

## КОМПЬЮТЕРНАЯ МОРФОМЕТРИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЕЙ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА

© 2010 И.Л. Давыдкин, О.И. Фёдорова, Н.О. Захарова, А.В. Селезнёв

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 02.10.2010

С целью изучения реакции крови у лиц разного возраста и пола при пневмонии обследованы 116 больных внебольничной бактериальной пневмонией (80 мужчин и 36 женщин), которые были разделены на три возрастные группы: 18–44 лет, 45–59 и 60–74 года, контрольные группы составили 16 и 14 практически здоровых мужчин и женщин, соответственно. Всем обследованным проведена компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови. Выявлена разная реакция лимфоцитов на воспаление легких у мужчин и женщин молодого и среднего возраста. Получены косвенные указания на снижение уровня активации лимфоцитов у женщин в молодом и среднем возрасте при развитии пневмонии. У пожилых больных пневмонией размеры лимфоцитов не изменяются относительно контрольных групп, что свидетельствует о нарушении иммунного ответа на воспаление.

Ключевые слова: компьютерная морфометрия, лимфоциты, пневмония, кровь

В настоящее время неблагоприятные экологические факторы оказывают существенное влияние на функционирование важнейших систем жизнеобеспечения человека, в частности, на систему крови.

**Цель работы:** выявить изменения в периферической крови людей различного возраста при таком распространенном заболевании воспалительного характера как пневмония, определить возможные причины патоморфоза заболевания в условиях крупного промышленного региона.

Несмотря на достигнутые успехи в лечении внебольничной пневмонии, по-прежнему ее роль в структуре заболеваемости и смертности остается значимой. В старших возрастных группах частота и смертность вследствие пневмонии существенно возрастают [1, 2]. Все это диктует необходимость совершенствования методов диагностики оценки тяжести воспалительного процесса этой формы патологии.

*Давыдкин Игорь Леонидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии с курсом трансфузиологии. E-mail: dagi2006@rambler.ru*

*Фёдорова Ольга Ивановна, врач клинично-диагностической лаборатории. E-mail: olga10174@mail.ru*

*Захарова Наталья Олеговна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гериатрии. E-mail: geriatry@mail.ru*

*Селезнёв Алексей Владимирович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом трансфузиологии. E-mail: samamed@inbox.ru*

В первую очередь это касается изменений клеток периферической крови. Сведения об изменениях морфологии клеток крови у больных пневмонией различного возраста не только немногочисленны, но в ходе выполнения этих наблюдений не использованы многие из предложенных в последние годы новых методов исследования количественных и качественных свойств форменных элементов крови. В частности, для объективизации морфологической диагностики предпринимаются попытки использовать методы морфометрии, проточной и сканирующей цитометрии [3, 4]. Стремление получить принципиально новые данные об объекте заставляет переходить от визуального наблюдения к измерению характеристик объекта по его изображению, переходить от микроскопии к морфометрии. Морфометрические исследования гемоизображений распространены в практике лабораторного анализа. Так, в работах [5, 6] авторы проводили «диагностическую морфометрию» бластных клеток костного мозга больных острым миелоидным лейкозом. В работе [7] выполняли компьютерную морфометрию лимфоцитов периферической крови при апластической анемии. Компьютерная морфометрия не только позволяет получить математические характеристики клеточной популяции, но и дает возможность судить об активности внутриклеточных процессов. Очевидно, что при активации процессов метаболизма в клетке увеличивается ее площадь, ядро становится более рыхлым и увеличивается

в размере [8]. Морфофункциональное состояние лимфоцитов отражают качественные и особенно количественные характеристики клеток.

В [9] осуществляли компьютерную фазовую морфометрию иммунокомпетентных клеток периферической крови и указывали, что увеличение диаметра, периметра и площади клеток соответствует уровню активации лимфоцитов, а фазовая высота и объём характеризуют состояние ядерных структур: чем меньше высота и объём, тем выше пролиферативный потенциал клетки. Проведенные исследования показали, что Т- и В-лимфоциты имеют определенные морфометрические различия. Является неопровержимым фактом, что одним из проявлений реактивности лимфоцитов служит изменение их топографии и, соответственно, их морфометрических параметров. В связи с этим динамика размерных показателей Т- и В-клеток объективно отражает особенности состояния иммунной системы. У соматически здоровых лиц субпопуляции малых и средних лимфоцитов включают 95% от всего количества циркулирующих Т-хелперов и около 50% от общего числа цитотоксических Т-лимфоцитов. Большие лимфоциты представлены оставшейся половиной цитотоксических Т-клеток и натуральными киллерами. Следовательно, анализ распределения лимфоцитов по величине их диаметра помогает с большой долей вероятности характеризовать особенности внутривещного состава иммунокомпетентных клеток. В работе [10] авторы, проводя витальную компьютерную фазовую морфометрию клеток периферической крови, показали, что морфометрические показатели (диаметр, периметр, площадь и объём) отражают морфологические особенности и функциональную полноценность клеток, в частности, уровень пролиферации и дифференцировки лимфоцитов.

Нами предпринята попытка исследовать морфологические особенности клеток периферической крови у больных в активной фазе пневмонии. Эти исследования представляют не только научный, но и практический интерес.

**Материалы и методы.** Обследованы 116 больных внебольничной бактериальной пневмонией разного возраста (деление на возрастные группы произведено согласно рекомендациям семинара геронтологов и ВОЗ (Киев, 1963): 1-я группа – больные молодого возраста (18-44 года), 2-я – больные среднего возраста (45-59 лет) и 3-я – больные пожилого возраста (60-74 года). Все больные не имели сопутствующих аутоиммунных заболеваний и были разделены на группы по полу и возрасту. Больных пневмонией 1-й возрастной группы

было 49 (34 мужчины и 15 женщин), 2-й группы – 32 (22 мужчины и 10 женщин), 3-й группы – 35 (24 мужчины и 11 женщин). Контрольную группу составили 30 практически здоровых человека (16 мужчин и 14 женщин) 18-44 лет, то есть люди молодого возраста. Мы согласны с мнением В.М. Дильмана [11], который, рассматривая одну из моделей развития болезней – онтогенетическую, предлагает отказаться от критерия «возрастной нормы». Он считает, что норма едина, поэтому необходимо основываться на критериях «идеальной нормы» (то есть соотношения возрастных сдвигов для каждого индивидуума к его показателям в возрасте 20-25 лет) или «оптимальной нормы», при которой минимальна частота главных неинфекционных болезней и, соответственно, минимальны нарушения, формирующие эти болезни.

Всем обследованным при поступлении в стационар проведены общий анализ крови и компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови в стандартно приготовленных мазках периферической крови, окрашенных по Паппенгейму. Поскольку показатели морфометрии клеток периферической крови существенно отличаются у мужчин и женщин, анализ их проведен отдельно. С помощью системы анализа изображения, состоящей из микроскопа проходящего света «AxioStar+» фирмы «Carl Zeiss» (объектив 100×МИ), видеокамеры «JVC 1/2», персонального компьютера и программы анализа изображений «Image Tool», была проведена морфометрия клеток крови. Проводили выделение границ клеток, их ядер и измерение диаметров клеток. В каждом наблюдении определяли площадь клеток и ядер 50 лимфоцитов, по два перпендикулярных диаметра 50 лимфоцитов. Всего измерено 7300 лимфоцитов (701 и 800 в контрольных группах женщин и мужчин, и по 745 и 1705, 500 и 1097, 549 и 1203 в группах больных пневмонией женщин и мужчин молодого, среднего и пожилого возраста соответственно). С помощью объективного микрометра была проведена калибровка системы анализа изображения, при которой было найдено соответствие микрометров к пикселям на экране монитора.

Первичные морфометрические показатели – площадь клетки ( $S_k$ ) и площадь ядра ( $S_j$ ) в дальнейшем применяли в расчетах цитоплазматно-ядерного отношения (ЦЯО). Его определяли по формуле:

$$ЦЯО = \frac{S_k - S_j}{S_j}$$

Вычисляли средний диаметр лимфоцита. Полученные результаты обрабатывали после проверки нормальности распределения методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента, статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Анализ полученных результатов показал, что уровень лейкоцитов периферической крови у больных пневмонией 3 групп ( $7,2 \pm 0,35 \cdot 10^9$ /л,  $8,2 \pm 0,77 \cdot 10^9$ /л,  $6,8 \pm 0,49 \cdot 10^9$ /л, соответственно), значимо выше, чем у здоровых ( $5,8 \pm 0,18 \cdot 10^9$ /л). Только у пожилых больных абсолютное число

лимфоцитов ( $1,450 \pm 0,116 \cdot 10^9$ /л) уменьшено относительно контрольной группы ( $2,028 \pm 0,123 \cdot 10^9$ /л) и молодых больных ( $1,835 \pm 0,107 \cdot 10^9$ /л). Относительное число лимфоцитов крови у больных пневмонией существенно уменьшено во всех возрастных группах ( $26,0 \pm 1,54\%$ ,  $25,3 \pm 2,30\%$  и  $24,3 \pm 2,18\%$ , соответственно) по сравнению с контрольной группой ( $34,7 \pm 1,57\%$ ). Относительное и абсолютное число плазмоцитов увеличено у молодых больных пневмонией ( $0,14 \pm 0,05\%$ ,  $0,0085 \pm 0,0032 \cdot 10^9$ /л, соответственно) относительно контроля (0).

**Таблица 1.** Морфометрические показатели лимфоцитов крови женщин больных пневмонией

Морфометрические показатели	Здоровые			1-я группа (18-44 лет)			2-я группа (45-59 лет)			3-я группа (старше 60 лет)		
	М	s	n	М	s	n	М	s	n	М	s	n
площадь лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	122,7	1,68	701	106,5*	1,49	745	114,0*^	1,92	500	122,0 <sup>#,+</sup>	1,75	549
площадь ядра лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	69,6	0,59	701	63,0*	0,60	745	64,5*	0,64	500	68,4 <sup>#,+</sup>	0,60	549
площадь цитоплазмы лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	53,2	1,22	701	43,5*	1,04	745	49,5*^	1,45	500	53,6 <sup>#,+</sup>	1,30	549
ЦЯО лимфоцитов	0,73	0,014	701	0,73	0,075	745	0,73	0,017	500	0,75	0,015	549
диаметр лимфоцитов, мкм	12,3	0,091	701	11,1	0,081	745	11,5^	0,098	500	11,9 <sup>#,+</sup>	0,090	549

*Примечание:* здесь и в табл. 2: \* - достоверность различий между показателями у здоровых и больных  $p < 0,05$ ; # - достоверность различий между показателями у больных 1 и 3 групп  $p < 0,05$ ; + - достоверность различий между показателями у больных 2 и 3 групп  $p < 0,05$ ; ^ - достоверность различий между показателями у больных 1 и 2 групп  $p < 0,05$ ; n - число измеренных клеток в наблюдаемых группах.

**Таблица 2.** Морфометрические показатели лимфоцитов крови мужчин больных пневмонией

Морфометрические показатели	Здоровые			1-я группа (18-44 лет)			2-я группа (45-59 лет)			3-я группа (старше 60 лет)		
	М	s	n	М	s	n	М	s	n	М	s	n
площадь лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	120,1	1,52	800	123,7	1,08	1705	123,5	1,38	1097	118,5	1,20	1203
площадь ядра лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	70,0	0,52	800	70,2	0,43	1705	67,7*^	0,48	1097	68,8 <sup>#,+</sup>	0,45	1203
площадь цитоплазмы лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	50,1	1,12	800	53,4*	0,78	1705	55,8*^	1,04	1097	49,7 <sup>#,+</sup>	0,86	1203
ЦЯО лимфоцитов	0,68	0,013	800	0,85	0,113	1705	0,81*	0,018	1097	0,70 <sup>+</sup>	0,017	1203
диаметр лимфоцитов, мкм	12,3	0,081	800	11,9	0,056	1705	11,9	0,069	1097	11,7 <sup>#,+</sup>	0,061	1203

У пожилых больных пневмонией морфометрические параметры лимфоцитов не изменены по сравнению с контрольной группой (табл. 1 и 2). Площадь клетки, ядра и цитоплазмы лимфоцитов у больных пневмонией женщин молодого ( $106,5$  мкм<sup>2</sup>,  $63,0$  мкм<sup>2</sup>,  $43,5$  мкм<sup>2</sup>, соответственно) и среднего возраста ( $114,0$  мкм<sup>2</sup>,  $64,5$  мкм<sup>2</sup>,  $49,5$  мкм<sup>2</sup>, соответственно) уменьшается по сравнению с показателями контрольной группы ( $122,7$  мкм<sup>2</sup>,  $69,6$

мкм<sup>2</sup>,  $53,2$  мкм<sup>2</sup> соответственно) и пожилыми больными ( $122,0$  мкм<sup>2</sup>,  $68,4$  мкм<sup>2</sup>,  $53,6$  мкм<sup>2</sup>, соответственно). Значимы различия площади клетки и цитоплазмы лимфоцитов между 1-й и 2-й группами больных пневмонией женщин (см. табл. 1). У больных пневмонией мужчин молодого ( $53,4$  мкм<sup>2</sup>) и среднего возраста ( $55,8$  мкм<sup>2</sup>) цитоплазма лимфоцитов увеличивается по сравнению со здоровыми добровольцами ( $50,1$  мкм<sup>2</sup>) и пожилыми больными ( $49,7$  мкм<sup>2</sup>).

У больных пневмонией мужчин среднего возраста по сравнению с контрольной группой (70,0 мкм<sup>2</sup>, 0,68) и пожилыми (68,8 мкм<sup>2</sup>, 0,70) уменьшается площадь ядра лимфоцитов (67,7 мкм<sup>2</sup>) и увеличивается ЦЯО (0,81). Есть различия у больных пневмонией мужчин между 1-й и 3-й, 2-й и 3-й группами по размерам площади клетки, ядра, цитоплазмы, диаметру лимфоцитов, а также между 1-й и 2-й группами по площади ядра и цитоплазмы (см. табл. 2).

Таким образом, у пожилых больных пневмонией размеры лимфоцитов не изменяются относительно здоровых, что свидетельствует о нарушении иммунного ответа на воспаление в этой группе. В группах больных пневмонией молодого и среднего возраста выявлена различная реакция лимфоцитов у мужчин и женщин. Характер изменений морфометрических показателей лимфоцитов (уменьшение площади лимфоцитов, их ядра, цитоплазмы, отсутствие увеличения ЦЯО) может свидетельствовать о снижении метаболизма в лимфоцитах при развитии воспаления легких у женщин в молодом и среднем возрасте [8], а вследствие этого – и о снижении уровня активации лимфоцитов у них. В доступной нам литературе мы не нашли указаний о существенных различиях в функционировании клеточного звена иммунной системы у взрослых женщин и мужчин. А.М. Королюк [12] отмечает половое различие в характере сдвигов в функции иммунной системы у подростков. Можно предположить разную реакцию лимфоцитов на фоне различного гормонального фона в группах людей молодого и среднего возраста.

Популяция лимфоцитов неоднородна и представляет собой сложную мозаику клеточных форм, отличающихся друг от друга, как по функции, так и по микроструктуре. Лимфоциты имеют разные размеры: так, незрелые тимоциты (*cytCD3+TdT+*) являются крупными бластами и клетками среднего размера. *CD45RO+* T-клетки (T-клетки памяти) по размеру несколько больше *CD45RA+* клеток (наивных), но мельче активированных T-клеток. Первичные фолликулы лимфоцитов и зона мантии вторичных фолликулов состоят из малых лимфоцитов [13]. Кроме того, известно, что естественные киллерные клетки имеют морфологию больших гранулярных лимфоцитов, причем их количество увеличивается в старших возрастных группах [14]. Возможно, изменение соотношений субпопуляций лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови, а вследствие этого – размеров клеток у мужчин и женщин молодого и среднего

возраста происходит по-разному, поэтому по-разному изменяются морфометрические параметры лимфоцитов.

**Выводы:** реакция лимфоцитов на воспаление легких у мужчин и женщин молодого и среднего возраста различная: у мужчин площадь цитоплазмы лимфоцитов увеличивается, а площадь клетки не изменяется, у женщин уменьшается площадь ядра, цитоплазмы и лимфоцита в целом, что косвенно указывает на снижение уровня активации лимфоцитов у женщин в молодом и среднем возрасте при развитии пневмонии. У пожилых больных пневмонией размеры лимфоцитов не изменяются относительно контрольной группы, что свидетельствует о нарушении иммунного ответа на воспаление и что следует учитывать при лечении больных с данной патологией.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Чучалин, А.Г. Решение экспертного совещания «Новые возможности лечения внебольничной пневмонии и бактериального синусита» / А.Г. Чучалин, Ю.Б. Белоусов, А.И. Синопальников, Р.С. Козлов // Пульмонология. 2007. №1. С.117-120.
2. Fine, M.J. Processes and outcomes of care for patients with community-acquired pneumonia: results from the Pneumonia Patient Outcomes Research Team / M.J. Fine, R.A. Stone, D.E. Singer et al. // Arch. Intern Med. 1999. 159(9). P. 970-980.
3. Автандилов, Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. 240 с.
4. Davey, D.D. Competency assessment and proficiency testing / D.D. Davey, E. McGoogan, T.M. Somrak et al. // Acta Cytol. 2000. V. 44. P. 939-943.
5. Погорелов, В.М. Принципы и возможности стандартизации морфоцитохимической диагностики острых лейкозов / В.М. Погорелов, О.А. Дягилева, С.А. Луговская, Г.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. 2006. №7. С. 20-22, 35-38.
6. Погорелов, В.М. Ключи к диагностике острых лейкозов (по следам утренних конференций института гематологии и интенсивной терапии гематологического научного центра РАМН) / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец // Гематология и трансфузиология. 2008. Т. 53, №5. С. 27-31.
7. Шишина, Р.Н. Морфометрическая характеристика лимфоцитов при апластической анемии / Р.Н. Шишина, Д.Ф. Рахманова, С.Г. Потапова и др. // Гематол. и трансфузиол. 2009. Т. 54, № 2. С. 19-22.
8. Новодержкина, Ю.К. Морфометрические показатели лимфоцитов периферической крови в условиях 120-суточной антиортостатической гипокинезии. / Ю.К. Новодержкина, В.В. Караитин, Б.В. Моруков и др. // Клиническая лабораторная диагностика. 1996. №1. С. 40-41.
9. Детиненко, И.Н. Сравнительная оценка информативности клеточной морфометрии и пункционной биопсии при хронической нефропатии трансплантата. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2006. 22 с.

10. *Виноградская, Ю.Б.* Морфофункциональное состояние клеток крови у женщин с физиологической беременностью в I триместре и при угрозе самопроизвольного выкидыша / *Ю.Б. Виноградская, И.А. Василенко, В.Е. Радзинский, В.Б. Метелин* // Материалы конференции «Новое в гематологии и клинической трансфузиологии. Москва, 15-16 апреля 2003 г. Проблемы гематологии и переливания крови. 2003. №2. С. 35.
11. *Дильман, В.М.* Хронобиологические аспекты геронтологии и гериатрии // *Хронобиология и хрономедицина* / Под ред. *Ф.И. Комарова*. М.: Медицина, 1989. С. 323-335.
12. *Королюк, А.М.* Возрастные особенности иммунитета // *Медицинская микробиология, вирусология, иммунология*. – М.:МИА, 2002. С. 291-303.
13. *Тупицын, Н.Н.* Лимфоциты и иммунокомпетентная система // *Руководство по гематологии: в 3 т. Т 1.* / Под ред. *А.И.Воробьева*. – М.: Ньюдиамед, 2002. С. 106-129.
14. *Семенов, В.Ф.* Возрастной иммунодефицит и его коррекция / *В.Ф. Семенов, И.В. Мирошниченко, В.Н. Столникова, Т.В. Левашова* // *Руководство по геронтологии* / Под ред. *В.Н. Шабалина*. – М.: Цитадель-трейд, 2005. С. 187-204.

## COMPUTER MORPHOMETRY OF PERIPHERIC BLOOD LYMPHOCYTES AT PATIENTS OF DIFFERENT AGE WITH PNEUMONIA

© 2010 I.L. Davydkin, O.I. Fyodorova, N.O. Zaharova, A.V. Seleznyov

Samara State Medical University

With the purpose of studying the blood reaction of different ages and sex patients with pneumonia are surveyed 116 patients with out-hospital bacterial pneumonia (80 men and 36 women), which have been parted on three age groups: 18-44 years, 45-59 and 60-74 years, control groups have made 16 and 14 practically healthy men and women, accordingly. All surveyed leads a computer morphometry of peripheral blood lymphocytes. Different reaction of lymphocytes to pneumonia at men and women young and middle age is taped. Indirect indicatings on depression of a level of lymphocytes activation at women in young and middle age are received at development of pneumonia. At elderly patients with pneumonia the sizes of lymphocytes do not change concerning control groups that testifies to disturbance of the immune answer to inflammation.

Keywords: *computer morphometry, lymphocytes, pneumonia, blood*

---

*Igor Davydkin, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Hospital Therapy with Course of Transfusiology. E-mail: [dagi2006@rambler.ru](mailto:dagi2006@rambler.ru)*

*Olga Fyodorova, Doctor of Clinical-diagnostical Laboratory. E-mail: [olga10174@mail.ru](mailto:olga10174@mail.ru)*

*Nataliya Zaharova, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Geriatrics Department. E-mail: [geriatry@mail.ru](mailto:geriatry@mail.ru)*

*Aleksey Seleznyov, Candidate of Medicine, Assistant at the Department of Hospital Therapy with Course of Transfusiology. E-mail: [samaramed@inbox.ru](mailto:samaramed@inbox.ru)*