

Halina M. Żbikowska, Tadeusz Krajewski, Barbara Wachowicz

ZMIANY POZIOMU GLUTATIONU I AKTYWNOŚCI TRANSFERAZY GLUTATIONOWEJ W PŁYTKACH KRWI INDUKOWANE ZWIĄZKAMI SELENU

Zbadano wpływ nieorganicznych związków selenu (seleninu i selenianu sodowego) na poziom zredukowanego glutationu (GSH) i wolnych grup sulfhydrylowych białek oraz na aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w płytkach krwi świni.

Wykazano, że selenin sodowy w przeciwieństwie do selenianu powodował obniżenie ilości zarówno GSH, jak i grup tiolowych białek płytkowych. Ilość GSH po godzinnej inkubacji badanych komórek w środowisku o wysokim stężeniu seleninu (10^{-4} M) zmniejszała się o połowę. Jednocześnie obserwowano znaczny spadek poziomu tioli. Stwierdzono także hamowanie aktywności płytkowej S-transferazy glutationowej po działaniu na płytki toksyczną dawką seleninu (10^{-4} M), podczas gdy selenian o takim samym stężeniu nie zmieniał aktywności badanego enzymu.

WSTĘP

Mechanizm działania związków selenu na komórki nie jest jeszcze całkowicie poznany, a dane dotyczące skutków działania i toksyczności poszczególnych selenozwiązków nie są jednoznaczne. Cytotoksyczność związków selenu zależy w znacznym stopniu od jego struktury chemicznej, stężenia, a także od rodzaju komórki ekspozowanej na te substraty. Za cytotoksyczność mogą być odpowiedzialne zarówno selenozwiązki bezpośrednio działające na komórkę, jak i pośrednie metabolity powstające w komórce w wyniku biotransformacji, czy też produkty uboczne, m. in. wolne rodniki tlenowe [8, 14]. Uważa się, że kluczową rolę w mechanizmie działania nieorganicznych form selenu na komórkę odgrywają wolne grupy tiolowe, przede wszystkim zredukowany glutation (GSH) [5, 10, 13]. Do nieorganicznych związków selenu wykazujących silne właściwości toksyczne w wyższych dawkach (stężenie powyżej 10^{-5} M) należy selenin sodowy.

Na bezpośrednie działanie związków selenu wprowadzonych do organizmu i znajdujących się w krwioobiegu najbardziej narażone są płytki krwi. Te

najmniejsze bezjądrzaste elementy morfotyczne krwi pełnią istotną rolę nie tylko w hemostazie, ale również w wielu procesach patologicznych, m. in. miażdżycy, metastazie, w stanach zapalnych. Wstępne badania wykazały, że selen w formie seleninu hamuje przemianę arachidonianu i syntezę tromboksanu A_2 oraz proces sekrecyjny zachodzący w płytkach krwi stymulowanych trombiną, prowadząc do poważnego upośledzenia biologicznej funkcji płytek [12]. Selenin posiada również właściwości antyoksydacyjne [3].

Celem przedstawionej pracy było zbadanie *in vitro* wpływu nieorganicznych związków selenu w zależności od stopnia utlenienia – seleninu i selenianu sodowego – na poziom zredukowanego glutationu, wolnych grup tiolowych białek oraz na aktywność S-transferazy glutationowej w płytkach krwi świni.

MATERIAŁY I METODY

Płytki krwi otrzymywano ze świeżej krwi świni pobranej na ACD metodą wirowania różnicowego. Osad płytek przemywano 2-krotnie buforem o składzie: 150 mM NaCl, 14 mM Tris-HCl, 5 mM glukoza, pH 7,4 i zawieszano go w tym samym buforze.

Grupy sulfhydrylowe glutationu oraz białek płytkowych oznaczano metodą Ando i wsp. [1, 2]. Próbkę o objętości 1 ml, stanowiącą zawiesinę płytek po inkubacji w określonym czasie (0–120 min) z różnymi stężeniami seleninu lub selenianu sodu (10^{-4} – 10^{-7} M) w temp. 37°C oraz bez selenu, wirowano 5 min 2500 × g. Osad zamrażano i dodawano 1 ml wychłodzonego roztworu zawierającego: 30% NaCl, 8,5% H_3PO_4 i 0,2% EDTA. Następnie płytki poddawano lizie przez 3-krotne zamrożenie (–20°C) i rozmrożenie (37°C). Po zmierzeniu objętości lizat wirowano 20 min 3800 × g i w supernatancie oznaczano ilość GSH. Do 0,5 ml supernatantu dodawano 3,2 ml 0,32 M Na_2HPO_4 (dla doprowadzenia ekstraktu do pH 7,8) oraz 0,25 ml 4 mM DTNB (kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy) w 1% cytrynianie sodowym. Po 15 min oznaczano absorbancję przy 412 nm. W otrzymanym osadzie oznaczano liczbę grup tiolowych obecnych w białkach płytkowych. W tym celu do osadu dodawano 3 ml 10% SDS. Po dokładnym rozpuszczeniu dodawano 5 ml wody, 3,2 ml 0,32 M buforu fosforanowego o pH 7,8 i 0,25 ml DTNB. Absorbancję oznaczano po 30 min. Zawartość tioli w nanomolach odczytywano z krzywych wykreślonych dla wzorcowego roztworu GSH (10–50 nmoli).

W celu oznaczenia aktywności S-transferazy glutationowej zawiesinę płytek kontrolnych oraz preinkubowanych z różnymi stężeniami seleninu i selenianu sodowego poddawano lizie, a następnie wirowano. Aktywność GST we frakcji cytozolowej płytek kontrolnych i po inkubacji ze związkami

seleniu oznaczano spektrofotometrycznie według metody Habiga i wsp. [6] z 1-chloro-2,4-dwunitrobenzenem (CDNB).

Stężenie białka oznaczano zmodyfikowaną metodą Lowry'ego [10].

Do analizy statystycznej wykorzystano sparowany test *t*-Studenta. Wyniki prezentowane są jako wartości średnie z odchyleniem standardowym.

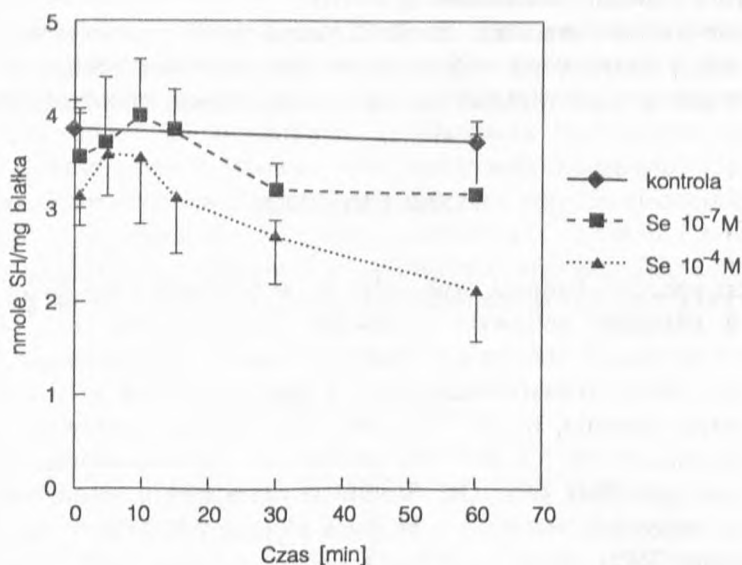
WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że w płytkach krwi świni inkubowanych z seleninem sodowym o stężeniu fizjologicznym (10^{-7} M) bądź wyższym dochodzi do obniżenia poziomu zredukowanego glutationu. Wyraźny spadek (ok. 50%) zaobserwowano po 1 h inkubacji płytek krwi z seleninem o toksycznym stężeniu, tj. 10^{-4} M (rys. 1A). Selenian stosowany w takich samych stężeniach (10^{-7} i 10^{-4} M) powodował tylko nieznaczne ($p > 0,05$) zmiany poziomu GSH (rys. 1B). Selenin również niekorzystnie wpływał na liczbę grup tiolowych obecnych w białkach płytkowych. Proces ten, podobnie jak obniżenie GSH, zależał od stężenia i czasu działania selenozwiązku (rys. 2A). Poziom grup sulfhydrylowych po 1 h działania dawką toksyczną wynosił ok. 75% wartości obserwowanych w płytkach kontrolnych. W przeciwieństwie do seleninu, selenian nawet w stężeniu 10^{-4} M nie powodował istotnych zmian (rys. 2B). Wskazuje to na wyraźną różnicę w sposobie oddziaływania badanych związków selenu na płytkę, a w szczególności na płytkowy glutation, niezbędny w procesach detoksykacji. Podobne wnioski nasunęły się podczas badania efektu oddziaływania obu form selenu na aktywność S-transferazy glutationowej w płytkach.

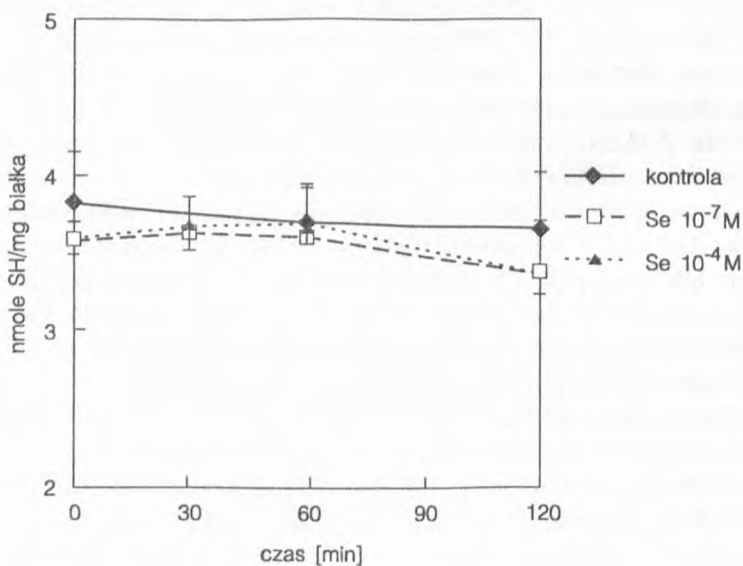
Aktywność enzymu oznaczana metodą Habiga [6] wahała się od $26,5 \pm 2,4$ do $32,9 \pm 5,4$ nmoli S-koniugatów/mg białka/min i znacznie spadała po inkubacji płytek z seleninem w dawkach wyższych niż fizjologiczna. Po 1 h działania seleninu (10^{-4} M) aktywność obniżała się o 50%. Inkubacja badanych komórek z analogicznym stężeniem selenianu nie zmieniała aktywności płytkowej transferazy (rys. 3A i B).

Przeprowadzone doświadczenia potwierdzają pogląd, że selenin wnika do płytki i wchodzi w połączenie ze związkami zawierającymi wolne grupy -SH. Co prawda, poziom grup -SH we frakcji kwasorozpuszczalnej zawierającej GSH w pierwszych minutach działania seleninu na płytki wykazuje (w porównaniu z płytkami kontrolnymi) nawet tendencję wzrostu, fakt ten należy tłumaczyć powstawaniem, na skutek reakcji seleninu z glutationem, pośrednich metabolitów, takich jak glutationyloselenek (GS-Se-SH) reagujących z DTNB [15]. Biotransformacja seleninu w komórce polega na jego reakcji ze związkami zawierającymi grupy sulfhydrylowe, przede wszystkim

(A)

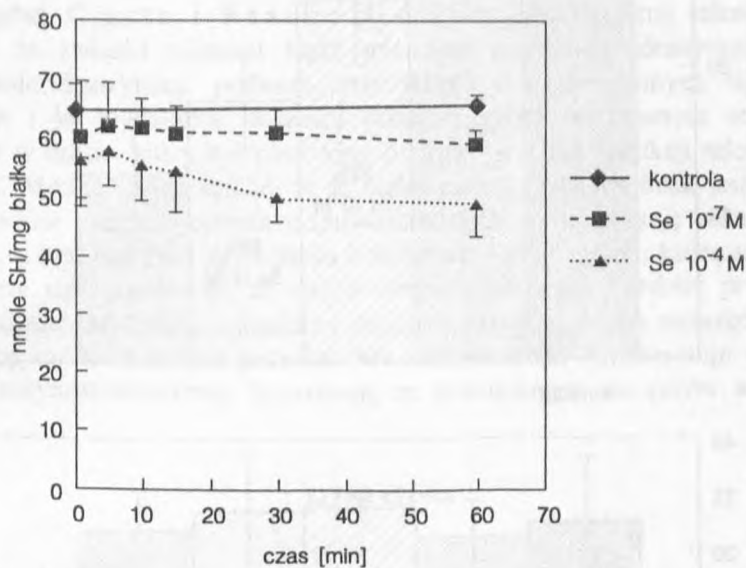


(B)

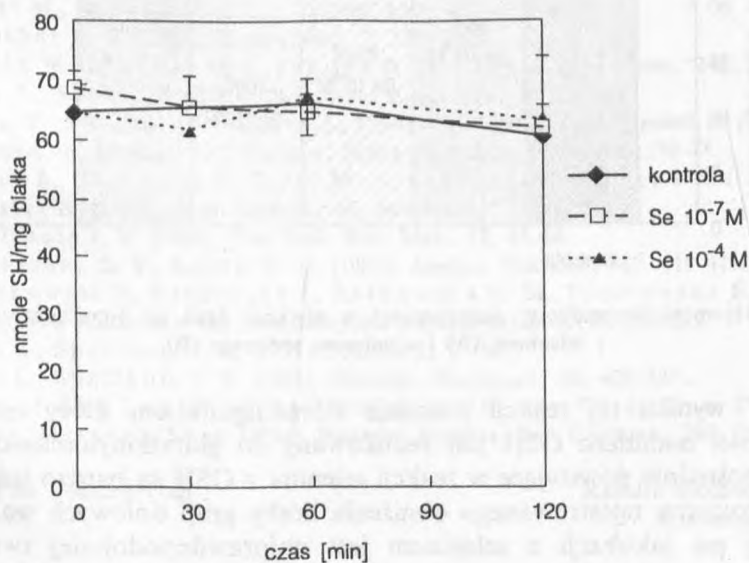


Rys. 1. Wpływ nieorganicznych związków selenu: seleninu sodowego (A) i selenianu sodowego (B) na poziom zredukowanego glutationu w płytkach krwi w zależności od czasu działania. Ilość GSH oznaczano jako zawartość -SH we frakcji kwasorozpuszczalnej metodą Ando i wsp. [1, 2]

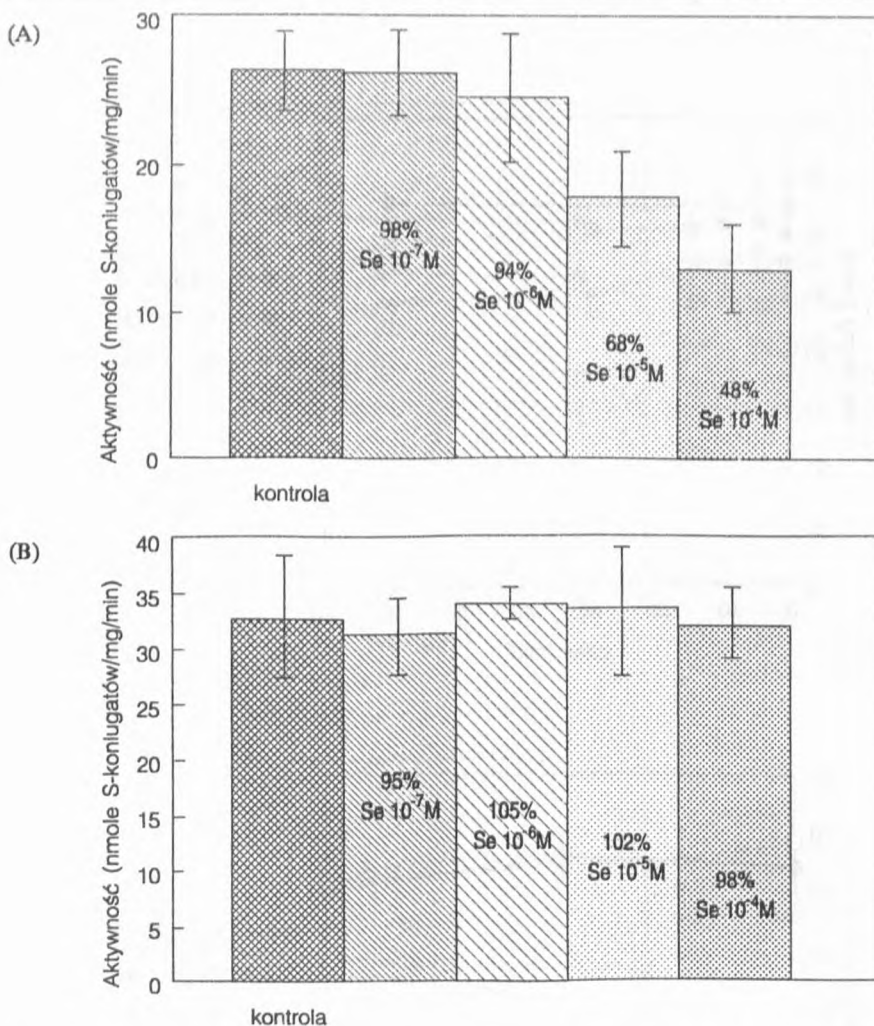
(A)



(B)



Rys. 2. Wpływ seleninu sodowego (A) i selenianu sodowego (B) na zawartość grup tiolowych w białkach płytkowych w zależności od czasu działania



Rys. 3. Aktywność S-transferazy glutationowej w płytkach krwi po 1-godzinnej inkubacji z seleninem (A) i selenianem sodowym (B)

GSH. W wyniku tej reakcji powstaje selenodiglutation, który następnie w obecności nadmiaru GSH jest redukowany do glutationyloselenku. Metabolity pośrednie powstające w reakcji seleninu z GSH są bardzo toksyczne [9, 1]. Przyczyną rejestrowanego obniżenia liczby grup tiolowych we frakcji białkowej po inkubacji z seleninem jest najprawdopodobniej tworzenie poprzez Se nowych, mieszanych połączeń typu $-S-Se-S$ czy też $-S-Se-SeH$ [7].

Hamujący wpływ seleninu na aktywność S-transferazy glutationowej może być skutkiem obniżenia poziomu glutationu (blokada grup GSH) bądź (i) zmienionej struktury białka enzymatycznego w wyniku interakcji

jego grup -SH z seleninem i powstawaniem dodatkowych mostków (mieszane disulfidy).

Z badań Cikrta i Bencko [4] dotyczących interakcji selenu i rtęci wynika, że związki seleninu bądź selenianu powodują identyczne skutki w zakresie dystrybucji podanej rtęci (HgCl_2) w określonych narządach szczurów i jej wydalania. Różnica polegała tylko na pewnym rozłożeniu skutków w czasie, który był niezbędny organizmowi dla redukcji selenianu do seleninu. Można zatem sądzić, że w izolowanych płytkach brak jest enzymu lub układów enzymatycznych odpowiedzialnych za konwersję selenianu do seleninu, a tym samym i utworzeniu reaktywnej formy selenu, którą są selenki.

Należy się spodziewać, że dalsze badania pozwolą bardziej precyzyjnie ustalić różnice i poznać mechanizmy działania poszczególnych związków selenu na płytkę, co nie powinno pozostać bez znaczenia dla opracowania właściwej terapii antynowotworowej, kojarzonej ze stosowaniem związków selenu.

LITERATURA

- [1] Ando Y., Steiner M. (1973a), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 26–37.
- [2] Ando Y., Steiner M. (1973b), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 38–44.
- [3] Burk R. F. (1983), *Annu. Rev. Nutr.*, **3**, 53–70.
- [4] Cikrt M., Bencko V. (1989), *Toxicol. Lett.*, **48**, 159–164.
- [5] Ganther H. E. (1968), *Biochemistry*, **7**, 2898–2905.
- [6] Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130–7139.
- [7] Mas A., Sarkar B. (1989), *Biol. Trace Elem. Res.*, **20**, 95–104.
- [8] Seko Y., Saito Y., Kitahara J., Imura N. (1989), [w:] *Selenium in Biology and Medicine*, ed. A. Wendel, Springer, Berlin–Heidelberg–New York, 70–73.
- [9] Siwek B., Bahbouth E., Serra M. A., Sabbioni E., de Pauw-Gillet M. C., Bassler R. (1994), *Arch. Toxicol.*, **68**, 246–254.
- [10] Spallholz J. E. (1994), *Free Rad. Biol. Med.*, **17**, 45–64.
- [11] Vatassary G. T., Smith W. E. (1987), *Analyst. Biochem.*, **167**, 411–417.
- [12] Wachowicz B., Krajewski T., Żbikowska H. M., Piotrowska E., Olas B. (1994), [w:] *Białka komórek prawidłowych i patologicznych*, ŁTN, 211–222.
- [13] Yan L., Spallholz J. E. (1991), *FASEB J.*, **5**, 581.
- [14] Yan L., Spallholz J. E. (1993), *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 429–437.
- [15] Zen-qi Zhu, Lan Ding, Gui-Min Luo, Zhi Liu, Qi-an Sun, Tong-shu Yang, Jig-cong Shen (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 1645–1650.

Wpłynęło do Redakcji Foliai
12.01.1996 r.

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Halina M. Żbikowska, Tadeusz Krajewski, Barbara Wachowicz

**SELENIUM - INDUCED CHANGES OF GSH LEVEL
AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY
IN BLOOD PLATELETS**

The effects of inorganic selenocompounds (sodium selenite and selenate) on the level of reduced glutathione, free sulfhydryl groups of proteins and the activity of S-glutathione transferase (GST) in pig blood platelets were studied. It was shown that selenite, contrary to selenate reduced the amounts of both GSH and -SH of platelet proteins. The concentration of GSH after one-hour treatment of platelets with a high dose of selenite (10^{-4} M) was reduced by 50%. A decrease in protein thiols was also significant. We observed that the activity of platelet GST was inhibited after incubation of these cells with a toxic dose of selenite but not selenate.