

Katedra i II Klinika Chorób Wewnętrznych. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Alfred R. Tuszkiewicz

Jan KOWALEWSKI

Morfologiczne i cytochemiczne badania komórek skórno-wysięku zapalnego i komórek krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na różnego typu białaczki

Morphological and Cytochemical Studies of Inflammatory Exudate Cells and Peripheral Blood Cells in Healthy Persons and Leukaemic Patients

Krwinki białe przebywają we krwi obwodowej tylko przez niewielką część swego życia. Wg Athens'a (4) oraz Craddock'a (10) czas życia granulocytów wynosi 9—13 dni. Około połowę tego czasu spędzają one w szpiku kostnym. We krwi przebywają 9—36 godz. (średnio 24 godz.), po czym przechodzą do tkanek. Ruch granulocytów ze szpiku kostnego przez krew do tkanek jest ruchem jednokierunkowym. Ilość granulocytów w tkankach zbliżona jest do ilości dojrzałych granulocytów w szpiku kostnym i jest 30-krotnie większa od ilości tych komórek, krążących we krwi.

Również limfocyty po opuszczeniu utkania chłonnego przechodzą drogą naczyń chłonnych do krwi i następnie do tkanek. Ilość limfocytów w tkankach jest 400-krotnie większa od ich ilości we krwi krążącej. Czas życia limfocytów i okres ich przebywania we krwi nie są dokładnie znane, ponieważ komórki te — w przeciwieństwie do granulocytów — mogą powracać z tkanek do krwi lub limfy i ponownie przechodzić do tkanek. W tkankach część ich ulega różnokierunkowym przekształceniom w komórki tkankowe, komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego, a w szpiku kostnym — w komórki macierzyste tkanki krwiotwórczej (43).

Fakty powyższe zdają się świadczyć o tym, że właściwym terenem działania jądrzastych komórek krwi są tkanki, a krew stanowi środek ich transportu z ośrodków wytwarzania do tkanek.

Jedną z funkcji leukocytów w tkankach jest ich udział w odczynie zapalnym. Aktywność biologiczna tych komórek w ognisku zapalnym ulega zmianom. Wskazują na to wyniki niektórych badań m. in. Antonioliego (2), który wykazał znaczne różnice metabolizmu leukocytów krwi obwodowej i zapalnego wysięku otrzewnowego u świń morskich oraz Wulffa (40—42), który stwierdził różnice w aktywności fosfataz zasadowej i kwaśnej, fosforylasy, dehydrogenazy burszynyazowej, dehydrogenazy NAD i NADP oraz dehydrogenazy α -glicerofosforanowej w komórkach skórno-wysięku zapalnego w porównaniu z odpowiadającymi im komórkami jądrzastymi krwi obwodowej u ludzi zdrowych.

Wiadomo również, że w wielu stanach patologicznych odczyn zapalny tkanki przebiega nieprawidłowo. Badania Riisa (32), Torre i Leikina (37), Boggsa (6), Perille i Fincha (29) oraz Aleksandrowicza i wsp. (1) dowiodły istnienia ilościowych zmian składu komórkowego skórno-wysięku zapalnego u chorych na białaczkę. Nie dały one jednak odpowiedzi na pytanie, czy obok zmian ilościowych w komórkach wysięku zapalnego u chorych na białaczkę zachodzą również zmiany jakościowe, polegające na zmianach metabolizmu i aktywności biologicznej tych komórek.

Praca niniejsza jest próbą odpowiedzi na powyższe pytanie. Przyjmując, zgodnie z opinią większości autorów głównie hematogenne pochodzenie komórek w ognisku zapalnym, podjęto badania aktywności biologicznej komórek krwi obwodowej i odpowiadających im komórek wysięku zapalnego u ludzi zdrowych i chorych na różnego typu białaczkę. W badaniach zastosowano metodę tzw. „okienka skórno-wysięku” Re buck a (30), przy pomocy której uzyskać można dogodny do badań u ludzi model odczynu zapalnego oraz posłużono się oznaczeniem zdolności żernej, aktywności niespecyficznego fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej, esterazy niespecyficznego fosfatazy, aminopeptydazy, dehydrogenazy bursztynianowej i dehydrogenazy NADPH₂ oraz zawartości glikogenu i lipidów, jako wybranymi wskaźnikami stanu czynnościowego badanych komórek.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania wykonano u 33 chorych na różne typy białacek oraz u 34 osób zdrowych lub chorych bez zmian hematologicznych (nie powikłana choroba wrzodowa, choroba wieńcowa, nadciśnienie samoistne, nerwice). Ostatni stanowili grupę kontrolną. Wśród chorych na białaczkę było 11 przypadków przewlekłej białaczki granulocytowej, w tym 9 mężczyzn i 2 kobiety w wieku od 29 do 68 lat, 13 przypadków przewlekłej białaczki limfatycznej, w tym 11 mężczyzn i 2 kobiety w wieku od 51 do 71 lat oraz 9 przypadków białacek ostrych, w tym 5 mężczyzn i 4 kobiety w wieku od 14 do 64 lat. W grupie białacek ostrych rozpoznano w oparciu o kryteria cytologiczne wg Hayhoe (14) białaczkę mieloblastyczną u 6 chorych, promielocytową u 2 chorych i ostrą białaczkę limfatyczną u 1 chorej.

Badania rozpoczynano o godz. 9 rano. Po odkażeniu skóry przedramion po stronie zginaczy zdrapywano przy pomocy jałowego skalpela naskórek na obszarze około 8 × 8 mm, obnażając brodawkowatą warstwę skóry. Na uszkodzenie nakładano jałowe szkiełko nakrywkowe, które przytwierdzano przy pomocy jałowego opatrunku plasterkowego. Uraz oraz drażnienie skóry przez przylegające szkiełko są bodźcami, wywołującymi odczyn zapalny w skórze. Komórki gromadzące się w wysięku zapalnym przyczepiają się do dolnej powierzchni szkiełka i po jego zdjęciu mogą być poddane badaniom przy pomocy odpowiednich metod i oglądane pod mikroskopem.

U każdego badanego wykonywano po 3 uszkodzenia. Szkiełko nakrywkowe zmieniano przez 14 godzin co godzinę, następnie po 16, 18, 20, 22 i 24 godz. od rozpoczęcia badania. W ten sposób u każdego z badanych uzyskiwano po 3 serie, składające się z 19 preparatów z każdego uszkodzenia. Badania cytologiczne i cytochemiczne komórek wysięku zapalnego wykonywano wg następującego schematu: W preparatach uzyskanych po 2, 5, 8, 11, 14 i 20 godz. oznaczano aktywność fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej oraz dehydrogenazy NADPH₂. W preparatach po 3, 6, 9, 12, 18 i 24 godz. obserwowano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, wykonywano również barwienie na lipidy i barwienie wg metody May-Grünwald-

-Giemzy. W preparatach uzyskanych po 4, 7, 10, 13, 16 i 22 godz. badano aktywność aminopeptydazy, esterazy niespecyficznej i zawartość glikogenu. Odczyny na aktywność dehydrogenaz wykonywano zaraz po zdjęciu szkiełek, pozostałe zaś następnego dnia po zebraniu całej serii preparatów. Preparaty przeznaczone do badań cytochemicznych po wysuszeniu na powietrzu przechowywano w temp. -5°C .

U każdego chorego oznaczano leukocytozę i skład odsetkowy krwinek białych oraz wykonywano rozmazy krwi obwodowej do badań cytochemicznych. Z rozmazami krwi postępowano w ten sam sposób, jak z preparatami komórek wysięku zapalnego. Badania kontrolne u osób hematologicznie zdrowych przeprowadzano w tym samym dniu i w ten sam sposób, jak u chorych na białaczkę. Uzyskane preparaty komórkowe były przechowywane w tych samych warunkach, a do reakcji cytochemicznych używano tych samych odczynników.

Do badań zdolności żernej komórek wysięku zapalnego wykonywano czwarte „okienko skórne” w dniu wykonywania poprzednich badań lub w innym terminie. Szkiełka nakrywkowe zmieniano co godzinę. Po 3 i 12 godz. na powierzchnię uszkodzenia nakładano zawiesinę zabitych bakterii szczepu *staphylococcus aureus* typ Oxford, zawierającą około 4 milionów drobnoustrojów w 1 mm^3 . Preparaty uzyskane po 4 i 13 godz. barwiono wg metody May-Grünwald-Giemzy. Mikroskopowo określano odsetek i rodzaj komórek fagocytykujących bakterie. Liczono po 200 komórek w preparacie.

Do oznaczeń aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) zaadaptowano metodę de Souza i Kothare'a (36). Płyn inkubacyjny nakraplano na nie utrwalone, wysuszone na powietrzu preparaty, które inkubowano w wilgotnej kamerze w temp. 37°C przez 90 min. Po inkubacji płyn zlewano, preparaty utrwalano w płynie Bakera i po opłukaniu zamykano w żelu glicerynowym.

Aktywność dehydrogenazy NADPH_2 oznaczano zmodyfikowaną metodą Farbera (12). Preparaty nie utrwalone inkubowano w wilgotnej kamerze w temp. 37°C przez 30 min. w płynie o następującym składzie: 0,1 M bufor fosforanowy, pH 7,4—1,8 ml, 1% roztwór wodny NADPH_2 — 0,6 ml, 0,1% roztwór wodny Nitro BT — 1,4 ml, 0,004 M roztwór chlorku wapnia i 0,004 M roztwór chlorku glinu po 0,6 ml, woda destylowana do 6 ml. Po inkubacji z preparatami postępowano tak, jak przy oznaczaniu dehydrogenazy bursztynianowej.

Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP-aza) oznaczano met. Kapłowa w modyfikacji Hayhoe i Quaglino (15) a fosfatazę kwaśną (ACP-aza) wg Burstnena (28). Aktywność esterazy niespecyficznej (En) wykazano met. Braunsteina (17), aktywność aminopeptydazy met. Burstnena i Folka (8). Preparaty kontrolne inkubowano w płynach, nie zawierających odpowiednich substratów.

Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP-aza) oceniano metodą półilościową wg Kapłowa (18), obliczając tzw. wartość globalną, która wyraża sumę aktywności enzymu w 100 granulocytach wg skali 0—4. Aktywność pozostałych enzymów oceniano w zależności od ilości i wielkości ziarnistości barwnika, powstałych w komórkach w wyniku reakcji.

Zawartość glikogenu oznaczano met. PAS wg McManusa i Mowry'ego (23). Preparaty kontrolne po utrwaleniu poddawano trawieniu 1% roztworem diastazy słodowej. Zawartość glikogenu w limfocytach oceniano metodą półilościową wg Mitusa i wsp. (25).

Ciała tłuszczowe wykazywano met. Lisona (21).

Otrzymane wyniki fagocytozy, aktywności fosfatazy zasadowej i zawartości glikogenu w limfocytach poddano analizie statystycznej wg testu Studenta (34), przyjmując za statystycznie znamienne wartości $P < 0,05$.

WYNIKI BADAŃ, OMÓWIENIE I WNIOSKI

1. Morfologia komórek wysięku zapalnego

U osób zdrowych pierwsze komórki wysięku zapalnego pojawiają się na szkiełkach po 2—3 godz. od chwili zdrapania naskórka, czasem już po 1 godz. Są to komórki o jądrze podzielonym, przedstawiające ten sam wygląd i powinowactwo do barwników, podobne do obojętnochłonnych granulocytów wielojądrzastych krwi. W porównaniu do tych ostatnich niektóre z komórek wielojądrzastych wysięku są nieco większe, o obfitszej, jakby obrzmiałej cytoplazmie. Segmenty ich jąder są nieco grubsze, o mniej zbitej chromatynie. Po 2—4 godz. pojawiają się pierwsze komórki jednojądrzaste, morfologicznie odpowiadające histiocytom tkankowym. Po 6—8 godz. wśród komórek wysięku obserwuje się komórki monocytopodobne, mniejsze od histiocyto-
w. Ilość tych komórek w miarę upływu

Tab. 1. Skład komórkowy skórno-
Cellular composition of inflammatory exudate after 3, 6, 9, 12, 18 and

Nazwa choroby	Ilość badanych	po 3 godz.		po 6 godz.	
		% kom. wielojądrz.	% kom. jednojądrz.	% kom. wielojądrz.	% kom. jednojądrz.
Zdrowi	20	zakr. 94—99	1—6	42—88	12—58
		śred. 96,1	3,9	68,3	31,7
		śr. odch. $\pm 1,6$	$\pm 1,6$	$\pm 11,6$	$\pm 11,6$
Przewlekła białaczka granulocyt.	11	zakr. 90—100	0—10	62—96	4—38
		śred. 97,8	2,2	80,3	19,7
		śr. odch. $\pm 1,9$	$\pm 1,9$	$\pm 3,8$	$\pm 3,8$
Ostra białaczka szpikowa	8	zakr. 99—100	0—10	88—100	0—12
		śred. 99,7	0,3	94,8	5,2
		śr. odch. $\pm 0,6$	$\pm 0,6$	$\pm 6,0$	$\pm 6,0$
Przewlekła białaczka limfatyczna	13	zakr. 92—100	0—8	62—90	10—38
		śred. 96,9	3,1	75,8	24,2
		śr. odch. $\pm 2,3$	$\pm 2,3$	$\pm 9,0$	$\pm 9,0$
Ostra białaczka limfatyczna	1	—	—	—	—

czasu stale wzrasta. Pojawiają się również komórki małe, przypominające wyglądem małe limfocyty. Ilość tych komórek nie przekracza 1—2%.

Liczba komórek wysięku z godziny na godzinę wzrasta. W preparatach uzyskanych po 12—14 godz. stwierdza się zwarte skupienia, liczące po kilka tysięcy komórek. W miarę upływu czasu w wysięku zwiększa się udział komórek jednojądrzastych. Po 6 godz. stanowią one około 30%, a po 9—12 godz. około 50% wszystkich komórek wysięku. Odsetek ich wzrasta jeszcze w dalszych godzinach, przekraczając niekiedy 80%. Komórki jednojądrzaste stają się stopniowo większe i przyjmują wygląd dużych makrofagów. Po 18 godz. obserwuje się narastanie ilości komórek wielojądrzastych, które po 24 godz. ponownie stanowią większość komórek wysięku. W wysięku spotyka się również granulocyty kwasochłonne oraz zasadochłonne, lecz zazwyczaj w ilości znacznie mniejszej aniżeli we krwi obwodowej. Nie stwierdzono różnic w składzie i ilości komórek wysięku w zależności od wieku ani od płci badanych. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną ilość komórek wysięku i jego skład jest taki sam, jak u zdrowych. Tylko u 1 chorego wysięk był mniej obfity, a odsetek komórek jednojądrzastych mniejszy.

18 i 24 godz. u osób zdrowych i chorych na różnego typu białaczki
24 hours of inflammation in healthy persons and in leukaemic patients

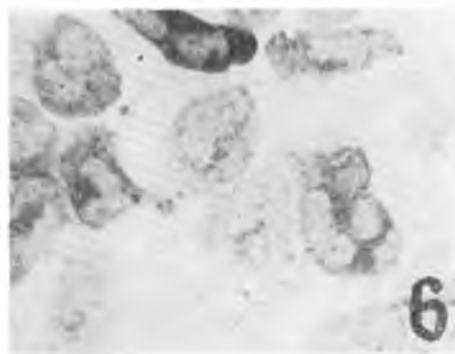
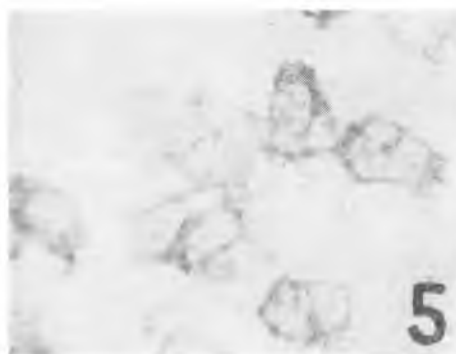
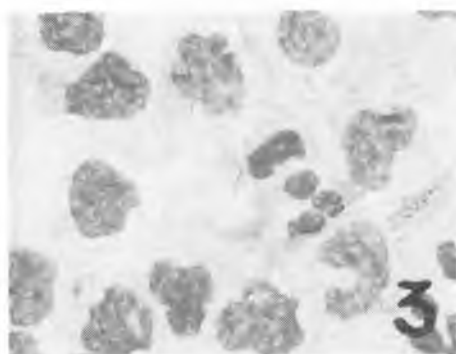
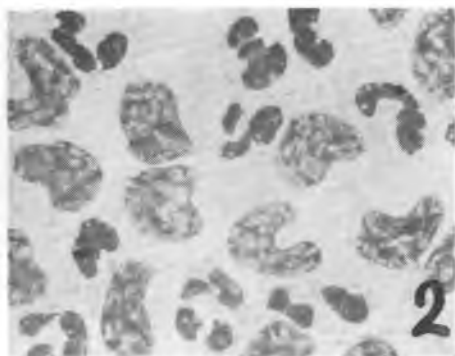
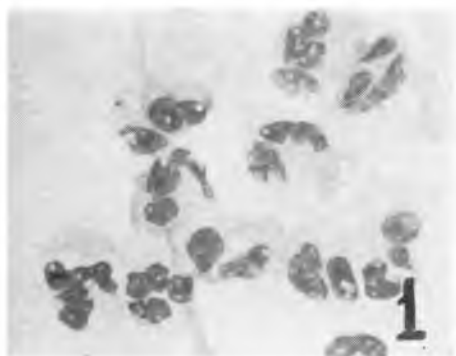
po 9 godz.		po 12 godz.		po 18 godz.		po 24 godz.	
% kom. wielo- jądrz.	% kom. jedno- jądrz.	% kom. wielo- jądrz.	% kom. jedno- jądrz.	% kom. wielo- jądrz.	% kom. jedno- jądrz.	% kom. wielo- jądrz.	% kom. jedno- jądrz.
40—68 58,2 ±10,5	32—60 41,8 ±10,5	18—77 48,7 ±14,0	23—82 51,3 ±14,0	22—50 34,6 ±7,6	20—78 51,4 ±15,2	50—78 65,4 ±7,6	22—80 48,6 ±15,2
55—88 74,2 ±9,1	12—45 25,8 ±9,1	48—90 64,1 ±11,9	10—52 35,9 ±11,9	36—68 50,2 ±12,5	32—63 49,8 ±12,5	50—96 70,8 ±14,7	4—50 29,2 ±14,7
87—100 94,1 ±7,1	0—13 5,9 ±7,1	76—100 90,5 ±11,1	0—24 9,5 ±11,1	66—100 85,8 ±15,0	0—34 14,2 ±15,0	78—98 89,8 ±8,2	2—22 10,2 ±8,2
48—80 60,3 ±9,0	20—52 39,7 ±9,0	26—72 48,8 ±12,5	28—74 51,2 ±12,5	20—62 36,3 ±11,4	38—80 63,7 ±11,4	24—72 50,8 ±14,2	28—76 49,2 ±14,2
100	—	100	—	100	—	—	—

U chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową pierwsze granulocyty wysięku pojawiają się z opóźnieniem a udział komórek jednojądrzastych jest często mniejszy. W wysięku nie stwierdzono niedojrzałych granulocytów niezależnie od ich ilości we krwi obwodowej. Tylko u 1 chorego w preparatach z pierwszej połowy cyklu obecne były pojedyncze metamielocyty.

Tab. 2. Fagocytoza *staphylococcus aureus* przez komórki skórno wysięku za
typu
Inflammatory exudate cells: phagocytosis of *Staphylococcus aureus* after 4 and

Nazwa choroby	Ilość chorych	Po 4 godzinach trwania				
		Granulocyty			Kom.	
		w % wszystkich komórek wysięku		% fagocyty- jących granulo- cytów	w % kom.	
		Fagocyt +	Fagocyt. —		Fagocyt. +	
Zdrowi	12	zakres	11—21	70—82	12—24,5	0—1,5
		średnia	16,2	75	17,4	0,5
		śr. odch.	±2,8	±4,0	±3,3	±0,5
Przewlekła białaczka limfatyczna	10	zakres	10—24	61—84,5	10,6—28,2	0—1,5
		średnia	15,5	77,1	16,7	0,5
		śr. odch.	±4,6	±7,2	±5,5	±0,5
Przewlekła białaczka granulocyt.	10	zakres	6,5—13,5	78—90	7,1—14,6	0—1
		średnia	9,8	85,2	10,3	0,2
		śr. odch.	±2,0	±4,5	±2,4	±0,3
Ostra białaczka szpikowa	7	zakres	6—14	86—94	6—14	—
		średnia	10,3	87,7	10,3	—
		śr. odch.	—	—	—	—
Ostra białaczka limfatyczna	1	—	—	—	—	—

Największe odchylenia składu komórkowego wysięku stwierdza się u chorych na ostre białaczki. U 6 chorych na białaczkę mieloblastyczną i u chorej na białaczkę limfatyczną ostrą wysięk zapalny był bardzo skąpy i składał się w 80—100% z komórek wielojądrzastych. U jednego z tych chorych w żadnym z preparatów komórek nie znaleziono. U 2 chorych na białaczkę promielocytową o klinicznie podostrym przebiegu wysięk był również skąpokomórkowy, a ilość komórek jednojądrzastych dochodziła do 6% u jednego i do 30% u drugiego chorego. W żadnym z preparatów nie obserwowano niedojrzałych komórek białaczkowych.







Najmniej obfity w komórki wysięk z całkowitym brakiem lub tylko nielicznymi komórkami wielojądrzastymi występował u chorych ze skrajnie niską ilością dojrzałych granulocytów obojętnochłonnych we krwi. W jednym przypadku białaczki mieloblastycznej badanie powtórzone po uzyskaniu całkowitej remisji klinicznej. Stwierdzono zupełną normalizację składu komórkowego wysięku. W tabeli 1 zestawiono procen-

palnego po 4 i 13 godz. trwania zapalenia u osób zdrowych i chorych na różnego białaczki

13 hours of inflammation in healthy persons and in leukaemic patients

zapalenia		Po 13 godzinach trwania zapalenia					
jednojądrzaste		Granulocyty			Kom. jednojądrzaste		
wszystkich wysięku	% fagocy-tujących kom. jednojądr.	w % wszystkich komórek wysięku		% fagocy-tujących granulocytów	w % wszystkich komórek wysięku		% fagocy-tujących jednojądrzastych
		Fagocyt +	Fagocyt. —		Fagocyt. +	Fagocyt. —	
3—12,5 8,3 ±3,0	0—21,4 6,4 ±5,6	2,5—10 6,0 ±2,0	36—57 43,4 ±6,2	5—19,3 12,3 ±4,5	10—18 13,7 ±2,2	31—47 36,9 ±4,3	20,3—33,3 27,0 ±3,9
2—13,5 6,9 ±3,9	0—16,6 6,7 ±6,4	2—10 6,2 ±2,7	35—66,5 47,6 ±11,1	4,9—16,2 11,5 ±4,7	8,5—17 12,7 ±3,4	19,5—42 33,5 ±9,2	21,7—31,5 27,5 ±3,3
2—9,5 4,9 ±2,8	0—11,7 3,0 ±4,2	1,5—6,5 4,5 ±1,7	38—73,5 55,9 ±10,8	2,3—11,1 7,5 ±2,8	6—16 10,5 ±3,1	15—47 29,1 ±7,0	17,9—34,7 27,1 ±7,2
—	—	5—12,5 8,3 ±2,5	72,5—94 84,2 ±8,6	5,2—14,7 8,9 ±3,5	0—3,5 1,2 ±1,5	0—12 6,3 ±4,9	0—25 16,0 ±13,8
—	—	12,5	87,5	12,5	—	—	—

towy skład komórek wysięku zapalnego w poszczególnych grupach badanych.

Skład komórkowy wysięku zapalnego i dynamika jego przekształceń wykazują u osób zdrowych dużą stałość. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami innych autorów, m.in. Riisa (32), Riisa i Wulffa (33) oraz autorów polskich Aleksandrowicza i wsp. (1), Kowala (19) oraz Kuńskiego i Rogoża (20).

Wyniki badań u chorych na białaczki są zgodne z wynikami Riisa (32), Torre i Leikina (37) oraz Aleksandrowicza

i wsp. (1). Potwierdzają one obserwacje, że do ogniska zapalnego migrują jedynie dojrzałe granulocyty, natomiast ich prekursorzy, niezależnie od ilości we krwi i stopnia dojrzałości nie przekraczają bariery krew-tkanek. Mechanizm wybiórczej migracji do obszaru zapalenia tylko dojrzałych granulocytów nie jest wyjaśniony. Zdaje się odgrywać tu rolę brak oddziaływania niedojrzałych granulocytów na bodźce chemotaktyczne. Wyniki badań u chorych na ostre białaczki świadczą o tym, że prawidłowy, dostatecznie obfity w komórki odczyn zapalny nie może się rozwinąć, jeżeli we krwi obwodowej ilość dojrzałych, zdolnych do migracji granulocytów obojętnochłonnych jest zbyt niska. Przyczyny granulocytopenii zdają się nie mieć znaczenia, bowiem podobnie skąpo komórkowy wysięk zapalny obserwował Riis (32) u chorych z agranulocytozą a Page i Good (27) u chorego z okresową neutropenią.

2. Fagocytoza komórek wysięku zapalnego

Zarówno u osób zdrowych, jak u chorych część komórek wysięku zapalnego fagocytuje bakterie nałożone na powierzchnię uszkodzonej skóry. Zdolność żerna komórek wysięku jest różna w poszczególnych grupach badanych. Wyniki badań zestawiono w tabeli 2. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną zdolność żerna komórek wysięku jest podobna, jak u osób zdrowych. W grupie chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową stwierdzono statystycznie istotne ($P < 0,01$) obniżenie zdolności żernej granulocytów wysięku. Podobnie obniżoną zdolność żerną wykazują granulocyty wysięku chorych na ostrą białaczkę szpikową.

Fagocytoza bakterii przez komórki zapalne stanowi jeden z podstawowych mechanizmów obronnych ustroju przeciw zakażeniu bakteryjnemu. Miles i wsp. (24) wykazali, że zasadnicze znaczenie w tej obronie mają już pierwsze godziny po wtargnięciu bakterii do tkanek. Jeżeli do miejsca zakażenia granulocyty migrują szybko i w dostatecznej ilości, szybko zaczyna się fagocytoza, skutecznie zapobiegająca rozmnażaniu się bakterii i przenikaniu ich w głąb tkanek.

Większa podatność na zakażenia bakteryjne chorych na białaczki szpikowe, zwłaszcza ostre, wydaje się w dużej mierze zależna od niedostatecznej migracji granulocytów do ogniska zapalnego i ich obniżonej zdolności żernej.

3. Cytochemia komórek wysięku zapalnego krwi obwodowej

Niespecyficzną fosfatazą zasadową (ALP-aza). Spośród komórek wysięku zapalnego aktywność tego enzymu wykazuje tylko część granulocytów obojętnochłonnych. Nasilenie reakcji w poszczególnych komórkach waha się od kilku brązowych ziaren do wypeł-

Tab. 3. Aktywność fosfatazy zasadowej granulocytów krwi obwodowej i skórno-wysięku zapalnego po 5, 8, 11, 14 i 20 godz. u osób zdrowych i chorych na różnego typu białaczki

Nonspecific alkaline phosphatase activity of granulocytes in the peripheral blood and in the inflammatory exudate after 5, 8, 11, 14 and 20 hours of inflammation in healthy persons and in leukaemic patients .Score according to K a p l o w

Nazwa choroby	Ilość chorych	Globalna wartość fosfatazy zasadowej						
		Dojrzałe granulocyty krwi obwodowej	Granulocyty wysięku zapalnego					
			po 5 godz.	po 8 godz.	po 11 godz.	po 14 godz.	po 20 godz.	
Zdrowi	34	zakres średnio śr. odchyl.	12—82 36,0 ±20,4	7—90 36,9 ±19,6	9—128 40,1 ±22,6	20—110 52,1 ±25,4	12—106 48,2 ±24,1	12—92 42,9 ±21,1
Przewlekła białaczka granulocyt.	11	zakres średnio śr. odchyl.	0—5 1,0 ±1,8	0—18 6,7 ±6,1	0—28 11,3 ±10,1	6—46 22,4 ±16,2	3—42 17,9 ±15,6	4—42 17,0 ±14,4
Ostra białaczka szpikowa	8	zakres średnio śr. odchyl.	0—8(76) *) 13,7 ±3,5	0—7(16) 5—6 ±2,9	2—9(35) 11,8 ±3,1	2—15(70) 18,0 ±5,3	0—8(64) 13,7 ±3,4	0—9(54) 12,5 ±4,0
Przewlekła białaczka limfatyczna	13	zakres średnio śr. odchyl.	18—186 77,1 ±49,2	20—138 71,4 ±34,7	28—163 83,4 ±41,4	51—220 102,7 ±54,6	38—180 97,6 ±44,3	40—182 85,5 ±38,7
Ostra białaczka limfatyczna	1		—	—	—	10	—	—

*) W nawiasach globalna wartość fosfatazy zasadowej granulocytów chorego, otrzymującego Encorton w ilości 100 mg/dobę przez okres 3 tygodni.

niających całą protoplazmę precypitatów. W preparatach krwi obwodowej aktywność fosfatazy zasadowej wykazują tylko obojętnochłonne granulocyty o jądrze podzielonym lub pałeczkowatym. Wartość globalna aktywności ALP-azy granulocytów wysięku jest początkowo mniej więcej równa, a w dalszych godzinach cyklu zapalnego wyższa aniżeli granulocytów krwi obwodowej. Wyniki badań zestawiono w tabeli 3.

W grupie chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową aktywność fosfatazy zasadowej granulocytów wysięku jest obniżona ($P < 0,01$). Fosfatazododatnie granulocyty wysięku stwierdzono jednak i u tych chorych, u których odczyn w granulocytach krwi obwodowej był ujemny. Fakt ten świadczy o tym, że granulocyty białaczkowe nie są pozbawione możliwości wytwarzania lub aktywowania ALP-azy pod wpływem bodźców środowiska zapalnego. Statystycznie istotne zmniejszenie aktywności ALP-azy granulocytów wysięku ($P < 0,05$) stwierdzono również u chorych na ostrą białaczkę szpikową. U większości chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną aktywność ALP-azy granulocytów wysięku jest silniejsza aniżeli u osób zdrowych ($P < 0,05$).

Aktywność fosfatazy zasadowej komórek wysięku zapalnego u osób zdrowych badał Wulff (42). Stwierdził on również dodatni odczyn w części granulocytów wysięku. Nasilenie odczynu było różne, lecz w poszczególnych komórkach większe aniżeli w granulocytach krwi o najwyższej aktywności enzymu. Zdaniem Aleksandrowicza i wsp. (1) aktywność ALP-azy granulocytów wysięku jest wielokrotnie słabsza aniżeli granulocytów krwi.

Niespecyficzna fosfataza kwaśna (ACP-aza). U osób zdrowych we wszystkich komórkach wielojądrzastych i jednojądrzastych wysięku występuje dodatni odczyn w postaci czerwono-brunatnych ziarnistości w cytoplazmie, jednakowo licznych w obu typach komórek. Odczyn narasta w czasie trwania zapalenia, osiągając największe nasilenie w preparatach z 11 i 14 godz. cyklu. We krwi obwodowej aktywne są granulocyty obojętnochłonne, eozynochłonne i monocyty, jednak w stopniu słabszym aniżeli komórki wysięku. Słabą aktywność ACP-azy wykazuje 0—10% limfocytów.

W grupie chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową odczyn w komórkach wysięku jest taki sam, jak u zdrowych. We krwi obwodowej słabą aktywność fosfatazy kwaśnej stwierdza się w promielocytach, natomiast mielocyty, metamielocyty, granulocyty pałeczkowate i podzielone wykazują znaczną aktywność enzymu. U chorych na ostrą białaczkę szpikową aktywność ACP-azy w obu typach komórek wysięku zapalnego oraz w granulocytach obojętnochłonnych krwi jest obniżona. W mieloblastach odczyn jest ujemny. Obniżenie aktywności ACP-azy stwierdzono również w komórkach wysięku zapalnego i krwi u większości chorych

na przewlekłą białaczkę limfatyczną oraz u chorej na ostrą białaczkę limfatyczną. Wyniki badań aktywności ACP-azy i pozostałych enzymów zestawiono w tabeli 4 i 5.

ACP-aza zawarta jest w specjalnych strukturach komórkowych, zwanych lizosomami i związana jest ze zjawiskami litycznymi, fagocytozą i pinocytozą. Wysoką aktywność tego enzymu stwierdzono w makrofagach tkankowych i obdarzonych zdolnością żerną komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego. Za związkiem fosfatazy kwaśnej z fagocytozą przemawia wiele obserwacji, m. in. badania Gedigka i Bont-

Tab. 4. Aktywność kwaśnej fosfatazy, niespecyficznej esterazy, aminopeptydazy, dehydrogenazy bursztynianowej i dehydrogenazy NADPH₂ w komórkach skór- nego wysięku zapalnego u osób zdrowych i chorych na różnego typu białaczki
Nonspecific acid phosphatase, nonspecific esterase, aminopeptidase, succinic dehydrogenase and NADPH₂ dehydrogenase activity of inflammatory exudate cells
in healthy persons and in leukaemic patients

Nazwa enzymu	Rodzaj komórek wysięku	Aktywność enzymu u osób zdrowych	Przewle- kła bia- łaczka granulocyto- wa			Ostra białaczka szpikowa			Przewle- kła bia- łaczka limfa- tyczna			Ostra białaczka limfa- tyczna		
			N	↑	↓	N	↑	↓	N	↑	↓	N	↑	↓
Fosfataza kwaśna	Wielojądrzaste	+++	6	5	0	0	0	8	3	0	10	0	0	1
	Jednojądrzaste	+++	11	0	0	0	0	5	4	0	9	—	—	—
Niespecyficzna esteraza	Wielojądrzaste	-/+	11	0	0	8	0	0	13	0	0	1	0	0
	Jednojądrzaste	+++	11	0	0	5	0	0	13	0	0	—	—	—
Amido- peptydaza	Wielojądrzaste	+++	4	0	7	3	0	5	11	0	2	0	0	1
	Jednojądrzaste	+++	4	0	7	2	0	3	11	0	2	—	—	—
Dehydroge- naza bursztynianowa	Wielojądrzaste	-/+	3	0	8	2	0	6	9	0	3	0	0	1
	Jednojądrzaste	++	8	0	3	3	0	2	9	0	3	—	—	—
Dehydroge- naza NADPH ₂	Wielojądrzaste	++	9	0	2	2	0	6	13	0	0	0	0	1
	Jednojądrzaste	+++	9	0	2	4	0	1	13	0	0	—	—	—

Objaśnienia (Explanation):

- brak aktywności (no activity)
- + słaba aktywność (slightly positive)
- ++ dość silna aktywność (positive)
- +++ silna aktywność (strongly positive)

N aktywność równa aktywności u osób zdrowych (activity as in healthy persons)

↑ aktywność wyższa niż u osób zdrowych (increased activity)

↓ aktywność niższa niż u osób zdrowych (decreased activity)

Tab. 5. Aktywność kwaśnej fosfatazy, niespecyficznej esterazy, aminopeptydazy, dehydrogenazy bursztynianowej i dehydrogenazy NADPH₂ w krwinkach białych krwi obwodowej u osób zdrowych i chorych na różnego typu białaczki
 Nonspecific acid phosphatase, nonspecific esterase, aminopeptidase, succinic dehydrogenase and NADPH₂ dehydrogenase activity of peripheral blood white cells in healthy persons and in leukaemic patients

Nazwa choroby	Ilość badanych	Rodzaj komórek	Aktywność enzymów			
			fosfataza kwasna	niespecyficzna esteraza	aminopeptydaza	dehydrogenaza bursztyn.
Zdrowi	34	Granulocyty obojętnochłonne	++	40—60% kom. ±	60—80% kom. +	60—80% kom. +
		Granulocyty eozynochłonne	+	—	—	—
		Limfocyty	0—10% kom. ±	ok. 5% kom. +	—	++
		Monocyty	++	+++	+/++	+
Przewlekła białaczka granulocyt.	11	Mieloblasty	ok. 40% kom. ±	+	—	±
		Mielocyty obojętnochłonne	+++	++	30—50% kom. +	+/++
		Dojrzałe granuloc. obojętn.	+/+/+++	ok. 60% kom. ±	+	ok. 80% kom. +
Ostra białaczka szpikowa	8	Paramieloblasty	—	ok. 80% kom. +	10—30% kom. +	±
		Dojrzałe granulocyty	+/+++	—/+	+	—/+
Przewlekła białaczka limfatyczna	13	Limfocyty	0—10% kom. ±	5—10% kom. +	—	+/+/+++
		Granulocyty obojętnochłonne	+/+++	—/+	+	—/+
Ostra białaczka limfatyczna	1	Limfoblasty	—	+	—	+
		Granulocyty obojętnochłonne	++	—/+	+	+/+

Objaśnienia (Explanation):

— brak aktywności (no activity)
 ± ślad aktywności (traces of activity)

+ słaba aktywność (slightly positive)

++ dość silna aktywność (positive)

+++ silna aktywność enzymu (strongly positive)

kego (13), którzy stwierdzili wzrost tego enzymu w komórkach fagocytyzujących w porównaniu z nefagocytyzującymi.

W świetle własnych obserwacji nie wydaje się jednak, aby większa czy mniejsza zdolność żerna komórek zależna była od stopnia aktywności ACP-azy tych komórek. Nie stwierdzono bowiem korelacji pomiędzy nasileniem aktywności tego enzymu w komórkach wysięku a ich zdolnością żerną. U chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową, u których zdolność żerna komórek wysięku była obniżona, aktywność fosfatazy kwaśnej pozostawała prawidłowa. Natomiast u chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną z obniżoną aktywnością enzymu w komórkach wysięku, ich zdolność żerna była prawidłowa.

Esteraza niespecyficzna (En). Silną aktywność En pod postacią licznych brunatno-czarnych ziaren w cytoplazmie przejawiają wszystkie komórki jednojądrzaste wysięku zarówno u zdrowych, jak u chorych na białaczkę. W granulocytach wysięku aktywność enzymu jest bardzo słaba lub zupełnie jej brak. W preparatach krwi obwodowej odczyn w dojrzałych granulocytach jest ujemny lub bardzo słabo dodatni, w granulocytach eozynochłonnych ujemny. U chorych na ostrą i przewlekłą białaczkę szpikową w większości mieloblastów stwierdzono słabą aktywność En. Większą aktywność przejawiają promielocyty, a największą mielocyty. Granulocyty na dalszych szczeblach dojrzewania wykazują stopniowy spadek aktywności enzymu. Silną aktywność En stwierdzono w monocytach krwi u wszystkich badanych. W limfocytach osób zdrowych odczyn jest ujemny, jedynie w niektórych obserwowano ślad dodatniej reakcji. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną ilość limfocytów ze słabo dodatnim odczynem wynosi 5—10%. Słabo dodatni odczyn obserwowano również w części limfoblastów chorej na ostrą białaczkę limfatyczną.

Rola En w komórkach nie jest dostatecznie wyjaśniona. Zdaniem Monisa i Weinberga (26) jej wysoka aktywność w makrofagach wskazuje na związek En w fagocytozę. Wykazany spadek aktywności tego enzymu w miarę dojrzewania mielocytów przemawia za tym, że jest on związany z wewnętrznym metabolizmem granulocytów i z procesami dojrzewania.

Aminopeptydaza (LAP). We krwi osób zdrowych słabo dodatni odczyn LAP pod postacią nielicznych, czerwono-brunatnych ziaren w cytoplazmie stwierdza się w granulocytach obojętnochłonnych i eozynochłonnych. W monocytach odczyn jest silniejszy, natomiast w limfocytach całkowicie ujemny. U chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową słabą aktywność LAP przejawiają granulocyty, poczynając od mielocytów. Nasilenie reakcji wzrasta nieco wraz ze stopniem dojrzałości granulocytów. U chorych na ostrą białaczkę szpikową słabo dodatni

odczyn występuje w 10—30% mieloblastów. Limfocyty i limfoblasty u chorych na przewlekłą i ostrą białaczkę limfatyczną są pozbawione aktywności LAP.

Aktywność tego enzymu w komórkach wysięku zapalnego jest znacznie wyższa aniżeli w komórkach krwi. Narasta ona w czasie trwania zapalenia i jest taka sama w obu typach komórek wysięku. U większości chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową i ostrą białaczkę szpikową wzrost aktywności LAP w komórkach wysięku, zwłaszcza w granulocytach, jest mniejszy aniżeli u osób zdrowych. Prawdopodobnie istnieje związek pomiędzy obniżoną aktywnością LAP komórek wysięku u chorych na białaczki szpikowe a zmianami składu komórkowego i dynamiki odczynu zapalnego u tych chorych. Większość komórek wysięku zapalnego przez cały okres badania stanowią u nich granulocyty. Migracja tych ostatnich do ogniska zapalnego odbywa się pod wpływem obecnych w nim biologicznie czynnych polipeptydów (leukotaksyna Menkina). Degradacja tych polipeptydów przez enzymy proteolityczne, do których należy również LAP prowadziłaby do ustania migracji granulocytów i stopniowej przewagi w wysięku komórek jednojądrzastych. Niedobór LAP, przyjmując, że działa ona również pozakomórkowo, np. po uwolnieniu jej w następstwie rozpadu granulocytów wysięku, powodowałby utrzymywanie się w wysięku przez dłuższy czas czynnych polipeptydów i przedłużenie fazy granulocytarnej odczynu zapalnego.

Dehydrogenaza bursztynianowa (SDH). U osób zdrowych w preparatach z 3 godz. cyklu tylko 10—20% granulocytów daje dodatni odczyn pod postacią pojedynczych ziaren formazanu w cytoplazmie. W dalszych godzinach aktywność SDH w granulocytach narasta. Po 12 i 16 godz. cytoplazma około 60—70% tych komórek zawiera do kilkunastu ziaren w cytoplazmie. Komórki jednojądrzaste wysięku wykazują znacznie silniejszą aktywność SDH. Aktywność enzymu narasta w czasie zapalenia i jest najsilniejsza w preparatach uzyskanych po 16 godz. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną aktywność SDH komórek wysięku jest na ogół taka sama, jak u osób zdrowych, natomiast u chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową i ostre białaczki, w większości przypadków ulega obniżeniu. Obniżenie aktywności zależy głównie od zmniejszenia odsetka komórek z dodatnim odczynem.

We krwi obwodowej największą aktywność SDH stwierdzono w limfocytach. Dodatni odczyn wykazują wszystkie monocyty i 60—80% granulocytów obojętnochłonnych. W granulocytach eozynochłonnych odczyn jest ujemny. U chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową aktywność SDH stwierdzono we wszystkich komórkach rzędu granulocytów. Aktywność enzymu zmniejsza się na ogół wraz ze stopniem dojrzałości granulocytów. Słabo dodatni odczyn obserwowano również w mieloblas-

tach u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Limfocyty chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną przejawiają nieco wyższą aktywność SDH, aniżeli limfocyty osób zdrowych. Słabo dodatni odczyn stwierdzono w limfoblastach chorej na ostrą białaczkę limfatyczną.

SDH jest bardzo nietrwała i łatwo ulega unieczynnieniu pod wpływem czynników uszkadzających komórke. Dlatego Wachstein i Meisel (38) uważają, że utrata aktywności tego enzymu jest czułym wskaźnikiem uszkodzenia komórki. Zmniejszenie ilości granulocytów z dodatnią reakcją na SDH u większości chorych na białaczki szpikowe i u chorej na ostrą białaczkę limfatyczną przemawia za mniejszą odpornością tych komórek na uszkadzające czynniki środowiska zapalnego.

Dehydrogenaza NADPH₂. Aktywność tego enzymu wykazano we wszystkich komórkach wysięku. Granulocyty zawierają w cytoplazmie początkowo nieliczne, a w preparatach z dalszych godzin cyklu coraz liczniejsze ciemno niebieskie ziarna formazanu. Dodatkowo są również granulocyty eozynochłonne. Komórki jednojądrzaste wysięku wykazują silną aktywność NADPH₂ od początku cyklu. Nie stwierdzono różnic w aktywności enzymu w komórkach wysięku u osób zdrowych i chorych na przewlekłą białaczkę — granulocytową i limfatyczną. U chorych na ostre białaczki jego aktywność w granulocytach jest obniżona. W krwi obwodowej odczyn na NADPH₂ w granulocytach wielojądrzastych jest słabszy, aniżeli w granulocytach wysięku. Monocyty dają słabo dodatni odczyn. Największą aktywność spośród komórek krwi obserwowano w limfocytach. U chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową aktywność NADPH₂ wykazano w granulocytach na wszystkich szczeblach dojrzewania. Najśłabszy odczyn występuje w mieloblastach, a najsilniejszy w mielocytach. W miarę dojrzewania mielocytów odczyn nieco słabnie. Słaby odczyn stwierdzono również w mieloblastach u chorych na ostrą białaczkę szpikową i w limfoblastach chorej na ostrą białaczkę limfatyczną.

Aktywność NADPH₂ w komórkach krwi badali Balogh i Cohen (5), a w komórkach wysięku zapalnego u osób zdrowych Wulff (41). Wyniki tych badań nie różnią się od wyników badań własnych.

Glikogen. Wyniki badań zestawiono w tabeli 6. Cytoplazma granulocytów wysięku wypełniona jest drobnymi ziarnami glikogenu, dającymi jednolity, czerwony kolor. Tylko około 5% komórek z pierwszych godzin cyklu jest słabo i nierównomiernie zabarwionych na kolor różowy. Granulocyty eozynochłonne zawierają ziarenka glikogenu pomiędzy specyficznymi ziarnistościami cytoplazmy. Pierwsze komórki jednojądrzaste wysięku nie zawierają wcale lub tylko nieliczne ziarna

Tab. 6. Zawartość glikogenu w komórkach skórnoego wysięku zapalnego i w krwinkach białych krwi obwodowej u osób zdrowych i chorych na różnego typu białaczki

Glycogen content of inflammatory exudate cells and of peripheral blood white cells in healthy persons and in leukaemic patients

Nazwa choroby	Ilość badanych	Wysięk zapalny		K r e w o b w o d o w a							
				Mielo-blasty	Mielocyty	Granulocyty dojrzałe			Limfoblasty „wartość globalna”	Limfocyty „wartość globalna”	Monocyty
		Komórki wielojądrzaste	Komórki jednojądrzaste			% kom. PAS ujemnych	% kom. PAS dodatnich				
Zdrowi	34	++++	±/±	0	0	0—3 śr. 0,8±0,9	78—96 śr. 87,2±4,9	2—22 śr. 12,0±5,7	0	12—46 śr. 19,5±7,5	—/±
Przewlekła białaczka granulocyt.	11	++++	±/±	—	+	2—10 śr. 6,2±2,3	90—98 śr. 95,8±2,3	—	0	0	0
Ostra białaczka szpikowa	8	++++	±/±	40—60% kom. ±	0	—	100 *)	—	0	0	0
Przewlekła białaczka limfatyczna	13	++++	±/±	0	0	—	100 *)	—	0	18—162 śr. 93,7±46,2	0
Ostra białaczka limfatyczna	1	++++	0	0	0	—	100 *)	—	28	0	0

Objaśnienia (Explanation):

- odczyn PAS ujemny (PAS negative)
- ± odczyn PAS słabo dodatni (PAS very weakly positive cells)
- + odczyn PAS dodatni (PAS weakly positive cells)
- ++ odczyn PAS silnie dodatni (PAS positive cells)
- +++ odczyn PAS bardzo silnie dodatni (PAS strongly positive cells)
- *) małe ilości komórek (< 20) (small number of cells (< 20))

glikogenu. W preparatach z późniejszych godzin cyklu ilość i wielkość tych ziaren wzrasta. Podobne wyniki badań nad zawartością glikogenu w komórkach wysięku zapalnego u osób zdrowych uzyskali W u l f f (40) oraz A l e k s a n d r o w i c z i w s p. (1). Nie stwierdzono różnic w zawartości glikogenu w komórkach wysięku osób zdrowych i chorych na białaczkę.

Spośród komórek krwi obwodowej dużo glikogenu zawierają dojrzałe granulocyty obojętnochłonne. Nasilenie reakcji jest jednak słabsze aniżeli w granulocytach wysięku. Większość limfocytów nie zawiera glikogenu w cytoplazmie. W około 10% tych komórek stwierdza się kilka do kilkunastu czerwonych ziaren. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną zawartość glikogenu w limfocytach wzrasta. Wzrost ten jest statystycznie istotny ($P < 0,01$). Monocyty nie zawierają glikogenu, tylko niektóre barwią się na kolor słabo różowy.

Powyższe wyniki są zgodne z wynikami innych autorów, m. in. A s t a l d i e g o i V e r g i (3), J o n e s a i w s p. (17) oraz W i c h r z y c k i e j (39).

Lipidy. W preparatach wysięku z 3 godz. cyklu większość granulocytów zawiera w cytoplazmie liczne, brunatno-czarne ziarna sudanochłonne. Około 5% komórek zawiera tylko nieliczne ziarna. W dalszych godzinach cyklu odczyn w granulocytach narasta. Sudanochłonne ziarna stają się grube i jednolicie wypełniają cytoplazmę komórek. Również granulocyty eozynochłonne zawierają substancje sudanochłonne, które opłaszczają specyficzne ziarnistości cytoplazmy. W komórkach jednojądrzastych wysięku widoczne są dość drobne, początkowo nieliczne, barwiące się sudanem czarnym ziarna. W drugiej połowie cyklu ilość i wielkość tych ziaren wzrasta w około 30—40% tych komórek. Nie stwierdzono różnic w zawartości ciał sudanochłonnych pomiędzy komórkami wysięku osób zdrowych i chorych na białaczkę.

We krwi obwodowej w granulocytach obojętnochłonnych odczyn jest słabszy aniżeli w granulocytach wysięku. W niedojrzałych granulocytach chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową obecne są sudanochłonne ziarna, których liczba wzrasta wraz ze stopniem dojrzałości granulocytów. Nieliczne, drobne ziarna zawarte są również w cytoplazmie mieloblastów u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Limfocyty u osób zdrowych i chorych na białaczkę limfatyczną nie barwią się sudanem. Również limfoblasty u chorej na ostrą białaczkę limfatyczną dawały odczyn ujemny. Monocyty nie zawierają wcale lub tylko nieliczne ziarna sudanochłonne.

Zawartość lipidów w komórkach wysięku zapalnego badali R e b u c k i w s p. (31) oraz A l e k s a n d r o w i c z i w s p. (1). R e b u c k obserwował zmniejszenie sudanochłonności komórek wysięku u chorych na prze-

wlekłą białaczkę limfatyczną. Badania własne nie potwierdziły tych spostrzeżeń.

W przedstawionych badaniach wykazano, że aktywność niespecyficznej ALP-azy i ACP-azy, SDH i NADPH_2 oraz LAP jest wyższa w granulocytach wysięku aniżeli w granulocytach krwi. Również komórki jednojądrzaste wysięku zapalnego przejawiają większą aktywność tych enzymów aniżeli jednojądrzaste komórki krwi. Przyczyny tych różnic mogą zależeć albo od wybiórczej migracji do ogniska zapalnego komórek krwi o najwyższej aktywności, albo od wzrostu aktywności tych enzymów w komórkach w środowisku zapalnym.

Przeciw pierwszej możliwości przemawia fakt, że aktywność badanych enzymów w poszczególnych komórkach wysięku była wyższa aniżeli najwyższa aktywność tych enzymów w komórkach krwi, a w odniesieniu do fosfatazy zasadowej i dehydrogenazy bursztynianowej fakt, że w wysięku obecne były również granulocyty pozbawione ich aktywności. Wzrost aktywności w komórkach wysięku zapalnego może być przeto interpretowany jako wyraz stanu pobudzenia tych komórek i przejścia ich z fazy spoczynkowej, w jakiej się znajdowały we krwi krążącej, w fazę czynną, charakteryzującą się wzrostem ich aktywności biologicznej pod wpływem czynników środowiska zapalnego.

Wyniki powyższych badań rzucają również światło na zagadnienie pochodzenia komórek jednojądrzastych wysięku. Zdaniem Maxima (22), Downey'a (11), Rebuska (31) i wielu innych komórki te wywodzą się głównie z limfocytów krwi, zdaniem innych autorów, m. in. Seemanna (35) oraz Hulligera i Allgöwera (16) — z monocytów. Cooke i wsp. (9) sądzą, że jądrzaste komórki wysięku zapalnego są pochodzenia miejscowego, a ich źródłem są komórki przydanki naczyń. Komórki te cechuje wysoka aktywność kwaśnej fosfatazy, aminopeptydazy i esterazy niespecyficznej. Nieco niższą aktywność tych enzymów stwierdzono w monocytach krwi, natomiast limfocyty pozbawione są prawie zupełnie ich aktywności. Nadto pomiędzy limfocytami krwi a komórkami jednojądrzastymi wysięku istnieją znaczne różnice w zawartości glikogenu i lipidów. Obserwacje te przemawiają na korzyść poglądów, w myśl których źródłem komórek jednojądrzastych wysięku są oprócz histiocytów tkankowych nie limfocyty, lecz monocyty krwi.

Należy również zwrócić uwagę na obecność we wczesnej fazie wysięku komórek wielojądrzastych, wykazujących mniejszą zawartość glikogenu i lipidów. Zdaniem Aleksandrowicza i wsp. (1) są to mezenchymocyty, komórki pochodzenia tkankowego, a nie migrujące ze krwi granulocyty obojętnochłonne.

Wnioski

1. Skład komórkowy i dynamikę skórniego wysięku zapalnego u osób zdrowych w okresie 24-godzinnej obserwacji cechuje duża stałość.

2. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną jest on taki sam, jak u osób zdrowych lub wykazuje tylko niewielkie różnice. U chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową obserwuje się opóźnienie migracji granulocytów i często mniejszy udział w wysięku komórek jednojądrzastych. U chorych na ostre białaczki wysięk zapalny jest skąpy w komórki, a ilość komórek jednojądrzastych jest w nim wybitnie zmniejszona. U chorych z wybitnie obniżoną ilością dojrzałych granulocytów we krwi wysięk zapalny nie zawiera żadnych komórek. Granulocyty niedojrzałe nie migrują do ogniska zapalnego.

3. Znaczna część komórek wielojądrzastych wysięku odpowiada pod względem morfologicznym aktywności fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej, esterazy niespecyficznej, dehydrogenazy bursztynianowej, dehydrogenazy NADPH₂ oraz zawartości glikogenu i lipidów wielojądrzastym granulocytom obojętnochłonnym krwi, natomiast komórki jednojądrzaste wysięku wykazują podobieństwo cytochemiczne do monocytów krwi. Obserwacje te przemawiają na korzyść poglądów, według których zasadniczym źródłem komórek wielojądrzastych wysięku zapalnego są migrujące ze krwi wielojądrzaste granulocyty, a komórki jednojądrzaste wywodzą się głównie z monocytów krwi.

4. Aktywność badanych enzymów w komórkach wysięku wzrasta w czasie trwania odczynu zapalnego i przewyższa aktywność w odpowiadających im komórkach krwi obwodowej. Przemawia to za wzrostem aktywności biologicznej komórek w ognisku zapalnym pod wpływem czynników środowiska zapalnego.

5. U chorych na białaczki wzrost aktywności badanych enzymów w komórkach wysięku zapalnego jest mniejszy aniżeli u osób zdrowych. Świadczyć to może o słabszej aktywności biologicznej tych komórek u chorych na białaczki. Największe różnice występują u chorych na ostre białaczki, mniejsze u chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową. U chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną są one najmniej wyraźne.

6. Nieprawidłowy skład komórkowy wysięku zapalnego, mniejsza aktywność biologiczna komórek wysięku, czego wyrazem jest mniejsza aktywność badanych enzymów oraz osłabienie zdolności żernej granulocytów, wydają się mieć duże znaczenie w obniżeniu odporności na zakażenia chorych na białaczki ostre i przewlekłą białaczkę granulocytową.

PIŚMIENNICTWO

1. Aleksandrowicz J., Blicharski J., Czyżewska-Ważewska M., Cichocki T., Pol. Tyg. Lek., 20, 81—83, 1965.

2. Antonioli J. A.: Metabolism of the White Blood Cell inside and outside the Blood Stream. Biological Activity of the Leucocyte. Ciba Foundation Study Group No. 10, Churchill, London 1961, 92—99.
3. Astaldi G., Verga L.: *Acta Haemat.*, 17, 129—135, 1957.
4. Athens J. W.: *Ann. Rev. Physiol.*, 25, 195—212, 1963.
5. Balogh K., Cohen R. B.: *Blood*, 17, 491—496, 1961.
6. Boggs D. R.: *Blood*, 15, 466—475, 1960.
7. Braunstein H.: *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 202—207, 1959.
8. Burstone M. S., Folk J. E.: *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 217—226, 1956.
9. Cooke J. W., Goldering D., Kahn L. I.: *J. Exptl. Med.*, 97, 651—663, 1953.
10. Craddock C. G.: Production and Distribution of Granulocytes and the Control of Granulocyte Release. Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis, Churchill, London 1960, 237—261.
11. Downey H.: *Anat. Rec.*, 12, 429—436, 1917.
12. Farber E.: *Histochemistry*. University of Kansas, 1958, 15—20.
13. Gedigk P., Bontke E.: *Virchow's Arch. path. Anat. u. Physiol.*, 330, 538—568, 1957.
14. Hayhoe F. G. J.: *Leukaemia. Research and Clinical Practice*, Churchill, London 1930, 222.
15. Hayhoe F. G. J., Quaglini D.: *Brit. Jour. Haemat.*, 4, 375—381, 1958.
16. Hulliger L., Allgöwer M.: *Experientia*, 19, 577—582, 1963.
17. Jones R. V., Goffi G. P., Hutt M. S. R.: *Jour. Clin. Path.*, 15, 36—39, 1962.
18. Kaplow L. S.: *Blood*, 10, 1023—1029, 1955.
19. Kowal E.: *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 34, 579—583, 1964.
20. Kuński H., Rogoż J.: *Lek. Wojsk.*, 40, 283—285, 1964.
21. Lison L.: *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*, Gauthier-Villars, Paris 1960, 749.
22. Maximow A.: *Arch. Anat. Entwicklungsmech.*, 97, 283—289, 1923.
23. Mc Manus J. F. A., Mowry R. W.: *J. Histochem. Cytochem.*, 6, 309—316, 1958.
24. Miles A. A., Miles E. M., Burke J.: *Britt. J. Exp. Path.*, 38, 79—85, 1957.
25. Mitus W. J., Bergna L. J., Mednicoff I. B., Dameshek W.: *Blood*, 13, 748—756, 1958.
26. Monis B., Weinberg T.: *Cancer*, 14, 369—377, 1961.
27. Page A. R., Good R. A.: *Am. Jour. Path.*, 34, 645—669, 1958.
28. Pearse A. G. E.: *Histochemia teoretyczna i stosowana*. Warszawa, PZWL, 1957, str. 481.
29. Perille P. E., Finch S. C.: *Clin. Invest.*, 39, 1353—1357, 1960.
30. Rebuck J. W.: *Anat. Rec.*, 76, 46—58, 1940.
31. Rebuck J. W., Monto R. W., Monaghan E. A., Riddle J. M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 73, 8—38, 1958.
32. Riis P.: *The Cytology of Inflammatory Exudate*, Munksgaard, Copenhagen 1959, 74—78.
33. Riis P., Wulff H. R.: *Acta Haemat.*, 23, 276—286, 1960.
34. Rydygier J.: *Pol. Tyg. Lek.*, 2, 739—744, 1947.
35. Seemann G.: *Beitr. path. Anat.*, 85, 303, 1930.

36. Souza de E. J., Kothare S. N.: J. Histochem. Cytochem., 7, 77—81, 1959.
37. Torre C. M., Leikin S. L.: Am. Jour. Clin. Path., 32, 335—344, 1959.
38. Wachstein M., Meisel E.: J. Histochem. Cytochem., 5, 204—211, 1957.
39. Wichrzycka E.: Pol. Tyg. Lek., 20, 1076—1078, 1956.
40. Wulff H. R.: Acta Haemat., 28, 86—94, 1962.
41. Wulff H. R.: Acta Haemat., 29, 208—217, 1963.
42. Wulff H. R.: Acta Haemat., 30, 159—167, 1963.
43. Yoffey J. M.: Lancet, 1, 206—211, 1962.

Pracę otrzymano 1 XII 1966

OBJAŚNIENIA DO TABLIC

Ryc. 1. Preparat po 3 godz. zapalenia. Komórki wielojądrzaste. May-Grünwald-Giemsa. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 2. Preparat po 12 godz. zapalenia. Komórki wielojądrzaste i jednojądrzaste. May-Grünwald-Giemsa. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 3. Preparat po 18 godz. zapalenia. Większość komórek wysięku stanowią komórki jednojądrzaste. May-Grünwald-Giemsa. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 4. Preparat po 24 godz. zapalenia. Rozpadające się komórki zapalne wśród struktur włóknistych. May-Grünwald-Giemsa. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 5. Preparat po 5 godz. zapalenia. Aktywność fosfatazy zasadowej komórek wielojądrzastych od 0 do +2 wg Kaplowa. Metoda Hayhoe i Quaglino. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 6. To samo uszkodzenie, jak np. na ryc. 5 po 11 godz. zapalenia. Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej komórek wielojądrzastych: +1 — +4 wg Kaplowa. Metoda Hayhoe i Quaglino. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 7. Preparat po 5 godz. zapalenia. Słabo dodatni odczyn na fosfatazę kwaśną w komórkach wielojądrzastych. Metoda Burstona. Jądra barwione hematoksyliną Mayera. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 8. To samo uszkodzenie, jak na ryc. 7 po 11 godz. zapalenia. Silnie dodatni odczyn na fosfatazę kwaśną w komórkach wielojądrzastych i jednojądrzastych. Metoda Burstona. Jądra barwione hematoksyliną Mayera. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 9. Preparat po 4 godz. zapalenia. Słabo dodatni odczyn na niespecyficzną esterazę w komórkach wielojądrzastych, silnie dodatni w histiocycie. Metoda Braunsteina. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 10. To samo uszkodzenie, jak na ryc. 9 po 16 godz. zapalenia. Silnie dodatni odczyn na niespecyficzną esterazę w komórkach jednojądrzastych i słabo dodatni w komórkach wielojądrzastych. Metoda Braunsteina. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 11. Preparat po 6 godz. zapalenia. Słabo dodatni odczyn na dehydrogenazę bursztynianową w komórkach wielojądrzastych i jednojądrzastych. Metoda de Souzy i Kothara. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 12. To samo uszkodzenie, jak na ryc. 11 po 12 godz. zapalenia. Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową w komórkach wielojądrzastych i jednojądrzastych o różnym nasileniu. Metoda de Souzy i Kothara. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 13. Preparat po 5 godz. zapalenia. Dodatni odczyn na dehydrogenazę NADPH₂ w komórkach wielojądrzastych. Metoda Farbera. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 14. To samo uszkodzenie, jak na ryc. 13 po 14 godz. zapalenia. Silnie dodatni odczyn na dehydrogenazę NADPH₂ w komórkach jednojądrzastych, słaby w komórkach wielojądrzastych. Metoda Farbera. Powiększenie 850 ×.

Ryc. 15. Preparat po 16 godz. zapalenia. Dodatni odczyn na aminopeptydazę w komórkach wielojądrzastych i jednojądrzastych. Metoda Burstona i Folka. Jądra podbarwione hematoksyliną Mayera. Powiększenie 1000 $\times$.

Ryc. 16. Preparat po 16 godz. zapalenia. Silnie dodatni odczyn PAS na glikogen w komórkach wielojądrzastych. Liczne ziarna glikogenu w komórkach wielojądrzastych. Powiększenie 1000 $\times$.

Ryc. 17. Preparat po 12 godz. zapalenia. Barwienie sudanem czarnym B na lipidy wg Lisona. Silnie sudanochłonne komórki wielojądrzaste. Liczne sudanochłonne ziarna w komórkach jednojądrzastych. Powiększenie 850 $\times$.

Морфологические и цитохимические исследования клеток кожного воспалительного экссудата и клеток периферической крови у здоровых и больных разного типа лейкозом людей

Резюме

Целью исследований было установление, являются ли изменения в воспалительном процессе кожной реакции у больных лейкозом только количественными, или же в клетках экссудата происходят также качественные изменения.

Исследовались 11 больных, страдающих хроническим миелозом, 8 острым миелозом, 13 хроническим лимфаденозом, 1 острой лимфатической лейкемией, а также 34 здоровых человека. Экспериментальная воспалительная реакция у них вызывалась методом „кожного оконца” Ребука.

В полученных препаратах определялся клеточный состав и активность неспецифической кислой и щелочной фосфатазы, аминоксиптидазы, неспецифической эстеразы, янтарной дегидрогеназы, дегидрогеназы кофермента II клеток экссудата, а также содержание в них гликогена и липидов. Те же цитохимические реакции были проведены в препаратах периферической крови исследованных людей. У некоторых из больных отмечалась фагоцитарная способность клеток экссудата. У больных хроническим лимфаденозом резкой разницы в составе клеток во время всего воспалительного процесса не замечено. У больных хроническим миелозом многоядерные клетки экссудата появляются с опозданием, а участие мононуклеарных клеток часто уменьшается. У больных острой формой лейкоза, особенно с крайне низким содержанием гранулоцитов в периферической крови, воспалительный экссудат беден клетками или не содержит их вовсе. Обнаружено понижение фагоцитарной активности клеток экссудата, особенно гранулоцитов у больных острым и хроническим миелозом.

Активность исследованных энзимов в гранулоцитах экссудата в первые часы воспаления такая же, как и в периферической крови

и повышается в процессе воспаления за исключением неспецифической активности эстеразы.

Активность исследованных энзимов в мононуклеарных клетках экссудата соответствует их активности в моноцитах крови. Эти наблюдения подтверждают взгляды о гематогенном генезе клеток экссудата. Главным источником многоядерных клеток экссудата являются нейтрофильные многоядерные лейкоциты крови, а источником мононуклеарных клеток могут быть моноциты. Возрастание активности энзимов в клетках экссудата в процессе воспаления у больных лейкозом не является таким острым, как у здоровых людей. Самые большие разницы установлены у больных острым лейкозом. У больных хроническим лимфаденозом эти разницы были незначительные.

Проведенные исследования дают возможность предположить, что клетки крови после миграции в воспалительный очаг под влиянием местных факторов возбуждаются, а их биологическая активность возрастает. У больных острым и хроническим миелозом рост биологической активности клеток экссудата является недостаточным. Меньшая биологическая активность экссудата, количественные изменения динамики и состава воспалительного экссудата, а также пониженная фагоцитарная способность этих клеток возможно имеют большое значение в понижении иммунитета на инфекции у больных миелозом.

Morphological and Cytochemical Studies of Inflammatory Exudate Cells and Peripheral Blood Cells in Healthy Persons and Leukaemic Patients

S u m m a r y

The author presents the results of studies concerning some inflammatory cellular responses in patients suffering from different types of leukaemias and in healthy persons. An attempt was made to determine whether the changes in the pattern of response were quantitative or qualitative as well.

The inflammatory responses were induced experimentally by the method of Rebuck's "skin window". The following groups of patients were examined: 11 patients with chronic granulocytic leukaemia, 8 patients with acute myeloblastic leukaemia, 13 patients with chronic lymphocytic leukaemia, and 1 patient with acute lymphoblastic leukaemia. A group of 34 haematologically normal persons served as control. The cellular composition of the exudate, the activity of nonspecific acid and alkaline phosphatases, aminopeptidase, nonspecific esterase, succinic dehydro-

genase, and NADPH₂ dehydrogenase were examined by cytochemical methods. The content of glycogen and lipids in the inflammatory cells and in white cells of peripheral blood were also estimated by cytochemical methods. In some patients the ability of phagocytosis in the inflammatory cells was also examined.

No distinct changes in the cellular composition of the inflammatory exudate were found in patients with chronic lymphocytic leukaemia. In patients with chronic granulocytic leukaemia the initial granulocytic migration was delayed and the participation of mononuclear cells was often reduced. Immature granulocytes were absent, but in one patient a few metamyelocytes were found. Only in patients with acute leukaemias, especially in those whose mature granulocyte content in the blood was extremely low, the inflammatory cells in the exudate were very scarce or even absent.

In patients with chronic and acute myelogenous leukaemias, the ability of phagocytosis was impaired in the inflammatory cells, especially in granulocytes.

The degree of the activity of the enzymes in the initial phase of inflammation was almost identical with the activity in the blood granulocytes and tended to increase during the experiment, except for nonspecific esterase activity.

The activity of these enzymes and the glycogen and lipids contents in the mononuclear exudate cells corresponded to their activity in the monocytes of peripheral blood.

Polynuclear neutrophils of peripheral blood are the main source of polynuclear inflammatory cells, while mononuclear cells are likely derived from blood monocytes.

The increase in the enzyme activity is not so striking in the leukaemic patients as that in healthy persons. The greatest differences were found in patients with acute leukaemia. In patients with chronic lymphocytic leukaemias these differences were not so distinct.

The results of the examinations suggest that blood cells are stimulated after migration to the inflammatory area, and become biologically more active under the influence of local factors present in the inflammatory focus.

In patients with acute leukaemias and chronic granulocytic leukaemias the biological activity of the exudate cells is diminished. A decrease in the biological activity of the cells, some quantitative changes in the cellular composition of the inflammatory exudate as well as a decreased phagocytic capacity of the cells are most likely responsible for the increased susceptibility of patients to infections.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Preparation after three hours of inflammation. The response of polynuclear cells. May-Grünwald-Giemsa staining. $\times 850$

Fig. 2. Preparation after twelve hours of inflammation. Polynuclear and mononuclear cells. May-Grünwald-Giemsa staining. $\times 850$

Fig. 3. Preparation after eighteen hours of inflammation. Predominance of mononuclear cells. May-Grünwald-Giemsa staining. $\times 850$

Fig. 4. Preparation after twenty-four hours of inflammation. Degenerated inflammatory cells among fibrous structures. May-Grünwald-Giemsa staining. $\times 850$

Fig. 5. Preparation after five hours of inflammation. Alkaline phosphatase of polynuclear cells; activity from 0 to +2 according to Kaplow. Azo dye method after Hayhoe and Quaglino. $\times 850$

Fig. 6. The same lesion as in Fig. 5 after eleven hours of inflammation. Alkaline phosphatase activity from +1 to +4 according to Kaplow. Azo dye method after Hayhoe and Quaglino. $\times 850$

Fig. 7. Preparation after five hours of inflammation. Weak acid phosphatase activity of polynuclear cells. Azo dye method after Burstone. Nuclei counterstained with Mayer's hematoxylin, $\times 850$

Fig. 8. The same lesion as in Fig. 7 after eleven hours of inflammation. Strong acid phosphatase activity of polynuclear and mononuclear cells. Azo dye method after Burstone. Nuclei counterstained with Mayer's hematoxylin. $\times 850$

Fig. 9. Preparation after four hours of inflammation. Weak nonspecific esterase activity of polynuclear cells. Strongly positive activity in the histiocyte. The method according to Braunstein. $\times 850$.

Fig. 10. The same lesion as in Fig. 9 after sixteen hours of inflammation. Strong nonspecific esterase activity of mononuclear cells. Weakly positive polynuclear cells. Method of Braunstein. $\times 850$.

Fig. 11. Preparation after six hours of inflammation. Weak succinic dehydrogenase activity of polynuclear and mononuclear cells. Method of de Souza and Kothare. $\times 850$.

Fig. 12. The same lesion as in Fig. 11 after twelve hours of inflammation. Various degrees of succinic dehydrogenase activity of inflammatory cells. Method of de Souza and Kothare. $\times 850$.

Fig. 13. Preparation after five hours of inflammation. NADPH₂ dehydrogenase activity of polynuclear cells. Method of Farber. $\times 850$

Fig. 14. The same lesion as in Fig. 13 after fourteen hours of inflammation. Strong NADPH₂ dehydrogenase activity of mononuclear cells and weak activity of polynuclear cells. Method of Farber. $\times 850$

Fig. 15. Preparation after sixteen hours of inflammation. Aminopeptidase activity of polynuclear and mononuclear cells. Method of Burstone and Folk. $\times 1000$

Fig. 16. Preparation after sixteen hours of inflammation. Strongly positive PAS-reaction for glycogen in polynuclear cells. Numerous glycogen granules in mononuclear cells. Method of Mc Manus and Mowry. $\times 1000$

Fig. 17. Preparation after twelve hours of inflammation. Sudan Black B staining for lipids. Strongly sudanophilic polynuclear cells. Numerous sudanophilic granules in mononuclear cells. The method by Lison. $\times 850$.

Papier druk. sat. III kl. 80 g
Annales UMCS Lublin 1967
800 + 60 egz. F-3

Format 70 × 100
LZGraf im. PKWN, Lublin, Unicka 4
Manuskrypt otrzymano 17.VIII.68

Druku str. 26 + 3 tab.
Zam. 2682. 17.VIII.68
Data ukończenia 26.III.69