

ZMIANY STRUKTURALNE KRwinek CZERWONYCH PODDANYCH DZIAŁANIU IZOHEMOAGLUTYNIN OBCOGRUPOWYCH W ŚWIETLE BADAŃ ZA POMOCĄ MIKROSKOPU ELEKTRONOWEGO

Z Zakładu Fizjologii Człowieka A. M. w Warszawie

Kierownik: prof. dr *Fr. Czubalski*

i z Państwowego Zakładu Higieny

Kierownik: prof. dr *F. Przesmycki*

Obcogrupowa aglutynacja krwinek czerwonych była badana za pomocą mikroskopu elektronowego przez kilku autorów. *Bessis* (2) oraz *Bessis* i *Bricka* (3, 4, 5) opisali istnienie mostków łączących zaglutynowane krwinki. Mostki te w formie specyficznych wypustek miały wychodzić z okolic „kraterowatych“ zagłębień, opisywanych przez *Pondera* i wsp. (10) oraz *Bessisa* i *Bricka* (3) w krwinkach czerwonych, na które działano swoistymi i nieswoistymi czynnikami powodującymi ich aglutynację. *Rebuck* (13) opisywał istnienie w krwinkach czerwonych, poddanych działaniu obcogrupowych aglutynin, pofałdowania powierzchni krwinek w kształcie stożków o ściętych wierzchołkach. Wszyscy ci autorzy przypisują opisywanym przez siebie zmianom strukturalnym krwinek czerwonych zasadnicze znaczenie w procesie aglutynacji obcogrupowej.

Zadaniem naszej pracy jest sprawdzenie tych danych przy zastosowaniu odmiennej nieco od stosowanej przez cytowanych autorów metody przygotowywania preparatów.

METODYKA

Pobieraliśmy krew od zdrowych dawców grupy A, B, i AB z palca do mieszalnika Potaina i rozcieńczaliśmy ją 100-krotnie 0,85% roztworem NaCl. Kroplę zawiesiny tak rozcieńczonych krwinek czerwonych umieszczaliśmy na błonce kolodionowej rozpiętej na podstawie preparatowej. Po 3 minutach nadmiar płynu został ściągnięty i na warstewce krwinek czerwonych, które opadły na błonkę, umieszczano kroplę rozcieńczonej 10-krotnie 0,85% NaCl surowicy zawierającej obcogrupowe aglutyniny. Przy tym surowica otrzymywana była z krwi pobranej od dawcy bezpośrednio przed doświadczeniem. Dawało to nam lepsze obrazy aniżeli przy stosowaniu surowic wzorcowych, produkowanych dla celów krwiodawstwa. W każdym doświadczeniu sporządzaliśmy preparat kontrolny, w którym na krwinkach umieszczano kroplę surowicy własnej badanej osoby. Preparat pozostawialiśmy w temperaturze 37° w komorze wilgotnej od 5 do 30 minut, po czym ściągano surowicę pipetką, utrwalano preparat w parach kwasu osmowego w ciągu 5 minut i następnie płukano wodą destylowaną. W niektórych preparatach hemolizowano krwinki po inku-

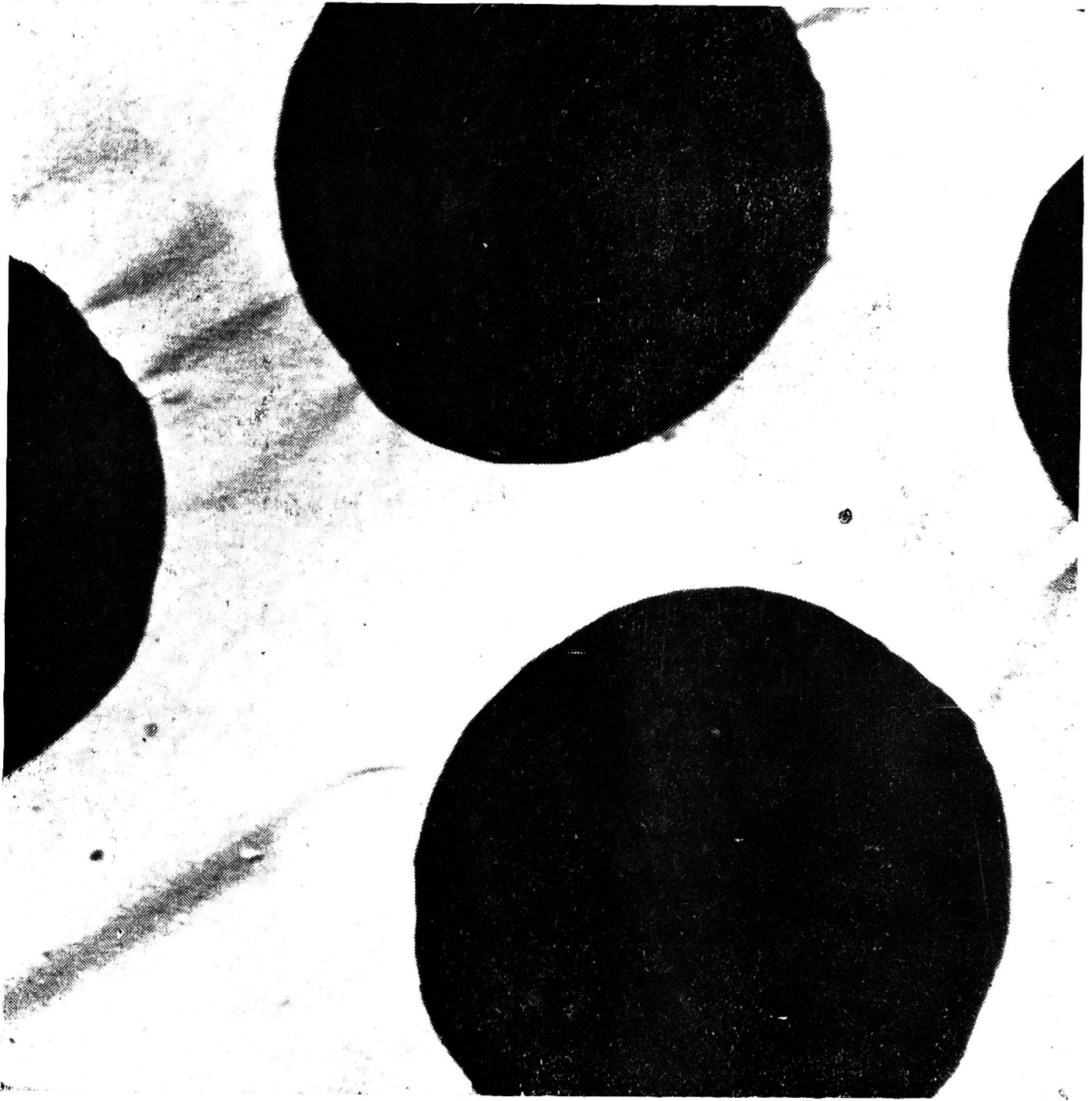
bacji z surowicą i następnie dopiero utrwalano w parach kwasu osmowego. Przy takim postępowaniu proces aglutynacji zachodził we wszystkich tych przypadkach na podstawie preparatowej. Po wysuszeniu preparatu cieniowano go przez napylenie w próżni chromem wg metody Williamsa i Wyckoffa (15). Preparaty oglądano w mikroskopie elektronowym Siegbahna i Schönandera przy powiększeniu 4 500—6 000 razy. Niektóre zdjęcia powiększono drogą optyczną do około 20 000 razy.

Bliższe dane, dotyczące metodyki badań elektronoskopowych krwinek czerwonych, znajdują się w naszej poprzedniej pracy (14) oraz znacznie obszerniej w pracy zbiorowej na temat mikroskopii elektronowej składników postaciowych krwi (1). Ogólne dane dotyczące preparatyki mikroskopowo-elektronowej znajdują się w specjalnym opracowaniu A. Feltynowskiego w podręczniku bakteriologii (12).

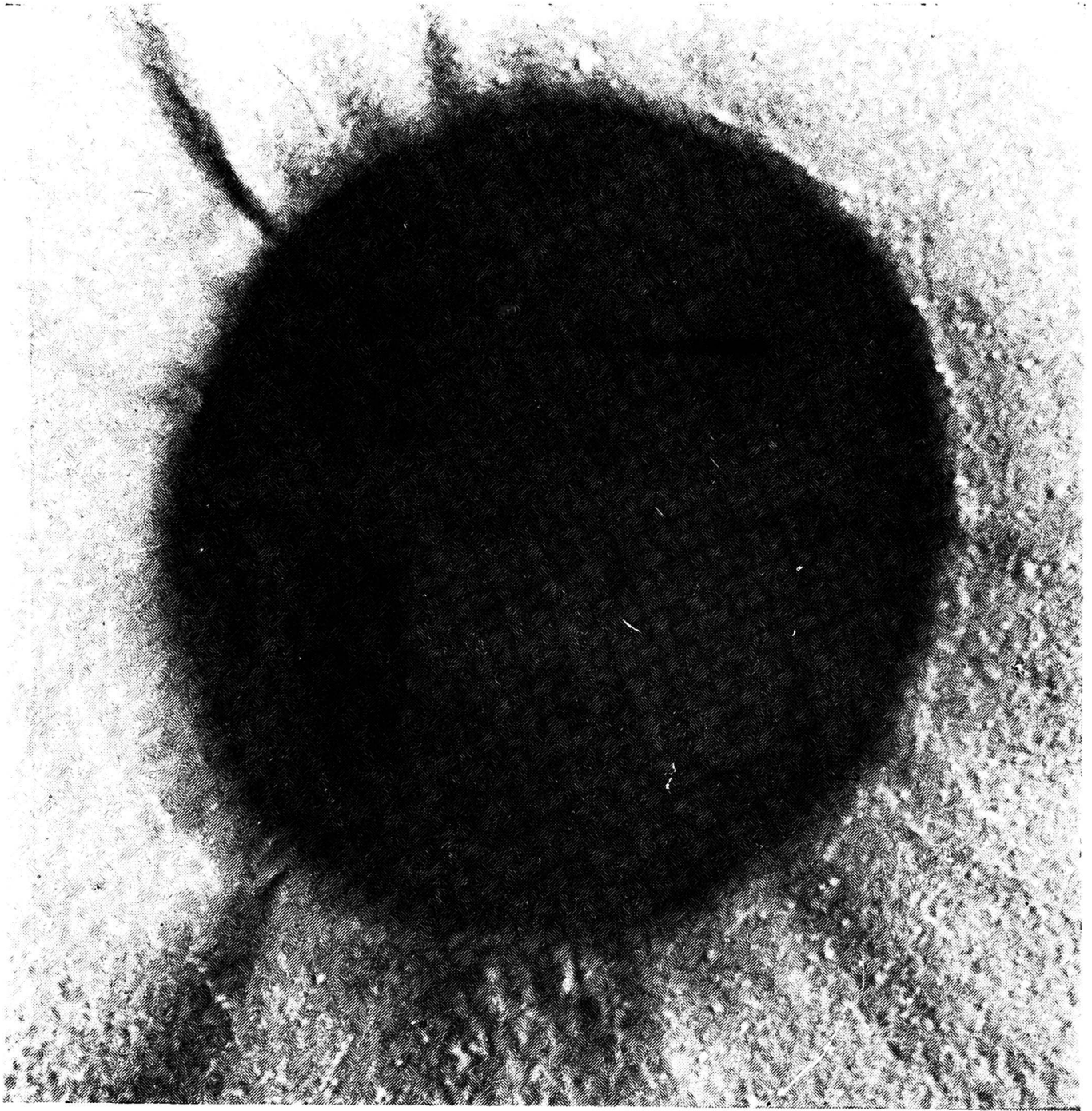
WYNIKI

Posługując się opisaną metodą wykonaliśmy 60 preparatów działając na krwinki grup A, B, i AB aglutyninami anty-A, anty-B i anty-AB oraz surowicami własnych grup w preparatach kontrolnych. W preparatach kontrolnych krwinki czerwone były niezmienione, o brzegach gładkich, nie pofałdowanych (ryc. 1). W niektórych preparatach kontrolnych pojedyncze krwinki były połączone z sąsiednimi za pomocą mostków, podobnych do opisywanych przez Bessisa i wsp. (3, 10) w przypadku nieswoistej aglutynacji. Wypustki te zresztą w naszych preparatach występowały rzadko, a olbrzymia większość krwinek wyglądała jak na ryc. 1.

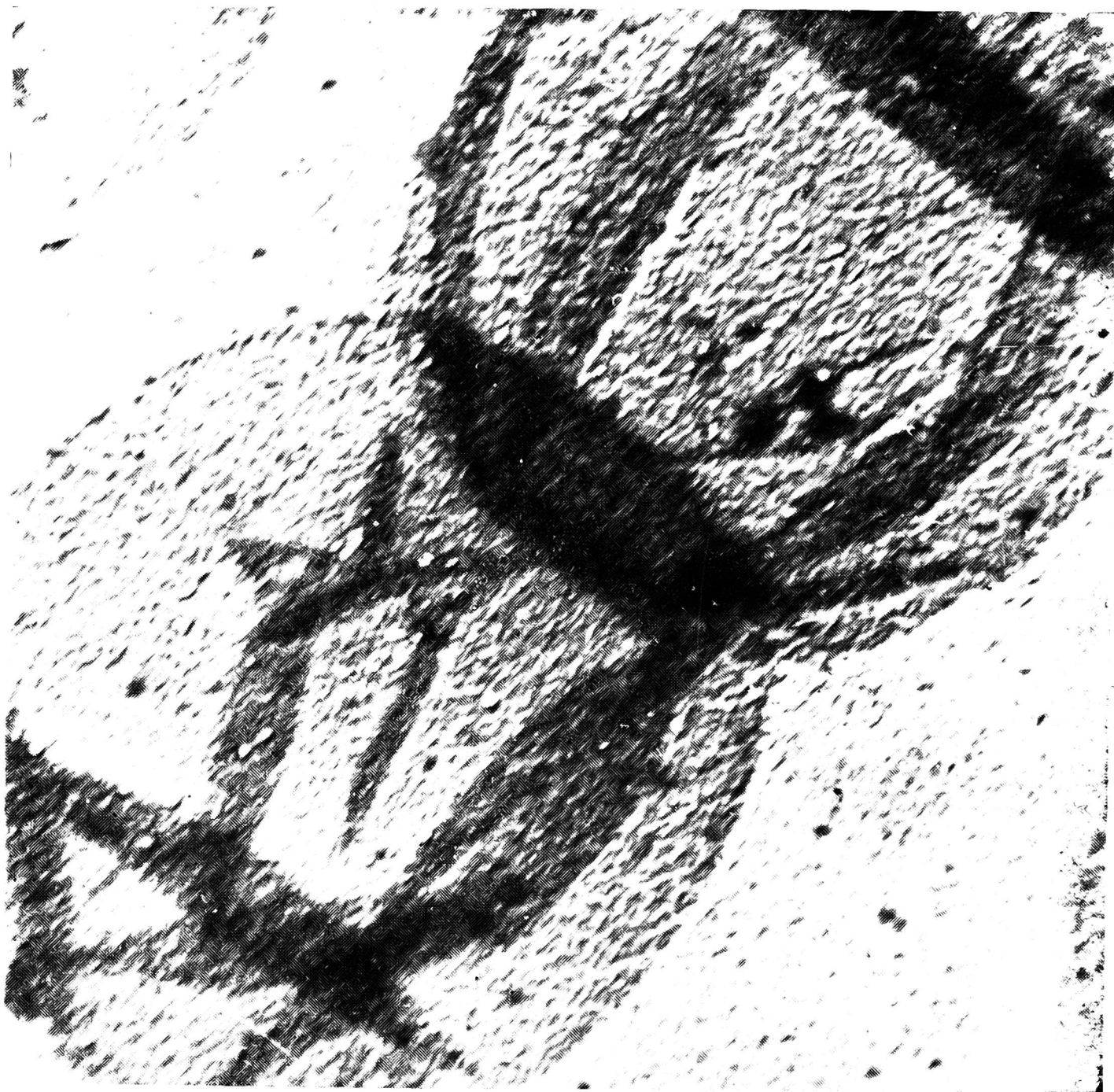
Ryc. 3 przedstawia również fotografię preparatu kontrolnego z tą różnicą, że krwinki zostały zhemolizowane przed inkubacją z własną surowicą. Błonki krwinek czerwonych dotykają się wzajemnie, ale widać wyraźnie, że nie są one ze sobą ściśle złączone. Inaczej jest na preparacie przedstawionym na ryc. 4, gdzie błonki również zhemolizowanych krwinek są ściśle ze sobą zespolone. Jest to aglutynacja krwinek grupy AB pod wpływem aglutynin anty-AB. Znamienny jest obraz krwinki na ryc. 2 przedstawiający erytrocyt grupy B po 30-minutowym działaniu surowicy zawierającej aglutyniny anty-B. Na rycinie widać, że na krwince znajduje się warstewka jakiejś substancji, która zdawałoby się równomiernie pokrywa jej powierzchnię. Żadnych wypustek, uwypukleń lub innych odkształceń krwinki czerwonej nie stwierdza się. Na wszystkich naszych preparatach, tam gdzie krwinki leżały pojedynczo, otrzymywaliśmy podobne obrazy. Nigdy nie spostrzegaliśmy w takich warunkach doświadczalnych zmian struktury krwinki, bez względu na grupę krwi oraz czas inkubacji. Inaczej rzecz przedstawiała się tam, gdzie krwinki znajdowały się w większych zespołach. Ryc. 5 i 6 przedstawiają tego rodzaju obrazy. Widać na nich wypustki, łączące ze sobą powierzchnie sąsiednich krwinek. Na ryc. 6 widać, że wypustki te mogą nawet pociągać za sobą błonę krwinki, co powoduje powstanie odkształcenia jej w postaci stożka (ryc. 6a). Wypustki te mogą odrywać się od jednej krwinki (ryc. 6b). Mogą również ulegać przerwowaniu. Widać wtedy sterczące wolno końce przerwanej w środku wypustki (ryc. 6c). Dokładniejsza analiza mechanizmu powstawania tych wypustek znajduje się w „Omówieniu wyników” — tu ograniczymy się tylko do stwierdzenia, że pojedynczo leżące krwinki w preparacie nigdy nie miały tego rodzaju wypustek. Natomiast w krwinkach, znajdujących się w zespołach, p r a w i e z a w s z e znajdo-



Ryc. 1. Preparat kontrolny. Krwinki AB w surowicy własnej grupy 15 min.
Utrw. kw. osm. Pow. 16.200 ×



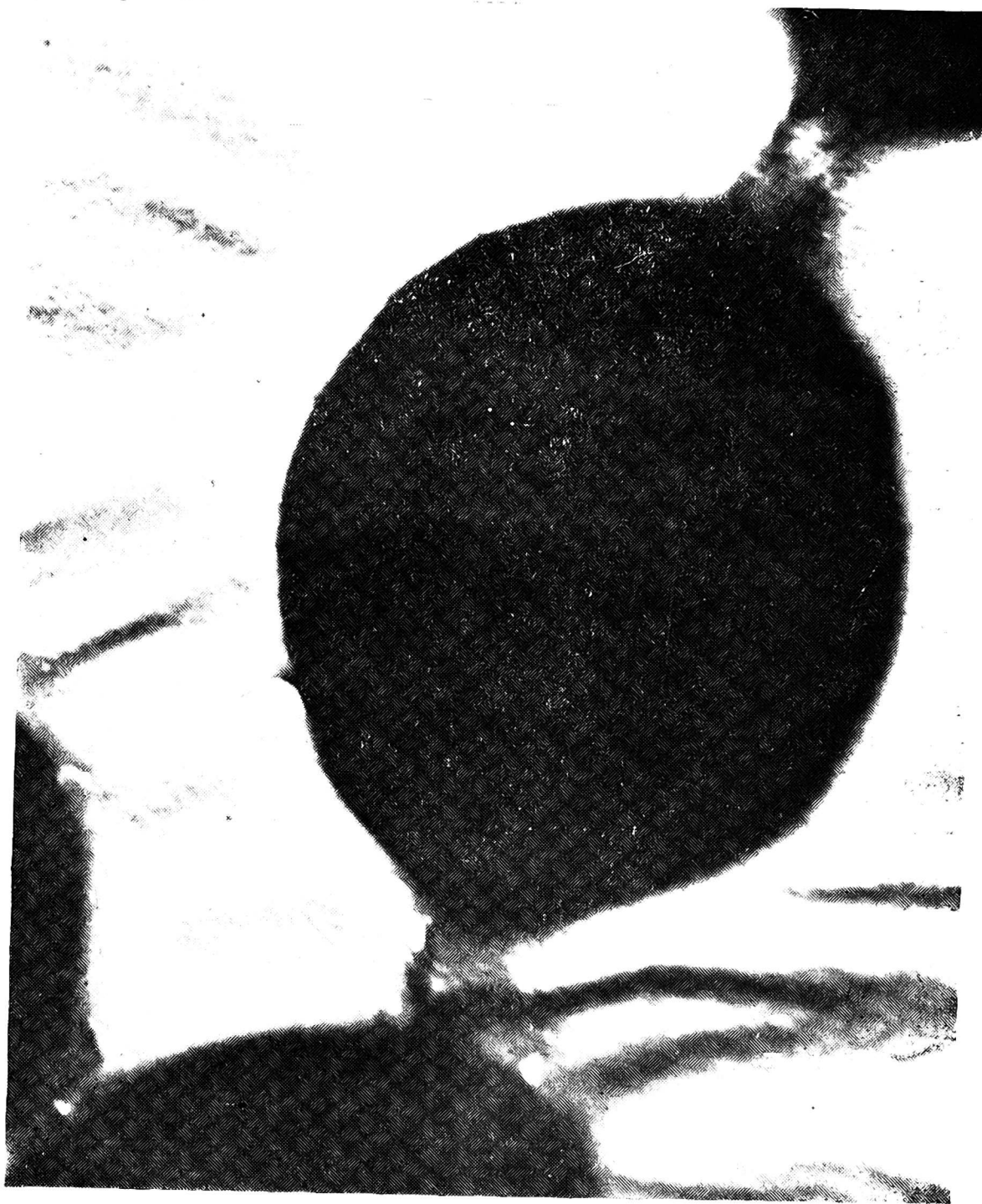
Ryc. 2. Krwinka B w surow. anty-B 30 min. Utrw. kw. osm. Pow. 18.600×



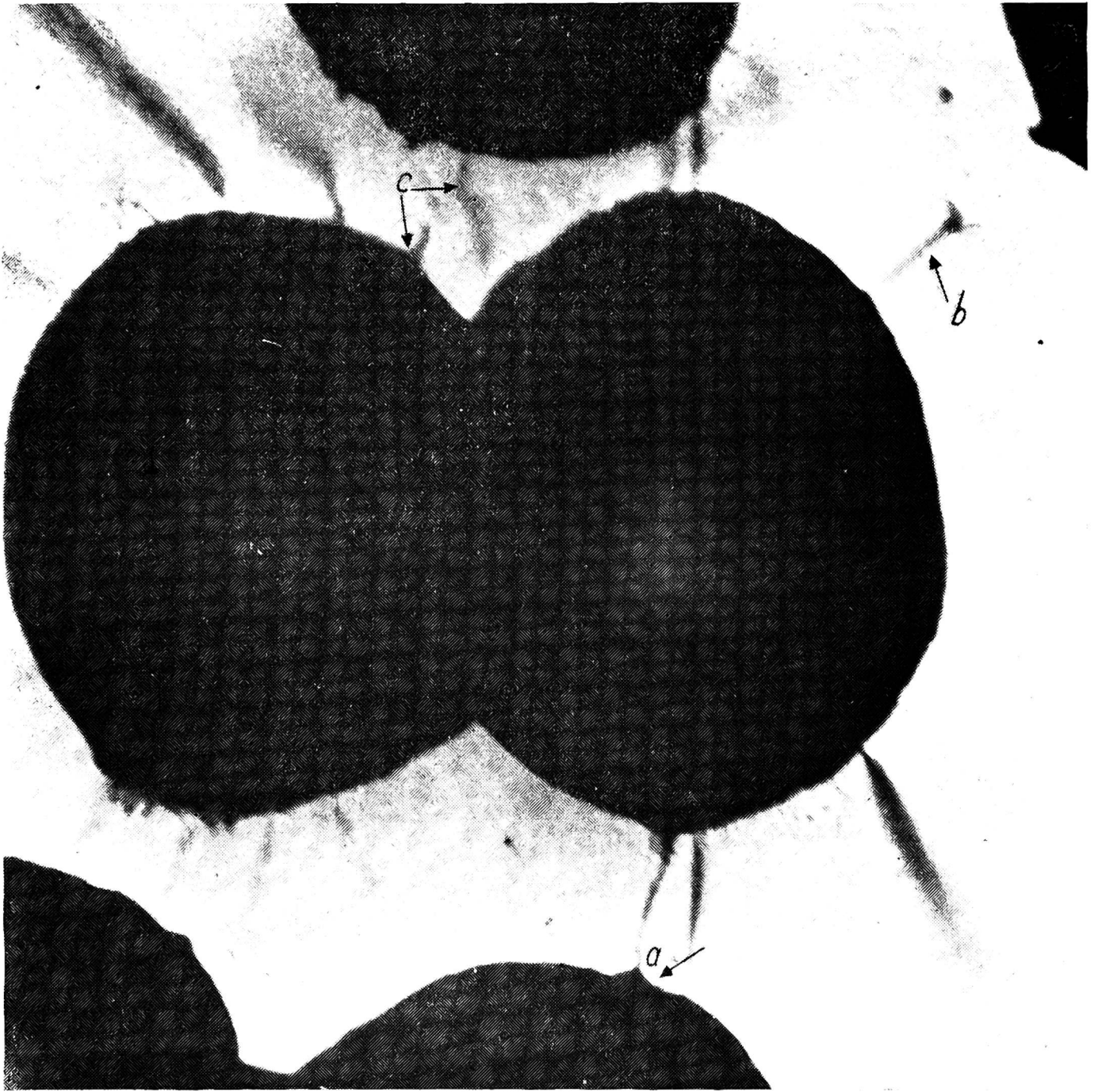
Ryc. 3. Preparat kontrolny. Zhemolizowane krwinki AB w surowicy własnej grupy 10 min. Utrw. kw. osm. Pow. 16.200 \times .



Ryc. 4. Zhemolizowane kiwinki AB w surow. anty-AB 10 min. Utrw. kw. gsm.
Pow. 15.600 \times



Ryc. 5. Krwinki B w surow. anty-B 30 min. Utrw. kw. osm.
Pow. 18.900 ×



Ryc. 6. Krwinki B w surow. anti-B 30 min. Utrw. kw. osm. Pow. $15.900\times$
a) — stożkowate odkształcenie błonki krwinki czerwonej,
b) — wypustka oderwana od jednej krwinki,
c) — wypustka przerwana w środku.

waliśmy wypustki i odkształcenia w preparatach, w których działaliśmy obcogrupowymi surowicami na krwinki czerwone oraz r z a d k o w preparatach kontrolnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W czasie procesu aglutynacji grupowej krwinek czerwonych następuje łączenie się aglutyniny surowicy z aglutynogenem krwinek, co jest procesem dającym się określić wagowo (8). Według *Bordeta* (7) proces ten zachodzi w dwóch fazach. Powstający w pierwszej fazie związek aglutyniny z aglutynogenem — w drugiej fazie precypituje jako związek hydrofobowy. Otóż obserwując w mikroskopie elektronowym pojedynczą krwinkę, na którą działano surowicą obcogrupową, widać pokrywającą ją warstewkę jakiejś substancji słabo przepuszczalnej dla elektronów, której dokładnej budowy nie udało nam się stwierdzić (ryc. 2). Jest to prawdopodobnie warstewka owego precypitatu powstałego z połączenia się aglutyniny z aglutynogenem. Podobne obrazy otrzymywano badając w mikroskopie elektronowym bakterie poddane działaniu swoistych przeciwciał. Spostrzegano mianowicie na komórkach bakteryjnych warstewkę jakiejś substancji, wykazującej własności mogące świadczyć o jej dużej lepkości (9). *Bloch* i *Powell* (6), obserwując w mikroskopie elektronowym krwinki chorych na różne choroby zakaźne i inne, spostrzegali na krwinkach czerwonych warstewkę substancji trudno przepuszczalnej dla elektronów.

Obserwacje nasze oraz *Blocha* i *Powella* (6) dotyczyły krwinek leżących pojedynczo na błonce preparatu. Gdy jednak krwinki znajdują się blisko siebie na preparacie, wtedy zlepiają się ze sobą. Taki obraz widzimy na ryc. 5 i 6. Na ryc. 6 oprócz zaglutynowanych krwinek widać krwinki połączone ze sobą mostkami. Powstanie tych tworów można tłumaczyć w następujący sposób: zarówno krwinki, jak i białka surowicy wysychając kurczą się nieco, co może powodować, że niezbyt ściśle ze sobą zespolone krwinki nieco się od siebie oddalają. Może również w czasie przygotowywania preparatu lub utrwalenia go niektóre krwinki ulegają niewielkim przemieszczeniom i oddalają się od siebie. Otóż przy tym oddalaniu się od siebie niektórych uprzednio zaglutynowanych krwinek precypitat sklejający krwinki może wyciągać się w nitki, tworząc pewnego rodzaju „mostki“, którymi poszczególne krwinki czerwone mogą być w pewnych wypadkach ze sobą połączone. Cytowani na wstępie autorzy, opisujący występowanie na krwinkach poddanych działaniu obcogrupowych aglutynin — szeregu zmian strukturalnych, jak kratery, wygórowania czy specyficzne wypustki — posługiwali się nieco inną niż my metodą sporządzania preparatów. Mieszali oni mianowicie przed doświadczeniem krwinki z surowicą, zawierającą obce aglutyniny i dopiero po tym pobierali próbkę, którą umieszczali na podstawce preparatowej. Oczywiście operowali oni już zaglutynowanymi krwinkami, z których pojedyncze w czasie manipulacji mogły odrywać się od całego zespołu zaglutynowanych krwinek i pociągać za sobą nitki precypitatu. Mogły przy tym powstawać na jednych krwinkach wypukłości, na innych pewne zagłębienia („kratery“), mogące powstawać wskutek oderwania się części warstewki precypitatu. Wymienieni badacze nie mieli możliwości obserwowania pojedynczych krwinek, które by poprzednio nie stykały się z innymi. Nato-

miast przy użyciu naszej metody taka możliwość istnieje. Krwinki bowiem w odpowiednio rzadkiej zawieszynie umieszczamy na podstawce preparatowej, następnie po ich opadnięciu na błonkę rozpiętą na siateczce podstawki ściągamy nadmiar płynu i umieszczamy kroplę rozcieńczonej surowicy obcogrupowej. Krwinki znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie mogą ulegać aglutynacji, natomiast bardziej oddalone od innych nie mogą zespalać się z nimi, gdyż nie pozwala na to uprzednie ustalenie się krwinki na błonce preparatu. Błonka ta uginając się pod ciężarem krwinki tworzy zagłębienie, z którego sama krwinka już wydostać się nie może. Otóż w tych warunkach doświadczalnych, obserwując pojedyncze krwinki, które jak można przypuszczać, nie stykały się w preparacie z innymi — nigdy nie stwierdzaliśmy na nich zmian podobnych do opisywanych przez cytowanych autorów. Spostrzegaliśmy jedynie zatarcie granic krwinek, które może być wywołane przez obecność na nich warstewki precypitatu, podobnej do opisywanej przez *Blocha* i *Powella* (6).

Nie możemy tu wdawać się w analizę mechanizmu powstawania zmian struktury krwinki czerwonej w postaci „kraterów“ i wypustek spostrzeganych w krwinkach przechowywanych przez dłuższy czas w roztworze fizjologicznym (3, 11) czy opisywanych w czasie nieswoistej aglutynacji, zachodzącej pod wpływem stężonych roztworów soli (10), czy też zaobserwowanych przez nas w kilku preparatach kontrolnych. Być może mechanizm powstawania w tych warunkach wypustek i innych zmian struktury krwinki czerwonej jest podobny do opisanego przez nas, z tym, że zlepianie się krwinek zachodziłoby nie wskutek obecności aglutynin, ale byłoby wywołane czynnikami chemicznymi lub fizyko-chemicznymi.

Streszczając otrzymane przez nas wyniki i zestawiając je z obrazami, opisywanymi przez innych autorów możemy powiedzieć, że:

1. Obcogrupowe aglutyniny działając na krwinki czerwone nie powodują w nich żadnych zmian w rodzaju wypustek, „kraterów“, czy stożkowatych wyniosłości. Natomiast powstaje w tych warunkach pokrywająca krwinki warstewka jakiejś substancji, będąca prawdopodobnie precypitatem związku aglutyniny z aglutynogenem. Ze sposobu rozmieszczenia tego precypitatu — jak wydaje się z naszych obrazów — równomiernego na całej powierzchni krwinki, nie można oczywiście wyciągać żadnych wniosków co do rozmieszczenia grup antygenowych w błonie krwinki.

2. Wypustki, łączące w postaci mostków zaglutynowane uprzednio krwinki, są tworem powstałymi wtórnie wskutek wyciągania się w nitki warstwy precypitatu. Również „kratery“ i stożkowate wyniosłości krwinek są prawdopodobnie zmianami wtórnymi.

В. Романовски, А. Фельтыновски

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ
ДЕЙСТВИЮ ИЗОГЕМОАГГЛЮТИНИНОВ ЧУЖЕРОДНЫХ ГРУПП КРОВИ
В СВЕТЕ ИССЛЕДОВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОНОВОГО МИКРОСКОПА

С о д е р ж а н и е

Авторы применяли собственный метод, состоящий в том, что действовали чужеродной сывороткой непосредственно на подставке препарата (holder). Благодаря этому они имели возможность наблюдать отдельные эритроциты и агглю-

тинированные их комплексы. На поверхности эритроцитов, лежавших отдельно на пленке препарата, на которые действовала сыворотка чужой группы крови, авторы констатировали присутствие тонкого слоя какого-то вещества, являющегося вероятно преципитатом соединения агглютиногена с агглютинином. Сверх того они никогда не обнаруживали каких либо отростков либо других изменений структуры эритроцита.

Наблюдая комплексы агглютинированных эритроцитов в местах, где кровяные шарики лежали отдельно друг от друга, они констатировали присутствие отростков, напоминающих „hematexodia“ Бессиса и выпуклости на поверхности эритроцита, напоминающие изменения, описанные Ребуком. Авторы полагают, что отростки являются нитями преципитата соединения агглютиногена с агглютинином, выпуклости же и, быть может, и „кратеры“, описанные Бессисом, представляют собою вторичные изменения, вызванные потягиванием отростками оболочки эритроцита, или же отслаиванием части преципитата от поверхности кровяного шарика.

W. Romanowski, A. Feltynowski

THE ELECTRON MICROSCOPE RESEARCHES ON THE STRUCTURAL CHANGES OF ERYTHROCYTES SUBJECTED TO THE INFLUENCE OF THEIR SPECIFIC AGGLUTININS

S u m m a r y

The authors have applied their own method in which they acted on the erythrocytes with specific serum agglutinins upon the holder of the electron microscope. Thus they could observe single erythrocytes, and also agglutinated clumps. On the surface of single erythrocytes on which the authors acted with specific agglutinins they observed fine layer of substance, which was probably a precipitated compound of the agglutigen with agglutinin. The authors did not find any summits or other changes of the structure of these erythrocytes.

When they observed clumps of agglutinated erythrocytes, in the parts of the preparation, in which the erythrocytes are separated, they showed fringes resembling „hemotexodias“ described by Bessis and „plateau — like summits“ of the erythrocyte membrane, resembling the changes described by Rebuck.

According to the authors the fringes are the filaments of precipitated compound of the agglutigen with agglutinin, and convexities on the surfaces, perhaps the „craters“ described by Bessis, are secondary changes, which seem to be caused by fringe pulling or partially decollating of the precipitate from the surface of some erythrocytes.

PIŚMIENICTWO

1. Aleksandrowicz J., Blicharski F., Feltynowski A.: Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 1954, 4, 393—480. — 2. Bessis M.: Blood, 1950, 5, 1083—1098. — 3. Bessis M., Bricka M.: C. R. Soc. Biol., 1951, 145, 1509—1511. — 4. Bessis M., Bricka M.: C. R. Ac. Sci., 1953, 236, 1208—1209. — 5. Bessis M., Bricka M.: Blood, 1954, 9, 39—45. — 6. Bloch E. H., Powell A.: Science, 1952, 115, 46—47. — 7. Bordet J.: Traité de L'immunité. Paris, Masson, 1939. — 8. Milgrom T.: Badania nad budową przeciwciał. Warszawa, PZWL, 1950. — 9. Mudd St., Anderson T. F.: Journ. of Immunology, 1941, 42, 251.

10. Ponder E., Bessis M., Bricka M., Gorius J.: C. R. Ac. Sci., 1952, 234, 2645-2646. —
11. Ponder E., Bessis M., Breton — Gorius J., Guinier A., Antzenberger P., Dervichian D. G.: Revue d'Hematologie, 1954, 9, 123—126. — 12. Przesmycki F.: Zarys Bakteriologii Praktycznej. Warszawa, PZWL, 1951, str. 232—248. — 13. Rebeck J. W.: The Anatomical Record, 1953, 115, 591—613. — 14. Romanowski W., Feltynowski A.: Acta Physiologica Polonica, 1953, 4, 267—272. — 15. Williams R. C., Wyckoff R. W. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1954, 58, 256.

Otrzymano: 23. XII. 1954.