

A VÖRÖSVÉRTEST ALAK VIZSGÁLATÁNAK NÉHÁNY ASPEKTUSA KONZERVÁLT ÉS KONZERVÁLT-REJUVENÁLT VÉRMENTÁKON*

LACZKÓ JENŐ és VARGA SÁNDOR

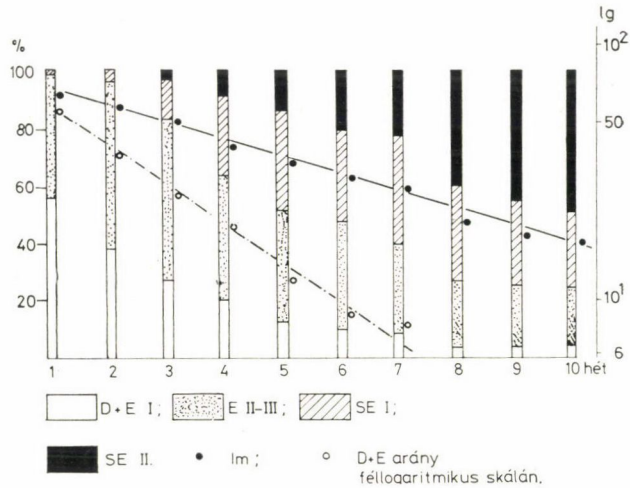
Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma

*A discocyta echinocyta transzformáció (D—E tr) vizsgálata a konzerválási
ártalom fokának megítélésére*

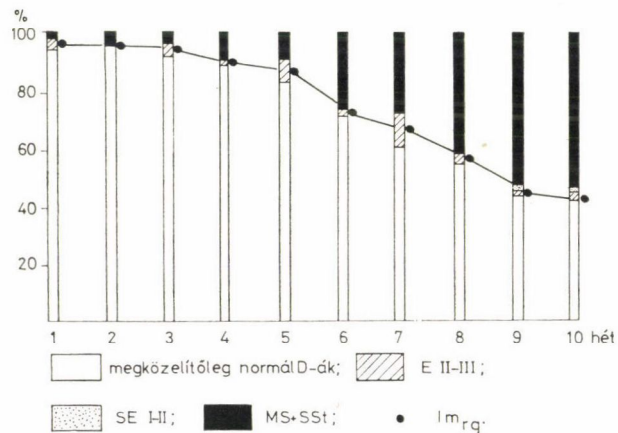
A transzfúziós célra szokásos módokon (ACD, CPD közegeben 4 °C-on) konzervált vérben a vörösvértestek (vvt-ek) fokozatosan jellegzetes alakú változáson esnek át. Ez a folyamat a D—E tr vagy más néven discoid-spheroid átalakulás. Az így kialakuló vvt populáció alakilag heterogén, a tárolási idő előrehaladtával a morfológiai kép fokozatosan tolódik „jobbra”: nő az átalakulás előrehaladottabb stádiumaiban levő alakok aránya. A sphero-echinocyta (SE) II alakok 2—3 hét tárolás után jelennek meg, de D-ák még 7 hét után, E I formák pedig 11—12 hét elteltével is találhatóak (LACZKÓ és mtsai 1979). Az alakváltozás alakulásának számszerű jellemzésére mind fénymikroszkópos (FM-os), mind pásztázó elektronmikroszkópos (PEM-os) kiértékelésnél jól használható a morfológiai index (Im) (GÁRDOS és mtsai 1966). A PEM-os kiértékelés pontossága érdekében ajánlatos olyan preparátumkészítési eljárást használni, amely a tárgytartón egyenletes sejteloszlást ad, s a sejtek jó tapadását biztosítva kiküszöböli a víztelenítés-szárítás során az esetleges szelektív sejtleválást. Erre igen alkalmas a SANDERS és mtsai (1975) által leírt poly-L-lysines fölragasztás.

Az Im megadásánál bizonyos problémát jelent az, hogy az alakváltozások egymást követő stádiuma közötti határ nem éles, így vizsgálónként, ill. munkacsoportonként a besorolás kritériumaiban lehetnek eltérések. Ebből adódik a módszer szemikvantitatív jellege. A kísérleti eredmények értékelésénél így pontos információt jelent egy munkacsoporton belül, problémásabb azonban a különböző munkacsoportok által publikált adatok összevetése. Az Im csökkenése és a bikonkáv (D + EI) formák arányának csökkenése a konzervált vérben — a konzerválási idő függvényében — jellegében azonos (l. ábra), ezért gyors FM-os kiértékelésre felhasználható a viszonylag könnyen identifikálható bikonkáv alakok arányának meghatározása.

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

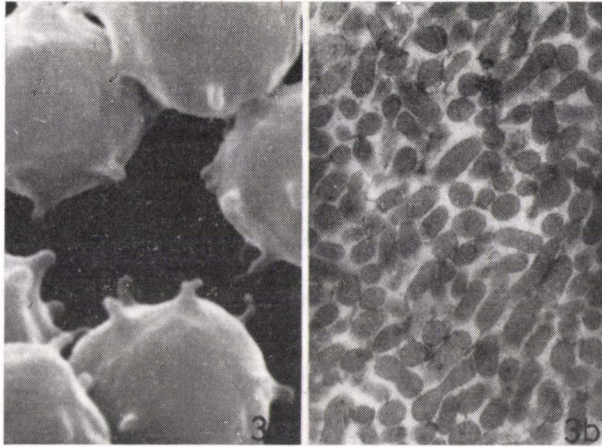


1. ábra. A D-E tr alakulása CPD-n konzervált vérben



2. ábra. A morfológiai kép alakulása 1 térf. vérnek 1 térf. PBS-ben oldott 60 mM Adenozinnal 37 °C-on 4 órán keresztül végzett inkubálás után

A konzerválási ártalom egyik, valószínűleg meghatározó jellegű következménye az, hogy a vvt-ek az alakváltozás előrehaladt (SE) stádiumaiba jutva membránt vesztenek. A membránvesztés az elvékonyodott tüskék csúcsának lefűződésével (3a. ábra) vezikulák, mielin formák képződésével jön létre (BESSIS és MANDON 1972, WEED és mtsai 1974). LUTZ és mtsai (1977) 37 °C-on történő ATP deplációval járó vezikulaképződés esetében a vezikulákban az integráns membránfehérjéket olyan arányban találták meg mint az intakt membránban, míg a kolineszteráz frakció bedúsult. ACD-re levett, egyéb alakelemektől mentesített plazmával 9 hétig 4 °C-on tárolt vvt-ekből



3. ábra. a) Vezikulációra utaló befűződés a SE-ák tövisein. b) Vezikulák transzmissziós elektronmikroszkópos képe

származó vezikulák (3b. ábra) egy része megnyúlt ($90\text{--}100 \times 250\text{--}260\text{ nm}$), középen kissé befűződött, egység membránnal határolt, hemoglobint tartalmaz. A fokozott kolineszteráz aktivitás is kimutatható volt. A vezikulák pontosabb mennyiségi és minőségi jellemzőit, ezek időbeli alakulását, alaki és egyéb változásokhoz való viszonyait a konzervált vérben behatóbb vizsgálatokkal közelíthetjük meg.

A D—E tr előrehaladása a konzervált vvt-ek morfológiai öregedését jelenti, mértéke viszonylag közvetlenül jelzi a membránt vesztett sejtek arányát. A morfológiai jellemzők meghatározása így a konzerválási ártalom vizsgálatának egyik fontos módszere. LONGSTER és mtsai (1972) felhasználták konzerváló folyadékok összehasonlító vizsgálatában.

A D—E tr-t kiváltó tényezők. A sejtmembrán szerepe

A D—E tr régóta ismert és tanulmányozott jelenség. Kísérletekben számos tényező echinocytogén hatását kimutatták és vizsgálták. A D—E tr kiváltható ATP deplécióval (NAKAO és mtsai 1961, GÁRDOS és mtsai 1966, FÉO és LEBLOND 1974), anionos vagy nem ionos amfifil anyagokkal (DEUTICKE 1968), inkubált plazmával (BESSIS és BRECHER 1971, FÉO 1972, LICHTMAN és MARINETTI 1972), „üveg effektussal”, valamint a szuszpendáló közeg pH-jának emelésével (PONDER és PONDER 1962, BESSIS és PRENANT 1972, WEED és CHAILLEY 1973). A fiziológiásan igen alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésének alakváltozást kiváltó hatását sok oldalról vizsgálták (WEED és mtsai 1969; WEED és CHAILLEY 1973; WHITE 1976), de a Ca^{2+} (és más divalens kationok) pontosabb hatásmódjának, egyéb tényezőkkel való kapcsot

latának, a Ca^{2+} és a vvt membrán kölcsönhatásainak tisztázásában éppen magyar kutatók munkái alapvetőek (SZÁSZ 1970, SZÁSZ és mtsai 1970, SZÁSZ és mtsai 1978, GÁRDOS és mtsai 1979).

Az intakt vvt-ek D—E tr-ja során létrejövő alakokhoz hasonló formák ghostokon is megfigyelhetők. MIRCEVOVÁ (1974) konzervált vvt-ekből ATP jelenlétében készített ghostokat discoid, míg az ATP mentes közegben preparáltakat crenált formájúnak találta. PALEK és mtsai (1974) ghostokon vizsgálva a Ca^{2+} , Mg^{2+} és ATP hatását arra következtettek, hogy az alakváltozásért felelős hatások a membrán belső fehérjekomponensein érvényesülnek. A ghostok ATP függő alakváltozásait demonstrálták SHEETZ és SINGER (1977), ill. az alakváltozás és a spektrin 2 foszforilációja közötti korrelációt BIRCHMEIER és SINGER (1977). Saját vizsgálatainkban SHEETZ és SINGER (1977) módszerével 3—6 hetes vérkonzervekből visszazárt ghostokat készítve crenált alakokat kaptunk, melyek Adenozin tartalmú közegben 37°C -on történt inkubálás után sima felszínű, általában monokonkáv formákká alakultak. Ez utóbbi formákat kaptuk, ha előzetesen rejuvenált vvt-ekből indultunk ki.

Ma már elég egyértelmű, hogy a vvt-ek alakváltozásai (nem kóros hemoglobin szerkezet esetében) a vvt membrán konformáció változásaival magyarázhatók. Ennek mechanizmusában a SHEETZ és SINGER (1974) féle hipotetikus modell továbbfejlesztésének eredményeként a pontosabb molekuláris részjelenségek szerepe is kezd tisztázódni (SZÁSZ és mtsai 1978, GÁRDOS és mtsai 1979).

Az experimentálisan létrehozott D—E tr-ért felelős tényezők egy része a konzervált vérben is kimutatható: ATP és 2—3 DPG szint csökkenése, lizolecitin keletkezése, a membrán passzív Ca^{2+} permeabilitásának fokozódása. Összefüggésük az alakváltozással azonban részben más jellegűnek látszik: az ATP szint csökkenését a D—E tr a 37°C -on történő depléciókor megkésve követi, a konzervált vérben megelőzi (SZÁSZ 1970), a plazma echinocytogén hatása csak hosszabb tárolás után mutatható ki (LICHTMAN és MARINETTI 1972, LACZKÓ és mtsai 1979), a citrátos közeg a Ca^{2+} felvételt megakadályozza, de csökkenti a membrán Ca^{2+} affinitását (SZÁSZ és mtsai 1978). Jelenleg tehát a konzervált vvt-ek morfológiájának vizsgálatából a sejtek funkcionális jellemzőire pontosan következtetni még nem tudnak. Ez aláhúzza a komplex vizsgálatok fontosságát, melyekben azonban a morfológiai jellemzők tanulmányozása, épp a PEM-os módszerek adta lehetőségek kihasználásával, nagyobb szerepet kaphat.

A rejuvenálás és a D—E tr reverzibilitása

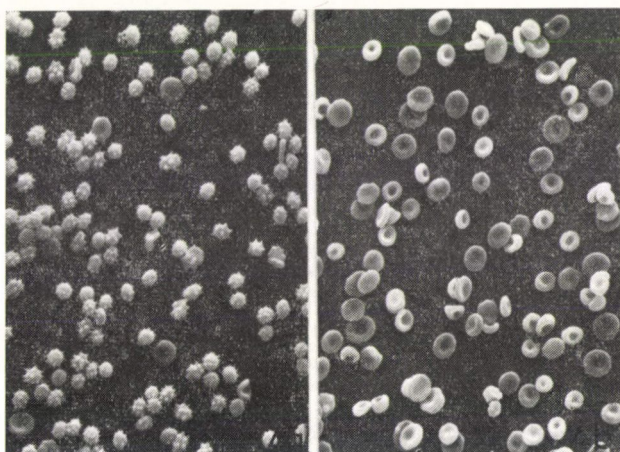
A konzervált vvt-ek rejuvenálására vonatkozó vizsgálatok kiindulópontja NAKAO és mtsai (1959) azon megfigyelése volt, hogy nukleozid tartalmú közegekkel inkubált, előzetesen hosszabb ideig konzervált vvt-ek ATP szint-

je visszaállítható, s eközben a sejtek tüskés formákból konkáv formákba alakulnak. A rejuvenálási eljárások a konzervált vvt-ek más élettani jellemzőire is kedvező hatásúaknak bizonyultak. Ez a gyakorlati alkalmazás lehetőségeit fölvetette: a vvt-ek transzfuzióra való alkalmasságának javítását előzetes rejuvenálással (BARTLETT 1974), a konzerv vérek gazdaságosabb felhasználását a lejárt vérek rejuvenálás utáni fagyasztva tárolásával (VALERI és ZAROLIS 1972). A rejuvenálás morfológiai hatását általában az E alakok arányának csökkenése alapján ítélik meg, és a reverzió jellemzésére az Im -et használják (USRY és mtsai 1975), jóllehet már NAKAO és mtsai (1959) közleménye sem mint normál D-at jellemzi a konkáv formákba revertált sejteket. Más szerzők is megfigyelték, hogy a konzerválási idő előrehaladtával a rejuvenálás részben kisebb átmérőjű vvt-eket eredményez (SZÁSZ és mtsai 1968, WEED és mtsai 1974).

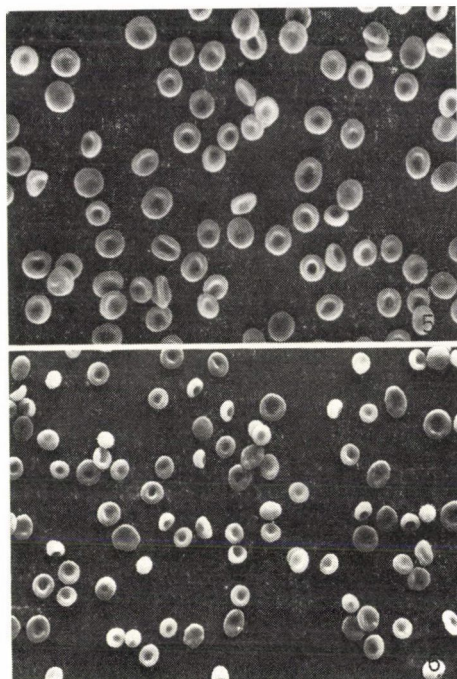
a) *A rejuvenált vvt-ek morfológiája: a reverzió szintje és minősége*

A konzervált sejtek rejuvenálását erőteljes kezeléssel végezve (30 mM Adenozin, 4 óra, 37 °C) az E alakok aránya alacsonyra vihető le (4. ábra) és rejuvenálás utáni arányuk a tárolási idővel nem nőtt (2. ábra). Az E-ák és SE-ák igen nagy része tehát ilyen körülmények között reverzibilis abban az értelemben, hogy konkáv formákba alakulásra, decrenációra képes. Az E—SE formák arányának csökkenését a *reverzió szintjeként* javasoljuk definiálni. (Az Im megadásakor indokolt jelölni, hogy a reverzió szintjére értelmezzük: Im_{r1} — level of reversion.)

A reverziószint meghatározása megtévesztő is lehet, mert mint esetünkben azt sugallhatja, hogy az adott rejuvenálás a tárolási időtől függetlenül azonosan kedvező morfológiájú vvt-eket eredményez. Ha azonban összehasonlítunk



4. ábra. 7 hétig CPD-n konzervált (a) és Adenozinos inkubálással rejuvenált (b) vvt-ek PEM-osképe



5. ábra. CPD-re frissen levett vér vvt-jeinek PEM-os képe
6. ábra. 9 hétig CPD-n tárolás után Adenozinos inkubálással rejuvenált vvt-ek PEM-os képe

egy frissen levett vérből (5. ábra) és egy hosszabb tárolás után rejuvenált vérből (6. ábra) készült mintát, igen szembevetendő a különbség: az utóbbiban nagyfokú az anizocitózis, feltűnő a spherostomatocyták (SSt) és a microspherocyták (MS) (bikonkáv, de kisebb átmérő/vastagság viszonyú) sejtek nagy száma. Ez utóbbi két forma aránya a konzerválási idő előrehaladtával nő és jó korrelációt mutat az inkubálás előtt talált SE II alakok arányával (1. és 2. ábra). A D—E tr és reverzibilitás összefüggésére vonatkozó elképzelésünket a 7. ábrán foglaltuk össze: a D—E tr előrehaladott stádiumaiban membránvesztés lép fel; rejuvenálás során a membránanyagot nem (vagy nem kritikus mennyiségben) vesztett sejtek közel normál nagyságú, míg a membrándeficiens alakok morfológiailag is kóros, bár konkáv formákká képesek átalakulni. Ilyen alakok figyelhetők meg pl. hereditær spherocytosisban, s kisebb deformabilitásuknak tulajdonítják funkcionális csökkent-értékűségüket (BESSIS és MOHANDAS 1975, BESSIS 1977). A rejuvenált vvt-ek esetében a deformabilitásra vonatkozó megfigyelések nem teljesen egyértelműek: a deformabilitás növekedését mutatták ki filtrációval (HARADIN és mtsai 1969) és mikropipettás technikával (LA CELLE 1969), (a filtrabilitás csökkenését a tárolás előrehaladtával és növekedését a rejuvenálás után magunk is megfigyeltük), míg Ektacytométerrel mér-

ve a rejuvenált sejtek deformabilitása csökkentnek mutatkozott (FÉO és mtsai 1978). Kérdéses, hogy a konzervált vvt-ek lienális és hepatikus szekvesztrációjában a deformabilitás kritikus mértékű csökkenése vagy a membránkárosodás és membránvesztés egyéb következményei a meghatározóbb jellegűek.

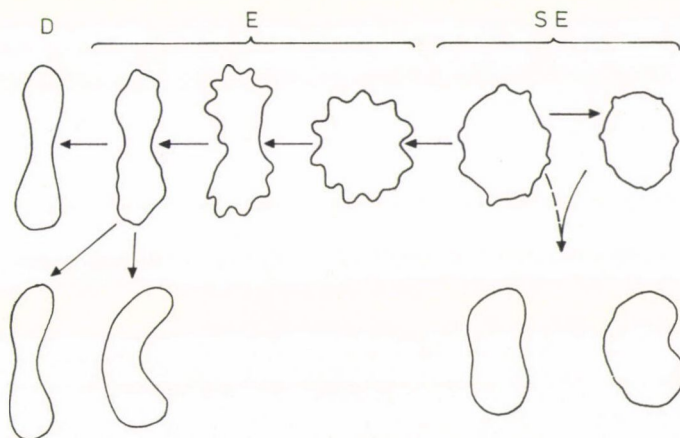
A rejuvenálás hatásának morfológiai értékelését a SSt + MS alakok arányának figyelembevételével informatívabbnak véljük, s a reverzió minőségé-ként javasoljuk tekinteni. Morfológiai index (Im_{rq} — quality of reversion) számolásához: D + E I 1,0; E II—III 0,5; SE I—II és SSt + MS 0,0. (2. ábra).

b) *A rejuvenáláskor létrejövő alakváltozások időbeli lefolyása — néhány rejuve-náló közeg és hőmérséklet összevetése*

Korábbi vizsgálatainkban arra utaló megfigyeléseink voltak, hogy a konzervált vvt-ek D—E tr-jának reverziója bizonyos szintig a saját, konzervált plazmában történő fracionáláskor és friss autológ plazmában történő inkubáláskor szobahőmérsékleten is bekövetkezik (LACZKÓ és mtsai 1979). A rejuve-náláskor létrejövő alakváltozások értékeléséhez ezért szükségesnek látszik, hogy az inkubációs körülmények hatását pontosabban ismerjük. A következő körülmények között vizsgáltuk a reverzió szintjét az inkubációs idő függvényé-ben 3 hétig tárolt véreken: Közegek

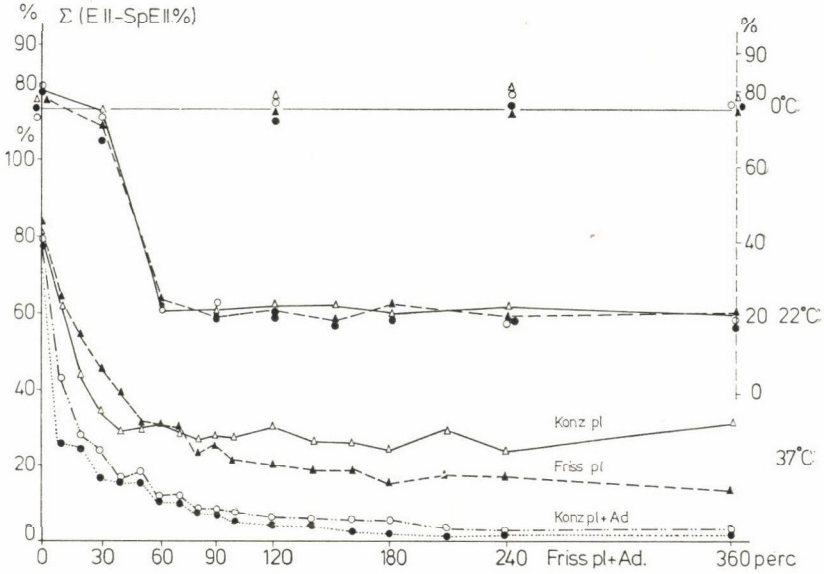
- A) 1 térf. friss autológ plazma + 1 térf. PBS
- B) 1 térf. friss autológ plazma + 1 térf. PBS-ben oldott 60 mM Adenozin (Serva);
- C) 1 térf. konzervált plazma + 1 térf. PBS;
- D) 1 térf. konzervált plazma + 1 térf. PBS-ben oldott 60 mM Adenozin; hematokrit 10%, hőmérséklet 0, 22 és 37 °C.

Az inkubáció tartama alatt meghatározott időközökben kivett mintákat

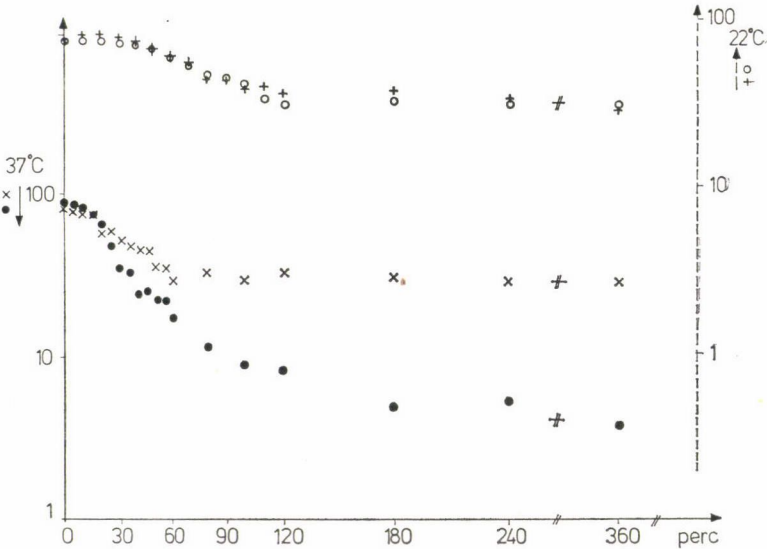


7. ábra. A D—E tr és reverzió sémája

glutáraldehidben fixáltuk. Az eredményeket a 8., 9. ábrák mutatják. 0 °C-on változás nincs, ami arra utal, hogy az alakváltozás a sejtek aktív anyagcseréjétől függő folyamat. Alakváltozás a vizsgált közegekben mind 22 °C-on, mind 37 °C-on létrejött, az időbeli lefolyás jellegének különbözőségei azonban rész-



8. ábra. A reverzió szint változása, az inkubálási idő függvényében (3 hetes ACD-s vér)



9. ábra. A reverzió szint változása rövidebb mintavételi időközökkel féllogaritmikus skálán (3 hetes ACD-s, de az előbbivel nem azonos vér)

ben eltérő anyagcsere folyamatokra utalhatnak. Ezt a sejtek energiaszintjére és egyéb biokémiai és fiziológiai jellemzőire vonatkozó párhuzamos vizsgálatok tisztázhatják. A rejuvenálás okozta alakváltozások értékelése szempontjából a gyors fázisok jelenléte az inkubálási idők pontos megválasztásának fontosságát hűzza alá. A vizsgálni kívánt konzerv vér előkészítésénél (denzitás alapján történő szeparálás, mosás stb.), valamint a kontrollok beállításánál fontos figyelembe venni a 22 és 37 °C-on a konzervált plazmában is létrejövő alakváltozást. A viszonylag stabil végállapotok viszont a különböző viselkedésű vvt-ek szeparálásához jelenthetnek kedvezőbb feltételeket. További vizsgálatokat kíván az a kérdés, hogy maga a reverziósebesség milyen információkat jelenthet a vvt-ek állapotának, a vvt-ek és a plazma, ill. más inkubáló közegek kölcsönhatásainak tanulmányozásához.

Következtetések

1. A D—E tr a konzerválási ártalom morfológiai jellemzője, előrehaladottságának mértéke a membránvesztéséget szenvedett vvt-ek arányával van összefüggésben.
2. A rejuvenálás morfológiai hatásának kiértékelésénél a rejuvenált vvt populációban található bi- vagy monokónkáv, de alaki sajátosságaik alapján membrándeficiens formák aránya nem hagyható figyelmen kívül.
3. A morfológiai értékelésre kerülő konzervált vérminták előkészítésénél, kontrollok beállításánál tekintettel kell lenni a szobahőn is bekövetkező alakváltozásokra, a rejuvenálási eljárások összehasonlításánál pedig az alakváltozások időfüggésének jellegére.

IRODALOM

- BARTLETT, G. R.: in: *The Human Red Cell in vitro*, eds: T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson. Grune and Stratton, New York—London p. 5 (1974).
- BESSIS, M.: *Nouv. Rev. fr. Hémat.* **18**, 75 (1977).
- BESSIS, M., BRECHER, G.: *Nouv. Ref. fr. Hémat.* **11**, 305 (1971).
- BESSIS, M., MANDON, P.: *Nouv. Ref. fr. Hémat.* **12**, 443 (1972).
- BESSIS, M., MOHANDAS, N.: *Sweiz. med. Wschr.* **105**, 1568 (1975).
- BESSIS, M., PRENANT, M.: *Nouv. Ref. fr. Hémat.* **12**, 351 (1972).
- BIRCHMEIER, W., SINGER, S. J.: *J. Cell Biol.* **73**, 647 (1977).
- DEUTICKE, B.: *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 494 (1968).
- FÉO, C. J.: *Nouv. Rev. fr. Hémat.* **12**, 455 (1972).
- FÉO, C. J., LACZKÓ, J., PHILLIPS, W. M.: *Com. 17^e Cong. de la Sté Intern. d'Hématol. Vol. 1*, p. 281 (1978).
- FÉO, C. J., LEBLOND, P. F.: *Blood* **44**, 639 (1974).
- GÁRDOS, G., SZÁSZ, I., ÁRKY, I.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1**, 253 (1966).
- GÁRDOS, G., SZÁSZ, I., SARKADI, B.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **22**, 103 (1979).
- HARADIN, A. R., WEED, R. I., REED, C. F.: *Transfusion* **9**, 229 (1969).
- LA CELLE, P. L.: *Transfusion* **9**, 238 (1969).
- LACZKÓ, J., FÉO, C. J., PHILLIPS, W.: *Transfusion* **19**, 379 (1979).
- LICHTMAN, M. A., MARINETTI, G. V.: *Nouv. Rev. fr. Hémat.* **12**, 755 (1972).

- LONGSTER, G. H., BUCKLEY, T., SIKORSKI, J., DERRICK TOVEY, L. A.: *Vox Sang.* **22**, 161 (1972)
- LUTZ, H. V., LIU, SH-CH., PALEK J.: *J. Cell Biol.* **73**, 548 (1977).
- MIRCEVOVÁ, L.: *Blut* **29**, 108 (1974).
- NAKAO, M., NAKAO, T., TATIBANA, M., YOSHIKAWA, H., ABE, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 564 (1959).
- NAKAO, M., NAKAO, T., YAMAZOE, S., YOSHIKAWA, H.: *J. Biochem. (Japan)* **49**, 487 (1961).
- PALEK, J., STEWART, G., LIONETTI, F. J.: *Blood* **44**, 583 (1974).
- PONDER, E., PONDER, R.: *Nouv. Rev. fr. Hémat.* **2**, 223 (1962).
- SANDERS, S. K., ALEXANDER, E. L., BRAYLAN, R. C.: *J. Cell Biol.* **67**, 476 (1975).
- SHEETZ, M. P., SINGER, S. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4457 (1974).
- SHEETZ, M. P., SINGER, S. J.: *J. Cell Biol.* **73**, 638 (1977).
- SZÁSZ, I.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **5**, 399 (1970).
- SZÁSZ, I., ÁRKY, I., GÁRDOS, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **3**, 289, (1968).
- SZÁSZ, I., HASITZ, M., BREUER, J. H., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **29**, 1 (1978).
- SZÁSZ, I., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: *Brit. J. Haematol.* **39**, 559 (1978).
- SZÁSZ, I., TEITEL, P., GÁRDOS, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **5**, 409 (1970).
- USRY, R. T., MOORE, G. L., MANALO, F. W.: *Vox Sang.* **28**, 176 (1975).
- VALERI, C. R., ZAROULIS, C. G.: *New Engl. J. Med.* **287**, 1307 (1972).
- WEED, R. I., CHAILLEY, B.: in: *Red Cell Shape*, eds: M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond, Springer Verlag, New York p. 55 (1973).
- WEED, R. I., LA CELLE, P. L., MERRILL, E. W.: *J. Clin. Invest.* **48**, 795 (1969).
- WEED, R. I., LA CELLE, P. L., UDKOW, M.: in: *The Human Red Cell in vitro*. eds: T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson, Grune and Stratton, New York—London p. 65 (1974).
- WHITE, J. G.: *Seminars in Hematol.* **13**, 121 (1976).