

*Halina M. Żbikowska, Tadeusz Krajewski, Barbara Wachowicz*

## WPLYW SELENINU SODOWEGO NA BIAŁKA PŁYTEK KRWI ŚWINI

Metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym badano wpływ seleninu sodowego na białka frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100 otrzymane z przemytych płytek krwi świnii. Wykazano, że inkubacja płytek z niską dawką seleninu ( $10^{-7}$ M) nie powodowała żadnych zmian w obrazie elektroforetycznym białek cytoszkieletu. Po inkubacji płytek z seleninem sodu o stężeniu  $10^{-4}$ M obserwowano zmniejszenie, a nawet zanik głównych białek cytoszkieletu odpowiadających aktynie, ciężkiemu łańcuchowi miozyny oraz białku wiążącemu aktyne. Ponadto pojawiało się wysokocząsteczkowe pasmo nie wchodzące w 7% żel. W obecności czynnika redukującego –  $\beta$ -merkaptoetanolu – obraz elektroforetyczny cytoszkieletu z płytek zarówno kontrolnych jak i traktowanych różnymi dawkami seleninu pozostawał niezmienny.

Otrzymane wyniki sugerują, że selenin sodu może reagować z grupami sulfhydrylowymi białek frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100 otrzymanej z płytek krwi. Wysokocząsteczkowe agregaty obserwowane po inkubacji płytek z toksyczną dawką seleninu sodowego mogą wskazywać na tworzenie się *via* selen nowych wiązań pomiędzy białkami cytoszkieletu.

### 1. WSTĘP

Powszechnie występującym związkiem selenu wykorzystywanym przez układy biologiczne jest selenin. Jest on metabolizowany w komórce i wbudowywany do selenobiałek, głównie do peroksydazy glutationowej (GPx) – enzymu rozkładającego toksyczne dla komórki nadtlenki lipidów i  $H_2O_2$  [5, 9, 13]. Selen w formie seleninu działa również jako antyoksydant [19], reaguje z wolnymi grupami sulfhydrylowymi i ma wpływ na poziom zredukowanego glutationu w komórce [13, 15]. Duże dawki seleninu (powyżej  $5 \times 10^{-6}$ M) są jednak bardzo toksyczne [14, 15]. Dane dotyczące roli selenu w funkcjonowaniu płytek krwi są fragmentaryczne. Godny uwagi jest fakt, że w płytkach krwi stwierdzono bardzo wysokie stężenie selenu (0,5–0,7  $\mu$ /g mokrej masy komórek) [9, 7] oraz wielokrotnie wyższą niż w erytrocytach aktywność peroksydazy glutationowej [15].

## 2. MATERIAŁ I METODY

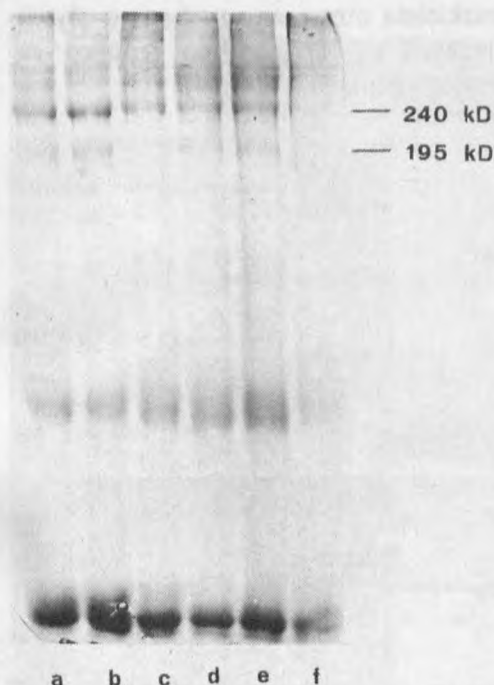
Izolowanie płytek krwi świni. Płytki otrzymywano metodą wirowania różnicowego świeżej krwi świni pobranej na roztwór ACD; (65 mM kwas cytrynowy/85 mM cytrynian sodu/110 mM glukoza), 5 : 1, v/v. Do roztworu ACD oraz do stosowanego do przemywania płytek buforu o pH 7,4 (0,15 M NaCl/0,01 M Tris-HCl) dodawano także inhibitory: trasylol (10 j/ml), chlorowoderek benzamidyny (10 mmol/l), apyrazę (50–100  $\mu$ g/ml) oraz kwas  $\epsilon$ -aminokapronowy (0,04%). Trzykrotnie przemyte płytki zawieszano w buforze o takim samym składzie i oznaczano całkowitą zawartość białka płytkowego metodą mikrobiuretową [6].

Otrzymywanie frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100. Do zawiesiny płytek (10–12 mg białka/ml) dodawano selenin sodowy o końcowym stężeniu  $10^{-7}$ M oraz  $10^{-4}$ M i inkubowano w temperaturze 25°C w czasie 5 min, 2 godz. oraz 17 godz. W niektórych eksperymentach na płytki preinkubowane 2 godz. z seleninem działało trombiną (1 NIH/ml, 3 min, 37°C), po czym reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 mmol/l diizopropylodifluorofosforanu (DFP).

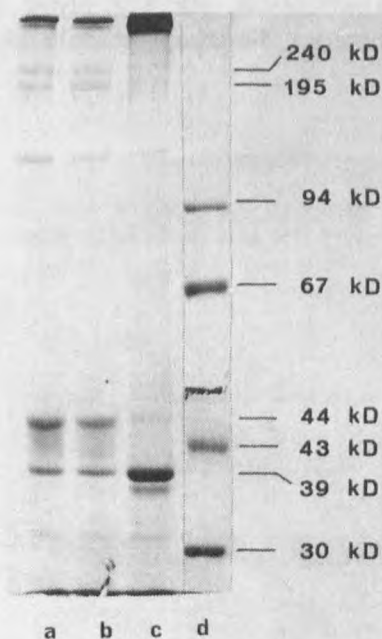
Do płytek inkubowanych z seleninem sodu oraz do płytek kontrolnych dodawano równą objętość buforu o składzie: 2% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, pH 7,4. Mieszaninę pozostawiano na okres 15–20 min, po czym wirowano (5 min, 12 000  $\times$  g). Osad otrzymanej frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie przemywano dwukrotnie, wyżej wymienionym buforem rozcieńczonym za pomocą 0,9% NaCl w stosunku 1 : 1, a następnie 0,9% roztworem NaCl. Otrzymaną frakcję białek cytoszkieletu rozpuszczano w buforze zawierającym 2% SDS oraz 8 M mocznik i poddawano analizie w żelu poliakrylamidowym. Elektroforezę przeprowadzano w 7% żelu z SDS według metody Laemmli'ego [12]. W celu otrzymania preparatów zredukowanych, do próbek dodawano  $\beta$ -merkaptotanol do końcowego stężenia 1,4% i ogrzewano przez 5 min w temperaturze 100°C.

## 3. WYNIKI

Rozdział elektroforetyczny białek cytoszkieletu uzyskanych zarówno z kontrolnych płytek krwi świni, jak i z płytek po określonym czasie inkubacji z różnymi dawkami seleninu, przedstawiono na rys. 1 i 2. W obrazie elektroforetycznym zarejestrowano obecność podstawowych białek cytoszkieletu: aktyny (44 kD), ciężkiego łańcucha miozyny (195 kD) i białka wiążącego aktynę (240 kD).



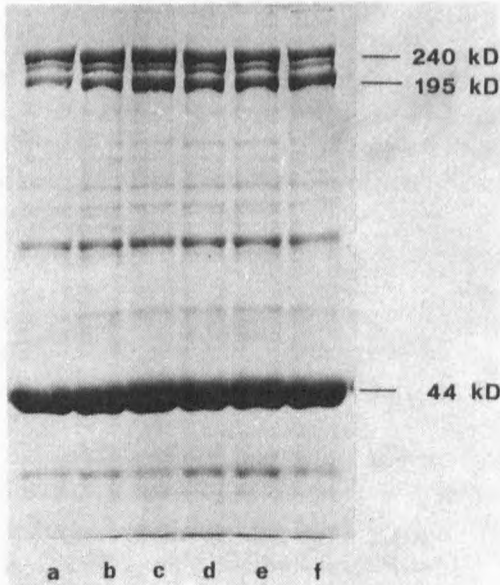
Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny w 7% żelu poliakryloamidowym z SDS białek cytoszkieletu izolowanych z płytek krwi świni, kontrolnych (a), po 5 min inkubacji z seleninem sodu:  $10^{-7}$ M (b),  $10^{-4}$ M (c). Płytki inkubowane przez 2 godz. z buforem (kontrola) (d), z seleninem o stężeniu  $10^{-7}$ M (e),  $10^{-4}$ M (f)



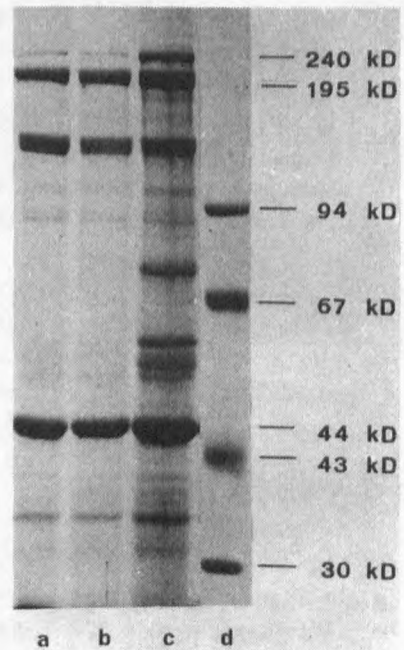
Rys. 2. Obraz elektroforetyczny białek cytoszkieletu izolowanych z płytek krwi świni po 17 godz. inkubacji bez seleninu (a), z seleninem o stężeniu  $10^{-7}$ M (b),  $10^{-4}$ M (c), białka wzorcowe firmy Bio-Rad (d) (fosforylaza b – 94 kD, BSA – 67 kD, ovoalbumina – 43 kD i anhidraza węglanowa – 30 kD)

Stwierdzono, że selenin o stężeniu  $10^{-7}$ M, niezależnie od czasu inkubacji (5 min, 2 godz., 17 godz.), nie powoduje zmian w obrazie elektroforetycznym białek cytoszkieletu płytek (rys. 1 b, e i 2 b), natomiast wyraźne zmiany w rozdziale elektroforetycznym białek cytoszkieletu zaobserwowano już po pięciominutowej inkubacji płytek z seleninem o stężeniu  $10^{-4}$ M (rys. 1 c, f i 2 c). Zmiany te polegały przede wszystkim na zmniejszaniu się i zanikaniu wraz z czasem inkubacji płytek z seleninem pasm odpowiadających głównym białkom cytoszkieletu. Po siedemnastogodzinnej inkubacji płytek z seleninem o końcowym stężeniu  $10^{-4}$ M zaobserwowano w białkach cytoszkieletu wzrost frakcji o masie cząsteczkowej ok. 40 kD i pojawienie się nowego pasma odpowiadającego białku o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej nie wchodzącemu w 7% żel (rys. 2 c).

Obraz elektroforetyczny białek cytoszkieletu otrzymany zarówno z płytek kontrolnych, jak i z płytek inkubowanych z seleninem po redukcji za pomocą  $\beta$ -merkaptoetanolu nie wykazywał różnic (rys. 3 i 4).

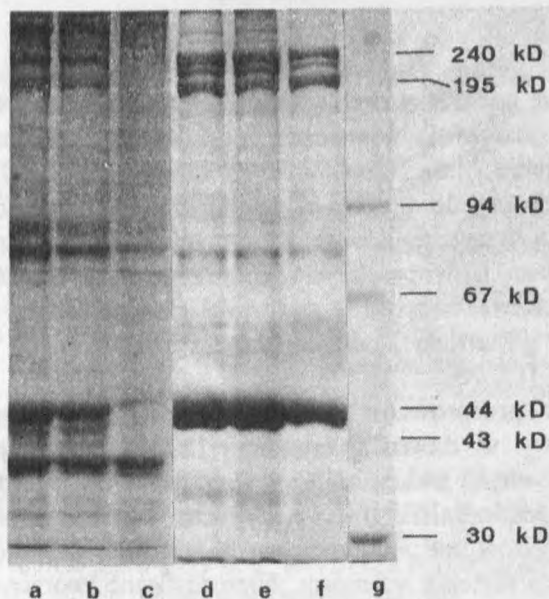


Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny w 7% żelu poliakrylamidowym z SDS białek cytoszkieletu izolowanych z płytek krwi świni kontrolnych (a), po 5 min inkubacji z seleninem sodu:  $10^{-7}$ M (b),  $10^{-4}$ M (c). Płytki inkubowane przez 2 godz. z buforem (kontrola) (d), z seleninem:  $10^{-7}$ M (e),  $10^{-4}$ M (f); a-f – preparaty po redukcji z  $\beta$ -merkaptoetanolem

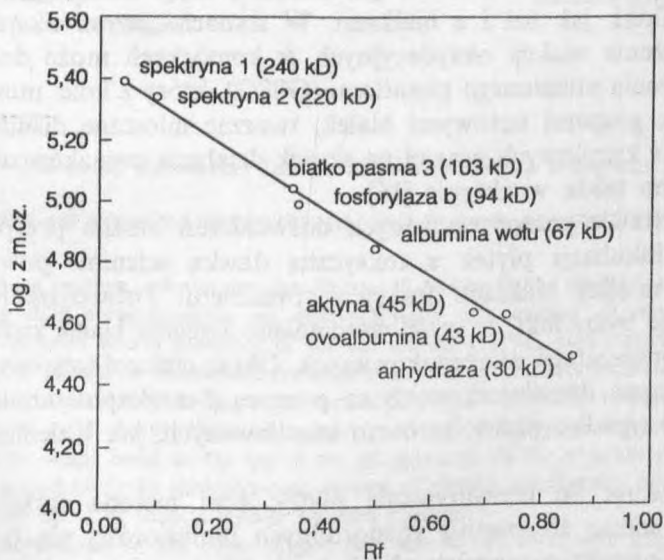


Rys. 4. Obraz elektroforetyczny białek cytoszkieletu izolowanych z płytek krwi świni po inkubacji przez 17 godz. bez seleninu (a), z seleninem o stężeniu  $10^{-7}$ M (b),  $10^{-4}$ M (c). Białka wzorcowe firmy Bio-Rad pokazano jako (d); a-d – preparaty zredukowane

Podobny obraz rozdziału elektroforetycznego, charakteryzujący się zmniejszeniem głównych pasm w nieredukowanych preparatach białek cytoszkieletu i brakiem zmian po redukcji uzyskano, gdy płytki były preinkubowane przez 2 godz. z seleninem o stężeniu  $10^{-4}$ M, a następnie poddane działaniu trombiny (rys. 5). Na rys. 6 przedstawiono krzywą wzorcową, według której wyznaczano masę cząsteczkową rozdzielanych białek.



Rys. 5. Rozdział elektroforetyczny białek cytoszkieletu płytek stymulowanych trombiną. Płytki kontrolne (a), po 2 godz. preinkubacji z seleninem sodu o stężeniu  $10^{-7}M$  (b),  $10^{-4}M$  (c), białka wzorcowe (d); preparaty niezredukowane (A), po redukcji z  $\beta$ -merkaptotanołem (B)



Rys. 6. Krzywa wzorcowa do wyznaczania mas cząsteczkowych frakcji białkowych rozdzielanych metodą elektroforezy w 7% żelu poliakrylamidowym z SDS



## 4. DYSKUSJA

Dotychczasowe badania nad rolą selenu w metabolizmie i funkcjonowaniu płytek nie dają jeszcze jednoznacznej odpowiedzi. Wiadomo jednak, że selenin sodu zmienia funkcjonowanie tych komórek [18, 19]. *In vivo* selen może być wbudowany do płytkowej peroksydazy glutationowej, zwiększać jej aktywność i tą drogą regulować poziom wytwarzanego tromboksanu  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) oraz kwasu hydroperoksyseikozotetraenowego (12-HPETE) [2, 16, 19, 20]. Selen, przede wszystkim w formie nieorganicznej (selenin), może zmieniać poziom glutationu i oddziaływać na ilość wolnych grup tiolowych w płytkach krwi [15, 20].

Na podstawie przeprowadzonej analizy elektroforetycznej stwierdzono, że selenin sodowy w dawce toksycznej ( $10^{-4}M$ ) powoduje zmniejszenie, a nawet zanik głównych frakcji białek cytoszkieletu otrzymanych za pomocą Tritonu X-100. Jednocześnie towarzyszy temu pojawianie się wysokocząsteczkowych agregatów nie wchodzących w 7% żel, szczególnie po wielogodzinnej inkubacji płytek z seleninem. Niespecyficzne tworzenie się agregatów białkowych pod wpływem seleninu obserwowano również w komórkach myszy. Jak sugerują Morrison i Medina [14] markerem cytotoksyczności seleninu może być powstawanie agregatów selenoprotein w komórce.

Selenin może tworzyć połączenia ze związkami zawierającymi wolne grupy sulfhydrylowe, zarówno z glutationem, dając selenodiglutation bądź selenotrisulfidki, jak też i z białkami. W stanach „stresu oksydacyjnego”, czyli wzmoczenia reakcji oksydacyjnych w komórkach może dochodzić do wzrostu stężenia utlenionego glutationu (GSSG), który z kolei może wchodzić w reakcję z grupami tiolowymi białek, tworząc mieszane disulfidy [1, 13]. Powstawanie krzyżowych wiązań na skutek działania związków utleniających obserwowano także w aktywie [16].

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można przypuszczać, że w trakcie inkubacji płytek z toksyczną dawką seleninu powstają nowe połączenia między białkami frakcji cytoszkieletu. Potwierdzeniem takiego rozumowania byłby fakt, że wyżej wspomniane agregaty białek zaobserwowano jedynie w preparatach niezredukowanych. Obraz elektroforetyczny białek po redukcji wiązań dwusiarczkowych za pomocą  $\beta$ -merkaptetanolu był identyczny w przypadku płytek zarówno inkubowanych, jak i nieinkubowanych z seleninem.

Zastosowana do otrzymywania płytek krwi metoda frakcjonowanego wirowania, mimo stosowania różnorodnych inhibitorów, nie pozwoliła na otrzymanie niezaktywowanych płytek krwi. Dlatego też trudno jest ustalić, jak obecność seleninu wpływa na zmianę cytoszkieletu wywołaną działaniem trombiny.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bartosz G. (1993), „Postępy Biochemii”, **39**, 32–38.
- [2] Bryant R. W., Simon F. C., Bailey J. M. (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14937–14943.
- [3] Bryant R. W., Simon F. C., Bailey J. M. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **117**, 183–189.
- [4] Evenson J. K., Sunde R. (1988), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **187**, 169–180.
- [5] Hockman G. (1988), *Int. J. Biochem.*, **20**, 123–132.
- [6] Itzhake R. F., Gill D. M. (1964), *Anal. Biochem.*, **9**, 401–410.
- [7] Kasperek K., Iyengar G. V., Kiem J., Borberg H., Feinendegen L. E. (1979), *Clin. Chem.*, **25**, 711–715.
- [8] Kiem J., Feinendegen I. I. (1984), *Trace Elem. Anal. Chem. Med. Biol.*, **3**, 339–345.
- [9] Kiremidijan-Schumacher L., Stotsky G. (1987), *Environment. Res.*, **42**, 227–303.
- [10] Kramer G. F., Ames B. N. (1988), *Mutation Res.*, **201**, 169–180.
- [11] Kyle M. E., Nakae D., Sakaida I., Serroni A., Farber J. R. (1989), *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 3797–3805.
- [12] Laemli V. K. (1970), „Nature”, **227**, 680–685.
- [13] Mas A., Sarkar B. (1989), *Biol. Trace Elem. Res.*, **20**, 95–104.
- [14] Morrison D. G., Medina D. (1988), *Toxicol. Lett.*, **44**, 307–314.
- [15] Neve J., Vertongen F., Capel P. (1988), *Amer. J. Clin. Nutr.*, **48**, 139–143.
- [16] Orrenius S., McConkey D. J., Nicotera P. (1988), [w:] Liss Alan R. (red.), *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, 327–339.
- [17] Schoene N. W., Morris V. C., Levander O. A. (1986), *Nutr. Res.*, **6**, 75–83.
- [18] Toivanen J. L. (1987), *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, **26**, 265–280.
- [19] Wachowicz B., Szwarocka A. (1994), *Biomed. Lett.*, **49**, 147–152.
- [20] Yan L., Spallholz J. E. (1993), *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 429–437.

Wpłynęło do Redakcji  
„Folia biochimica et biophysica”  
19.07.1993

Katedra Biochemii Ogólnej  
Uniwersytet Łódzki

*Halina M. Żbikowska, Tadeusz Krajewski, Barbara Wachowicz*

#### INFLUENCE OF SODIUM SELENITE ON PIG BLOOD PLATELET PROTEINS

The effect of sodium selenite on the Triton X-100-insoluble fraction of washed pig platelets using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was studied. It was shown that incubation of platelets with a low dose of sodium selenite ( $10^{-7}$ M) didn't cause any changes in electrophoretic pattern of cytoskeletal proteins. Treatment of platelets with  $10^{-4}$ M of sodium selenite resulted in a marked decrease (or even the loss) of the main cytoskeletal proteins corresponding to actin, heavy chain of myosin and actin binding protein. Simultaneously a high molecular weight band on the top of the gel appeared. In the presence of the reducing agent ( $\beta$ -mercaptoethanol) the electrophoretic pattern of platelet cytoskeleton both control and treated with two doses of sodium selenite was not changed.

The results presented in this paper suggest that selenite can react with sulphhydryl groups of Triton X-100-insoluble fraction of blood platelet proteins. The high molecular weight aggregates observed after incubation of platelets with toxic dose of sodium selenite may provide the evidence that new links via selenium between cytoskeletal proteins are created.