

Barbara Wachowicz, Tadeusz Krajewski, Maria Bończak

SKŁADNIK CUKROWY PŁYTEK KRWI ŚWINI*

W przemitych krwinkach płytkowych świni oznaczono stężenia kwasu sialowego, białka i hektoz związanych z białkami. Stwierdzono, że liczba płytek 10^9 zawiera 1,4 mg białka. Zawartość kwasu sialowego wynosi $15,0 \pm 4,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka, a hektoz $32,3 \pm 6,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka. Trombina ($5 \mu\text{ NIH}/\text{mg}$ białka) powoduje uwolnienie $20,5 \pm 4,8\%$ całkowitej zawartości kwasu sialowego płytki, $33,4 \pm 8,2\%$ całkowitej zawartości hektoz oraz $9,6 \pm 1,9\%$ całkowitej zawartości białka płytki pochodzącego z α -ziarnistości. Stwierdzono także zmniejszenie się zawartości kwasu sialowego po 24-godzinnym przechowywaniu płytek w temperaturze 4°C .

WSTĘP

Krwinki płytkowe ssaków, najmniejsze komórki krwi, odgrywają kluczową rolę w hamowaniu krwawienia. Przylegając do ściany naczynia, tworzą z jednej strony agregaty uszczelniające ubytki naczynia, a z drugiej wchodzi w interakcję ze ścianą naczynia poprzez związki uwalniane w procesie sekrecyjnym.

Istotne znaczenie w aktywacji krwinki płytkowej, warunkującej m. in. proces agregacji i reakcji uwalniania posiada błona płytkowa, a w szczególności powierzchniowo zlokalizowane glikoproteiny błony płytkowej.

Do głównych frakcji glikoprotein błony płytkowej ssaków zaliczane są glikoproteiny (GP): GPI, GPII i GPIII [2, 9, 15, 20]. GPII (GPIIb) i GPIII (IIIa) zawierają znaczne ilości kwasu sialowego. Są one odpowiedzialne przede wszystkim za przyłączanie

* Problem R.III.13.4.7.

fibrinogenu do płytki oraz za reakcję płytka-płytki i proces agregacji [13]. Powierzchniowo zlokalizowana GPI zawiera rozpuszczalną glikokalicynę (GP Ib) [6].

Istnieje wiele wrodzonych zaburzeń procesu krzepnięcia krwi z upośledzoną funkcją krwinek płytkowych. Wiele z nich spowodowanych jest niedoborem czy brakiem określonych glikoprotein powierzchniowych płytki oraz zmniejszoną zawartością kwasu siałowego [5, 9, 17].

Na powierzchni płytki człowieka stwierdzono obecność ok. $2,4 \cdot 10^6$ grup karboksylowych warunkujących jej ruchliwość elektroforetyczną, z których ok. $1,3 \cdot 10^6$ przypada na kwasy siałowe wrażliwe na działanie neuraminidazy [3].

Kwas acetyloneuraminowy jest jedynym kwasem siałowym obecnym w krwinkach płytkowych [3]. Występuje on w ilościach 35-90 nmoli na 10^9 płytki [8, 16, 18, 19, 21, 26]. Około połowa tego związku jest związana z powierzchnią komórki i wrażliwa jest na działanie neuraminidazy i plazminy [11, 25]. Zmniejszoną zawartość kwasu siałowego stwierdzono w płytkach pacjentów z trombastenią Glanzmanna i z zespołem Bernard-Souliera [5, 17].

Podczas przechowywania płytek w osoczu obniża się również poziom tego powierzchniowo zlokalizowanego związku [23]. Usunięcie go z powierzchni pod działaniem neuraminidazy czy plazminy skraca czas przeżycia komórki [11, 25]. Utrata powierzchniowego kwasu siałowego płytki powoduje przypuszczalnie rozpoznanie tej komórki jako "obcej" i usunięcie jej z krwioobiegu [11, 21].

Ze względu na ważną rolę glikoprotein i kwasu siałowego w procesie aktywacji krwinek płytkowych główną uwagę skierowano w niniejszej pracy na ustalenie zawartości tego kwasu i heksoz związanych z białkiem w przemitych płytkach świni. Próbowano też określić wpływ trombiny na poziom tych składników.

MATERIAŁ I METODY

Krew pobierano od świni na 1% roztwór EDTA w 0,15 M NaCl, pH 7. (1:9, v/v). Krwinki płytkowe otrzymywano metodą różnicowego wirowania [24]. Po dwukrotnym przemyciu buforem o składzie: 0,14 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4, płytki wolne od zanieczyszczeń innymi elementami morfotycznymi krwi zawieszano

w tym samym buforze. Ilość krwinek płytkowych w zawieszynie liczono w komorze Burkera. Zawartość białka oznaczano metodą mikrobiuretową [12]. Kwas sialowy określano metodą Warrena po uprzedniej hydrolizie płytek w 0,1 n H_2SO_4 [25]. Do określenia zawartości heksoz związanych z białkiem płytek posłużono się metodą antronową [14].

W celu zbadania wpływu trombiny na proces sekrecyjny płytek, zawieszinę o stężeniu 10-15 mg białka płytek w 1 ml, inkubowano 5 min w temperaturze 37°C z trombiną (5 j. NIH/mg białka płytek). Po ochłodzeniu płytki wirowano (1200 xg przez 15 min) w temperaturze 4°C. W klarownym supernatancie określano ilościowo uwolnione białka i kwas sialowy. Zawartość tych składników wyrażono w procentach całkowitej ich ilości znajdującej w płytce.

WYNIKI

Za pomocą metody Warrena [25] stwierdzono, że zawartość kwasu sialowego w analizowanych płytkach wynosi $15,0 \pm 4,3$ $\mu g/mg$ białka, co w przeliczeniu na stosunki molowe daje $63,9 \pm 12,3$ nmol/ 10^9 płytek (tab. 1).

T a b e l a 1

Zawartość kwasu sialowego w przemitych krwinkach płytkowych świni oznaczona metodą Warrena

The total sialic acid contents in washed pig platelets (by Warren method)

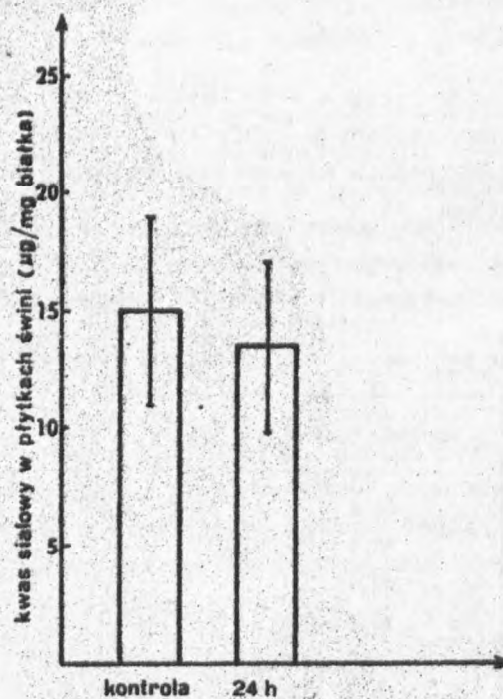
$\mu g/mg$ białka	nmol/mg białka	$\mu g/10^9$ płytek	nmol/ 10^9 płytek
21,0	66,8	22,0	70,0
11,3	36,9	21,4	68,1
21,8	69,4	-	-
12,5	39,8	17,2	54,7
14,3	45,5	20,7	65,9
13,5	42,9	21,2	67,5
18,7	59,5	28,05	89,3
11,4	36,3	16,7	53,1
10,7	34,0	18,9	60,1
-	-	14,8	47,1
$15,0 \pm 4,3$	$47,8 \pm 13,8$	$20,1 \pm 3,8$	$63,9 \pm 12,3$

T a b e l a 2

Zawartość heksoz związanych z białkiem krwinek płytkowych świni
oznaczona metodą antronową [14]

Hexose contents in pig platelet proteins (by authrone method) [14]

$\mu\text{g}/\text{mg}$ białka	$\mu\text{g}/10^9$ płytek	nmol/mg białka	$\text{nmol}/10^9$ płytek
44,0	40		222
29,6	83		461
27,7	38	154	211
40,5	52	225	287
22,9	26	127	146
33,0		183	
$32,3 \pm 6,9$	$47,8 \pm 21,0$	$172 \pm 42,0$	$265,4 \pm 120$



Rys. 1

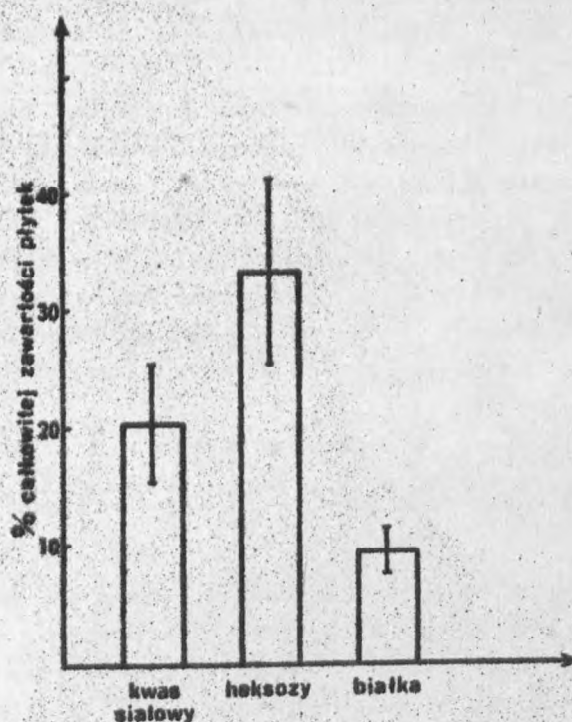
Zawartość kwasu sialowego w płytkach świni przechowywanych w temperaturze 4°C przez 24 h w stosunku do kontroli

The total sialic acid contents in pig platelets after 24 h storage in 4°C

Liczba znalezionych heksoz związanych z białkiem płytek waha się w granicach 32-40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka płytek. Wyniki ilustruje tab. 2.

Przemyte płytki świni zawieszone w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej i przechowywane 24 h w temperaturze 4°C traciły średnio ok. 10% zawartości kwasu sialowego (rys. 1).

Po inkubacji płytek z trombiną ilość uwolnionego białka oceniano na ok. 10% całkowitej jego zawartości w płytce, kwasu sialowego na 20%, a heksoz na ok. 33% (rys. 2).



Rys. 2

Wpływ trombiny na białka, kwas sialowy i heksozy krwinek płytkowych świni. Ilość uwolnionych związków po inkubacji krwinek płytkowych z trombiną (5 $\mu\text{NIH}/\text{mg}$ białka)

The effect of thrombin on protein, sialic acid and hexose in pig platelets. The contents of the compounds after storage of platelet suspension with thrombin (5 $\mu\text{NIH}/\text{mg}$ protein)

Wykazano, że w ilości 10^9 płytek znajduje się średnio 1,4 mg białka.

DYSKUSJA

Krwinki płytkowe ssaków należących do poszczególnych gromad różnią się między sobą w zakresie wielkości, kształtu, gęstości, funkcji i aktywności metabolicznej [11, 18, 21], zaś w obrębie tego samego gatunku stwierdzono znaczną niejednorodność [21]. Jednym z powodów może być różnica w strukturze i rozmieszczeniu powierzchniowych glikoprotein [4, 18].

Jak wykazały badania R a n d a i wsp. (1981), subpopulacja płytek królika o dużej gęstości zawiera np. podwyższoną ilość kwasu sialowego [21].

Z drugiej strony zaobserwowano obniżony poziom kwasu sialowego w błonach płytek ulegających procesowi starzenia się [11]. Podobnie zmniejszanie się ilości tego kwasu zauważono w płytkach krążących we krwi po przebytej infekcji wirusowej [22]. Według cytowanych autorów może być to wynik działania neuraminidazy wirusowej [22]. Wpływ plazminy na skracanie czasu przeżycia płytek próbuje się częściowo tłumaczyć działaniem tego enzymu na glikoproteiny powierzchniowe płytki, a przede wszystkim na uwalnianie kwasu sialowego z GPI [11].

Część kwasu sialowego obecnego w płytkach (ok. 20-47%) może wydostawać się poza komórkę w reakcji uwalniania płytek wywołanej trombiną [18, 19].

Jak stwierdził B o s m a n n (1972), błona krwinki płytkowej wykazuje aktywność sialylotransferazy. Enzym ten uważany za katalizator ostatniego etapu biosyntezy glikoprotein, jest odpowiedzialny za przejście kwasu N-acetylneuraminowego z substratu CMP-NANA na akceptor - asialoproteinę. Według B a u v o i s [1] endogennym akceptorem kwasu sialowego w płytce jest GPIIb [1]. Aktywność sialylotransferazy płytkowej jest stymulowana trombiną i innymi czynnikami agregującymi. Aspiryna hamuje jej działanie [26]. Zmniejszanie się poziomu kwasu sialowego w błonie płytkowej prowadzi do upośledzonej funkcji krwinek płytkowych. Przykładem jest trombasteinia Glanzmanna i zespół Bernard-Souliera [5, 7, 17, 20]. W trombasteinii Glanzmanna, wrodzonej skazie krwotocznej, charakteryzującej się upośledzoną agregacją płytek i brakiem retrakcji skrzepu, stwierdzono śladowe ilości lub całkowity brak kompleksu glikoprotein: GPIIb i GPIIIa [7, 17].

Krwinki płytkowe pacjentów z zespołem Bernard-Souliera, wykazujące zmniejszoną adhezję do kolagenu i upośledzoną agregację, charakteryzują się z kolei brakiem GPI [5].

W dostępnej literaturze fachowej brak jest danych dotyczących zawartości składników cukrowych w płytkach świni.

Uzyskane przez nas wartości dotyczące poziomu kwasu sialowego nie odbiegają od wartości podanych przez innych autorów dla płytek ludzkich [17-19, 21, 26], chociaż porównanie takie ma charakter bardzo ogólny.

Wykazaliśmy także, że na 10^9 płytek wieprzowych przypada 1,46 mg białka płytek, niewiele mniej od ilości przedstawionych przez Collera i Zarabbi [8] dla płytek ludzkich [1, 65]. Podobne ilości białka [1,48 mg] stwierdzono w płytkach królika [21].

Działanie trombiny na płytki świni, jak wykazano, powoduje uwalnianie białek oraz kwasu sialowego i heksoz w ilościach nie odbiegających od wartości podawanych dla płytek ludzkich [18]. Według Packhama krwinki płytkowe człowieka uwalniają 20 $\pm$ 7% całkowitej zawartości kwasu sialowego płytki, co jest całkowicie zgodne z naszymi wynikami.

Należałoby podkreślić, że źródłem kwasu sialowego mogą być nie tylko glikoproteiny błony, ale i w pewnym stopniu uwalniane działaniem trombiny białka z α -ziarnistości płytek (fibrynogen, trombospondina) [10].

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że płytki krwi świni prawdopodobnie zawierają podobne glikoproteiny jak płytki ludzkie i dlatego reagują w sposób zbliżony na działanie trombiny: uwalniają do środowiska zbliżone wartości białek i cukrów.

LITERATURA

- [1] Bauvois B., Cacan R., Nurdén A. L., Caen J., Montreuil J., Verbert A., 1981, FEBS Letters, 125, 277-281.
- [2] Bjerrum O. J., 1977, Biochim. Biophys. Acta, 472, 135-145.
- [3] Bosmann H. B., 1972, Biochim. Biophys. Acta, 279, 456-474.

- [4] Cierniewski C., Krajewski T., Wodzinowska B., 1977, Zesz. Nauk. UŁ, S. II, 16, 33-47.
- [5] Clemetson K. J., McGregor J. L., James E., Dechavanne M., Luscher E. F., 1982, 304-311.
- [6] Clemetson K. J., Naim H. Y., Luscher E. F., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2712-2716.
- [7] Clemetson K. J., Capitanio A., Pareti P. J., McGregor J. L., Luscher E. F., 1980, Thrombos. Res., 18, 797-806.
- [8] Collier B. S., Zarrabbi M. H., 1981, Blood, 58, 279-284.
- [9] George J. N., Lyons R. M., Morgan R. K., 1980, *Platelets: Cellular Response Mechanisms and their Biological Significance*, wyd. A. Rotman, F. A. Meyer, C. Gitler, A. Silberberg, 81-93.
- [10] Gogstad G. O., Hagen I., Korsmo R., Solum N. O., 1981, Biochim. Biophys. Acta, 670, 150-162.
- [11] Greenberg J. P., Packham M. A., Guccione M. A., Rand M. L., Reimers H. J., Mustard J. F., 1979, Blood, 53, 916-927.
- [12] Itzhake F. R., Gill D. M., 1964, Anal. Biochem., 9, 401-408.
- [13] Leung L. K., Kinoshita T., Nachman R. L., 1981, J. Biol. Chem., 256, 1994-1997.
- [14] Menini E., Falholt W., Lous P., 1958, Acta Med. Scand., 160, 315-325.
- [15] McGregor J. L., Clemetson K. J., James E., Greenland T., Dechavanne M., 1979, Thrombos. Res., 16, 825-831.
- [16] Motamed M., Michal F., Born G. V. R., 1976, Biochem. J., 158, 655-657.
- [17] Nurden A. T., Caen J. P., 1974, Brit. J. Haematol., 28, 253-260.
- [18] Packham M. A., Guccione M. A., Kinlough-Rathbone R. L., Mustard J. F., 1980, Blood, 56, 876-880.
- [19] Peerschke E. J., Zucker M. B., 1978, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 159, 54-56.
- [20] Peterson D. M., Hirst A., Wehring B., 1982, J. Lab. Clin. Med., 100, 26-36.
- [21] Rand M. L., Greenberg J. P., Packham M. A., Mustard J. F., 1981, Blood, 57, 741-746.

- [22] Scott S., Reimers H. J., Chernesky M. A., Greenberg J. B., Kinlough-Rathbone A. L., Packham M. A., Mustard J. F., 1978, *Blood*, 52, 47-58.
- [23] Soslaue G., Giles J., 1982, *Thrombos. Res.*, 26, 443-455.
- [24] Wachowicz B., Krajewski T., 1979, *Thrombos. Haemostas.* 42, 1289-1295.
- [25] Warren L., 1959, *J. Biol. Chem.*, 234, 1971-1975.
- [26] Wu K. K., Ku C. S. L., Chen Y. C., 1980, *Lancet*, 440-443.

Zakład Biochemii
Instytut Biochemii i Biofizyki UŁ

Barbara Wachowicz, Tadeusz Krajewski, Maria Bończak

CARBOHYDRATE COMPONENT OF PIG PLATELETS

In washed pig platelets the total sialic acid, hexose bound to proteins and protein contents were estimated. The platelets contained 1.4 mg of protein 10^9 platelets. We have found that total sialic acid and hexose contents amounted 15.0 ± 4.3 μ g and 32.3 ± 6.9 μ g/mg of platelet protein, respectively. Thrombin (5 μ NIH/mg protein) released about $20.5 \pm 4.8\%$ of total platelet sialic acid, $33.4 \pm 8.2\%$ of total hexoses and $9.6 \pm 1.9\%$ total platelet proteins derived from α -granules. The loss of platelet sialic acid after 24 h storage of platelet suspension was also observed.