
ZVLÁŠTNÍ RUBRIKA

PŮVODNÍ ZAHRANIČNÍ PŘÍSPĚVKY S ČESKÝM PŘEKLADEM

616.322-002.2-097

**AN IMMUNOFLUORESCENCE STUDY OF
IMMUNOCOMPETENT TONSILLAR
LYMPHOCYTES - A COMPARATIVE ANALYSIS
BETWEEN LEFT AND RIGHT TONSILS IN
PATIENTS WITH CHRONIC COMPENSATED
TONSILLITIS**

¹O. NAOUMOV, ²K. PLOCHEV, ²K. PENKOVA
¹Department of Otorhinolaryngology and ²Centre of
Immunology, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

Introduction

The tonsils are lymphoepithelial tissues located in strategic areas of the oral pharynx. They are one of the organs known as mucosal associated lymphoid tissue (MALT) (7). These immunocompetent tissues represent the first line of defence against ingested or inhaled foreign proteins, such as bacteria, viruses, or food antigens (1, 2, 7). They are continually directly bombarded by antigens, unlike the majority of lymph nodes, which receive antigens via the blood stream (2). Although the tonsils have a significant function in the immune system, tonsillectomy is one of the commonest surgical procedures performed in otorhinolaryngological practice (5). The indications for surgical intervention are a subject of controversy. The information necessary to make a rational decision in resolving this controversy can be obtained by understanding the immunological potential and the changes that occur in chronically diseased tonsils (6).

The authors consider the conventional criteria insufficient for taking decisions for surgical intervention. As the tonsils play an important role in the immune defence of the organism, we accept that this focal inflammatory process can provoke some disorders of the distribution of the tonsillar immunocompetent cells.

That is reason to investigate the immunophenotype of tonsillar lymphocytes in both palatine tonsils, to look for differences between them and to see if there is any correlation between microorganisms isolated deeply in the tonsillar parenchyma and their immune activity.

616.322-002.2-097

**IMUNOFLUORESCENČNÍ STUDIE
IMUNOKOMPETENTNÍCH TONZILÁRNÍCH
LYMFOCYTŮ - SROVNÁVACÍ ANALÝZA MEZI
LEVOU A PRAVOU TONZILOU U NEMOCNÝCH
S CHRONICKOU KOMPENZOVANOU
TONZILITIDOU**

¹O. NAOUMOV, ²K. PLOCHEV, ²K. PENKOVA
¹Katedra otorinolaryngologie a ²Imunologické středisko,
Vojenská lékařská akademie, Sofie, Bulharsko

Úvod

Tonzily jsou lymfoepiteliální tkáň umístěné ve strategických oblastech orofaryngu. Jsou jedním z orgánů známých jako lymfoidní tkáň přiléhající ke sliznici (LTPS) (7). Tyto imunokompetentní tkáň představují první linii obrany proti proteinům, jako jsou bakterie, viry nebo potravinové antigeny, přijaté ústí s potravou nebo inhalačně (1, 2, 7). Tonzily jsou trvale přímo bombardovány antigeny na rozdíl od většiny lymfatických uzlin, ke kterým se antigeny dostávají prostřednictvím krevního oběhu (2). Přestože tonzily mají významnou funkci v imunitě, tonzilektomie je jedním z nejběžnějších chirurgických výkonů prováděných v otorinolaryngologické praxi (5). Indikace pro chirurgický výkon jsou předmětem sporu. Informace potřebná k racionálnímu rozhodnutí a k řešení tohoto sporu může být získána pochopením imunologického potenciálu a změn, které probíhají v chronicky nemocných tonzilách (6).

Autoři považují konvenční kritéria pro rozhodnutí o chirurgickém výkonu za nedostatečná. Jelikož tonzily hrají významnou úlohu v imunitní obraně organismu, chápeme, že tento ložiskový zánětlivý proces může vyvolávat určité poruchy v distribuci tonzilárních imunokompetentních buněk.

To je důvod pro výzkum imunofenotypu tonzilárních lymfocytů v obou palatálních tonzilách a k hledání rozdílů mezi nimi, abychom zjistili, zda je nějaká korelace mezi mikroorganismy izolovanými z hloubky tonzilárního parenchymu a jejich imunitní funkcí.

Materials and methods

A group of 40 male patients, aged between 18 and 28 years and suffering more than 3 attacks of recurrent tonsillitis without metatonsillar complications, was subjected to immunological investigation. The immunological status was made separately for the left and right tonsils, obtained after tonsillectomy. Operations were carried out regularly under local anesthesia between 9 and 11 o'clock a.m. Using the fluorescent activated cell sorter (FACSORT) of the firm BECTON-DICKINSON and software Lysis II we measured with monoclonal antibodies the following markers: CD3, CD19, CD16/56, CD4, CD8, CD25, CD71, HLA/DR in tonsillar suspension. Microbiological investigations were made of the same patients, who had undergone tonsillectomy, in order to identify the pathogens localised deeply in the tonsillar parenchyma, and to find out if there is any correlation between the isolated flora and the complex of immune tonsillar activity. Immediately after removing the tonsils, they were placed in a sterile Petri dish. After this they were cut in half and then the incised area was swabbed with a sterile cotton-tipped applicator and put onto suitable conventional media. The time between operation and inoculation was about 15-20 minutes.

Results and discussion

From the results shown in tabl. 1 it is evident that the leading microbial agent in our study is *Staphylococcus aureus*, followed by the different groups of *Streptococcus*.

As shown on tabl. 1 and fig.1 microbiological contamination with pathogenic flora is established for the left tonsil in 18 patients (45 %), and in 13 patients (32,5 %) for the right tonsil.

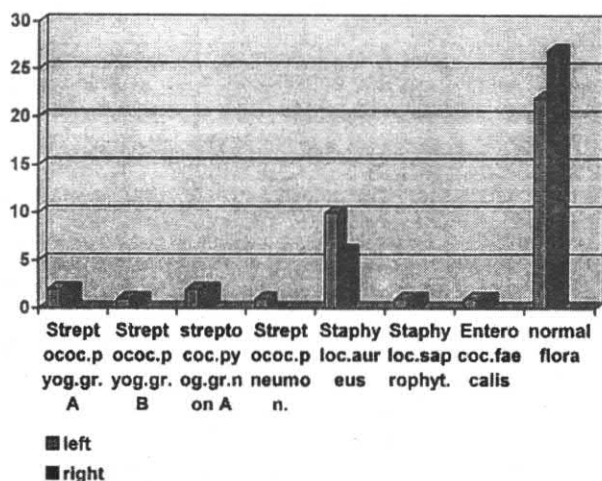


Fig.1 Graphical representation of the isolated flora in the left and right tonsils.

Materiál a metody

Skupina 40 mužů ve věku mezi 18 až 28 roky, kteří prodělali více než 3 ataky recidivující tonzilitidy bez metatonzilárních komplikací, byla podrobena imunologickému vyšetřování. Imunologický stav byl zjišťován odděleně pro levou a pravou tonzilu, získanou po tonzilektomii. Operace byly provedeny běžným způsobem při lokální anestezii mezi 9. až 11. hodinou dopoledne.

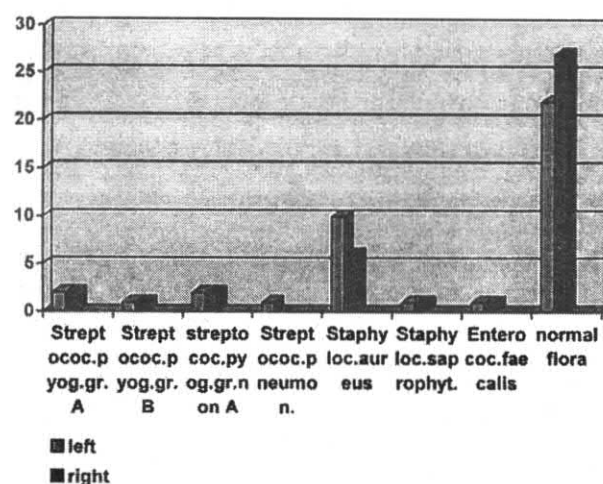
S použitím fluorescenčně aktivovaného separátoru buněk (FACSORT) firmy Becton-Dickinson a softwarového programu, Lysis II jsme s pomocí monoklonálních protilátek měřili v suspenzi z tonzil následující markery: CD3, CD19, CD16/56, CD4, CD8, CD25, CD71, HLA/DR.

Mikrobiologická vyšetření byla prováděna u stejných pacientů, kteří se podrobili tonzilektomii, a to za tím účelem, abychom identifikovali patogeny lokalizované v hloubce tonzilárního parenchymu a abychom zjistili, zda existuje nějaká korelace mezi izolovanou flórou a celkovou imunitní aktivitou tonzil. Bezprostředně po odstranění tonzil jsme je umístili do sterilní Petriho misky. Poté byly tonzily rozřezány na polovinu a z řezné plochy byl proveden stěr vatovým tampónem a ten přenesen na vhodnou živnou půdu. Doba mezi operací a inokulací byla asi 15-20 minut.

Výsledky a diskuse

Z výsledků uvedených v tabulce 1 je zřejmé, že dominantní mikrobiální agens v naší studii představuje *Staphylococcus aureus*, za ním následují streptokoky různých skupin.

Jak ukazuje tabulka 1 a obrázek 1, mikrobiální kontaminace patogenní flórou se nalézá v levé tonzile u 18 pacientů (45 %) a v pravé tonzile u 13 pacientů (32,5 %).



Obr. 1 Grafické znázornění flóry izolované z levé a pravé tonzily

Table 1

**Microbiological characteristics of the isolated flora
in depth of the tonsils in patients with chronic tonsillitis**

Organisms	Left tonsil n = 40	Right tonsil n = 40
<i>Streptococcus pyogenes</i> gr.A	2 (5 %)	2 (5 %)
<i>Streptococcus pyogenes</i> gr.B	1 (2.5 %)	1 (2.5 %)
<i>Streptococcus pyogenes</i> gr. non A non B	2 (5 %)	2 (5 %)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (2.5 %)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 (25 %)	6 (15 %)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 (2.5 %)	1 (2.5 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (2.5 %)	1 (2.5 %)
Normal flora	22 (55 %)	27 (67.5 %)

Tabulka 1

**Mikrobiologická charakteristika flóry izolované z hloubky
tonzil pacientů s chronickým zánětem mandlí**

Organismus	Levá tonsila n = 40	Pravá tonsila n = 40
<i>Streptococcus pyogenes</i> skupiny A	2 (5 %)	2 (5 %)
<i>Streptococcus pyogenes</i> skupiny B	1 (2,5 %)	1 (2,5 %)
<i>Streptococcus pyogenes</i> skupiny non A non B	2 (5 %)	2 (5 %)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (2,5 %)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 (25 %)	6 (15 %)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 (2,5 %)	1 (2,5 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (2,5 %)	1 (2,5 %)
Normální flóra	22 (55 %)	27 (67,5 %)

Our investigations confirm the fact that lately *Streptococcus pyogenes* has been isolated more rarely as a cause of reactive tonsillar pathology.

We found that in 22 patients (55 %) for the left tonsil and in 27 patient (67,5 %) for the right tonsil the presence of normal flora is confirmed, which again proves that the microbic agents have not the leading role in the etiopathogenesis of chronic tonsillitis (3, 4).

We did not define the type of the organisms involved as normal oropharyngeal flora. Many authors consider that the normal flora in the throat consists predominantly of anaerobic microorganisms (3, 4). The incidence of isolation of anaerobes in these sites is ten to one in their favour to aerobes (3).

The results from immunophenotyping are presented in tables 2 and 3.

As far the research into the immunologic activity of the left and right tonsils is concerned (tabl. 2 and 3), the established rates of T- and B-lymphocyte populations correspond to these discovered by other authors (1, 2) - Brandtzaeg, Bernstein (42 % for CD3, 52 % for CD19). This also applies to T-lymphocyte subpopulations (CD4 and CD8), which are similar in both suspensions.

The relative increase of the percentage rates is determined by the early activation markers (CD25/CD4 - average rate 4,7, CD25/CD8 - average rate 4,4) with respect to the tonsillar suspension of the left tonsil. A similar assessment for the right tonsil was made as shown in tabl. 3.

Bigger rates of natural killers (NK-cells) in the left tonsil (2,3 %) are observed than in the right (1,8 %). It can be explained by the more moderately expressed microbial contamination, or else by the greater antigenic irritation in the left tonsil. No essential difference can be noted with respect to

Naše výzkumy potvrzují skutečnost, že v poslední době je *Streptococcus pyogenes* izolován vzácněji jako příčina reaktivní tonzilární patologie.

Lze shrnout, že u 22 pacientů (55 %) v levé tonsile a u 27 pacientů (67,5 %) v pravé tonsile byla zjištěna normální flóra, což je opětovným důkazem toho, že mikrobiální agens nehraje hlavní roli v etiopatogenezi chronické tonzilitidy (3, 4).

Nedefinovali jsme typ mikroorganismů zahrnutých do normální orofaryngeální flóry. Mnozí autoři soudí, že normální flóra hrdla se skládá převážně z anaerobních mikroorganismů (3, 4). Incidence izolovaných anaerobů v těchto místech je 10:1 ve prospěch anaerobů ve srovnání s aeroby (3).

Výsledky imunofenotypizace jsou znázorněny v tabulkách 2 a 3.

Pokud jde o výzkum imunitní aktivity levé a pravé tonsily (tabulka 2 a 3), zjištěné hodnoty populací T- a B-lymfocytů odpovídají údajům jiných autorů (1, 2) - Brandtzaega, Bernsteina (42 % pro CD3, 52 % pro CD19). To platí také o subpopulacích T-lymfocytů (CD4 a CD8), které jsou v obou suspenzích podobné.

Relativní nárůst procenta je zjišťován u markerů časně aktivace (CD25/CD4 - průměrná hodnota 4,7, CD25/CD8 - průměrná hodnota 4,4), což se týká suspenze z levé tonsily. Podobné hodnocení bylo provedeno také u pravé tonsily, jak ukazuje tabulka 3.

Vyšší podíl přirozených zabíječských buněk (NK-cells) byl pozorován v levé tonsile (2,3 %) než v tonsile pravé (1,8 %). To lze vysvětlit mírněji vyjádřenou mikrobiální kontaminací, popřípadě vyšším antigenním drážděním v levé tonsile. Nezamnamenali jsme podstatný rozdíl, pokud jde o marker

the marker CD71/CD3 for late activation (2,7 % for the left tonsil against 2,2 % for the right). The greater activation of B-lymphocyte population (CD71/CD19) for the right tonsil (3,6 %), as against 2,7 % for the left tonsil gave us reason to consider that the immune reaction in the right tonsil is more complete, in contrast to the left tonsil where the immune reaction is at its inception. The greater rates of HLA-DR/CD8 in the right tonsil also show a certain suppression of the immune process.

CD71/CD3 pro pozdní aktivaci (2,7 % pro levou mandli oproti 2,2 % pro pravou). Větší aktivace populace B-lymfocytů (CD71/CD19) pro pravou tonzilu (3,6 %) oproti 2,7 % pro levou tonzilu nám dala důvod k předpokladu, že imunitní reakce v pravé tonzile je kompletnější ve srovnání s levou tonzilou, kde je imunitní reakce na začátku. Vyšší podíly HLA-DR/CD8 v pravé tonzile také ukazují určité potlačení imunitního procesu.

Table 2

Immunophenotyping characteristics of tonsillar suspension (left tonsil) in patients with compensated chronic tonsillitis

Investigated markers n=40	Average %	Range %	Median %
CD 3	41.7±2.2	39.5-43.9	41.1
CD 19	51.7±2.2	49.5-53.9	51.2
CD 16/56 (NK)	2.3±0.2	2.1-2.5	2.2
CD 4	31.7±3.1	28.6-34.8	32.2
CD 8	10.4±2.3	8.1-12.7	10.2
CD 25/CD 4	4.7±2.0	2.7-6.7	5.0
CD 25/CD 8	4.4±2.3	2.1-6.7	4.2
CD 71/CD 3	2.7±1.1	1.6-3.8	2.5
CD 71/CD 19	2.7±1.1	1.6-3.8	2.6
HLA-DR/CD 4	20.6±6.9	13.7-27.5	19.7
HLA-DR/CD 8	22.5±8.6	13.9-31.1	21.7
CD 4/CD 8-ratio	3.3±1.0	2.3-4.3	3.0

Tabulka 2

Výsledky imunofenotypizace suspenze připravené z levé tonzily nemocných s kompenzovanou chronickou tonzilitidou

Sledované markery n=40	Průměr %	Rozpětí %	Medián %
CD 3	41,7±2,2	39,5-43,9	41,1
CD 19	51,7±2,2	49,5-53,9	51,2
CD 16/56 (NK)	2,3±0,2	2,1-2,5	2,2
CD 4	31,7±3,1	28,6-34,8	32,2
CD 8	10,4±2,3	8,1-12,7	10,2
CD 25/CD 4	4,7±2,0	2,7-6,7	5,0
CD 25/CD 8	4,4±2,3	2,1-6,7	4,2
CD 71/CD 3	2,7±1,1	1,6-3,8	2,5
CD 71/CD 19	2,7±1,1	1,6-3,8	2,6
HLA-DR/CD 4	20,6±6,9	13,7-27,5	19,7
HLA-DR/CD 8	22,5±8,6	13,9-31,1	21,7
CD 4/CD 8-ratio	3,3±1,0	2,3-4,3	3,0

Table 3

Immunophenotyping characteristics of tonsillar suspension (right tonsil) in patients with compensated chronic tonsillitis

Investigated markers n = 40	Average %	Range %	Median %
CD 3	42.4±2.4	40-44.8	41.8
CD 19	52.3±2.7	49.6-55.0	51.6
CD 16/56 (NK)	1.8±0.9	0.9-2.7	1.6
CD 4	31.5±4.1	27.4-35.5	31.7
CD 8	11.2±3.1	8.1-14.3	10.6
CD 25/CD 4	3.9±1.8	2.1-5.7	3.7
CD 25/CD 8	3.3±1.4	1.9-5.7	3.2
CD 71/CD 3	2.2±0.8	1.4-3.0	2.1
CD 71/CD 19	3.6±1.9	1.7-5.5	3.1
HLA-DR/CD 4	26.9±7.4	19.5-34.3	28.6
HLA-DR/CD 8	27.1±9.1	18.0-36.2	25.4
CD 4/CD 8-ratio	3.1±1.0	2.1-4.1	3.1

Tabulka 3

Výsledky imunofenotypizace suspenze připravené z pravé tonzily nemocných s kompenzovanou chronickou tonzilitidou

Sledované markery n = 40	Průměr %	Rozpětí %	Medián %
CD 3	42,4±2,4	40-44,8	41,8
CD 19	52,3±2,7	49,6-55,0	51,6
CD 16/56 (NK)	1,8±0,9	0,9-2,7	1,6
CD 4	31,5±4,1	27,4-35,5	31,7
CD 8	11,2±3,1	8,1-14,3	10,6
CD 25/CD 4	3,9±1,8	2,1-5,7	3,7
CD 25/CD 8	3,3±1,4	1,9-5,7	3,2
CD 71/CD 3	2,2±0,8	1,4-3,0	2,1
CD 71/CD 19	3,6±1,9	1,7-5,5	3,1
HLA-DR/CD 4	26,9±7,4	19,5-34,3	28,6
HLA-DR/CD 8	27,1±9,1	18,0-36,2	25,4
CD 4/CD 8-ratio	3,1±1,0	2,1-4,1	3,1

Conclusions

We established that there is a difference between the bacterial contamination on both of the tonsils. Our results led us to consider the possibility that there is a correlation between the bacterial load of the tonsils and their immune activity. It can be accepted that the different tonsillar activity may hypothetically be due to anatomic or to vessel variety.

We suppose that the tonsillar immunological activity could be an object of a cyclic fluctuation in tandem with the well-defined nasal cycle. We may assume that taken together our results indicate that the right tonsil in men participates more actively in MALT-reactions, at least in the morning period.

References

1. BERSTEIN, JM: Mucosal Immunology of the Upper Respiratory Tract. *Respiration*, 1992, Suppl. 3, p. 3-13.
2. BRANDTZAEG, P. - HALSTENSEN, TS: Immunology and immunopathology of the tonsils. Abstr. Second Int. Symp. on tonsils. Pavia, September 1991, p. 27-29.
3. BROOK, I.: Bacteriology of Chronic Tonsillitis in Young Adults. *Arch. Otolaryngol.*, 1984; vol. 110, p. 803-805.
4. FAROCKI, MA: Bacteriology and Histology of tonsillar parenchyma in tonsillectomised specimens. *Ear Nose Throat*

Key words: Tonsils; Chronic tonsillitis; Tonsillectomy; MALT; Fluocytometry; Bacteriology.

Závěr

Zjistili jsme, že existuje rozdíl mezi bakteriální kontaminací obou tonzíl. Naše výsledky nám daly možnost uvažovat o korelaci mezi bakteriální zátěží tonzíl a jejich imunitní aktivitou. Lze přijmout hypotézu, že různá aktivita tonzíl může být způsobena jejich anatomickou nebo cévní rozdílností.

Předpokládáme, že tonzilární imunitní aktivita může být předmětem cyklického kolísání ve spolupráci s dobře definovaným nosálním cyklem. Na základě shrnutí našich výsledků lze předpokládat, že pravá tonzila u člověka se účastní reakcí LTPS aktivněji, alespoň v dopoledních hodinách.

- J., 1967, vol. 40, p. 801-812.
5. MING-DE YING: Immunological Basis of Indications for Tonsillectomy and Adenoidectomy. *Acta Otolaryngol.*, 1988; Suppl. 454, p. 279-285.
6. MORAG, A. - OGRA, PL: Immunologic Aspects of Tonsils. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1975; vol. 84, p. 37-43.
7. SCADDING, GK: Immunology of the tonsil: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1990, vol. 83, p. 104-107.

Klíčová slova: Tonzily; Chronická tonzilitida; Tonzilektomie; Slizniční lymfoidní tkáň; Fluocytometrie; Bakteriologie.

Received 21. 10. 1997

Překlad V. Měrka