

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЗДОРОВИХ ОСІБ І ЗА ДІЇ ТЯЖКОЇ ТЕРМІЧНОЇ ТРАВМИ

Отримана характеристика лімфоцитів периферійної крові на мікроскопічному рівні дала можливість розробити робочу класифікацію лімфоцитів і виділити серед них чотири типи залежно від структури ядра і цитоплазми. Згідно із запропонованою робочою класифікацією було досліджено динаміку кількісного співвідношення виділених нами типів лімфоцитів та їх морфометричних показників за дії тяжкої термічної травми. Показано, що остання супроводжується перерозподілом типів лімфоцитів з одночасною зміною їх морфометричних параметрів залежно від стадії опікової хвороби.

Аналіз останніх досліджень

Лімфоцит, який є центральною клітиною імунної системи, складає різну за функцією і формою популяцію клітин [3, 5]. Аналіз результатів морфометрії лімфоцитів крові може бути покладений в основу інтегрального тесту щодо оцінки імунної системи організму, бо розміри клітини та її структурних

компонентів – ядра і цитоплазми – зв'язані не тільки зі ступенем та функціональним станом лімфоцитів, але й приналежністю їх до відповідної популяції. Проте в літературі відсутні однозначні кількісні співвідношення малих, середніх і великих лімфоцитів у практично здорових осіб [1, 4, 6, 7], а за опікової травми такі дослідження взагалі не проводились.

Об'єкти та методика досліджень

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферійної крові 20 здорових осіб (донорів) та 47 хворих з опіковою травмою тяжкого ступеня. На мазках периферійної крові, забарвлених за Романовським-Паппенгеймом, проводили вимірювання ~ 50 лімфоцитів у кожному мазку, зберігаючи правила випадкового вибору. За допомогою системи комп'ютерної обробки зображень IBAS-2000 заміряли площу ядра (S_n), площу цитоплазми (S_c), вираховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

Морфологічне вивчення проводили на світлооптичному та електронно-мікроскопічному рівнях за загальноприйнятою методикою [8].

Результати досліджень

Проведене комплексне дослідження лімфоцитів периферійної крові здорових осіб дозволило виділити чотири типи лімфоцитів.

Перший тип лімфоцитів характеризувався діаметром ядра менше 7 мкм. Площа ядра становила до 31 мкм², а ядерно-цитоплазматичне співвідношення – вище 6. Ядро було гомогенне, виявлявся високий ступінь конденсації хроматину. Електронно-мікроскопічними дослідженнями у ядрі спостерігали домінування гетерохроматину. У вузькій облямівці цитоплазми виявляли лише рибосоми, полісоми, одиничні мітохондрії. Вміст таких клітин у периферійній крові становив 3,8 %.

Другий тип лімфоцитів має діаметр ядра 1–8 мкм, його площа становила до 42 мкм², а ядерно-цитоплазматичне співвідношення – до 5. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що в ядрі другого типу лімфоцитів майже однаково виявляються еу- та гетерохроматин. В цитоплазмі спостерігали зростання вмісту органел, зокрема мітохондрій, виявляли короткі канальці гранулярної ендоплазматичної сітки, в окремих лімфоцитах було по одній азурофільній гранулі. Вміст таких лімфоцитів у периферійній крові становив 24,7 %.

Третій тип лімфоцитів характеризувався діаметром ядра 8–10 мкм, площею до 56 мкм². Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у таких лімфоцитів дорівнює 4. Електронно-мікроскопічними дослідженнями в ядрі спостерігали домінування еухроматину. В цитоплазмі виявляли збільшення вмісту органел апарату білкового синтезу, в інших клітинах спостерігали гіпертрофію комплексу Гольджі. Відбувалось зростання кількості мітохондрій і часто виявлялись азурофільні гранули. Вміст третього типу лімфоцитів у периферійній крові становив 48,3 %.

Четвертий тип лімфоцитів мав діаметр ядра 10–16 мкм. Площа ядра

становила до 90 мкм², а ядерно-цитоплазматичне співвідношення – 2. Ядро набувало пухкоподібної структури. Вміст таких клітин у периферійній крові займав 23,2 %.

Згідно із запропонованою класифікацією дослідили зміну кількісного співвідношення виділених типів лімфоцитів та їх морфометричних показників за дії тяжкої термічної травми, враховуючи при цьому, що малі лімфоцити представлені сукупністю численних субпопуляцій, в тому числі і клітин пам'яті [9]. За антигенної стимуляції відбувається перерозподіл вмісту лімфоцитів, які відносяться до різних субпопуляцій, втягнення їх у реакції імунної відповіді та збільшення їх кількості, що змінює число клітин специфічного клону [2].

За дії тяжкої термічної травми популяція лімфоцитів першого типу на 3–4 добу спостереження реагувала збільшенням кількості клітин у 3,1 раза, тенденцією до зростання площі ядра без зміни загальної площі клітини і, як наслідок, підвищенням ядерно-цитоплазматичного співвідношення через суттєве ($p < 0,001$) зменшення цитоплазми.

На 11–14 добу після тяжкої опікової травми лімфоцитів першого типу в периферійній крові було в 1,6 раза більше щодо норми і в 1,9 раза менше, ніж на 3–4 добу спостереження. Загальна площа клітини першого типу суттєво ($p < 0,001$) зменшувалась щодо норми та попереднього терміну спостереження. Площа ядра зменшилась на 19,6 % щодо показника норми і вище на 20,2 % щодо 3–4 доби спостереження. Площа цитоплазми лімфоцитів першого типу суттєво ($p < 0,001$) зменшилась як щодо показників здорових осіб, так і попереднього терміну спостереження. Внаслідок зменшення площі цитоплазми ядерно-цитоплазматичне співвідношення лімфоцитів I типу значно зросло і було у 2,1 раза вище норми і в 1,7 раза більше попереднього терміну спостереження.

На 21–24 добу після тяжкої термічної травми у периферійній крові хворих лімфоцитів першого типу було у 2,1 раза менше щодо норми, у 6,5 раза щодо відповідного показника на 3–4 добу спостереження і лише в 3,4 раза порівняно із 11–14 добою після опіку. Загальна площа лімфоцитів першого типу була суттєво ($p < 0,001$) вищою щодо відповідного показника на 11–14 добу після тяжкої опікової травми та статистично достовірно нижчою ($p < 0,01$) щодо 3–4 доби після травми і норми ($p < 0,01$). Площа ядер лімфоцитів першого типу на 21–24 добу після тяжкої термічної травми була вищою за відповідний показник на 11–14 добу, достовірно нижчою ($p < 0,01$) щодо 3–4 доби спостереження і щодо норми. Проте загальна площа цитоплазми лімфоцитів першого типу в даний термін спостереження залишалась достовірно нижчою щодо норми ($p < 0,001$) та відповідного показника на 3–4 добу спостереження ($p < 0,001$) і мало різнилась від попереднього терміну. Ядерно-цитоплазматичний індекс на 21–24 добу після тяжкого опіку мало різнився від попереднього терміну спостереження, у 1,5 раза був вищим від показника на 3–4 добу і в 1,7 раза вище за норму.

На час виписки із стаціонару у крові хворих, які перенесли тяжку термічну травму, вміст лімфоцитів першого типу в 1,8 раза перевищував показник

норми, хоча був суттєво нижчим щодо показника 3–4 доби та достовірно ($p < 0,001$) вищим, ніж на 11–21 добу спостереження. Загальна площа лімфоцитів, площа ядер і цитоплазми, ядерно-цитоплазматичне співвідношення на час виписки із стаціонару хворих після тяжких опіків не досягали показників здорових осіб.

У периферійній крові хворих, які перенесли тяжку термічну травму, вміст лімфоцитів другого типу на 3–4 добу зріс на 12,8%. Вплив тяжкої опікової травми (3–4 доба) мало позначився на морфометричних параметрах лімфоцитів другого типу. Так, площа клітин і площа ядра та цитоплазми мали лише тенденцію до зменшення, а ядерно-цитоплазматичне співвідношення мало різнилося від норми.

Загальна кількість лімфоцитів другого типу у периферійній крові хворих, які після термічної травми на 11–14 добу спостереження зменшилась на 8,8 % щодо норми та на 19,2% щодо попереднього терміну спостереження. Площа ядер лімфоцитів другого типу суттєво зменшилась щодо норми ($p < 0,001$) та 3–4 доби спостереження ($p < 0,01$) за достовірного зростання площі цитоплазми цих клітин, що не супроводжувалося значною зміною загальної площі лімфоцитів. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення лімфоцитів другого типу на 11–14 добу після опіку було найнижчим і дорівнювало 3,97, що в 1,2 раза менше щодо норми, так його величини на 3–4 добу після травми.

У периферійній крові хворих, які перенесли тяжку термічну травму на 21–24 добу кількість лімфоцитів другого типу зменшилась на 43,9% щодо норми, на 19,2% щодо відповідної кількості цих клітин на 3–4 добу після травми і на 38,5% щодо попереднього терміну спостереження. Загальна площа лімфоцитів другого типу достовірно ($p < 0,001$) зростає, що обумовлено суттєвим ($p < 0,001$) підвищенням площі ядра та площі цитоплазми ($p < 0,001$). Площа ядер та цитоплазми лімфоцитів другого типу статистично достовірно різниться також від аналогічних показників попередніх термінів спостереження. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складає 4,15, що на 4,5% вище попереднього терміну спостереження, але на 14,3% нижче норми.

Кількість лімфоцитів другого типу у периферійній крові хворих, які перенесли тяжку термічну травму, на час виписки із стаціонару дещо перевищувала рівень у здорових осіб. Загальна площа клітин та площа ядер лімфоцитів другого типу наближається до показників норми, проте достовірно вищою ($p < 0,001$) за норму залишається площа цитоплазми та ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

На 3–4 добу спостереження кількість лімфоцитів третього типу в периферійній крові хворих, які перенесли тяжку термічну травму була у 1,2 раза нижчою щодо норми. Аналіз морфометричних параметрів лімфоцитів третього типу показав, що загальна площа клітин суттєво ($p < 0,05$) підвищувалася за рахунок достовірного ($p < 0,05$) зростання площі ядра та

площі цитоплазми. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення склало 4,27, що було на 1,8% нижче норми.

На 11–14 добу після опіку тяжкого ступеня в периферичній крові хворих відбувалося зростання кількості лімфоцитів третього типу та зростання їх на 9,3 % до норми і 28,9 % відповідно до попереднього терміну спостереження. Площа лімфоцитів третього типу суттєво ($p < 0,001$) знижувалась щодо норми та попереднього терміну спостереження внаслідок достовірного зменшення площі ядер та цитоплазми цих клітин щодо попереднього терміну спостереження та проти норми. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у цей термін дослідження майже не відрізнялося від рівня норми та на 3–4 добу після опікової травми тяжкого ступеня.

Кількість лімфоцитів третього типу у периферійній крові хворих з термічною травмою тяжкого ступеня продовжувала зростати, і на 21–24 добу досягала найвищого значення і була на 14,5 % вище норми, на 4,7 % від попереднього терміну спостереження і на 34,9 % щодо 3–4 доби після травми. Опікова травма тяжкого ступеня викликала суттєве ($p < 0,05$) підвищення площі лімфоцитів третього типу внаслідок статистично достовірного ($p < 0,05$) зростання площі ядра і цитоплазми цих клітин щодо відповідних показників у нормі та попередніх термінів спостереження. Ядерно-цитоплазматичний індекс лімфоцитів третього типу істотно відрізнявся як від його значення в нормі, так і в попередні терміни спостереження.

Загальна кількість лімфоцитів третього типу периферійної крові хворих після термічної травми тяжкого ступеня на час виписки із стаціонару складала лише 92,75 % від норми. На час виписки із стаціонару суттєво ($p < 0,05$) вищою залишалась площа клітин, що обумовлено збільшенням площі ядра і цитоплазми лімфоцитів третього типу. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення було найнижчим щодо норми та всіх попередніх термінів спостереження і склало 3,31 ($p < 0,001$).

На 3–4 добу після опіку тяжкого ступеня в периферійній крові кількість лімфоцитів четвертого типу знизилась на 17,3% щодо норми, проте травма мало вплинула на загальну площу клітин, площу ядра та несуттєво на площу цитоплазми, що знайшло своє відображення і в рівні ядерно-цитоплазматичного співвідношення, яке склало 2,09 (рівень здорових осіб).

На 11–14 добу після термічної травми тяжкого ступеня в периферійній крові хворих кількість лімфоцитів четвертого типу знизилась на 17,3 % щодо норми, але зросла на 26,1 % щодо попереднього терміну спостереження. Зростання кількості лімфоцитів четвертого типу в периферійній крові хворих на 11–14 добу після термічної травми тяжкого ступеня супроводжувалось вираженим зменшенням загальної площі клітин ($p < 0,001$), обумовлене суттєвим зменшенням площі ядер та цитоплазми цих лімфоцитів ($p < 0,001$). Зміни площі ядер та цитоплазми призвели до суттєвого ($p < 0,001$) зростання

ядерно-цитоплазматичного співвідношення як щодо показників у здорових осіб, так і попереднього терміну спостереження.

На 21–25 добу спостереження загальна кількість лімфоцитів четвертого типу в периферичній крові хворих була вище норми на 26,6 %, на 53,0 % більше, ніж на 3–4 добу після травми і на 21,4% у порівнянні з 11–14 добою після опіку. Загальна площа лімфоцитів четвертого типу суттєво ($p < 0,001$) підвищувалась щодо попереднього терміну спостереження за рахунок зростання площі ядра ($p < 0,05$) та цитоплазми ($p < 0,01$), що супроводжувалось зниженням ядерно-цитоплазматичного індексу.

На час виписки із стаціонару кількість лімфоцитів четвертого типу в периферичній крові хворих після травми наближалась до норми. Загальна площа клітин суттєво ($p < 0,01$) збільшувалась щодо норми за рахунок зростання площі цитоплазми, про що свідчило зниження ядерно-цитоплазматичного співвідношення до 1,70, що було на 17,9 % нижче норми.

Таким чином, результати морфометричного аналізу лімфоцитів показали, що ці клітини реагують на термічну травму тяжкого ступеня як перерозподілом співвідношення різних типів лімфоцитів у загальній популяції, так і зміною морфометричних показників.

Динаміка перерозподілу лімфоцитів у периферичній крові хворих після дії тяжкої опікової травми відбувається стадійно. На 3–4 добу після травми підвищується кількість лімфоцитів першого і другого типів внаслідок зменшення числа лімфоцитів третього і четвертого типів. На 11–14 добу і особливо на 21–24 добу після термічної травми відбувається зниження кількості лімфоцитів першого і другого типів, що супроводжується зростанням вмісту лімфоцитів третього і четвертого типів, особливо за рахунок останнього. Різде зменшення малих лімфоцитів (першого і четвертого типів) свідчить про виражену депресію імунної системи і тяжкий перебіг опікової хвороби. На час клінічного видужання і виписки хворих зі стаціонару кількість лімфоцитів другого, третього і четвертого типів не досягають показників здорових осіб, а вміст лімфоцитів першого типу дещо перевищує норму.

Під впливом опікової травми тяжкого ступеня відбувалося зменшення площі лімфоцитів усіх типів внаслідок зниження площі ядра і цитоплазми (більшою мірою останньої), що супроводжувалось різким зростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення, найбільш вираженого на 11–14 добу після травми. На 21–24 добу спостережень площа ядра і цитоплазми лімфоцитів першого і другого типів зростає, однак площа цитоплазми залишається суттєво нижчою щодо норми, що супроводжується високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, названі показники на час виписки із стаціонару не досягають рівня у здорових осіб.

Площа ядер і цитоплазми лімфоцитів третього і четвертого типів зростала уже на 21–24 добу після термічної травми тяжкого ступеня. На час виписки хворих зі стаціонару площа ядер названих типів лімфоцитів за своїм значенням наближалась до рівня здорових осіб, а площа цитоплазми суттєво перевищувала показники норми, це супроводжувалось статистично достовірним зниженням ядерно-цитоплазматичного відношення.

Висновки

1. У периферійній крові здорових осіб на основі комплексного світлооптичного та електронно-мікроскопічного дослідження виділено чотири типи лімфоцитів.

2. Імунна відповідь організму за дії тяжкої опікової травми протікає стадійно і характеризується зміною кількості лімфоцитів та змінами їх морфометричних показників. Зменшення кількості лімфоцитів першого і другого типів супроводжується зменшенням площі клітини, їх ядер та цитоплазми, що не досягають рівня здорових людей, навіть на час виписки хворих зі стаціонару.

3. Різде зниження кількості лімфоцитів першого та другого типу на 11-21 добу після травми свідчить про виражену депресію імунної системи і тяжкий перебіг опікової хвороби.

Перспективи подальших досліджень

Провести аналогічні дослідження щодо структурного аналізу гранулярних лейкоцитів периферійної крові здорових осіб і за дії тяжкої термічної травми.

Література

1. Головацкий АС. Особенности изменения морфофункциональных параметров лимфоцитов различных компонентов соматических лимфатических узлов собак при антигенном воздействии // Сборник «Морфология». – К.: Здоров'я, 1990. – № 12. – С. 107–112.
2. Либерман Л.Н., Матущенко П.Г. Морфометрический метод исследования лимфоцитов крови // Лаб. дело. – 1989. – № 2. – С. 18–20.
3. Ломакин М.С. Иммунологический надзор. – М.: Медицина, 1990. – 256 с.
4. Луцук О.Д., Иванова А.И., Кабак К.С. Гистология людини. – Львів: Мир, 1993. – 399 с.
5. Морфология лимфоцита / А.М. Кременецакая, И.А. Воробьев, Ю.В. Сидорова и др. // Терапевт, архив. – 1993. – Т. 70. – №7. – С. 37–39.
6. Морфофункциональные параметры иммунокомпетентных клеток крови у людей разной конституции / Е.В. Маркова, Л.Б. Захарова, В.В. Фефелова и др. // Морфология. – 1999. – Т. 115. – № 1. – С. 31–34.
7. Сапин М.Р., Этинген Л.Е. Иммунная система. – М.: Медицина, 1996. – 385 с.
8. Уикли Б. Обработка тканей, приготовление ультрасрезов, контрастирование // В кн.: Электронная микроскопия для начинающих. – М., 1975. – С. 36–39.
9. Хаитов Г.М., Пинегин Б.В., Истматов Х.И. Экологическая иммунология. – М., 1995. – 361 с.