

Katarzyna Bednarska, Barbara Wachowicz

### PROCES SEKRECJI PŁYTEK KRWI WYWOŁANY PROMIENIOWANIEM UVB

Badano w warunkach *in vitro* wpływ dwóch dawek promieniowania UVB ( $1,08 \text{ J/cm}^2$  oraz  $4,32 \text{ J/cm}^2$ ) o niskiej mocy ( $1,2 \text{ mW/cm}^2$ ) na sekrecję nukleotydów adeninowych i białka z płytek krwi oraz ekspresję selektyny P, uwalnianej w procesie aktywacji, na powierzchni błony płytkowej. Promieniowanie UVB w zakresie stosowanych dawek powoduje uwalnianie nukleotydów adeninowych z ziarnistości o dużej gęstości elektronowej, natomiast w niewielkim stopniu indukuje uwalnianie białek z ziarnistości  $\alpha$  płytek krwi świni. Stwierdzono również, że promieniowanie UVB obniża ekspresję selektyny P na powierzchni płytek krwi człowieka.

#### WSTĘP

Ekspozycja komórek krwi na promieniowanie UV wiąże się z występowaniem różnorodnych efektów biologicznych. W zależności od dawki, mocy i czasu ekspozycji, promieniowanie UV może prowadzić do degradacji struktur komórkowych (sieciovanie białek, sieciovanie i utlenianie lipidów), bądź do modyfikacji ich aktywności biologicznej [4]. Wysokoenergetyczne promieniowanie UV uszkadza przede wszystkim składniki błony i jądra komórkowego [1]. Promieniowanie UV o niskiej energii oddziałuje przede wszystkim ze strukturami molekularnymi związanymi z przekazywaniem sygnału komórkowego i może modulować aktywność komórek [2].

Płytki krwi odpowiadają na działanie agonistów zmianą kształtu komórki, sekrecją zmagazynowanych związków, adhezją i agregacją. Uwalnianie białek, w tym specyficznego białka płytkowego – selektyny P, z ziarnistości  $\alpha$  jest czułym markerem aktywacji płytek krwi [8]. Do sekrecji białek może dochodzić w wyniku działania słabych agonistów (np. ADP, kolagen) oraz w wyniku spontanicznej aktywacji płytek krwi spowodowanej długim przechowywaniem preparatów płytkowych. Silniejsi agoniści, jak trombina,

powodują, obok sekrecji białek, również uwalnianie związków zmagazynowanych w ziarnistościach o dużej gęstości elektronowej i lizosomach [7]. Promieniowanie UVB o niskiej mocy jest uważane za czynnik powodujący zmiany procesu aktywacji płytek krwi [5].

Celem prezentowanych badań było określenie wpływu niskoenergetycznego promieniowania UVB na uwalnianie nukleotydów adeninowych i białka z płytek krwi. Ponadto badano wpływ promieniowania UVB na ekspresję selektyny P. Działanie promieniowania UVB na ekspresję selektyny P porównano z działaniem trombiny.

#### MATERIAL I METODY

Płytki krwi świni otrzymywano metodą wirowania różnicowego krwi pobranej na roztwór ACD (65 mM kwas cytrynowy, 85 mM cytrynian sodu, 110 mM glukoza). Płytki krwi człowieka otrzymywano metodą filtracji żelowej na złożu Sepharoza 2B. Zawiesinę komórek (5 mg białka/ml) w zmodyfikowanym buforze Tyroda (0,15 M NaCl w 0,014 M Tris - HCl, 5 mM glukoza, pH 7,4) poddawano ekspozycji na promieniowanie UVB (1,2 mW/cm<sup>2</sup>) o dawkach 1,08 J/cm<sup>2</sup> oraz 4,32 J/cm<sup>2</sup> (czas naświetlania 15 oraz 60 minut, temperatura 28°C). W supernatantach zawiesiny płytek krwi świni oznaczano stężenie nukleotydów adeninowych metodą spektrofotometryczną [10]. Białko oznaczano w supernatantach zawiesiny płytek zmodyfikowaną metodą Lowry'ego [9].

Ekspresję selektyny P na powierzchni płytek krwi człowieka badano metodą cytofluorymetrii przepływowej z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał anti-CD62 znakowanych fikoerytryną, region płytek bramkowano przy użyciu monoklonalnych przeciwciał anti-CD61 firmy Becton Dickinson [6].

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu par t Studenta oraz testu Wilcoxsona. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ze średnimi błędami standardowymi (SEM). Analizę wariancji wykonano metodą bloków zrandomizowanych.

#### WYNIKI I DISKUSJA

W supernatantach zawiesiny płytek krwi świni eksponowanych na promieniowanie UVB o niskiej mocy (1,2 mW/cm<sup>2</sup>) o dawkach 1,08 J/cm<sup>2</sup> oraz 4,32 J/cm<sup>2</sup> stwierdzono wzrost stężenia nukleotydów adeninowych

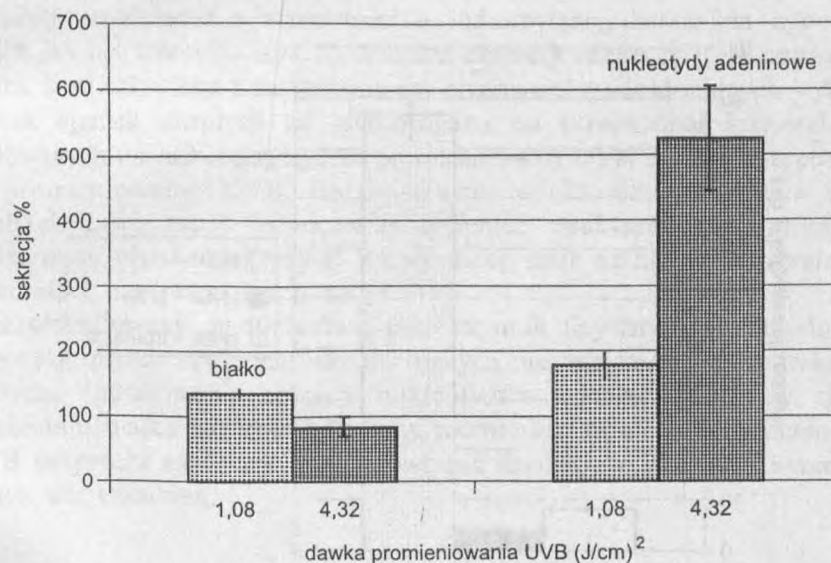
Tabela 1

Sekrecja białka i nukleotydów adeninowych z płytek krwi świni oraz ekspresja selektyny P na powierzchni płytek krwi człowieka po ekspozycji na promieniowanie UVB (wartość średnia  $\pm$  SEM)

Dawka UVB	1,08 J/cm <sup>2</sup>		4,32 J/cm <sup>2</sup>	
	- UV	+ UV	- UV	+ UV
Białko ( $\mu$ g/mg białka płytkowego)	50,0 $\pm$ 2,5 n = 6	68,0 $\pm$ 6,1* n = 6	108,0 $\pm$ 20 n = 6	92,0 $\pm$ 20,4 n = 6
Nukleotydy adeninowe (nmol/mg białka płytkowego)	6,9 $\pm$ 0,9 n = 6	12,4 $\pm$ 1,9* n = 6	7,3 $\pm$ 1,9 n = 8	43,6 $\pm$ 10,6** n = 8
Ekspresja selektyny P (%)	8,1 $\pm$ 0,4 n = 3	3,9 $\pm$ 1,1* n = 3	-	-

\* p < 0,05

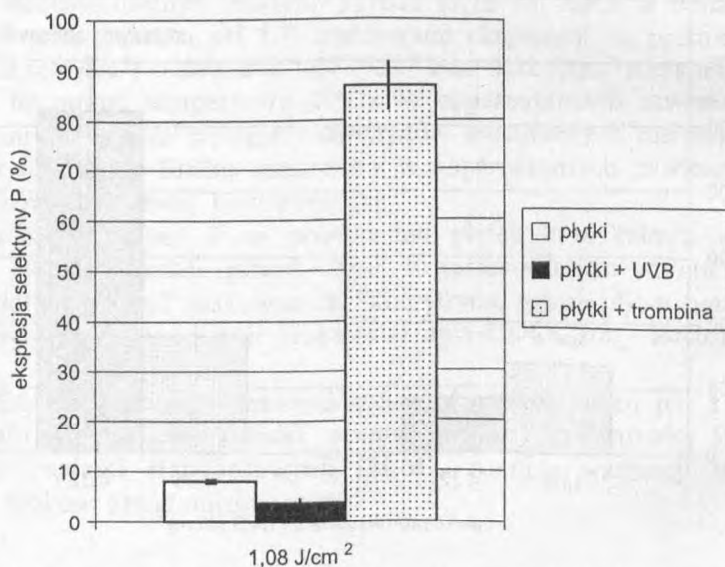
\*\* p < 0,01.



Rys. 1. Uwalnianie białek i nukleotydów adeninowych z płytek krwi świni pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania UVB (1,08 J/cm<sup>2</sup>, 4,32 J/cm<sup>2</sup>). Wartości kontrolne przyjęto jako 100%

odpowiednio o  $80 \pm 28\%$  oraz  $497 \pm 45\%$  w stosunku do wartości kontrolnych (rys. 1 i tab. 1). Natomiast w supernatancie zawiesiny płytek krwi naświetlonych promieniowaniem o dawce  $1,08 \text{ J/cm}^2$  stwierdzono wzrost stężenia białka jedynie o  $28 \pm 3\%$  w stosunku do kontroli (rys. 1 i tab.1). Po naświetleniu komórek promieniowaniem o dawce  $4,32 \text{ J/cm}^2$  nie zaobserwowano uwalniania białek z naświetlonych płytek krwi (rys. 1), chociaż podczas przechowywania płytek kontrolnych (bez ekspozycji na UVB) dochodziło do uwalniania białka z pytek w wyniku ich spontanicznej aktywacji (tab. 1).

Ekspresja selektyny P na powierzchni płytek krwi człowieka naświetlonych dawką  $1,08 \text{ J/cm}^2$  osiągała wartości niższe niż na powierzchni płytek kontrolnych przechowywanych w ciemności ( $3,9 \pm 1,1\%$  względem wartości kontrolnych  $8,1 \pm 0,4\%$ ) (tab. 1). Działanie promieniowania UVB na proces uwalniania i/lub ekspresji selektyny P porównywano z działaniem trombiny – silnego aktywatora procesu sekrecji. Zaobserwowano  $80 \pm 10\%$  ekspresji selektyny P wywołanej ekspozycją płytek krwi na trombinę ( $0,15 \text{ u/ml}$ ) (rys. 2).



Rys 2. Ekspresja selektyny P na powierzchni płytek krwi człowieka naświetlanych i nie naświetlanych promieniowaniem UVB ( $1,08 \text{ J/cm}^2$ ) oraz eksponowanych na działanie trombiny ( $0,15 \text{ u/ml}$ )

W odpowiedzi na działanie silnego agonisty, takiego jak trombina, dochodzi w aktywowanych płytkach krwi do sekrecji białek z ziarnistości  $\alpha$  oraz nukleotydów adeninowych. Nukleotydy adeninowe z puli niemetalicznej zmagazynowane w ziarnistościach o dużej gęstości elektronowej stanowią ok. 65% całkowitej ich zawartości w płytkach krwi [10]. Przeprowadzone badania wykazały, że promieniowanie UVB o niskiej mocy może być induktorem procesu sekrecyjnego z ziarnistości o dużej gęstości elektronowej. Zaobserwowano bowiem uwalnianie nukleotydów adeninowych z płytek krwi naświetlonych promieniowaniem UVB o dawkach nie powodujących wycieku dehydrogenazy mleczanowej (LDH), markera cytosolu [2]. Badania wykazały również, że promieniowanie UVB o niższej dawce ( $1,08 \text{ J/cm}^2$ ) powoduje niewielką, lecz statystycznie istotną sekrecję białek płytkowych, podczas gdy promieniowanie UVB o dawce wyższej ( $4,32 \text{ J/cm}^2$ ) nie powoduje uwalniania białka. Dalsze badania mechanizmu tego zjawiska pozwolą na zweryfikowanie hipotezy o ewentualnym przyłączaniu się uwolnionych białek do zmienionej powierzchni błony płytkowej w wyniku długotrwałej ekspozycji płytek krwi na promieniowanie UVB.

Selektyna P jest markerem początkowej fazy aktywacji płytek krwi i reakcji uwalniania z ziarnistości  $\alpha$  indukowanej działaniem agonistów, takich jak np. trombina (rys. 2). Badania ekspresji selektyny P na powierzchni płytek krwi człowieka z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych wykazały jednak spadek ekspresji tej glikoproteiny na powierzchni komórek eksponowanych na niskoenergetyczne promieniowanie UVB. Można przypuszczać, że promieniowanie UVB, będąc słabym induktorem uwalniania białka z płytek krwi, może jednocześnie zmieniać strukturę eksponowanej na powierzchni płytek selektyny P, której epitop staje się nierozpoznawalny dla przeciwciał monoklonalnych anti-CD62.

Promieniowanie nadfioletowe, jako czynnik fizyczny, może modulować aktywację płytek krwi przy udziale różnych mechanizmów wewnątrzkomórkowych. Indukowanie sekrecji nukleotydów adeninowych przy słabym uwalnianiu białka sugeruje odmienny mechanizm działania promieniowania UVB na proces aktywacji płytek krwi, niż działanie klasycznych agonistów, takich jak trombina.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] Ananyhaswamy N. H., Pierceal W. E. (1990), *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1119–1136.
- [2] Bednarska K., Wachowicz B. (1999), *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **49**, 187–191.

- [3] Godar D. E., Beer J. Z., *Biological Responses to UVA Radiation*, ed. F. Urbach, 1992, Valdemar Publ. Co., Overland Park, KS, 65-73.
- [4] Godar D. E., Thomas D. P., Miller S. A., Lee W. (1993), *Photochem. Photobiol.*, **57**, 1018-1026.
- [5] Lawler J. W., Chao F. C., Fang P. H. (1979), *Thrombos. Res.*, **14**, 1140-1143.
- [6] Michelson A. D. (1996), *Blood*, **12**, 4925-4936.
- [7] Olas B., Wachowicz B. (1995), *Post. Biol. Kom.*, **22**, 359-378.
- [8] Star J., Rosene K., Ferland J., Dileone G., Hogan J., Kestin A. (1997), *Platelet Activation*, **4**, 562-568.
- [9] Vatasary G. T., Smith W. T. (1987), *Analyt. Biochem.*, **167**, 411-417.
- [10] Wachowicz B. (1984), *Cell Biochem. Function*, **2**, 167-170.

Katedra Biochemii Ogólnej  
Uniwersytetu Łódzkiego

*Katarzyna Bednarska, Barbara Wachowicz*

#### SECRETORY PROCESS IN BLOOD PLATELETS INDUCED BY UVB RADIATION

The effects of two doses of UVB radiation (1.08 J/cm<sup>2</sup> and 4.32 J/cm<sup>2</sup>; 1.2 mW/cm<sup>2</sup>) on blood platelets secretion of adenine nucleotides and proteins and P selectin expression were studied. The effect of UVB radiation on P selectin expression (marker of platelet activation) was compared with the effect of thrombin, which is a strong platelet agonist. The obtained results showed that exposure of blood platelet to UVB radiation caused the release of adenine nucleotides, but proteins in a small amount. Moreover, UVB radiation caused decrease of P selectin expression on blood platelets, in opposite to the effect of thrombin. It seems that UVB radiation can partly activate blood platelets, but the mechanism is needed to be explain.