости кровотока в капиллярном русле. Результаты проведенных исследований доказывают, что даже умеренный лейкоцитоз понижает среднюю скорость кровотока в капиллярном русле, изменяет реологические свойства крови и условия ее течения по микрососудам [18].

Знание функциональных (механических) свойств нейтрофилов поможет лучше понять функции нейтрофилов в микроциркуляторном русле. В легочных капиллярах нейтрофилы (диаметром 6–8 мкм) должны преодолеть 40–100 капиллярных сегментов при движении от артериол к венам. 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. Время, необходимое нейтрофилам для деформации в микрокапиллярах, которые имеют меньший диаметр, чем диаметр самих нейтрофилов, определяется реологией нейтрофилов. Предполагают, что процесс деформации нейтрофилов необходим для того, чтобы регулировать их адгезию к эндотелию и последующую миграцию в поврежденные ткани. Увеличение деформации клеток (жесткость цитоплазматической мембраны) и площади контакта нейтрофилов с эндотелием способствует адгезии к эндотелию сосудов и ведет к его повреждению. Миграция и адгезия нейтрофилов к эндотелию сосудов опосредованы реологией нейтрофилов [11].

В нашем исследовании результаты анализа атомно-силовой спектроскопии показали увеличение жесткости мембран нейтрофилов у больных ХОБЛ. Установили, что клеточная мембрана нейтрофилов у больных ХОБЛ по сравнению с таковой в контрольной группе характеризуется более высокой жесткостью, отличающейся высокими значениями модуля Юнга. Модуль Юнга нейтрофилов у больных с обострением ХОБЛ превышает аналогичный показатель в контрольной группе в 4,7 раза. Этот факт свидетельствует о значимом снижении эластичности и вязкости клеточной мембраны и повышении жесткости мембраны нейтрофилов у больных ХОБЛ с легочной гипертензией.

Считается, что повышение адгезивности имеет большое значение в патогенезе дисфункции эндотелия при воспалении, атеросклерозе, септическом шоке и других патологических процессах. Важную роль в регуляции адгезии лейкоцитов и их трансэндотелиальной миграции играют молекулы межклеточной адгезии (белки, связанные с плазматической мембраной) ICAM-1, P-селектин, E-селектин. Ряд авторов в своих исследованиях показали, что увеличение плазменных растворимых молекул межклеточной адгезии ICAM-1 оказывает повреждающее действие на эндотелий. К. Blidberg и соавт. [6] в своем исследовании показали, что уровень растворимого ICAM-1, ICAM-3 в сыворотке повышается при ХОБЛ, что подтверждает системную воспалительную активность.

В данной работе методом прямых измерений с использованием АСМ определили адгезионные силы между поверхностью зонда и поверхностью нейтрофила. Показали увеличение силы адгезии нейтрофилов у больных с обострением ХОБЛ.

АСМ расширяет наши возможности в изучении как клеточных, так и субклеточных структур, что в дальнейшем позволит более широко использовать данный метод для диагностики различной патологии у взрослых и детей.

В нашем исследовании использование АСМ дало возможность установить изменения ультраструктуры и функциональных свойств клеточной поверхности нейтрофилов у больных ХОБЛ. Эти данные могут быть использованы в качестве индикатора степени выраженности воспаления и, возможно, позволят разработать в будущем новые методики ранней диагностики и профилактики осложнений ХОБЛ.

Исследование поддержано грантом Министерства образования РФ 11.G.34.31.0040.

ЛИТЕРАТУРА

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report. Last updated 2014. www.goldcopd.org/.

2. Черняев А.Л., Самсонова М.В. Воспаление при хронической обструктивной болезни легких: молекулярные основы патогенеза. *Consilium medicum Ukraina*. 2011; 1: 9–14.
3. Stefano A., Capelli A., Lusuardi M., Balbo P., Vecchio C., Maestrelli P., Mapp C.E., Fabbri L.M., Donner C.F., Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 58(4): 1277–85.
4. Pesci A., Balbi B., Majori M., Cacciani G., Bertacco S., Alciato P., Donner C.F. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1998; 12(2): 380–6.
5. Pesci A., Majori M., Cuomo A., Borciani N., Bertacco S., Cacciani G., Gabrielli M. Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 1998; 92(6): 863–70.
6. Blidberg K., Palmberg L., Jameet A. Adhesion molecule sin subjects with COPD and healthynon-smokers: a cross sectional parallel group study. *Respiratory Research*. 2013; 14: 47 doi: 10.1186/1465-9921-14-47.
7. Riise G.C., Larsson S., Lofdahl C.G., Andersson B.A. Circulating celladhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 1994; 7: 1673–7.
8. Emiel F.M. Wouters. Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of American Thoracic Society*. 2005; 2: 26–34.
9. Agusti A., Soriano J.B. COPD as a systemic disease. *COPD*. 2008; 5(2): 133–8.
10. Noguera A., Batle S., Miralles C. et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001; 56(6): 432–7.
11. Roca-Cusachs P., Almendros I., Sunyer Raimon et al. Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 2006; 91: 3508–18.
12. Подосинников И.В., Нилова Л.Г., Бабичев И.В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. *Лабораторное дело*. 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.
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; 31–8.
15. Авдеев С.Н. Ингибиторы фосфодиэстеразы-4: новые перспективы противовоспалительной терапии ХОБЛ. *Фарматека*. 2013; 4: 101–1.
16. Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г., Музафарова Д.А. Изменение параметров объема лейкоцитов крови при заболеваниях органов дыхания. *Пульмонология*. 2002; 3: 38.
17. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. *Клетки крови – современные технологии их анализа*. Москва: «Триада-Фарм»; 2002.
18. Иванов К.П., Левкович Ю.И., Московская С.В. Изменение микроциркуляции при лейкоцитозе. *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1992; 6: 89–91.

REFERENCES

1. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report*. Last updated 2014. www.goldcopd.org/.
2. Chernyaev A.L., Samsonova M.V. Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis of pathogenesis. *Consilium medicum Ukraina*. 2011; 1: 9–14.
3. Stefano A., Capelli A., Lusuardi M., Balbo P., Vecchio C., Maestrelli P., Mapp C.E., Fabbri L.M., Donner C.F., Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 58(4): 1277–85.
4. Pesci A., Balbi B., Majori M., Cacciani G., Bertacco S., Alciato P., Donner C.F. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1998; 12(2): 380–6.
5. Pesci A., Majori M., Cuomo A., Borciani N., Bertacco S., Cacciani G., Gabrielli M. Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 1998; 92(6): 863–70.
6. Blidberg K., Palmberg L., Jameet A. Adhesion molecule sin subjects with COPD and healthynon-smokers: a cross sectional parallel group study. *Respiratory Research*. 2013; 14: 47 doi: 10.1186/1465-9921-14-47.
7. Riise G.C., Larsson S., Lofdahl C.G., Andersson B.A. Circulating celladhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 1994; 7: 1673–7.
8. Emiel F.M. Wouters. Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of American Thoracic Society*. 2005; 2: 26–34.
9. Agusti A., Soriano J.B. COPD as a systemic disease. *COPD*. 2008; 5(2):133-8.
10. Noguera A., Batle S., Miralles C. et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001; 56(6): 432–7.
11. Roca-Cusachs P., Almendros I., Sunyer Raimon et al. Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 2006; 91: 3508–18.
12. Podosinnikov I.V., Nilov L.G., Babicheva I.V. The Method of determining the chemotactic activity of leukocytes. *Laboratornoe delo*. 1981; 8: 68–70. (in Russian)
13. Gushchina Y.Y., Pleskova S.N., Zvonkova M.D. Study of the differences of the morphological parameters of human blood cells by the method of scanning probe microscopy. *Surface. X-ray, synchronous and neutron research*. 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 bu AFM. *Physic of low-dimension structures*. 2003; 31–8.
15. Avdeev S.N. Inhibitors of phosphodiesterase-4: new perspectives anti-inflammatory therapy of COPD. *Farmateka*. 2013; 4: 101–11.
16. Matyushichev V.B., Shamaratova V.G., Muzafarova D.A. Change the settings of vulume of blood leukocytes in respiratory diseases. *Pulmonology*. 2003; 3: 38.
17. Kozinets G.I., Pogorelov V.M., Shmarov D.A. *Blood cells-modern technology analysis*. Moscow: «Triada-farm»; 2002.
18. Ivanov K.P., Levkovich Y.I., Moscow S.V. Changes of microcirculation in leukocytosis. *Russion Journal of physiology (formely I.M. Sechenov Physiologichesky zhurnal)*. 1992; 6: 89–91. (in Russian)

Поступила 15.05.14

Received 15.05.14