

ÖREGEDÉSI VÁLTOZÁSOK VÖRÖSVÉRTEST-MEMBRÁNBAN

IMRE SÁNDOR

Debreceni Orvostudományi Egyetem Kóréletani Intézete, Debrecen

Főleg *in vitro*, szövettényészeteken végzett megfigyeléseken alapul a sejtöregedés menetére, különböző fázisaira vonatkozó jelenlegi tudásunk [16].

Még 10 évvel ezelőtt is általános volt a nézet, miszerint a sejtek szövetkultúrában nem öregszenek. A forradalminak mondható változást, ismereteinkben a kromoszóma-vizsgálatok bevezetése eredményezte. A szövetkultúrában található sejttörzsek ugyanis, melyek már évek, évtizedek óta a degeneráció legkisebb jelét sem mutatva, különböző laboratóriumokban „virágoztak”, — e vizsgálatok szerint — a malignus sejtekre jellemző abnormális kromoszóma-állománnyal rendelkeztek. Ezzel szemben, a normál diploid sejtek *in vitro* megfigyelhető élettartama meglehetősen korlátozottnak mutatkozott [16].

HAYFLICK [6] normál, emberi szövetkultúra sejtek „életében” három fázist különít el: Az első, néhány napos, *latencia fázist* a *logaritmusos* növekedési *fázis* követi. Ebben a fázisban 1—1 sejt maximálisan 50—60-szor képes osztódni. Bizonyos idő után a mitózisok ritkulnak, s előbb néhány, majd egyre több sejtben a DNS-szintézis gyakorlatilag megszűnik, amit leginkább a ³H-timidin beépülésének elmaradásával szoktak demonstrálni. Ez a harmadik, a *degenerációs fázis*. Az RNS-, ill. fehérjeszintézis képessége azonban még ebben a fázisban, az osztódásra már nem képes sejtekben is még hosszú ideig megfigyelhető [1, 3].

In vivo körülmények között a sejtek életfázisai valószínűleg más periodicitást mutatnak. Az *in vivo* és *in vitro* történések szoros összefüggésére utal viszont a következő körülmény: az „anyaszervezet” életkora messzemenően determinálja a szövetkultúra logaritmusos fázisában az osztódások maximális számát. Embrionális szövet esetében ez 50—60. Fiatal szervezetből származó sejtek osztódási képessége már korlátozottabb, míg idősebb szervezet sejtjei, azonos körülmények ellenére, már csak néhány osztódásra képesek.

Vörösvértestek öregedését vizsgálva abban a szerencsés helyzetben vagyunk, hogy a sejtek, amelyek *in vivo* a szervezet szabályozó befolyása alatt állnak, csaknem olyan könnyen és ismételhetően hozzáférhetőek, mint egy *in vitro* szövettényészet sejtjei. A kérdés csupán az, hogy a szóban forgó, állandóan regenerálódó „*in vivo*” szövettényészet mutat-e öregedési tüneteket. HAYFLICK említett beosztását szem előtt tartva, úgy tűnik, hogy ezek a sejtek,

melyek a differenciálódás következtében RNS- és fehérje-szintetizáló képességüket már életük kezdetén, igen rövid időn belül elveszítik, a sejt életében az utolsó fázis, a sejt halálát megelőző 100—200 nap tanulmányozására figyelemre méltóan alkalmasak.

A vörösvértest öregedési jelenségei közül, a jelen összefoglaló röviden, csupán kettővel kíván foglalkozni: (i) a felületi töltésviszonyok megváltozása a vörösvértest öregedése során, (ii) energiatermelés és -felhasználás fiatal és idős vörösvértestekben.

(i) Az idős sejtek felszíni negatív töltésének feltűnő csökkenése elektroforetikus motilitásuk meghatározásával, agglutinációs készségük összehasonlításával mennyiségileg is jól jellemezhető [2, 10]. Az elektrokinetikus töltés túlnyomórészt a felszíni N-acetilneuraminsav (sziálsav) molekulák α -karboxil csoportjának köszönhető. Idős vörösvértestekben a sziálsav tartalom kifejezett csökkenését lehetett tapasztalni [5]. Úgy tűnik, hogy a sziálsav tartalom csökkenése valamiképpen összefügg az idős vörösvértesteknek a keringésből való fokozatos kiszűródésével. Feltételezhető, hogy a csökkent negatív töltés növeli e sejtek affinitását bizonyos katabolizáló, fagocitáló sejtek irányában. E feltételezést kísérletesen is alá lehetett támasztani [5]. Amennyiben cholera vibrióból preparált neuraminidáz enzimmel kezelték, *in vitro* körülmények között, nyúl vörösvértesteket, e sejtek fél életideje, az állatba való visszajuttatást követően, a sziálsav tartalom csökkenésének arányában redukálódott.

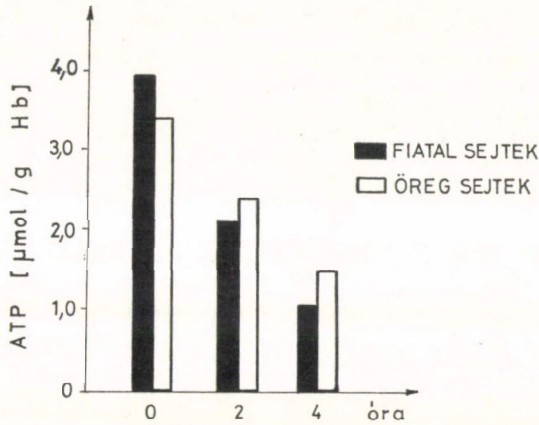
Aligha hihető el, hogy a fiziológiás deszializáció hasonló mechanizmus szerint történe, mégis elgondolkoztató a végeredmény meglepő azonossága.

(ii) Az idézett kísérletek derítették fényt egy, a fentieknek látszólag ellentmondó jelenségre is. A sziálsav tartalom azonos mértékű csökkenése sokkal rövidebb fél életidőt eredményez idős, mint fiatal sejtekben. A vörösvértest öregedése, végső degradációja, tehát mégsem vezethető vissza csupán egyetlen tulajdonság, a felületi töltésviszonyok megváltozására. Érdeemesnek látszik ezért a sejtöregedés szempontjából, a vörösvértest energiaháztartásának megváltozásával is foglalkozni. A glikolitikus enzimek, s mindenekelőtt a hexokináz aktivitásának progresszív csökkenése az *in vivo* sejtöregedés előrehaladtával fokozatosan kifejlődő „anyagcsere csődre” utal. Meglepő, hogy ennek ellenére, a „desity gradiens” centrifugálással elkülöníthető idős sejtek ATP-tartalma alig marad el a legfiatalabbakétól [14]. Glükóz mentes közegben inkubálva, párhuzamosan, fiatal és idős vörösvértesteket, mindkét csoportban az ATP-tartalom csökkenését tapasztaljuk. A csökkenés üteme, azonban a közel azonos kiinduló érték ellenére, jelentősen eltér egymástól (1. ábra). A fiatal sejtek sokkal nagyobb fokú ATP-bontással reagálnak az éhezetre, mint az idősek, s ezáltal ATP-tartalmuk, már 2 órán belül, az idősebb sejtek szintjére, sőt az alá süllyed.

E szembevető különbség arra utal, hogy a fiatal és idős vörösvértestek talán nem is annyira az ATP termelésében, mint inkább a felhasználás lehető-

ségében, képességében különböznek egymástól. Ha az ATP-vesztéséget, mint sejtöregedési tünetet vizsgáljuk, a fentiekből megállapítható, hogy az *in vitro* öregedés üteme fiatal sejtek esetében igen nagy, s ez az ütem, a sejt *in vivo* öregedése folyamán, végeredményben, egyre kisebb lesz.

Ez a törvényszerűség az alacsony anyagcserezintet képviselő vörösvértestek viszonylag hosszú keringésközi perzisztálásában feltételezhetően lényeges szerepet játszik.



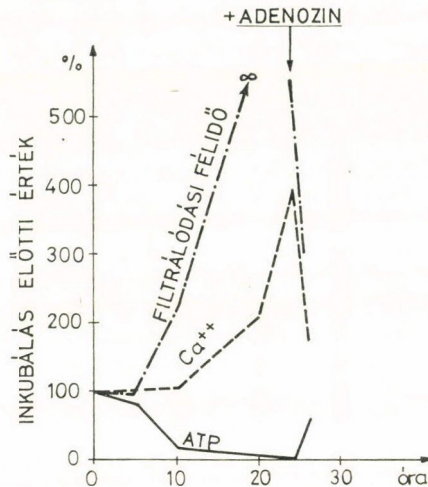
I. ábra. „Fiatal” és „idős” vörösvértestek ATP-vesztésége glükózmentes közegben való inkubálása során. SASS [14]

Az ATP-tartalom csökkenése a vörösvértest ATP-igényes funkcióinak fokozatos elégtelenné válását vonja maga után. Ezek közül is elsőként jelentkezik a vörösvértestek plaszticitásának csökkenése, deformálódási képességének elvesztése. E tulajdonság, TEITEL és SZÁSZ [18] vizsgálatai szerint, közvetlenül összefügg a vörösvértestek várható élettartamával, így érdemes a kérdéssel kissé részletesebben is foglalkozni.

WEED és mtsi [19] emberi vörösvértesteket inkubáltak 37 °C-on, 24 órán keresztül, defibrinált plazmában. A membrán deformálhatósága már 4–6 órán belül észrevehetően csökkent, jóllehet a sejtek ATP-tartalma még közel 70%-a volt az eredeti értéknek. 24 órás inkubálás során, mialatt az ATP-tartalom mérhetetlenül lecsökken, a sejtek filtrálhatósága teljesen megszűnik, Ca^{2+} -tartalmuk négyeszeresére emelkedik (2. ábra).

Adenozinnal inkubálva az ATP-depletált sejteket, nemcsak ATP-tartalmuk regenerálódik, de a többi változás is megfordíthatónak bizonyul. A sejtek ismét filtrálhatóak, Ca^{2+} -tartalmuk már 2 óra alatt kevesebb, mint felére csökken. Hogyan képes a vörösvértest ATP ennyire kézben tartani szinte valamennyi membránfunkciót? Milyen enzimszerek „csatornáin” keresztül valósul meg e szabályozás?

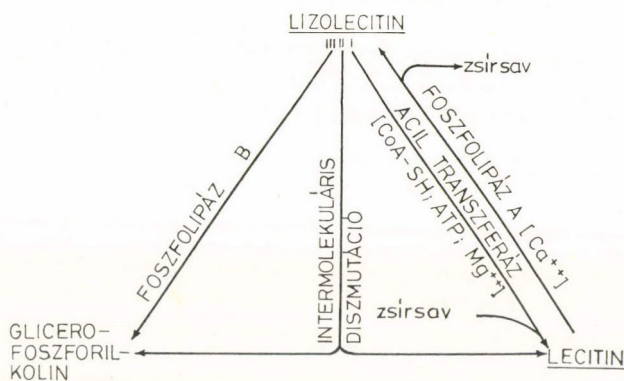
SCHATZMAN [15] egy kifelé irányuló vektoriálisan aktív Ca^{2+} transzport jelenlétét igazolta, mások ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) stimulálható ATP-át extraháltak emberi vörösvértest spektrinből [20]. Nem zárható ki, hogy az *in vitro* „öregítés” során tapasztalt Ca^{2+} -akkumuláció e transzportfunkció, ill. enzimaktivitás csökkenésének tulajdonítható.



2. ábra. Vörösvértestek Ca^{2+} - és ATP-tartalmának, valamint filtrálódási félidejének megváltozása *in vitro* inkubálás során. A változásokat az inkubálás előtti érték százalékában fejezzük ki. WEED és mtsai [19]

Az ATP-tartalom és vörösvértest plaszticitás összefüggése ma már bizonyítottan tekinthető [19]. Az viszont, hogy miáltal válik az ATP szegény sejt merev, rigid gömbbé, még ma is vitatott. Sokan, MARCHESI, PALADE és STEERS [8, 9] nyomán, egy aktinszerű kontraktilis fehérje ATP- Ca^{2+} -függő szol-gél transzformációjára gyanakszanak.

Több kutató viszont [7], a vörösvértest öregedés mechanizmusát vizsgálva arra a megállapításra jut, hogy a lizofoszfátidok szintjének emelkedése (mely fokozott képződésükből, vagy csökkent eliminációjukból származhat) a membránöregedés legtöbb megnyilvánulását önmagában is, kielégítően magyarázhatja. Lizofoszfátid vagy a plazmából kerül a vörösvértest-membránba, vagy magában a membránban képződik. Újabban ez utóbbi lehetőséget is egyre több kísérletes adat támasztja alá. PAYSANT és mtsai foszfátidil-etanolaminra specifikus latens foszfolipáz A jelenlétét igazolták vörösvértestekben [12]. ZAHLER birka vörösvértestekben, a membrán külső felszínén lecintin hasító Ca^{2+} függő foszfolipáz A aktivitást mutatott ki [21]. A lizofoszfátid eliminálódásának három lehetőségét a lizolecitin példáján a legkönnyebb demonstrálni (3. ábra).



3. ábra. A lizolecitin képződés és átalakulás fontosabb lehetőségei vörösvértest-membránban

I. Szabad zsírsav felhasználásával történő energiaigényes reaciláció, specifikus acil-transzferázok segítségével, koenzim-A, ATP és Mg^{2+} jelenlétében [17].

II. Intermolekuláris diszmutáció következtében két molekula lizolecitintől egy molekula lecitin és egy molekula glicerofoszforkolin képződik [4]. Ez a reakció fiziológiai viszonyok között alig jut szerephez [13].

III. Foszfolipáz-B a maradék zsírsavat is lehasítva glicerofoszforkolint produkál [11].

A fenti összefüggést tanulmányozva, valóban nem lehet kizárni, hogy a Ca^{2+} -szint emelkedés, ill. a Ca/Mg arány megváltozása és az ATP-tartalom csökkenése kedvezhet a lizofoszfátid akkumulációnak az öregedő vörösvértest-membránban.

Az elmondottakat összefoglalva, e rövid áttekintés a sejtöregedés egy speciális típusával, a vörösvértest öregedéssel foglalkozott.

Tekintettel arra, hogy ebben a sejtben már sem DNS-, sem RNS-, sem fehérjeszintézis nem folyik (feltételezhetően éppen ez a körülmény korlátozza e sejt élettartamát maximálisan 100–120 napra), így a sejtöregedés egyik utolsó megnyilvánulása, a membránfunkciók elégtelenné válása került érdeklődésünk középpontjába. A felületi negatív töltés csökkenése, ill. a sejtek plaszticitásának elvesztése már közvetlenül előkészíti a vörösvértestek lépbeli szequestrációját, fagocita sejtek közreműködésével.

Jelenlegi felfogásunk szerint e változások nagyrészt a sejt ATP-tartalom csökkenésére, ill. csökkent felhasználhatóságára vezethetők vissza.

IRODALOM

1. CHRISTOFALO, V. J.: Metabolic aspect of aging diploid human cells. In: *Aging in cell and tissue culture* (Holeckova, E., Christofalo, V. J., eds.). New York—London, Plenum Press (1970).
2. DANON, D.: Recognition by macrophages of alterations in the membranes of old red cells and expelled nuclei. In: *Permeability and function of biological membranes* p. 57. (Bolis, L., Katchalsky, A., Keynes, R. D., Loewenstein, W. R., Pethica, B. A., eds.) Amsterdam (1970).
3. DELL'ORCO, R. T., MERTENS, J. G., KRUSE, P. F., jr.: Doubling potential, calendar time, and donor age of human diploid cells in culture. *Exp. Cell. Res.* **84**, 363 (1974).
4. ERBLAND, J. F., MARINETTI, G. V.: The enzymatic acylation and hydrolysis of lysolecithin. *Biochim. et Biophys. Acta* **106**, 128 (1965).
5. GATTEGNO, L., BLADIER, D., CORNILLOT, P.: Ageing in vivo and neuraminidase treatment of rabbit erythrocytes: Influence on half-life as assessed by ^{51}Cr labelling. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **356**, 391 (1975).
6. HAYELICK, L.: Aging under Glass. *Exper. Gerontol.* **5**, 291 (1970).
7. LUCY, J. A.: Lipids and membranes. *FEBS Letters* **40**, 105—111 (1974).
8. MARCHESI, V. T., PALADE, G. E.: The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. *Journal of Cell Biology* **35**, 385 (1967).
9. MARCHESI, V. T., STEERS, E. jr.: Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science* **159**, 203 (1968).
10. MARIKOVSKY, Y., DANON, D.: Changes in surface negativ charge and agglutination kinetics in red blood cells. *Biorheology* **11**, 349 (1974).
11. MULDER, E., VAN DEN BERG, J. W. O., VAN DEENEN, L. L. M.: Metabolism of red cell lipids II. Conversions of lysophosphoglycerides. *Biochim. et Biophys. Acta* **106**, 118 (1965).
12. PAYSANT, M., BITRAN, M., WALD, R. et al.: Phospholipase a des globules rouges chez l'homme: action sur les phospholipides endogenes et exogenes. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* **52**, 1257 (1970).
13. ROBERTSON, A. F., LANDS, W. E. M.: Metabolism of phospholipids in normal and spherocytic human erythrocytes. *J. Lipid Res.* **5**, 88 (1964).
14. SASS, M. D.: Adenosine triphosphate utilization by "young" and "old" red cells. *Clinica Chimica Acta* **43**, 201 (1973).
15. SCHATZMANN, H. J.: ATP dependent Ca^{++} extraction from human red cells. *Experientia (Basel)* **22**, 365 (1966).
16. SCHWARZACHER, H. G.: Zellalterung in vitro. *Wiener klinische Wochenschrift* **87**, 21 (1975).
17. SHOHEI, S. B., NATHAN, D. G., KARNOVSKY, M. L.: Stages in the incorporation of fatty acids into red blood cells. *J. Clin. Invest.* **47**, 1096 (1968).
18. TEITEL, P., SZÁSZ, I.: A haemorheological view on molecular interactions between red blood cell constituents. *Haematologia* **5**, 37 (1971).
19. WEED, R. I., LA CELLE, P. L., MERRILL, E. W.: Metabolic dependence of red cell deformability. *The Journal of Clinical Investigation* **48**, 795 (1969).
20. WEIDKAMM, E., BRDIZKA, D.: Extraction and localization of a ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-stimulated ATP-ase in human erythrocyte spectrin. *Biochimica et Biophysica Acta* **401**, 51 (1975).
21. ZWAAL, R. F. A., FLÜCKIGER, R., MOSER, S., ZÄHLER, P.: Lecithinase activities at the external surface of ruminant erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **373**, 416 (1974).