

Barbara Wachowicz

NUKLEOTYDY ADENYLOWE PŁYTEK KRWI SSAKÓW I TROMBOCYTÓW PTAKÓW

W trombocytach ptasich, podobnie jak w płytkach krwi ssaków, nukleotydy adenyłowe są zlokalizowane w różnych przedziałach komórki. W celu określenia puli metabolicznej, trombocyty indyka inkubowano z ^3H -adeniną. Całkowita radioaktywność w komórce po 1-godzinnej inkubacji przedstawiała poziom nukleotydów puli metabolicznej. Część nukleotydów adenyłowych wchodzących w skład tej puli nie przechodzi do 50% etanolu (ok. $5 \text{ nmol}/10^9$ trombocytów) i stanowi frakcję związaną z F-aktyną.

WSTĘP

Trombocyty ptaków pod względem budowy morfologicznej, rozmiaru oraz niektórych własności są zbliżone do megakariocytów krążących we krwi ssaków [5], natomiast w aspekcie pełnionej funkcji wykazują podobieństwo do krwinek płytkowych ssaków [6, 7]. Dane dotyczące ilości nukleotydów adenyłowych w trombocytach ptasich, ich rozmieszczenia i roli w aktywacji są fragmentaryczne [8, 9]. Wcześniejsze badania wykazały, że pula metaboliczna nukleotydów adenyłowych w trombocytach indyka jest większa aniżeli odpowiadająca jej pula w bezjądrzastych płytkach krwi ssaków [8]. Stanowi ona aż 80% wszystkich nukleotydów adenyłowych obecnych w trombocytach [8].

Celem badań było ilościowe przedstawienie frakcji nukleotydowej trombocytów indyka związanej z F-aktyną.

MATERIAŁ I METODY

Krew pobierano bezpośrednio z żyły skrzydłowej indyka do plastikowych probówek zawierających 0,1 objętości 3,8% cytrynianu

trójsodowego. Osocze bogatotrombocytarne otrzymywano przez wirowanie pełnej krwi przez 5 min, 50 x g, w temperaturze pokojowej [7]. Liczbę komórek liczono w komorze Burkera.

Inkubacja trombocytów indyka z $8\text{-}^3\text{H}$ -adeniną: 1 ml osocza zawierającego 2×10^8 trombocytów inkubowano z 10 umol ^3H -adeniny i ^{125}I -albuminą [7]. Po 60 min inkubacji (37 C) próbki nanoszono na 0,2 ml mieszaniny oleju silikonowego (DC 550 : MS 200, 9 : 1, v/v) i wirowano przy 12 000 x g. Ilość osocza zatrzymanego przez komórki wyliczano na podstawie radioaktywności ^{125}I w osadzie trombocytów. Po uwzględnieniu tej wartości wyznaczano ilość adeniny włączonej do trombocytów [7].

Trombocyty po inkubacji z ^3H -adeniną wirowano 15 min, 350 x g, następnie przemywano dwukrotnie zmodyfikowanym buforem Tyroda i zawieszano w tym samym buforze do końcowego stężenia 2×10^8 trombocytów w 1 ml. Zawiesinę przemytych trombocytów poddawano ekstrakcji 50% etanolem. Zawartość wyekstrahowanych nukleotydów oznaczano spektrofotometrycznie. Całkowitą zawartość nukleotydów adenylo- wych w trombocytach indyka przyjętą za 100% oznaczano spektrofotometrycznie po ekstrakcji trombocytów kontrolnych (bez inkubacji z ^3H -adeniną) za pomocą kwasu nadchlorowego.

WYNIKI I DYSKUSJA

Całkowita zawartość nukleotydów adenylo- wych w trombocytach indyka wynosi $25 \text{ nmol}/10^9$ trombocytów (tab. 1). Pula metaboliczna stanowi ok. 20 nmol (ok. 80%). Po ekstrakcji 50% etanolem do roztworu przechodzi ok. 20 nmol nukleotydów adenylo- wych (tab. 1).

T a b e l a 1

Rozmieszczenie nukleotydów adenylo- wych w trombocytach indyka
po inkubacji z ^3H -adeniną (n = 4)

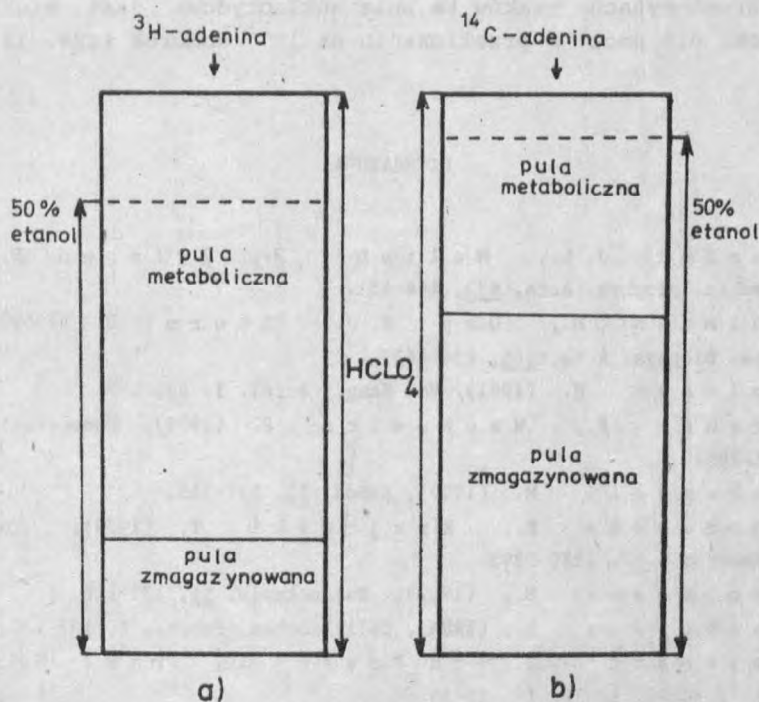
Compartmentalization of adenine nucleotides in turkey thrombocytes
after labeling with ^3H -adenine (n = 4)

Całkowita zawartość	Pula zmagazynowana	Pula metaboliczna	Fracja etanolowa
nmol/ 10^9 trombocytów			
25,0	5,1	19,9	20,0

Jak wykazały badania przeprowadzone na płytkach krwi ludzkich nu-

kleotydy adenylowe są obecne w trzech różnych przedziałach komórki [1, 2, 3]. Dwie trzecie nukleotydów (ADP i ATP) zlokalizowanych w ziarnistościach nie uczestniczy w procesach metabolicznych. Stanowi tzw. pulę zmagazynowaną, bardzo wolno wymienianą z nukleotydami znajdującymi się poza ziarnistościami [1].

Nukleotydy obecne w cytoplazmie są gwałtownie znakowane po inkubacji z radioaktywnym prekursorem (^3H -adenina). Po 2-3 h inkubacji radioaktywność prekursora jest obecna tylko w cytoplazmie [2], dlatego też określenie radioaktywnych nukleotydów po tym czasie daje ocenę wielkości puli metabolicznej. Część puli metabolicznej nie przechodzi do 50% etanolu, który powoduje ekstrakcję nukleotydów puli zmagazynowanej i znacznej części puli metabo-



Rys. 1. Rozmieszczenie nukleotydów adenylowych: a) w trombocytach indyka, b) w płytkach człowieka (wg H o l m s e n a [3]) po inkubacji z radioaktywną adeniną

Fig. 1. Compartmentalization of adenine nucleotides: a) in turkey thrombocytes, b) in human blood platelets (according to H o l m s e n [3]) after incubation with radioactive adenine

licznej. Ta frakcja nukleotydów adenylowych nierozpuszczalna w 50% etanolu składa się głównie z ADP związanego z F-aktyną [3]. Znakowanie radioaktywne izotopem nukleotydów adenylowych komórki jest metodą pozwalającą ocenić rozmieszczenie nukleotydów w komórce [1]. Metodę tę zastosowano do określenia frakcji nukleotydów adenylowych związanych z aktyną trombocytów indyka. Jak wykazano, 50% etanol pozwala na ekstrakcję ok. 20 nmol nukleotydów z 10^9 komórek. Można uważać, że do etanolu przechodzi pula magazynowana (5,1 nmol), a także większość nukleotydów aktywnych metabolicznie, tj. ok. 14,9 nmol (tab. 1). Do 50% etanolu nie przechodzi 5 nmol nukleotydów wchodzących w skład puli metabolicznej. Nukleotydy te stanowią frakcję ADP związaną z białkiem kurczliwym, F-aktyną. W porównaniu z płytkami krwi człowieka, które zawierają ok. 0,3 μ mol frakcji nukleotydowej (ADP) związanej z aktyną (3), w trombocytach ptaków ta pula nukleotydowa jest większa i wynosi ok. 0,5 μ mol w przeliczaniu na 10^{11} komórek (rys. 1).

LITERATURA

- [1] Daniel J. L., Molishi R., Holmsen H. (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 632, 444-451.
- [2] Holmsen H., Day H. J., Storm E. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, 186, 254-263.
- [3] Holmsen H. (1981), *Vox Sang.*, suppl. 1, 40, 1-7.
- [4] French P., Wachowicz B. (1974), *Haemostasis*, 3, 271-281.
- [5] Tabassoli M. (1980), *Blood*, 55, 537-545.
- [6] Wachowicz B., Krajewski T. (1979), *Thrombos. Haemostas.*, 42, 1289-1295.
- [7] Wachowicz B., (1982), *Haemostasis*, 11, 139-148.
- [8] Wachowicz B., (1984), *Cell Biochem. Funct.*, 2, 167-170.
- [9] Wesemann W., von Pusch I., Paul N. (1979), *Eur. J. Cell. Biol.*, 19, 26-34.

Zakład Biochemii Ogólnej
Instytut Biochemii
Uniwersytet Łódzki

Barbara Wachowicz

ADENINE NUCLEOTIDES IN MAMMALIAN PLATELETS AND AVIAN
THROMBOCYTES

In avian thrombocytes, like in mammalian blood platelets the adenine nucleotides are present in three distinguishable compartments. For studies of adenine nucleotide metabolic pool the turkey thrombocytes were prelabeled with ^3H -adenine. The level of metabolic nucleotides was followed by measuring their total radioactivity. Part of the metabolic adenine nucleotide pool was not extracted by 50% ethanol. This ethanol-insoluble fraction (about 5 nmol/ 10^9 thrombocytes) represents adenine nucleotides bound to F-actin.