

Wojciech Geremek, Zofia Walter

WPLYW KONSERWACJI KRWI
NA ZAWARTOŚĆ KWASÓW NUKLEINOWYCH
I AKTYWNOŚCI ENZYMÓW NUKLEOLITYCZNYCH
W LIMFOCYTACH LUDZKIEJ KRWI OBWODOWEJ

Materiałem do badań były limfocyty izolowane z ludzkiej krwi obwodowej, pobieranej od zdrowych dawców, przechowywanej w temperaturze $4^{\circ}\text{--}6^{\circ}\text{C}$ w 3 różnych płynach konserwujących; 1) ACD formuły B o składzie - 0,045 M cytrynian sodu, 0,025 M kwas cytrynowy, 0,035 M glukoza, $\text{pH} = 4,9$; 2) CPD o składzie - 0,088 M cytrynian sodu, 0,015 M kwas cytrynowy, 0,139 M glukoza, 0,158 M fosforan sodu, $\text{pH} = 5,63$; 3) CPD z dodatkiem adeniny i adenozy. Czas konserwacji krwi wynosił: 0, 7, 14, 21 dni dla ACDf.B; 0, 7, 14, 21 i 28 dni dla CPD; 0, 7, 14, 21, 28 i 42 dni dla CPD z adeniną i adenozy. W limfocytach oznaczono zawartość RNA i DNA metodą spektrofotometryczną Markova i Tsaneva, oraz aktywność rybonukleazową metodą Frih-Niggemeyer-Reddi, dezoksyrybonukleazy metodą Rotherham i fosfatazy kwasnej metodą Kinga-Armstronga.

Stwierdzono pewne zmiany w zawartości RNA i DNA oraz w aktywności badanych enzymów, zależne od czasu i warunków konserwacji krwi, przypominające zmiany zachodzące w limfocytach stymulowanych mitogenami.

WSTĘP

Zachowanie się krwinek białych w krwi ludzkiej konserwowanej ma duże znaczenie z teoretycznego i praktycznego punktu widzenia.

W procesie "starzenia" się leukocytów w czasie konserwowania krwi ludzkiej w temperaturze $+4$ do $+6^{\circ}\text{C}$, przy użyciu płynów konserwujących zwraca uwagę odmienna wrażliwość poszczególnych postaci leukocytów oraz różna kolejność, w jakiej ulegają one roz-

padowi. Najbardziej wrażliwe są komórki układu granulocytów, natomiast w limfocytach procesy zwyrodnienia przebiegają wolniej.

Istnieją badania [28, 29] wykazujące, że limfocyty są nie tylko zdolne przeżyć w krwi konserwowanej płynami konserwującymi, ale także zachowują swoją funkcję mitotyczną. Badania Petracki i wsp. [19] pokazały, że limfocyty krwi konserwowanej płynem ACD formuły B, przechowywanej do 22 dni w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, wykazują w hodowli aktywność mitotyczną, podobną jak limfocyty krwi świeżej. Natomiast Quagliano i wsp. [20] stwierdzili, że w hodowli bez PHA (fitohemaglutyniny) również obserwuje się proces transformacji limfocytów, a wzrost liczby blastów idzie w parze z rozpadem granulocytów i procesami ich zwyrodnienia [28].

Zastosowanie w leczeniu preparatów zawierających limfocyty jest dość szerokie [36], m. in. można wymienić leczenie immunodepresji różnego stopnia i pochodzenia, upośledzenie zjawisk odpornościowych, leczenie chorych z hipoplazją krwiotwórczą, zaburzeniami aktywności i transformacji limfocytów, wrodzonymi nieprawidłowościami metabolizmu limfocytów prowadzącymi do zaburzeń odporności komórkowej, itp. Wszystko to jest przyczyną niezbędności tworzenia zapasów preparatów zawierających limfocyty z wysoką aktywnością biologiczną.

Jak wykazują badania, koncentraty krwinek jednojądrzastych (limfocyty, monocyty) mogą być przechowywane w osoczu autologicznym w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ w czasie nie dłuższym jak 48 h, bez zmiany właściwości biologicznych (struktury, zmiany zdolności do transformacji blastycznej) [6, 12]. Metoda głębokiego zamrożenia pozwala na zatrzymanie procesów biologicznych w komórce przez bardzo długi okres [6, 33], jednak nie może być obecnie stosowana powszechnie m. in. ze względów ekonomicznych. Zatem, praktycznym, powszechnie dostępnym w lecznictwie źródłem limfocytów mogłaby być ludzka krew konserwowana w temperaturze $+4$ do $+6^{\circ}\text{C}$, w okresie dłuższym jak 48 h.

Należy podkreślić, że brak jest w dostępnych doniesieniach danych dotyczących badań metabolizmu limfocytów w krwi konserwowanej w temperaturze $+4$ do $+6^{\circ}\text{C}$, w aspekcie wykorzystania jej jako źródła tych krwinek dla lecznictwa, po okresach dłuższych jak 48 h konserwowania.

Celem pracy była próba określenia zmian zawartości kwasów nukleinowych DNA i RNA, oraz zmian aktywności niektórych enzymów nukleolitycznych, jak: rybonukleaza (RN-aza), dezoksyrybonukleaza

(DN-aza) oraz aktywności fosfatazy kwasowej (FK) w limfocytach ludzkiej krwi konserwowanej w temperaturze $+4$ do $+6^{\circ}\text{C}$, w zależności od czasu przechowywania i użytych rodzajów płynów konserwujących, jako jedne z kryteriów oceny wartości biologicznej tych krwinek pod kątem przydatności w leczeniu.

MATERIAŁ I METODY

1. Konserwowanie krwi ludzkiej. Skład płynów i warunki konserwowania krwi ludzkiej przedstawiono w tab. 1.

2. Izolowanie limfocytów [23]. Limfocyty izolowano metodą wirowania krwi konserwowanej po nawarstwieniu jej na mieszaninę uropolinum i dekstranu. W metodzie tej zastosowano modyfikację własną.

3. Izolowane limfocyty zawieszano w fizjologicznym roztworze chlorku sodu, obliczano zawartość komórek/ mm^3 próbki, oceniano żywotność limfocytów, metodą barwienia błękitem trypanu, oraz zanieczyszczenia innymi komórkami, metodą mikroskopową po ich wybarwieniu.

Próbki limfocytów zamrażano w temperaturze -35°C i przechowywano w -20°C , do momentu wykonania badań biochemicznych. Przed wykonaniem tych badań przeprowadzono homogenizację limfocytów w homogenizatorze Pottera w temperaturze 0°C .

W limfocytach oznaczono zawartość kwasów nukleinowych DNA i RNA metodą spektrofotometryczną wg Tsaneva i Markova [30], oraz aktywności enzymów:

- RN-azy (E.C.2.7.7.17 - tj. nukleotydyl-2 -transferazy rybonukleinianu, cyklizujące) na podstawie procedury Frih-Niggemayer-Reddi [5];

- DN-azy (E.C.3.1.4.6. - tj. nukleotydylhydrolazy dezoksyrybonukleinianu) metodą Rotherhama [21];

- FK (E.C.3.1.3.2. - tj. fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych) metodą Kinga-Armstronga [11].

T a b e l a 1

Skład płynów konserwujących i warunki przechowywania krwi ludzkiej

Composition of conserving fluids and conditions of human blood stored

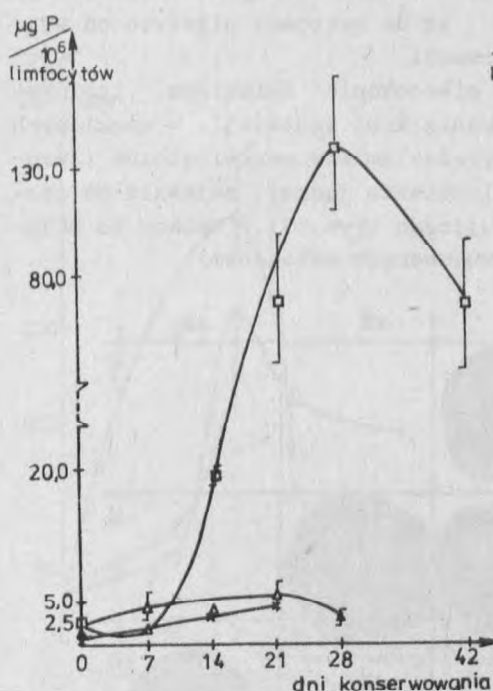
Rodzaj płynu konserwu- jącego	Cytry- nian trójso- dowy dwu- wodny	Kwas cytry- nowy jedno- wodny	Glukoza bez- wodna	Fosforan jedno- sodowy jedno- wodny	Adenina	Adenozyna	Aqua bide- stil- lata apyro- genna	pH	Temperatura konserwacji	Czas konserwacji (w dniach)					
ACD f.B	0,045 M	0,023 M	0,035 M	-	-	-	ad 1 000	4,9 do 5,1	277,15 do 279,15 K (+4 do +6°C)	0	7	14	21	-	-
CPD	0,088 M	0,015 M	0,139 M	0,158 M	-	-	ad 1 000	5,63	277,15 do 279,15 K (+4 do +6°C)	0	7	14	21	28	-
CPD+Ade+ Ado	0,05 M	0,011 M	0,111 M	0,011 M	0,005 M	0,0057 M	ad 1 000	5,6	277,15 do 279,15 K (+4 do +6°C)	0	7	14	21	28	42

U w a g a: ACDf.B, CPD, CPD + Ade + Ado - płyny konserwujące do przechowywania krwi ludzkiej;

Ade - adenina, Ado - adenozyna.

WYNIKI I DYSKUSJA

Procesy degradacji toczące się w limfocytach podczas konserwowania krwi ludzkiej dotyczą w znacznym stopniu kwasów nukleinowych zarówno DNA, jak i RNA, których odpowiedni poziom stanowi jeden z najważniejszych warunków zachowania zdolności limfocytów do transformacji blastycznych oraz do podjęcia odpowiednich funkcji w mechanizmach obronnych. Stwierdzone zmiany zawartości kwasów nukleinowych w limfocytach ludzkiej krwi konserwowanej przedstawiono na rys. 1 i 2.

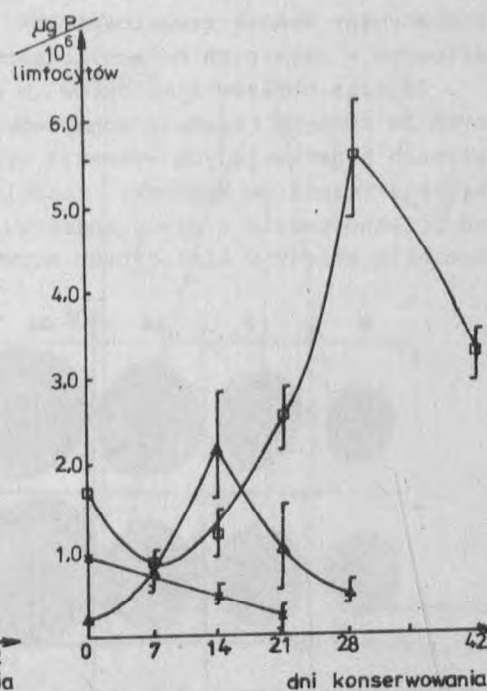


Rys. 1. Wpływ przechowywania ludzkiej krwi obwodowej w różnych płynach konserwujących na zawartość DNA w limfocytach

-x- płyn ACDf.B; -Δ- płyn CPD; -□- płyn CPD + Ade + Ado

Fig. 1. Effect of the storage of human peripheral blood conserved in different fluids on DNA content in lymphocytes

-x- conserving fluid ACDf.B; -Δ- conserving fluid CPD; -□- conserving fluid CPD + Ade + Ado



Rys. 2. Wpływ przechowywania ludzkiej krwi obwodowej w różnych płynach konserwujących na zawartość RNA w limfocytach

-x- płyn ACDf.B; -Δ- płyn CPD; -□- płyn CPD + Ade + Ado

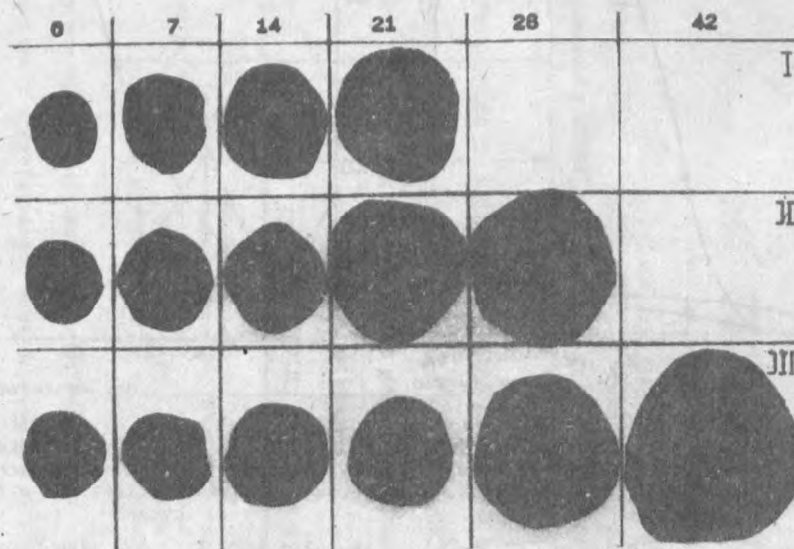
Fig. 2. Effect of the storage of human peripheral blood conserved in different fluids on RNA content in lymphocytes

-x- conserving fluid ACDf.B; -Δ- conserving fluid CPD; -□- conserving fluid CPD + Ade + Ado

Najwyższe zawartości całkowite DNA w porównaniu z próbami kontrolnymi otrzymano dla płynu CPD + adenina + adenozyna, w 28 dniu konserwowania. Wzrost był 45-krotny i znacznie wyższy niż w pozostałych płynach konserwujących. Jednocześnie zawartości DNA limfocytów w ostatnich dniach konserwowania były wyższe w każdym z zastosowanych płynów konserwujących od wartości kontrolnych.

Otrzymano także istotne statystycznie zmiany zawartości całkowitej RNA, które podobnie jak dla DNA są największe w odniesieniu do płynu CPD + adenina + adenozyna w okresie od 21 do 28 dnia konserwacji. W ACDf.B obserwuje się, odmiennie od pozostałych, systematyczny spadek zawartości RNA, aż do wartości niższych od wyjściowych w ostatnich dniach konserwacji.

Zdjęcia obrazów limfocytów w mikroskopie świetlnym, izolowanych po różnych czasach konserwowania krwi ludzkiej, w omawianych płynach konserwujących wykazują wyraźne zmiany morfologiczne (zwiększanie rozmiarów komórek, rozpułchnienie jądra), zależnie od czasu przechowywania i płynu konserwującego (rys. 3). Zmiany te przypominają zmiany w limfocytach stymulowanych mitogenami.



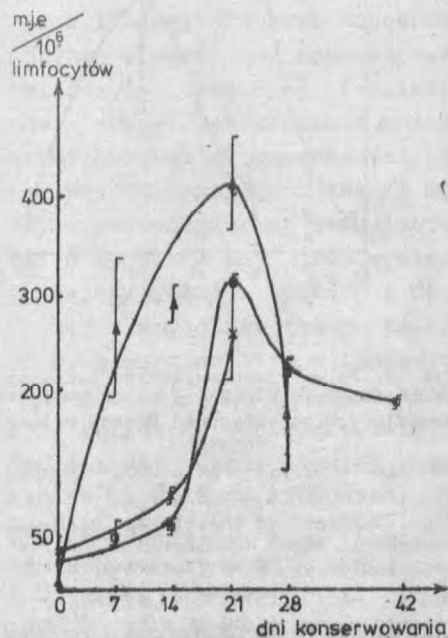
Rys. 3. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego limfocytów z ludzkiej krwi obwodowej: I - płyn ACDf.B; II - CPD; III - CPD + Ade + Ado; 0, 7, 14, 21, 28, 42 - dni konserwacji

Fig. 3. Light microscope picture of the lymphocytes isolated from human peripheral blood. Conserving fluids: I - ACDf.B; II - CPD, III - CPD + Ade + Ado. Conservation time: 0, 7, 14, 21, 28, 42, days

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono zmiany aktywności RN-azy zarówno w buforze octanowym o pH = 5,0, jak i w buforze fosforanowym o pH = 7,0. Zmiany te mają bardzo podobny przebieg w obu środowiskach, a różnią się tylko wartościami (rys. 4 i 5).

Maksymalne aktywności enzymu dla obu buforów i różnych płynów konserwujących przypadają na 21 dzień konserwowania.

Aktywność DN-azy wykazuje odmienny przebieg w obrębie poszczególnych płynów konserwujących. Przedstawia to rys. 6.

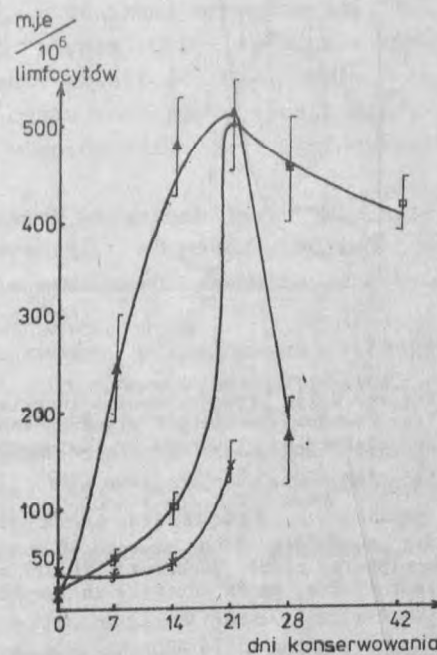


Rys. 4. Wpływ przechowywania ludzkiej krwi obwodowej w różnych płynach konserwujących na aktywność RN-azy w pH 5,0

-x- płyn ACDf.B; -Δ- płyn CPD; -□- płyn CPD + Ade + Ado

Fig. 4. Effect of the storage of human peripheral blood conserved in different fluids on RN-ase activity in pH 5.0

-x- conserving fluid ACDf.B; -Δ- conserving fluid CPD; -□- conserving fluid CPD + Ade + Ado

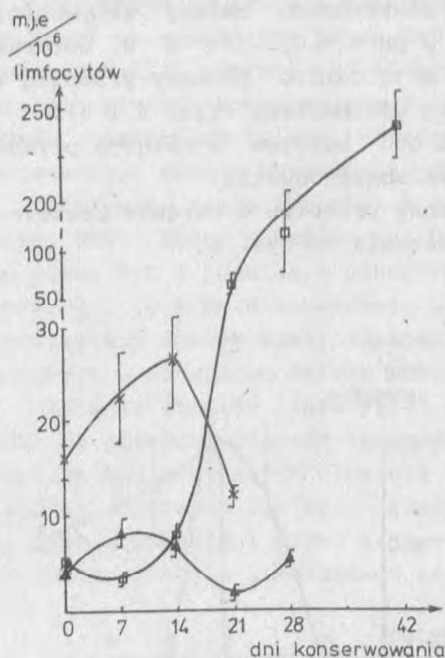


Rys. 5. Wpływ przechowywania ludzkiej krwi obwodowej w różnych płynach konserwujących na aktywność RN-azy w pH 7,0

-x- płyn ACDf.B; -Δ- płyn CPD; -□- płyn CPD + Ade + Ado

Fig. 5. Effect of the storage of human peripheral blood conserved in different fluids on RN-ase activity in pH 7.0

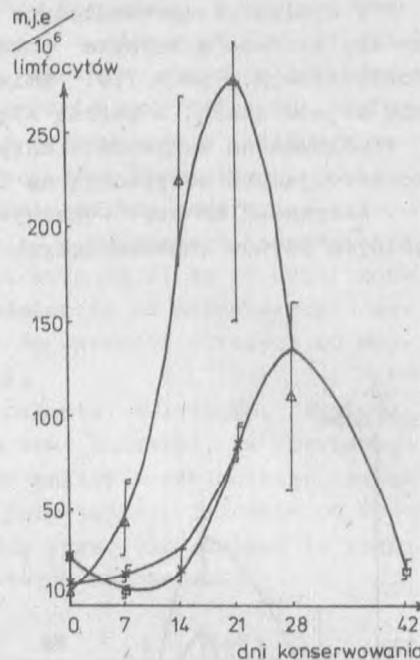
-x- conserving fluid ACDf.B; -Δ- conserving fluid CPD; -□- conserving fluid CPD + Ade + Ado



Rys. 6. Wpływ przechowywania ludzkiej krwi obwodowej w różnych płynach konserwujących na aktywność FK limfocytów
-x- płyn ACDf.B; -Δ- płyn CPD; -□- płyn CPD + Ade + Ado

Fig. 6. Effect of the storage of human peripheral blood conserved in different fluids on FK activity in lymphocytes

-x- conserving fluid ACDf.B; -Δ- conserving fluid CPD; -□- conserving fluid CPD + Ade + Ado



Rys. 7. Wpływ przechowywania ludzkiej krwi obwodowej w różnych płynach konserwujących na aktywność DN-azy w limfocytach

-x- płyn ACDf.B; -Δ- płyn CPD; -□- płyn CPD + Ade + Ado

Fig. 7. Effect of the storage of human peripheral blood conserved in different fluids on DN-ase activity in lymphocytes

-x- conserving fluid ACDf.B; -Δ- conserving fluid CPD; -□- conserving fluid CPD + Ade + Ado

Najniższe wartości, bez wyraźnego maksimum, występują w płynie CPD. Dla płynu ACDf.B stwierdza się stały, równomierny przyrost aktywności, z jej maksimum w 14 dniu konserwowania. W płynie CPD + adenozyna + adenina występuje początkowo obniżenie aktywności, a następnie bardzo szybkie przyrosty aż do 42 dnia konserwowania.

Zaobserwowano wzrost aktywności FK limfocytów w miarę upływu czasu konserwacji krwi we wszystkich rodzajach użytych płynów konserwujących. Zmienny przebieg i różnice aktywności w warunkach konserwowania przedstawia rys. 7.

Wyniki niniejszych badań nie sugerują jasno tylko uszkodzeń fizyko-chemicznych komórek limfocytnych i dalszych następstw - destrukcji w miarę upływu czasu konserwowania krwi. Świadczy o tym znaczne zwiększenie zawartości DNA i RNA w limfocytach krwi konserwowanej płynem CPD + adenina + adenozyne. Zwiększenie dotyczy szczególnie dłuższych okresów przechowywania: 14-21-28 dni.

Powstaje więc pytanie: co może być przyczyną tego zjawiska? Limfocyty ludzkiej krwi obwodowej w warunkach "in vivo" i "in vitro" jako komórki spoczynkowe charakteryzują się m. in. małą wydajnością syntezy kwasów nukleinowych. Sytuacja ta ulega zmianie w czasie stymulacji tych komórek czynnikami mitogenowymi.

W limfocytach krwi konserwowanej płynem CPD + adenina + adenozyne obserwujemy znaczne zwiększenie zawartości DNA. Może to świadczyć o wzmożonej replikacji w cyklu komórkowym tych limfocytów, aczkolwiek znacznie mniejszej w porównaniu z limfocytami stymulowanymi mitogenami [13, 31].

Wzrost zawartości RNA w tych samych warunkach jest także niższy w porównaniu ze stymulacją mitogenami, co może świadczyć tutaj o upośledzonej jego syntezie, a zawartość całkowita może być funkcją szybkości syntezy i degradacji RNA.

Uzyskany obraz zmian zawartości kwasów nukleinowych skłania do przypuszczeń, że w limfocytach krwi konserwowanej płynem CPD + adenina + adenozyne może zachodzić jakiś szczególny typ stymulacji, połączony z niewątpliwie toczącymi się tam procesami degradacji i destrukcji komórek. Jednakże, "stymulacja" ta w porównaniu ze stymulacją mitogenami jest znacznie wolniejsza i rozciągnięta w czasie. Potwierdzają to otrzymane obrazy mikroskopowe limfocytów (rys. 3).

Istnieją badania [16] sugerujące, że możliwy jest dodatkowy wpływ: erytrocytów, granulocytów, trombocytów i autologicznego osocza na odpowiedź mitogenową limfocytów. Prawdopodobnym czynnikiem stymulującym może być też opisany przez Tchórzewskiego i wsp. [25, 26, 27] oraz Viscera i wsp. [32] czynnik białkowy uwalniany z komórek granulocytów w czasie ich rozpadu i stymulujący limfocyty allogeniczne do komórek blastycznych. Stwierdzono też [28], że im szybciej zmniejsza się liczba granulocytów segmentowanych, tym szybciej odsetek komórek blastycznych osiąga swoje maksimum zarówno w hodowli, jak i w krwi konserwowanej płynem ACD. Ponadto zaobserwowano, iż po uprzednim usunięciu z hodowli granulocytów wszystkie małe limfocyty ulegają powiększeniu.

Biorąc pod uwagę dotychczasowe stwierdzenia należy wysunąć sugestię o prawdopodobnym wpływie granulocytów w czasie konserwowania krwi płynami konserwującymi użytymi w przedstawionej pracy (szczególnie z zastosowaniem płynu CPD + adenina + adenozyne) na zachowanie się limfocytów. Między 2 a 3 tygodniem konserwacji rozpad granulocytów jest największy i po tym czasie obserwuje się istotne, skorelowane zmiany, jak: zwiększenie całkowitej zawartości kwasów nukleinowych i zmiany morfologiczne, tj. zwiększanie rozmiarów komórek i rozpulchnienie jądra.

Istnieją liczne doniesienia o wzroście aktywności takich enzymów jak: RN-aza, DN-aza, FK w limfocytach stymulowanych "in vitro" [1, 2, 3, 7, 8, 10, 14, 15, 17, 34]. B ü s e n i wsp. stwierdzili wzrost aktywności RN-azy i jednoczesną syntezę DNA [4]. Natomiast O p h i r i wsp. [18] oraz S l o r i wsp. [24] stwierdzili wzrost syntezy DNA wraz z przyrostem aktywności DN-azy. Badania Greena również potwierdziły zmiany aktywności kwaśnych hydrolaz lizosomu (w tym RN-azy i FK) w czasie stymulacji [7]. Sugeruje się także, że uwalnianie FK do cytoplazmy stymuluje derepresję spoczynkowych limfocytów [9].

Porównując dane literaturowe z otrzymanymi wynikami badań aktywności enzymów: RN-azy, DN-azy i FK z homogenatu limfocytów krwi konserwowanej, znajdujemy pewną analogię w odniesieniu do wyników z płynu CPD + adenina + adenozyne, bowiem zwiększanie zawartości DNA (w mniejszym stopniu RNA) jest tutaj równoległe ze wzrostem aktywności DN-azy i FK. Nie widać tej równoległości w odniesieniu do RN-azy.

Na podstawie przedstawionych wyników można sugerować celowość dalszych badań w kierunku wykorzystania ludzkiej krwi konserwowanej płynem CPD + adenina + adenozyne do ok. 14 dnia przechowywania w temperaturze +4 do +6°C, jako źródła limfocytów dla celów terapeutycznych. Wskazują na to wyniki zachowania się tych komórek w czasie konserwowania, tj. utrzymanie względnie stabilnej całkowitej zawartości kwasów nukleinowych DNA i RNA oraz otrzymane obrazy morfologiczne.

LITERATURA

- [1] A s t a l d i G., L i s i e w i c z J. (1971), Lymphocyte structure production, function, Idelson, Naples, 49-52.
- [2] B r y n i a k C., L i s i e w i c z J., S e i b e r t K. (1974), *Pediatr. Pol.*, 49(12), 1447-1436.

- [3] Bryniak C., Lisiewicz J., Seibert K. (1975), *Pediatr. Pol.*, 50(12), 1417-1424.
- [4] Busen W., Petters J., Hansen P. (1977), *Eur. J. Bioch.*, 74(1), 203-208.
- [5] Frih-Niggemeyer W., Reddi K. K. (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, 226, 40.
- [6] Gaczkowski A. (1980), *Probl. Krwiod. i Lecz. Krwią*, 17, 35-76.
- [7] Green R. G. (1977), *Exp. Cell. Res.*, 110, 215-223.
- [8] Hirschorn R., Hishorn K., Weissman G., (1968), *J. Cell. Biol.*, 37, 394-403.
- [9] Hirschorn R., Brittinger G., Hirschorn K. Weissman G. (1968), *J. Cell. Biol.* 37, 412-423.
- [10] Kay H. D., Bonnard D. G., West H., Herberman R. (1977), *J. Immunol.*, 118, 2058-2066.
- [11] King J. (1966), *Practical elinical enzymology*, London, 196.
- [12] Kotelba-Witkowska B., Duda W., Daszyński J., Traczyk Z. (1972), *Acta Haemat. Pol.* 3(1), 71-78.
- [13] Ling N. R. (1968), *Lymphocyte stimulation*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- [14] Lisiewicz J., Sowa J. (1975), *Prz. Epid.* 29(2) 169-172.
- [15] Nadler H. L., Dowben R., Hsia D.Y.Y. (1969), *Blood*, 34, 52-62.
- [16] Nissen C., Albrecht R., Crneo. M., Brunn D., Speck B. (1981), *Blut*, 43, 41-46.
- [17] Ophir R., Ben-Efraim S. (1980), *Cell. Immunol.*, 52, 359-369.
- [18] Ophir R., Ben-Efraim S. (1979), *Ann. Immunol.*, (Inst. Pasteur.), 1300, 355-345.
- [19] Petrakis N. J., Politis C. (1962), *New. Engl. J. Med.*, 267, 286-291.
- [20] Puszkar N. S., Polyakova A., Tsutsaeva Yu Itkin A. (1974), *Probl. Giemat. Pereliv. Krovi*, 19, 23-26.
- [21] Quaglino D., Hayhoe R. G., Flemans R. J. (1962), *Nature*, 196, 338-342.
- [22] Rotherham J., Schotelius D. D., Irvin J., L. J. Biol. Chem., (1956), 233, 817-825.
- [23] Sagan Z., Kendziorek A., Uścińowicz B. (1975), *Diagn. Lab.* 11(5-6), 405-409.
- [24] Slor H., Bustan H., Lev T. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 556-561.

- [25] Tchórzewski H. (1972), Arch. Immunol. et Ther. Exp., 20, 831-835.
- [26] Tchórzewski H., Fidelski R., Denys A., Sułkowska Z., Płusa T. (1973), Ann. Immunol. 5, 29-36.
- [27] Tchórzewski H., Sułkowska Z. (1980), Arch. Immunol. et Ther. Exp., 28, 1-8.
- [28] Traczyk Z. (1970), Dynamics of morphological changes of white blood cells "in vitro", Warszawa.
- [29] Traczyk Z., Daszyński J. (1971), Acta Haemat. Pol. 1, 55-61.
- [30] Tsanev R., Markov C. (1960), Biochim. Biophys. Acta, 42, 442-452.
- [31] Urbanczyk J. (1973), Synthesis of nucleic acid and activity of ribonuclease in the lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin Warszawa-Wrocław, 1-63.
- [32] Vischer T., Bertz U., Baggiolini H. (1976), J. Exp. Med., 144, 863-872.
- [33] Zdebska E. (1975), Probl. Krwiod. i Lecz. Krwią, 12, 129-165.
- [34] Zollner E., Beck J. D., Lemmel E. M., Zahn R. K. (1975), Cancer. Lett., 1, 119-126.

Zakład Genetyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki
Wojewódzka Stacja Krwiodawstwa
w Kaliszu

Wojciech Geremek, Zofia Walter

INFLUENCE OF BLOOD CONSERVATION ON NUCLEIC ACIDS CONTENT
AND ACTIVITY OF NUCLEOLYTIC ENZYMES
IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

The lymphocytes from human peripheral blood of healthy donors stored from 4°C to 6°C in three different conserving fluids of the following composition: 1) ACDf.B: 0.045 M trisodium citrate, 0.025 M citric acid, 0.035 M glucose, pH = 4.9; 2) CPD: 0.088 M trisodium citrate, 0.015 M citric acid 0.139 M glucose, 0.158 M sodium phosphate, pH = 5.63; 3) CPD with the addition of adeni-

ne and adenosine, were used as the material for investigations. The conservation time of blood was 0, 7, 14, 21 days for ACDf.B; 0, 7, 14, 21, 28 days for CPD and 0, 7, 14, 21, 28, 42 days for CPD with adenine and adenosine. The contents of RNA and DNA were determined by spectrophotometry method of Markov and Tsanev, the activity of ribonuclease by the method of Frih-Niggemayer-Reddi, deoxyribonuclease by the method of Rotherham and acid phosphatase by King-Armstrong's method.

Some changes were found in the DNA and RNA contents and in the activity of investigated enzymes, depending on the time and conditions of blood conservation.

These changes resemble the processes observed in mitogen stimulated lymphocytes.