

Ю.В. Шевчук

Електрофоретична рухливість лімфоцитів мигдаликів людини при хронічному тонзиліті

Методом мікроелектрофореза досліджували зміни електрофоретичної подвижності (ЕФП) лімфоцитів мигдалини у хворих з хронічним тонзилітом. В якості контролю використовували лімфоцити мигдалин здорових людей-волонтерів. Показано, що середнє значення ЕФП лімфоцитів в контрольній групі було $(-0,98 \pm 0,02)$ мкм·см·В⁻¹·с⁻¹. У хворих з хронічним тонзилітом абсолютна величина ЕФП лімфоцитів зменшалась в середньому на 16 % і становила $(-0,82 \pm 0,02)$ мкм·см·В⁻¹·с⁻¹ ($P < 0,02$). Процентне вміщення лімфоцитів, ЕФП яких близька до 0, у хворих вище, ніж в контролі. На основі результатів математичного аналізу експериментальних даних висказано припущення про те, що зменшення абсолютної величини ЕФП при хронічному тонзиліті пов'язано з зменшенням кількості активізованих лімфоцитів.

ВСТУП

Мигдалики відносяться до периферичних лімфоїдних органів, які виконують захисну функцію. Їх паренхіма представлена лімфоїдною тканиною, клітинною основою якої є лімфоцити, макрофаги та плазматичні клітини. Лімфоцити мигдаликів *in vivo* здійснюють реакції клітинного та гуморального імунітету [4, 6, 10]. Функціональний статус мигдаликів, як імунних органів, залежить від повноцінності стану клітин, що їх утворюють. Серед методів оцінки функціонального стану клітини, нарівні з морфологічними, біохімічними й імунологічними, велику зацікавленість викликає електрофізичний метод (мікроелектрофорез) дослідження зовнішньої мембрани клітини, яка відображає її життєдіяльність.

Плазматична мембрана клітини є граничною поверхнею, яка безпосередньо відділяє клітини від навколишнього середовища. Саме мембрана підлягає атаці пошкоджувальних факторів – фізичних, хімічних і біологічних. На поверхні клітини здійс-

нюється її взаємодія з навколишнім середовищем, яке регулюється як хімічним складом плазматичної мембрани, так і фізико-хімічними характеристиками клітинної мембрани. Важливою фізико-хімічною властивістю поверхні клітини є її поверхневий заряд. Його величина залежить від функціонального стану клітини [1, 5, 7]. Вона визначає примембранну концентрацію іонів і біологічно активних молекул, впливає на функціонування потенціалзалежних мембранних механізмів, відіграє важливу роль в міжклітинному взаємозв'язку [3, 8].

Для дослідження поверхневого заряду різних типів клітин широко використовується метод мікроелектрофорезу [11]. Він дозволяє визначити не тільки величину поверхневого заряду, а і оцінити реакції клітин на зовнішні впливи при їх змінах. Поверхневий заряд лімфоцитів змінюється при різних захворюваннях [2, 6].

Метою нашого дослідження було визначення змін електрофоретичної рухливості лімфоцитів мигдаликів у хворих на хронічний тонзиліт.

© Ю.В. Шевчук

МЕТОДИКА

Виділення лімфоцитів. Лімфоцити отримували з мигдаликів здорових (донори – добровольці) та хворих на хронічний тонзиліт людей за стандартною методикою [9]. Підраховували кількість клітин у камері Горяєва та доводили їх концентрацію в суспензії до 10^6 клітин/мл. Кількість лімфоцитів із непошкодженою мембраною визначали за відсутністю пофарбування трипановим синім (0,1%-й розчин, 10 хв). У всіх експериментах воно було не менше ніж 90 %.

Вимірювання електрофоретичної рухливості лімфоцитів. Клітини промивали двократним центрифугуванням (10 хв, 400 g) розчином наступного складу (ммоль/л): CaCl_2 – 2,0, KCl – 2,5, тріс-НСІ (рН 7,4) – 10,0, глюкоза – 280,0. Електрофоретичну рухливість (ЕФР) лімфоцитів визначали в цьому самому розчині при 20°C за описаною раніше методикою [11].

Статистичний аналіз експериментальних результатів. Серія експериментів включала 8 досліджень, в кожному з яких проводили вимірювання ЕФР не менше ніж 50 клітин.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакету програм “Mat-

Lab V.6.5”. Рівень достовірності при оцінці дійсного значення вимірюваної величини ЕФР становив 95 %. Для визначення достовірності різниці при порівнянні середніх значень ЕФР використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1,а представлено гістограму ЕФР лімфоцитів мигдалика здорового донора. Середнє значення ЕФР становило $(-0,98 \pm 0,02)$ $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Оскільки гістограма асиметрична, можна допустити, що популяція клітин здорових мигдаликів гетерогенна. Для перевірки цієї гіпотези ми проаналізували експериментальні дані методом normal probability plot, який дозволяє виявити гаусові нормальні розподілення (рис. 1,б).

Графік нормальної ймовірності (див.рис. 1,б) має точку перегину $-1,00$ $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Це дає змогу зробити висновок про те, що гістограма на рис. 1,а є суперпозицією нормальних розподілень двох субпопуляцій лімфоцитів із середніми значеннями ЕФР $\omega_1 = -0,67 \pm 0,05$ та $\omega_2 = (-1,44 \pm 0,03)$ $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ відповідно ($P < 0,01$).

Поділ клітин на дві популяції за ознакою різної ЕФР оснований на результатах

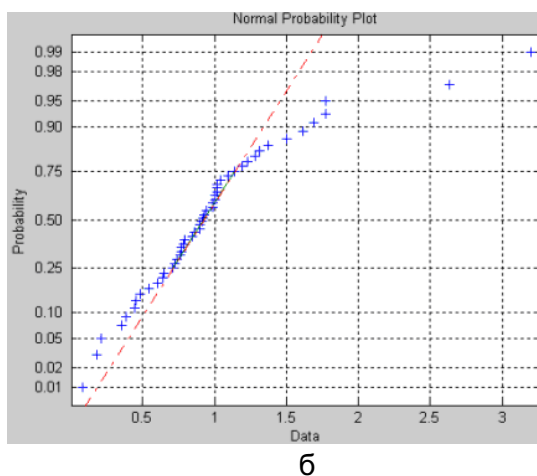
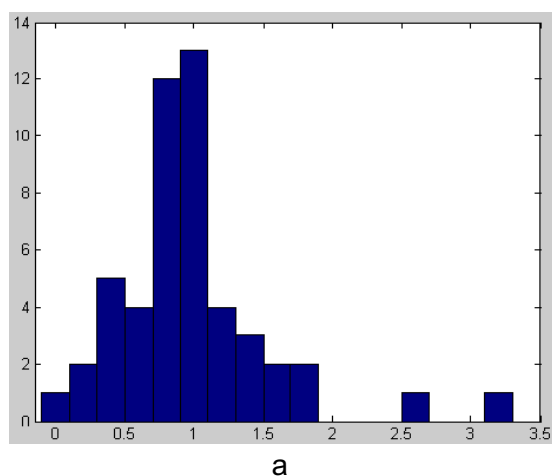


Рис. 1. Гістограма електрофоретичної рухливості лімфоцитів мигдаликів контрольної групи (за віссю абсцис – електрофоретична рухливість, $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$; за віссю ординат – кількість клітин) (а); графік нормальної ймовірності (normal probability plot) для електрофоретичної рухливості лімфоцитів мигдаликів контрольної групи (за віссю абсцис – електрофоретична рухливість, $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$; за віссю ординат – ймовірність) (б)

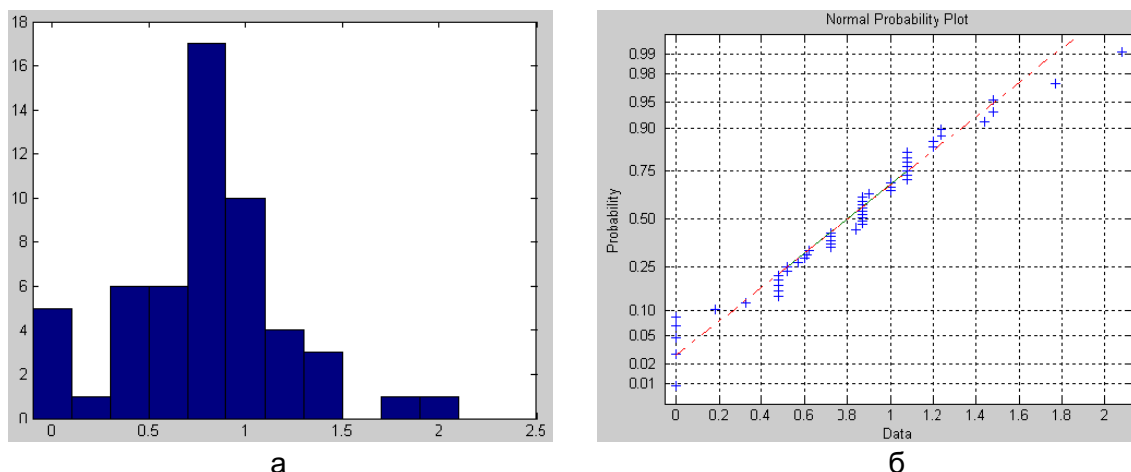


Рис. 2. Гістограма електрофоретичної рухливості лімфоцитів мигдаликів ушкоджених хронічним тонзилітом (за віссю абсцис – електрофоретична рухливість, $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$; за віссю ординат – кількість клітин) (а); графік нормальної ймовірності (normal probability plot) для електрофоретичної рухливості лімфоцитів мигдаликів хворих хронічним тонзилітом (за віссю абсцис – електрофоретична рухливість, $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$; за віссю ординат – ймовірність) (б)

математичного аналізу експериментально отриманих даних. Можливо, субпопуляція лімфоцитів з високою абсолютною величиною ЕФР представлена багатьма активованими клітинами, ЕФР яких значно вищий, ніж неактивованих [1, 2], і свідчить про високий функціональний стан здорових клітин.

Типову гістограму ЕФР лімфоцитів мигдаликів, ушкоджених хронічним тонзилітом, представлено на рис. 2,а. У середньому значення абсолютної величини ЕФР лімфоцитів мигдаликів у хворих на хронічний тонзиліт в наших дослідженнях становило $(-0,81 \pm 0,02)$ $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$, що на 16 % менше, ніж у контрольній групі. Число клітин, ЕФР яких близька до 0, в лімфоцитах ушкоджених мигдаликів більше, ніж у контрольній групі. Цей факт свідчить про погіршення функціонального стану лімфоцитів при хронічному тонзиліті. Асиметричність гістограм ЕФР лімфоцитів мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт виражена значно менше, ніж у контролі. Положення точки перегину графіка нормальної ймовірності не змінюється $\omega = 1,00$ $\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{В}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Таким чином, при хронічному тонзиліті зменшується абсолютна

величина ЕФР тієї популяції лімфоцитів, в якій, якщо оцінювати за величиною ЕФР, наявні активовані клітини та знижується кількість самих клітин.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу мікроелектрофорезу досліджено ЕФР лімфоцитів мигдаликів людини.
2. Показано, що при хронічному тонзиліті абсолютна величина ЕФР лімфоцитів мигдаликів зменшується.
3. На основі результатів математичного аналізу експериментальних результатів зроблено припущення про те, що зниження абсолютної величини ЕФР при хронічному тонзиліті пов'язано зі зменшенням числа активованих лімфоцитів, і це призводить до зниження функціонального стану мигдаликів.

Y.V.Shevchuk

ELECTROPHORESIS MOTILITY OF HUMAN TONSIL LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC TONSILLITIS

The changes in the electrophoresis motility (EPM) of lymphocytes in the tonsils of patients with chronic tonsillitis

litis were assessed using the method of microelectrophoresis. Tonsil lymphocytes of healthy volunteers were used as controls of these experiments. During this investigation it was shown that the average value of EPM of lymphocytes in the control group was $-0.98 \pm 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$. The absolute value of TPM of lymphocytes of the patients with chronic tonsillitis in average dropped 16% to a value of $-0.82 \pm 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$. The percent composition of lymphocytes, whose EPM was close to 0, is higher in the group of patients with chronic tonsillitis, then in the control group. Mathematical analysis were conducted on the experimental data and on the basis of the results it was proposed that the drop of the absolute value of EPM during chronic tonsillitis is connected with the drop in the amount of active lymphocytes.

A. A. Bogomoletz National Medical University, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Долгая Е.В., Крылова И.В., Рожманова О.М. Изменение электрофоретической подвижности Т-лимфоцитов мыши под влиянием конкаваналина А // Биол. мембраны 1991. – 8, № 7. – С. 775–762.
2. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф. Теоретические аспекты генеза и терапии хронического тонзиллита. – К.: Здоров'я, 1999. – 122 с.
3. Козинец Г.И. Электрофорез клеток гемопоэтической ткани. – Тбилиси: Сакартвело, 1986. – 150 с.
4. Ляшенко В.А., Дрожников В.А., Молотковская И.М. Механизмы активации иммунокомпетентных клеток. – М.: Медицина, 1988. – 240 с.
5. Мирошников А.И., Фомченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. – М.: Наука, 1986. – 184 с.
6. Петров Р.В., Дозморов И.М., Левин А.Д. и др. Характеристика субпопуляций лимфоцитов, полученных препаративным электрофорезом // Иммунология. – 1980. – № 5. – С. 5–8.
7. Сунгуров А.Ю. Электрофорез клеток // Цитология. – 1984. – 26, № 9. – С. 983–995.
8. Эшмен З. Активация лимфоцитов. – Иммунология. – М.: Мир, 1987. – С. 414–466.
9. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1967. – 215, Suppl. 1968. – P. 28–33.
10. Michael D. Cahalan, Heike Wulff, K. Georget Chandy. Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System // J. Clin. Immunol. – 2001. – 21, № 4. – P. 235–249.
11. Mironov S.L., Dolgaya E.V. Surface Charge of Mammalian Neurons as revealed by microelectrophoresis // J. Membrane Biol. – 1985. – 86, №2. – P. 197–202.

Нац. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця

*Матеріал надійшов до
редакції 15.02.2004*