

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Д.Э. Подольский, В.Т. Чещевик

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, [dmitrij.podolskij.94@list.ru](mailto:dmitrij.podolskij.94@list.ru)*

**Введение.** Тромбоциты – безъядерные элементы крови, которые происходят от клеток-предшественников – мегакариоцитов в результате гемопоэза. Эти клетки выполняют функцию гемостаза благодаря своей способности активироваться и слипаться, образуя тромб – данный процесс называется агрегацией тромбоцитов. При повреждении кровеносных сосудов, тромбоциты, вступая в контакт с коллагеном эндотелия, начинают перестраиваться, и у них происходит процесс активации. В процессе активации тромбоциты меняют свою форму, благодаря перестройке цитоскелета клетки, а также происходит дегрануляция внутриклеточных гранул – высвобождение катионов кальция, различных факторов свёртывания крови, аденозиндифосфата и т.д. для дальнейшей активации и вовлечения в активационный каскад других тромбоцитов [1]. На конечной стадии активации тромбоцитов через ряд внутриклеточных процессов происходит активация интегрин  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . В результате активации данного мембранного рецептора и его олигомеризации, происходит связывание двух и нескольких тромбоцитов через комплекс двух интегринов  $\alpha_{IIb}\beta_3$  и одной молекулы фибриногена.

Запуск активации также запускается при стимуляции определёнными агонистами, такими как тромбин, аденозиндифосфат (АДФ), серотонин, тромбоксан А<sub>2</sub> и другими.

При активации тромбоцитов сильными агонистами (тромбином или коллагеном) выделяют две разные по функциональной активности субпопуляции. Первая субпопуляция обладает плохой способностью к агрегации, однако несёт множество сайтов коагуляции на своей поверхности, на которой происходит экспозиция фосфатидилсерина. Такая субпопуляция называется фосфатидилположительной. Субпопуляция тромбоцитов, не экспонирующая на поверхности фосфатидилсерин, и имеющая хорошую способность к тромбоцитарной агрегации называют фосфатидилсеринотрицательной [2]. В образовании субпопуляции фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов огромную роль играют митохондрии и генерируемые ими активные формы кислорода (АФК).

Активные формы кислорода – это высокоактивные производные кислорода, образующиеся при нормальной работе электрон-транспортной цепи митохондрий в звеньях I и III комплексов и вы-

полняющие прежде всего регуляторную функцию в клетках. Среди АФК различают первичные АФК, которые образуются непосредственно при работе дыхательной цепи (супероксид-анион,  $O_2^-$ ) и вторичные АФК, которые образуются в дальнейшей цепи превращений первичных АФК (пероксид водорода  $H_2O_2$ , радикал гидроксида  $\cdot OH$ ). В естественных условиях такие реактивные молекулы могут приводить к повреждениям биополимеров, поэтому в организмах их обезвреживают специальные антиоксидантные системы (например, витамин Е, глутатион и т.д.). Дисбаланс между продукцией АФК и антиоксидантными механизмами, обусловленный увеличением продукции АФК и/или снижением активности антиоксидантов, приводит к окислительному стрессу, который способствует повреждению белков, липидов и ДНК. Окислительный стресс считается распространенным патофизиологическим механизмом и связан со многими патологическими состояниями, такими как рак, диабет, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания [3].

Основными источниками АФК в тромбоцитах являются изоформы никотинамидаденинуклеотид (фосфат) оксидазы, циклооксигеназа, ксантиноксидаза и митохондриальная дыхательная цепь. Бакдаш и Уильямс предположили, что продукция АФК во время активации тромбоцитов пространственно различна и зависит от агониста тромбоцитов. В литературе данные по этой теме все еще противоречивы. Например, было обнаружено, что коллаген продуцирует либо внутриклеточные, либо внеклеточные АФК, вероятно, из-за его способности связывать и активировать множество рецепторов.

АФК действуют как вторичные посредники и могут влиять на различные сигнальные пути, которые усиливают активацию тромбоцитов, индуцированную агонистами. Различные исследовательские группы продемонстрировали, что активация тромбоцитов коллагеном и тромбином вызывает быстрое и временное увеличение мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_M$ ) и окислительного фосфорилирования, вероятно, за счет мобилизации ионов  $Ca^{2+}$ . Увеличение  $\Delta\Psi_M$  связано с увеличением продукции АФК в митохондриях, а гиперполяризация мембраны уменьшает цепь переноса электронов, что приводит к утечке электронов из цепи с последующим стимулированием производства  $O_2^-$  [4].

При дальнейшей активации тромбоцитов и увеличения генерации АФК приводят к апоптозу митохондрий тромбоцитов и образованию переходной поры проницаемости митохондрий (mPTP). Эти события приводят к возникновению фосфатидилсерин-положительной субпопуляции апоптотических тромбоцитов, содержащих на себе множество сайтов для прикрепления факторов свёртывания крови, имеющую огромную роль для привлечения других тромбоцитов в дальнейший каскад агрегации. Образование mPTP играет ключевую роль в регуляции активации тромбоцитов, индуцируя переход тромбоцитов из «активированного» в «гиперактивированное» состояние, характеризующееся экстернализацией фосфатидилсерина. Кроме того, mPTP и АФК связаны с активацией и транслокацией проапоптотических белков Bid, Bax и Bak в митохондрии. Эти эффекты, вызываемые тромбином, значительно ослабляются каталазой, что указывает на центральную роль АФК в апоптозе тромбоцитов. АФК может непосредственно изменять проницаемость митохондриальной мембраны, приводя к высвобождению проапоптотических факторов, таких как цитохром С и каспазы в цитозоль [5].

Дисбаланс в количестве АФК тромбоцитов может приводить к самым различным патологическим состояниям. Традиционно считают, что основными заболеваниями, связанными с окислительным стрессом тромбоцитов являются многие воспалительные процессы, ожирение, гипертония, сахарный диабет I и II типов. У пациентов с ожирением и гипертонией обычно наблюдаются активированные циркулирующие тромбоциты, повышенная агрегация тромбоцитов и образование агрегатов тромбоциты-лейкоциты, повышенная выработка эндогенных АФК и сниженный антиоксидантный статус. У больных сахарным диабетом II типа нарушается внутриклеточный гомеостаз кальция, вероятно, из-за повышения уровня перекиси водорода и пероксильных радикалов, что приводит к гиперреактивности и гиперагрегируемости тромбоцитов [6].

**Целью** работы явилось изучение генерации АФК при работе электрон-транспортной цепи митохондрий тромбоцитов при их активации при ингибировании IV комплекса дыхательной цепи (цитохром с-оксидазы).

**Материалы и методы.** Для исследования использовали цитратную кровь (соотношение 9:1) от пациентов, не обладающих хроническими заболеваниями, вредными привычками и не имеющих воспалительных процессов в течение 7 дней и не принимающих лекарственных средств в течение 3 дня до забора крови.

Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием цитратной крови при режиме: 1040 об/мин в течение 15 минут. Полученную плазму разбавляли в модифицированном буфере

Тирода с глюкозой (состав буфера: 134 мМ хлорида натрия; 12 мМ гидрокарбоната натрия; 2,9 мМ хлорида калия; 0,34 мМ гидрофосфата натрия однозамещённого; 1 мМ хлорида магния; 10 мМ HEPES; 5 мМ глюкозы) до содержания клеток  $3 \times 10^7$  кл/мл.

Агрегацию запускали с помощью агониста АДФ концентрацией 10 мкМ.

Уровень генерации АФК измеряли с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Canto II с использованием липофильного зонда на цитоплазматические АФК 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата ( $H_2DCFDA$ ) концентрацией 10 мкМ, обладающего спектром эмиссии в зелёном диапазоне спектра ( $\lambda = 517-527$  нм). Ингибирование IV комплекса осуществляли азидом натрия ( $NaN_3$ ) в концентрации 10 мМ.

В качестве гасителя АФК использовали антиоксидант тролокс (производное витамина E) в концентрации 1 мМ.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования генерации АФК и её ингибирования тролоксом представлены на рисунке 1.

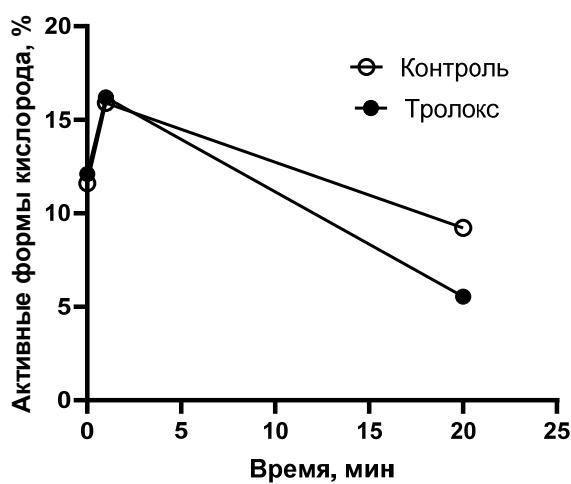


Рисунок 1. – Генерация АФК в присутствии тролокса

Из графика можно заметить, что генерация АФК присутствовала на начале добавления АДФ, а на протяжении 20 минут времени нивелировалась. Тролокс снижал концентрацию активных форм кислорода на конечных этапах инкубации тромбоцитов с АДФ, что можно объяснить антиоксидантным действием тролокса и некоторых витаминов.

Изучалась генерация АФК в присутствии ингибитора IV комплекса дыхательной цепи азид натрия. Данные представлены на рисунке 2.

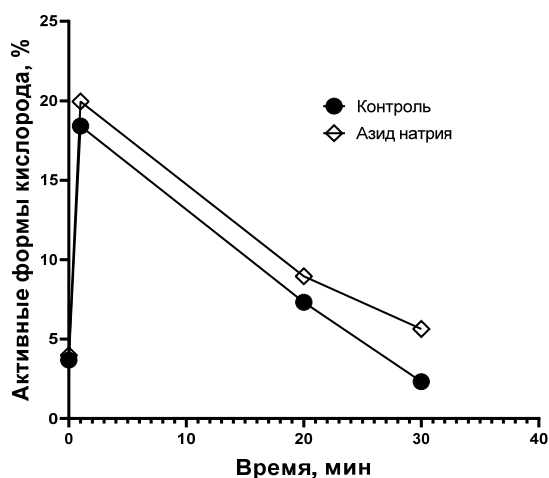


Рисунок 2. – Генерация АФК в присутствии азид натрия

Было выяснено, что ингибирование IV комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий азидом натрия в целом повышало генерацию активных форм кислорода на всём протяжении инкубации с АДФ, причём генерация АФК происходила скачкообразно при запуске активации тромбоцитов. Нарушение дыхательной цепи цитохром с-оксидазе может свидетельствовать о том, что ингибирование передачи электронов на молекулярный кислород может индуцировать генерацию АФК, однако данный вопрос всё ещё нуждается в обсуждении. Факт скачкообразного увеличения генерации АФК в обоих случаях может говорить о том, что образование активных форм кислорода происходит на начальных стадиях активации тромбоцитов, и интенсивность такой генерации снижается постепенно с дальнейшими морфофункциональными перестройками тромбоцитов.

**Заключение.** Полученные результаты о генерации активных форм кислорода при ингибировании дыхательной цепи говорят о том, что при активации тромбоцитов большую роль играет выработка АФК, которые не только являются результатом естественного процесса работы ферментов-оксидоредуктаз и дыхательной цепи митохондрий тромбоцитов, но и говорит о регуляторной роли АФК. Явление повышения генерации АФК при ингибировании цитохром с-оксидазы, возможно, свидетельствует о роли IV комплекса дыхательной цепи в тонкой регуляции митохондриального дыхания.

*Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (договор № 65 от 05.05.2021 г., госрегистрация № 20212457).*

#### **Список использованных источников**

1. Holinstat M. Normal platelet function / M. Holinstat // Cancer Metastasis Rev. 2017 Jun; vol. 36, no. 2, pp. 195-198.
2. Lesyk G. Advances in Platelet Subpopulation Research / G. Lesyk, P. Jurasz // Front Cardiovasc Med. 2019; vol. 6, P. 138.
3. Carrim N. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb $\alpha$  / N. Carrim [and etc.] // Redox Biol. 2015; vol. 6, pp. 640-647.
4. Li Z. Signaling During Platelet Adhesion and Activation / Z. Li [and etc.] // Arter. Thromb. Vasc. Biol. 2010; vol. 30, pp. 2341-2349.
5. Bartimoccia S. Platelet Oxidative Stress and Antioxidant Nutrients / S. Bartimoccia [and etc.] // J. Vasc. Med. Surg. 2014; vol. 2, P. 164.
6. Masselli E. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights / E. Masselli [and etc.] // Int J Mol Sci. 2020 Jul; vol. 21, no. 14, pp. 48-66.