

Ю.В. Яніш, С.П. Залеток, В.В. Бенрад, Л.М. Скляренко

# Електрокінетичні характеристики лімфоїдних клітин онкологічних пацієнтів і здорових донорів

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, Київ

Одержано 03.09.2018

Прийнято до друку 28.09.2018

Досліджено  $\zeta$ -потенціал і поверхневий електричний заряд В-лімфоцитів здорових донорів, лімфоцитів пацієнтів з В-клітинними лімфомами та бластних клітин пацієнтів з гострими лейкозами. Показано, що лімфоцити здорових донорів мають більший  $\zeta$ -потенціал, ніж лімфоїдні і бластні клітини хворих онкологічного профілю.

**Ключові слова:**  $\zeta$ -потенціал; поверхневий електричний заряд; В-лімфоцит; бласт; лейкоз; лімфома.

## ВСТУП

Дослідження, проведені за цією тематикою раніше, стосувалися визначення біофізичних параметрів (електрокінетичного  $\zeta$ -потенціалу і сумарного поверхневого заряду — СПЗ) лімфоїдних клітин пацієнтів, у яких були діагностовані хронічні і гострі форми лейкозів та деякі неходжкінські лімфоми [1]. На часі постала необхідність порівняння цих параметрів з аналогічними показниками лімфоцитів людей без онкологічних захворювань.

З цією метою виконано дослідження електрокінетичних характеристик лімфоїдних клітин зі зразків периферичної крові хворих на дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВВКЛ), гострий мієлобластний та гострий монобластний лейкози. Вказані характеристики паралельно визначено і для клітин загального пулу мононуклеарів периферичної крові здорових донорів, і для виділених з цього пулу В-лімфоцитів. На основі експериментальних вимірів електрокінетичного потенціалу ( $\zeta$ -потенціалу) зроблено обчислення щільності СПЗ досліджуваних клітин  $q$ , вираженої у кулонах на одиницю площі поверхні ( $\text{Кл}/\text{м}^2$ ), а також вивчено профілі їх частотного розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу. Проведено зіставлення електрокінетичних показників, визначених для лімфоцитів здорових людей, з аналогічними показниками лімфоїдних та бластних клітин хворих онкологічного профілю.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ І МЕТОДИ

Методи вимірювання біофізичних показників клітин доцільно викладено у попередній публікації [1].

Мононуклеари здорових донорів і пацієнтів онкологічного профілю виділяли центрифугуванням на градієнті фіколоворографіні «білої» фракції зі зразка периферичної крові, яка попередньо відстоювалася до осідання еритроцитарної маси (1500 об./хв, 40 хв, діаметр бакет-ротора 18 см; щільність градієнта  $1,076\text{--}1,078\text{ г}/\text{см}^3$ ); В-лімфоцити отримували із загального пулу мононуклеарів з використанням еритроцитів барана — шляхом видалення спонтанно утворених С-розеток, нехтуючи незначною домішкою моноцитів у кінцевій суспензії.

Кількісний розподіл лейкоцитів у зразках периферичної крові визначали за допомогою гемоаналізатора PCE-210 (ERMAinc, Японія).

Зразки крові пацієнтів, як і раніше, надходили з відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України (завідувач — професор Д.Ф. Глузман). Хворі були проінформовані щодо проведення досліджень і надали згоду на використання свого клінічного матеріалу в наукових цілях.

Статистичну обробку отриманих результатів проведено з використанням  $t$ -критерію Стьюдента за загальноприйнятою процедурою [1].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень зведені до табл. 1–6, найбільш ілюстративні матеріали представлені також у вигляді графіків (рис. 1–3).

**Таблиця 1.** Електрокінетичні характеристики мононуклеарів периферичної крові здорових донорів

№ зразка, стать	Вік, років	$\zeta$ -потенціал, мВ	Щільність СПЗ — $q$ , $\cdot 10^{-2}\text{ Кл}/\text{м}^2$
013, чол.	63	$9,8 \pm 1,2$	$-7,0 \pm 0,8$
019, чол.	56	$9,8 \pm 0,7$	$-7,0 \pm 0,5$
021, чол.	79	$11,6 \pm 0,8$	$-8,3 \pm 0,6$
022, жін.	66	$10,1 \pm 0,7$	$-7,3 \pm 0,5$
<b><math>M \pm n</math></b>	<b><math>66,0 \pm 6,5</math></b>	<b><math>10,3 \pm 0,5</math></b>	<b><math>-7,4 \pm 0,4</math></b>
020, чол.*	63	$14,9 \pm 0,6$	$-10,7 \pm 0,4$

\*Результати наведені окремо, оскільки вони статистично вірогідно відрізняються від середніх показників інших донорів.

З табл. 1 видно, що всі здорові донори були відносно похилого віку. Проте  $\zeta$ -потенціал і щільність СПЗ ( $q$ ) досліджуваних клітин їх периферичної крові варіювали досить мало, що дало підстави для усереднення даних без огляду на стать. Результати вимірів, що стосуються зразка № 020, помітно відрізняються від показників інших донорів, тому у табл. 1, 3 і 5 вони наведені окремо. Можливо, це — наслідок загострення доволі сильного запального процесу інфекційної етіології у м'яких тканинах, який маніфестував напередодні забору крові, тому дані щодо цього донора заслуговують на окрему увагу.

Табл. 2 демонструє значною мірою стабільні біофізичні показники В-лімфоцитів, отриманих із загального пулу мононуклеарів двох донорів, обраних за їх віком.

**Таблиця 2.** Електрокінетичні характеристики В-лімфоцитів периферичної крові здорових донорів

№ зразка, стать	Вік, років	$\zeta$ -потенціал, мВ	Щільність СПЗ — $q$ , $\cdot 10^{-2}\text{ Кл}/\text{м}^2$
013, чол.	63	$13,6 \pm 0,6$	$-9,7 \pm 0,5$
019, чол.	56	$12,4 \pm 0,5$	$-8,9 \pm 0,3$
<b><math>M \pm n</math></b>	<b><math>59,5 \pm 3,5</math></b>	<b><math>13,0 \pm 0,6</math></b>	<b><math>-9,3 \pm 0,4</math></b>

Довірчі інтервали у рядках табл. 1 і 2 характеризують точність вимірювань в експерименті, в той час як у стовпчиках ( $M \pm n$ ) — похибку середніх значень отриманих результатів.

Із даних табл. 3 бачимо, що частотний розподіл мононуклеарів периферичної крові здорових донорів за значеннями  $\zeta$ -потенціалу має одномодальний профіль з інтегральним максимумом близько 10,5 мВ. Зразок № 020 відрізняється від інших не тільки більшим середнім значенням  $\zeta$ -потенціалу (див. табл. 1), але і зсувом піку інтегральної моди розподілу клітин у напрямку його збільшення до 14,0 мВ.

**Таблиця 3.** Частотний розподіл за значеннями  $\zeta$ -потенціалу (мВ) мононуклеарів периферичної крові здорових донорів, %

№ зразка	Інтервали значень $\zeta$ -потенціалу, мВ							
	3,5	3,6–7,0	7,1–10,5	10,6–14,0	14,1–17,5	17,6–21,0	21,1–24,5	24,6–28,0
013	0	25	50	15	5	0	0	0
019	0	10	65	25	0	0	0	0
021	0	5	40	35	15	5	0	0
022	0	5	65	15	15	0	0	0
<b>M±n, %</b>	<b>0</b>	<b>11,3±5,6</b>	<b>55,0±7,0</b>	<b>22,5±5,6</b>	<b>8,8±4,2</b>	<b>1,3±1,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
020	0	0	0	50	35	10	5	0

**Таблиця 4.** Частотний розподіл за значеннями  $\zeta$ -потенціалу (мВ) В-лімфоцитів периферичної крові здорових донорів, %

№ зразка	Інтервали значень $\zeta$ -потенціалу, мВ							
	3,5	3,6–7,0	7,1–10,5	10,6–14,0	14,1–17,5	17,6–21,0	21,1–24,5	24,6–28,0
013	0	0	10	50	35	5	0	0
019	0	0	20	50	30	0	0	0
<b>M±n, %</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15,0±5,0</b>	<b>50,0±0,0</b>	<b>32,5 ± 2,5</b>	<b>2,5 ± 2,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Таблиця 5.** Кількісний розподіл лейкоцитів у зразках периферичної крові здорових донорів за даними гемоаналізатора

№ зразка, стать	Вік, років	Лейкоцити, $\cdot 10^9$ кл/дм <sup>3</sup>	Лімфоцити, %	Моноцити, %	Гранулоцити, %
013, чол.	63	5,14	37,2	6,1	56,7
019, чол.	56	5,33	53,8	2,5	43,7
021, чол.	79	9,80	31,9	3,0	65,1
022, жін.	66	5,15	35,5	6,3	58,2
<b>M±n</b>	<b>66,0±6,5</b>	<b>6,36±1,3</b>	<b>39,6±6,2</b>	<b>4,5±1,1</b>	<b>55,9±6,0</b>
020, чол.	63	5,30	35,8	5,7	58,5

Особливо треба відмітити практично повний збіг між собою профілів частотного розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу В-лімфоцитів, виділених зі зразків крові здорових донорів № 013 і № 019 (табл. 4).

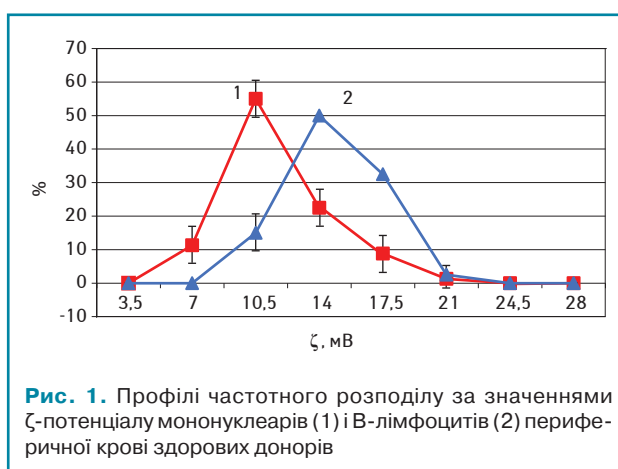
Лейкоцитарні формули демонструють нормальний стан білого ростка крові у всіх без винятку здорових донорів. Цікаво, що це стосується і зразка № 020, показники якого, наведені у табл. 5, статистично вірогідно не відрізняються від показників решти донорів. Можливо, згаданий вище запальний процес ще не встиг позначитися на формулі крові, але вже вдалося зареєструвати його перший вплив саме на електрокінетичні властивості поверхні лімфоцитів. А можливо, певні біофізичні відмінності органічно притаманні лімфоцитам цього донора і жодним чином не пов'язані ні з запаленням, ні з кількісним розподілом лейкоцитів за їх типами.

Порівняння даних табл. 1, 3 і 5 дає певні підстави вважати, що електрокінетичні характеристики мононуклеарів (переважно лімфоцитів) з периферичної крові здорових донорів взагалі не пов'язані з кількісними показниками формули крові. В свою чергу це може надати теоретичне підґрунтя для подальшого використання клітинного електрофорезу як додаткового прогностичного методу при комплексному дослідженні стану пацієнта.

Рис. 1 ілюструє наявність статистично вірогідних відмінностей між профілями частотного розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу мононуклеарів загального пулу і В-лімфоцитів зі зразків периферичної крові донорів, що вважалися здоровими. Зокрема, максимум значень інтегральної моди розподілу мононуклеарів загального пулу припадає на 10,5, а В-лімфоцитів, виділених з нього, — на 14,0 мВ відповідно; в обох випадках відмічають одномодальний характер розподілу, зазвичай притаманний живим однотиповим клітинам.

На рис. 2 наведено профіль частотного розподілу мононуклеарів зі зразка № 020 донора, у якого на момент забору крові спостерігався потужний запальний процес м'яких тканин, викликаний абсцесом глибокої атероми, у подальшому лікованим оперативно. Профіль має нормальний характер, проте максимум інтегральної моди розподілу зміщений і відповідає значенню 14,0 мВ, характерному швидше для В-лімфоцитів, ніж для мононуклеарів загального пулу (див. табл. 3, 4).

На рис. 3 представлено найбільш характерні дані щодо розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу бластних клітин пацієнток, хворих на гострі лейкози, зокрема гострий мієлобластний



**Рис. 1.** Профілі частотного розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу мононуклеарів (1) і В-лімфоцитів (2) периферичної крові здорових донорів



**Рис. 2.** Профіль частотного розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу мононуклеарів периферичної крові донора під час загострення запального процесу інфекційної етіології

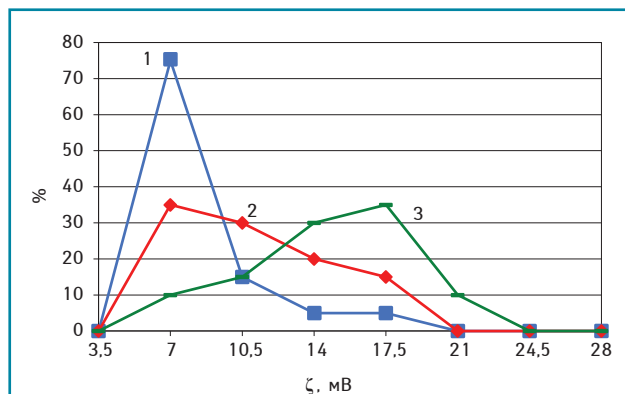
лейкоз М4 (історія хвороби № 2358), гострий монобластний лейкоз М5 (№ 2324) і (що трапляється рідше) гострий монобластний лейкоз М5, який на момент забору зразка периферичної крові був обтяжений вагітністю строком 20 тиж (№ 777).

Профіль розподілу клітин в усіх трьох випадках має одномодальний вигляд, проте максимум інтегральної моди як у випадку гострого мієлобластного (крива 1), так і гострого монобластного лейкозу (крива 2) дорівнює 7,0 мВ. Треба особливо відмітити, що з переходом мієлоїдного лейкозу від

**Таблиця 6.** Частотний розподіл за значеннями  $\zeta$ -потенціалу (мВ) лімфоїдних клітин периферичної крові хворих на деякі неходжкінські лімфоми та гострий лімфатичний лейкоз, %

Діагноз	Інтервали значень $\zeta$ -потенціалу, мВ							
	3,5	3,6–7,0	7,1–10,5	10,6–14,0	14,1–17,5	17,6–21,0	21,1–24,5	24,6–28,0
ВЛМ <sup>CD5</sup>	0	25	40	10	20	5	0	0
ДВВКЛ	0	35	40	15	10	0	0	0
ГЛЛ	0	5	25	55	15	0	0	0

ВЛМ<sup>CD5</sup> – В-клітинна лімфома з клітин маргінальної зони у стадії лейкоїзації з коекспресією CD5; ГЛЛ – гострий лімфатичний лейкоз.



**Рис. 3.** Профілі частотного розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу бластних клітин хворих на гострий мієлобластний лейкоз М4 (1), гострий монобластний лейкоз М5 (2) і гострий монобластний лейкоз М5, обтяжений вагітністю (3)

стадії М4 до стадії М5 помітна тенденція до зниження піку розподілу з розширенням його основи в бік більших значень  $\zeta$ -потенціалу. Це можна пояснити появою у досліджуваному пулі певної, але поки що невеликої кількості клітин з більшим від'ємним сумарним зарядом на їх поверхні. Вказаний йонний дисбаланс може бути спричинений або зниженням на клітинній поверхні та у глікокаліксі вмісту катіонів, зокрема деяких поліамінів, або ж надмірним вмістом поліаніонів (наприклад позаклітинних нуклеопротейдів). Остаточне пояснення описаному явищу можуть дати результати суто біохімічних досліджень. У пацієнтки з гострим мієлобластним лейкозом М4  $\zeta$ -потенціал мієлобластів становив  $6,7 \pm 0,7$  мВ, а поверхнева щільність сумарного електричного заряду  $q = -4,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>;  $\zeta$ -потенціал монобластів пацієнтки з гострим монобластним лейкозом М5 дорівнював  $9,4 \pm 0,7$  мВ, а  $q = -6,7 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>. Додатково треба мати на увазі, що обидві пацієнтки були менопаузального віку.

На окремий розгляд заслуговує випадок, коли хвора на гострий монобластний лейкоз віком 26 років перебувала наприкінці II триместру вагітності. Профілі частотного розподілу бластних клітин зі зразка її периферичної крові також мав одномодальний характер, але його максимум відповідав 17,5 мВ, до того ж була відмічена тенденція до зниження інтегральної моди за рахунок розширення її основи, але цього разу — переважно з боку менших значень  $\zeta$ -потенціалу (рис. 3).

Феноменологічне пояснення зафіксованого явища може полягати у прискореному накопиченні вільного L-аргініну в сироватці крові жінок протягом 12–18-го тижнів гестації, що забезпечує оптимальний рівень синтезу оксиду азоту і сприяє фізіологічному перебігу вагітності [2]. Зокрема, L-аргінін опосередковано через ROS-генеруючі системи впливає на відповідні зміни анатомічної структури шийки матки [3]. Але аргінін є ще й попередником утворення орнітину, з якого надалі починається сполучений каскад реакцій синтезу поліамінів [4]. Виявлене підвищення значень  $\zeta$ -потенціалу бластних клітин з периферичної крові вагітної пацієнтки може бути наслідком зростання їх від'ємного СПЗ саме внаслідок надлишкового накопичення аніонів орнітину. Це дотично узгоджується з на-

шими попередніми даними, які стосуються змін поверхневого заряду клітин карциноми Льюїс в експериментах *in vivo* [4].

У табл. 6 представлені найбільш характерні випадки розподілу за значеннями  $\zeta$ -потенціалу клітин лімфоїдного ряду пацієнтів із деякими неходжкінськими лімфомами та гострим лімфатичним лейкозом.

Так, у пацієнта з діагнозом В-клітинна лімфома з клітин маргінальної зони у стадії лейкоїзації з коекспресією антигену CD5 (ВЛМ<sup>CD5</sup>, 42 роки, зразок № 958;  $\zeta = 10,3 \pm 1,2$  мВ;  $q = -7,4 \pm 0,9 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>) відмічається бімодальний профіль розподілу з максимумами, що відповідають 10,5 мВ (головний пік) та 17,5 мВ (другорядний пік, див. табл. 6).

У пацієнта з ДВВКЛ (44 роки, історія хвороби № 1063;  $\zeta = 8,7 \pm 0,8$  мВ;  $q = -6,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>) профіль частотного розподілу лімфоцитів за значеннями  $\zeta$ -потенціалу має розширену форму, зумовлену геометричною суперпозицією двох близько розташованих мод з максимумами в інтервалі 3,6–7,0 мВ (35% клітин) та 7,1–10,5 мВ (40% клітин). Це цілком відповідає тій обставині, що у зразку мононуклеарів із його периферичної крові виявлено близько 30% великих до 15 мкм у діаметрі клітин з дещо порушеною сферичною формою; решта клітин не перевищувала за розмірами звичайний малий лімфоцит (8 мкм). Значно відрізняються електрокінетичні параметри мононуклеарів пацієнтки з таким самим діагнозом (зразок № 2371, у таблиці не представлений):  $\zeta = 3,1 \pm 0,4$  мВ;  $q = -2,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>. Це становить певний інтерес, тому що вік обох хворих цілком зіставний (чоловік 44 і жінка 39 років), отже, різниця може бути пояснена саме статевою приналежністю пацієнтів.

Профілі частотного розподілу трансформованих лімфоцитів пацієнта, хворого на гострий лімфатичний лейкоз (44 роки, зразок № 2854), має чітко виражений одномодальний характер з максимумом, що відповідає 14,0 мВ; притому він майже ідентичний за формою і кількісними характеристиками профілю розподілу В-лімфоцитів здорових донорів (див. рис. 1) і мононуклеарів загального пулу донора, у якого виявлено запальний процес інфекційної етіології (див. рис. 2) ( $\zeta$  лімфоцитів =  $11,8 \pm 0,8$  мВ;  $q = -8,4 \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$  Кл/м<sup>2</sup>).

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що В-лімфоцити здорових донорів мають достовірно вищі значення  $\zeta$ -потенціалу та від'ємного СПЗ, ніж лімфоцити хворих на В-клітинні лімфоми і навіть бластні клітини периферичної крові пацієнтів із гострими мієлоїдними лейкозами. Це може бути пояснено збільшенням кількості катіонів, зокрема поліамінів, на поверхні лімфоїдних клітин хворих онкологічного профілю, що призводить до відносного зменшення впливу аніонів на сумарний заряд їх поверхні.

2. Підтверджено раніше встановлений факт, що В-лімфоцитам із периферичної крові хворих на неходжкінські лімфоми притаманний бімодальний частотний розподіл за значеннями  $\zeta$ -потенціалу; не виключено, що він зумовлений початком процесу лейкоїзації лімфом.

3. Показано, що монобласти пацієнтки, перебіг гострого монобластного лейкозу М5 у якої був обтяжений вагітністю, мали достовірно вищий  $\zeta$ -потенціал, ніж такі клітини інших пацієнток із гострими мієлоїдними лейкозами. Це можна пояснити накопиченням вільного L-аргініну в сироватці крові вагітних, що в свою чергу викликає збільшений вміст синтезованих із нього аніонів орнітину на поверхні бластних клітин.

4. Клітинний електрофорез можна використовувати як допоміжний прогностичний метод при комплексній індивідуальній оцінці стану хворих онкологічного профілю.

#### ПОДЯКА

Висловлюємо щирю подяку співробітникам відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України і особисто завідувачу відділу професору Д.Ф. Глузману за люб'язно надані зразки крові пацієнтів і консультативну підтримку.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Яніш Ю.В., Залеток С.П., Скляренко Л.М. (2017) Електрокінетичні характеристики лімфоїдних клітин пацієнтів з хронічними і гострими лейкозами та неходжкінськими лімфомами. *Клін. онкол.*, 4(28): 88–91.
2. Грищенко О.В., Лісіцина Н.В., Коровай С.М. та ін. (2010) Тівортін як потужний модулятор судинного тонуусу та його місце в патогенетичній терапії преекламсії. *Педіатрія, акушерство та гінекологія*, (3): 101–106.
3. Климашкин А.А., Назаров Б.Б., Расуль-Заде Ю.Г. (2012) К вопросу о роли донаторов оксида азота при различных акушерских состояниях. *Укр. хіміотер. журн.*, 27(3): 76–82.
4. Яніш Ю.В., Гончар М.В., Гоголь С.В., Кленов О.О., Бентрад В.В. (2015) Вплив модуляторів метаболізму аргініну і поліамінів на поверхневий електричний заряд клітин карциноми легені *Lewis (LLC) in vivo* та на їх проліферативну активність у культурі. *Клін. онкол.*, 2(18): 52–54.

#### Электрокинетические характеристики лимфоидных клеток онкологических пациентов и здоровых доноров

*Ю.В. Яніш, С.П. Залеток, В.В. Бентрад, Л.М. Скляренко  
Інститут експериментальної патології, онкології  
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ*

**Резюме.** Исследованы ζ-потенциал и поверхностный электрический заряд В-лимфоцитов здоровых доноров, лимфоцитов пациентов с В-клеточными лимфомами и бластных клеток пациентов с острыми лейкозами. Показано, что лимфоциты

здоровых доноров имеют больший ζ-потенциал, чем лимфоидные и бластные клетки больных онкологического профиля.

**Ключевые слова:** ζ-потенциал; поверхностный электрический заряд; В-лимфоцит; бласт; лейкоз; лимфома.

#### Electrokinetic characteristics of lymphoid cells of cancer patients and healthy donors

*Yu. V. Yanish, S. P. Zaletok, V. V. Bentrads, L. M. Sklyarenko  
R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology  
and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv*

**Summary.** The ζ-potential and surface electrical charge of В-lymphocytes of healthy donors, lymphocytes of patients with В-cell lymphomas and blast cells in patients with acute leukemia have been investigated. It has been shown that lymphocytes of healthy donors have a greater ζ-potential than lymphoid and blast cells of cancer patients.

**Key words:** ζ-potential; surface electric charge; В-lymphocyte; blast; leukemia; lymphoma.

#### Адреса:

*Яніш Юрій Вадимович  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології  
ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
Тел.: (044) 259-91-95  
E-mail: yanish\_o@ukr.net*

#### Correspondence:

*Yanish Yuriy  
45, Vasylkivska str., Kyiv 03022  
R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,  
NAS of Ukraine  
Tel.: (044) 259-91-95  
E-mail: yanish\_o@ukr.net*