

УДК 616.155.2-073.537

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ИНТАКТНЫХ И АКТИВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТАХ

¹Ермолаева Е.Н., ¹Кривохижина Л.В., ¹Кантюков С.А., ²Сурина-Марышева Е.Ф.

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск;

²ФГБОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, e-mail: ermen33@mail.ru

Тромбоциты человека, как в состоянии покоя, так и при АДФ-индуцированной активации, вырабатывают свободные радикалы, которые можно определить методом хемилюминесценции. Регистрация собственного свечения тромбоцитов в присутствии люминола позволяет оценивать исходное состояние тромбоцитов. Метод основан на добавлении в обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) люминола и регистрации хемилюминесценции. Добавление физиологического индуктора агрегации АДФ (аденозин дифосфата) в дозе, используемой для лабораторной оценки агрегации тромбоцитов, увеличивает АДФ-индуцированную активацию тромбоцитов и хемилюминесценцию более чем в 3 раза. АДФ-индуцированная хемилюминесценция тромбоцитов позволяет установить функциональное состояние тромбоцитов, оценивая их способность образовывать свободные радикалы в процессе активации клеток. АДФ-индуцированная активация тромбоцитов сопровождается активацией свободнорадикальных процессов с одновременной активацией антиоксидантных систем.

Ключевые слова: хемилюминесценция, свободнорадикальное окисление, тромбоциты

FREE RADICAL OXIDATION IN INTACT AND ACTIVATED PLATELETS

¹Ermolaeva E.N., ¹Krivokhizhina L.V., ¹Kantyukov S.A., ²Surina-Marysheva E.F.

¹South Ural State Medical University (SUSMU), Chelyabinsk;

²Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, e-mail: ermen33@mail.ru

Human platelets as a rest and during activation of ADP-induced produce free radicals, which can be detected by chemiluminescence. Register your own glow in the presence of luminol platelets allows to estimate the initial state of platelets. The method is based on adding to the platelet-rich plasma and registering luminol. Adding the physiological inducer of aggregation, ADP (adenosine diphosphate) in the dose employed for laboratory assessment of platelet aggregation increases ADP-induced platelet activation and chemiluminescence more than 3 times. ADP-induced platelet chemiluminescence allows you to set the functional state of platelets, assessing their ability to generate free radicals in the process of cell activation. ADP-induced platelet activation was accompanied by the activation of free radical processes with simultaneous activation of antioxidant systems.

Keywords: chemiluminescence, free radical oxidation, platelet

Активация тромбоцитов является следствием развития каскада сложных взаимосвязанных реакций, приводящих к изменению метаболизма кровяных пластинок и их ультраструктурной организации. Внутренние процессы активации завершаются осуществлением специфических тромбоцитарных функций – гемостатической, репаративной, защитной и других [7]. К механизмам активации тромбоцитов относятся: перестройка плазматической мембраны, мобилизация и движение ионов, гидролиз инозитольных фосфолипидов, высвобождение и окисление мембранной арахидоновой кислоты, изменение метаболизма циклических нуклеотидов и другие явления. Обнаружение систем ферментного синтеза активных форм кислорода в тромбоцитах позволяет предположить возможность их участия в активации кровяных пластинок. При активации тромбоцитов тромбоином, аденозиндифосфатом (АДФ) – основными индукторами агрегации кровяных пластинок – происходит активация фосфолипазы А₂, инициирующей метаболизм арахидоновой кислоты и производство

малонового диальдегида. Активные формы кислорода являются новыми модуляторами тромбоцитарной активности. Показано, что их экзогенная или внутритромбоцитарная продукция влияет на тромбоцитарную функцию [12].

Цель исследования – определить интенсивность производства свободных радикалов в интактных и активированных тромбоцитах, используя метод хемилюминесценции.

Материалы и методы исследования

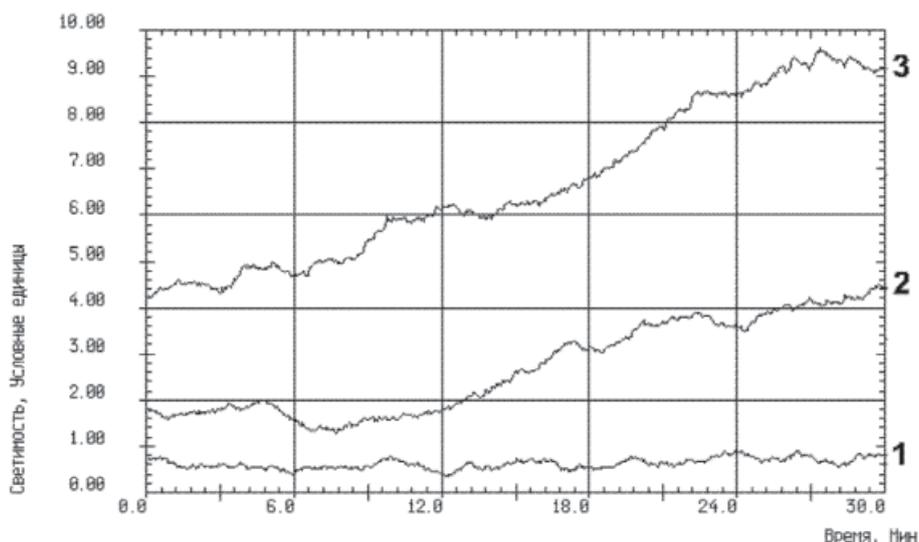
Работа выполнена на крови здоровых людей – доноров областной станции переливания крови ($n = 75$). Забор крови осуществлялся согласно правилам для гемостазиологических исследований. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия (5:1). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием цитратной крови при 200 g в течение 5 минут при комнатной температуре. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали после отбора из пробирок OTP и последующего центрифугирования при 650 g в течение 25 мин. Количество тромбоцитов в OTP доводили до 300000 кл/мкл добавлением бедной тромбоцитами плазмы. В качестве

опытной пробы брали ОТП, контролем служили пробы с БТП. АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали по методу Борна: определяли первую волну агрегации (на 2-й минуте), вторую волну (10-я минута) и завершение агрегации (30-я минута).

Исследование выполнено на приборе хемиллюминиметре ХЛ-003. Объем пробы составлял 5 мл, использовали медленное перемешивание, температурный режим – 37°C, время регистрации 30 минут. Для усиления ХЛ добавляли 1 мл рабочего люминола. Люминол (м.в. 177) готовили на диметил сульфоксиде из расчета 10^{-4} и хранили в холодильнике. Рабочий раствор готовили из маточного раствора разведением на стерильном физиологическом растворе в 1000 раз

(рН 7,0–7,2) [5]. Индуктором активации кровяных пластинок служил АДФ в конечной концентрации $6,4 \times 10^{-7}$ М, в дозе, используемой для исследования агрегационной способности тромбоцитов.

Результаты считывались на компьютере и отображались графически (рисунок). При оценке интенсивности ХЛ учитывали светосумму свечения и максимальную светимость. О генерации активных форм кислорода судили по интенсивности базисной (без люминола), люминолзависимой и АДФ-индуцированной хемиллюминесценции тромбоцитов (в присутствии люминола) [4]. На метод собственного свечения тромбоцитов получено авторское свидетельство [5].



Хемиллюминесценция тромбоцитов:

- 1 – базисная хемиллюминесценция (без люминола); 2 – люминолзависимое свечение тромбоцитов; 3 – АДФ-индуцированная хемиллюминесценция тромбоцитов (в присутствии люминола)

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли спектрофотометрическим методом в изопропанольной фракции [2]; уровень малонового диальдегида (МДА) определяли в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [3]; общую антиокислительную активность (ОАО) оценивали по степени подавления липопероксидации *in vitro* в присутствии суспензии мембран эритроцитов [6].

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с помощью пакета программ Statistica 6, использован непараметрический критерий Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Процессы свободнорадикального окисления, протекающие с образованием радикалов $RO\cdot$ и $RO_2\cdot$, можно оценивать посредством измерения хемиллюминесценции (ХЛ). Биохемиллюминесцентный метод не выступает в качестве прямого количественного метода определения свободных радикалов, методом ХЛ непосредственно определяется не концентрация радикалов, а интенсивность и скорость реакции, в ко-

торой они образуются. Метод хемиллюминесценции обладает тем преимуществом, что, во-первых, он обычно не связан с изменением хода процессов в растворах, клетках или даже целых тканях, где регистрируется свечение, а во-вторых, весьма чувствителен при обнаружении именно высокорекреакционных радикалов кислорода [8]. Собственная хемиллюминесценция, сопровождающая биохимические реакции в клетках и тканях, обладает, как правило, очень низкой интенсивностью и получила название «сверхслабого свечения». Поэтому применяются специальные вещества, которые усиливают процессы хемиллюминесценции. В качестве подобного усилителя применяется люминол – это соединение, вступающее в реакции с образовавшимися активными формами кислорода или органическими свободными радикалами [1].

На первом этапе исследования ставилась задача выявления базисного свечения интактных тромбоцитов. Сравнивая

показатели базисной хемилюминесценции обогащенной и бедной тромбоцитами плазмы, достоверно значимых отличий не выявили. Показатели хемилюминесценции

тромбоцитов: базисной (без люминола), люминолзависимой и АДФ-индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции тромбоцитов

Показатели	Базисное свечение без люминола		Базисное свечение с люминолом		АДФ-индуцированная ХЛ
	БТП	ОТП	БТП	ОТП	ОТП
Светосумма, у.е.·мин	1,73 ± 0,46	1,72 ± 0,42 $p_1 > 0,05$	3,20 ± 0,56	84,6 ± 21,1 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	267,7 ± 47,7 $p_3 < 0,01$
Макс. свет., у.е	0,43 ± 0,07	0,55 ± 0,06 $p_1 > 0,05$	0,60 ± 0,07	8,97 ± 2,56 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	14,38 ± 2,8 $p_3 > 0,05$

Примечания: p_1 – между базисной светимостью в ОТП и в БТП; p_2 – между ОТП без люминола и с люминолом; p_3 – между базисной светимостью с люминолом и АДФ-индуцированной хемилюминесценцией.

Добавление люминола в БТП не привело к достоверно значимому повышению показателей ХЛ, но внесение люминола в ОТП увеличивало ХЛ тромбоцитов – максимальная светимость возростала более чем в 16 раз, светосумма свечения более чем в 50 раз. Добавление АДФ в ОТП в дозе, используемой для исследования агрегационной способности тромбоцитов, приводило к активации процессов свободнорадикального окисления в кровяных пластинках: светосумма свечения возростала в 3,2 раза, максимальная светимость –

в 1,5 раза. Известно, что АДФ является физиологическим индуктором агрегации тромбоцитов, следовательно, процесс агрегации связан с активацией свободнорадикального окисления (СРО) в тромбоцитах. Следствием активации СРО в тромбоцитах может быть накопление вторичных (МДА) и конечных (Шиффовы основания) продуктов ПОЛ. Уровень ПОЛ в процессе АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов определяли на 2-й, 10-й минуте агрегации и на 30-й минуте агрегации, то есть после ее завершения (табл. 2).

Таблица 2

Содержание продуктов ПОЛ в ОТП в процессе АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

Продукты ПОЛ	Интактные (ОТП)	2-я минута агрегации	10-я минута агрегации	30-я минута агрегации
МДА, нмоль/л	3,89 ± 0,13	4,02 ± 0,21 $p > 0,05$	2,89 ± 0,04 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	2,66 ± 0,06 $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$
Σ 400 ед./мл	1,06 ± 0,29	1,36 ± 0,21 $p > 0,05$	0,72 ± 0,10 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$	0,60 ± 0,07 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примечания: p – достоверность с ОТП (интактными); p_1 – с ОТП (2 мин. агр.); p_2 – достоверность с ОТП (10 мин. агр.).

В процессе агрегации на 2-й минуте в ОТП проявляется тенденция к возрастанию МДА и Шиффовых оснований, но при завершении процесса агрегации (30-я минута) вторичные и конечные продукты ПОЛ

достоверно снижаются либо относительно начала агрегации, либо интактных тромбоцитов. Это может быть связано с постепенным повышением мощности общей антиокислительной активности (АОА) (табл. 3).

Таблица 3

Общая антиокислительная активность в ОТП в процессе АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

Общая АОА	Интактные (ОТП)	2-я минута агрегации	10-я минута агрегации	30-я минута агрегации
%	51,25 ± 2,07	51,56 ± 2,25 $p > 0,05$	54,69 ± 1,20 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$	65,00 ± 1,87 $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$

Примечания: p – достоверность с ОТП (интактными); p_1 – с ОТП (2 мин. агр.); p_2 – достоверность с ОТП (10 мин. агр.).

Действительно, со 2-й минуты агрегации начинается постепенное повышение антиокислительной активности с достоверным ее повышением на 30-й минуте агрегации.

Наше исследование показало, что тромбоциты, как в состоянии покоя, так и при АДФ-индуцированной активации вырабатывают свободные радикалы, которые можно зарегистрировать методом хемилюминесценции. Активация тромбоцитов АДФ, следствием которой будет процесс агрегации, приводит к повышению образования свободных радикалов и увеличению хемилюминесценции тромбоцитов более чем в 3 раза. Внутриклеточная сигнализация, необходимая для реорганизации цитоскелета и гранулярной секреции, связана с активацией образования свободных радикалов и осуществляется через фосфоинозитидный путь, за счет метаболизма эйкозаноидов и т.д. Образование эйкозаноидов из арахидоновой кислоты катализируется ферментами циклооксигеназа 1 и 2 (ЦОГ1; ЦОГ2). ЦОГ1 вовлечена в тромбоцитарную функцию; ЦОГ2 преимущественно представлена при воспалении. Наличие в тромбоцитах микропероксида, обеспечивающих эндогенный синтез пероксида водорода и его выделение в кровь в ходе реакции освобождения [7], указывает на важную роль АФК в регуляции агрегации-деагрегации тромбоцитов. Предполагается, что активные метаболиты кислорода являются новыми модуляторами тромбоцитарной активности [9]. Показано, что их экзогенная или внутритромбоцитарная продукция влияет на тромбоцитарную функцию. Это реализуется различными АФК, включая O_2^- , NO – и H_2O_2 , из тромбоцитарного происхождения, выходящих из тромбоцитов после их стимуляции коллагеном или тромбином. Активация пластинок коллагеном достаточно специфична особенно относительно гидроксильных радикалов и перекиси водорода. Более низкий уровень СРО в тромбоцитах был найден при активации АДФ и тромбином [12]. Активация тром-

боцитов и вовлечение их в процесс адгезии и агрегации обусловлены трансформацией арахидоновой кислоты в простагландиновые эндопероксиды, которые тромбоксансинтетазой превращаются в тромбоксан A_2 , малоновый диальдегид (МДА) и 12(L)-гидроксигептадека-5,8, 10-триеновая кислота в соотношении 1:1:1 [11]. На фоне возрастания ХЛ тромбоцитов мы не получили достоверно повышения МДА и Шиффовых оснований в процессе их агрегации. Прослеживалась лишь тенденция к возрастанию МДА и Шиффовых оснований на 2-й минуте агрегации, что соответствует первой волне агрегации, в конце агрегации (30 мин) эти метаболиты достоверно снижались относительно первой волны. Наш взгляд, это обусловлено постепенным возрастанием мощности антиокислительной системы, достигающих максимальных величин при завершении агрегации. В доступной нам литературе мы не нашли сведений об изменениях антиокислительной защиты тромбоцитов в процессе их агрегации. Известно, что на функцию тромбоцитов влияет состояние их окислительного статуса, наличие эндогенных или экзогенных радикалов, образования активных продуктов кислорода и азота. Экзогенные антиоксиданты могут модулировать тромбоцитарную активность [12]. Антиоксиданты, в частности тролокс и ресвератрол, потенциальные ингибиторы тромбоцитарной активации. Ингибиторный эффект ресвератрола, возможно, обусловлен ингибцией р38 MAP киназы, цитозольной фосфолипазы A_2 , арахидоновой кислоты, кальциевого каскада, активации NO , ингибции фосфолипазы С и активатора протеин киназы С [10]. Указывается, что антиокислители, кроме неспецифических радикально подавляющих механизмов, могут ингибировать СРО за счет взаимодействия со специфическими белками. Подобная регуляция обозначается как рецептор-редокс регуляция.

Таким образом, АДФ-индуцированная активация тромбоцитов сопровождается

активацией свободнорадикальных процессов с одновременной активацией антиоксидательных систем. Тромбоциты, как в состоянии покоя, так и при АДФ-индуцированной агрегации, вырабатывают свободные радикалы, которые можно зарегистрировать методом хемилюминесценции.

Заключение

Регистрация собственного свечения тромбоцитов в присутствии люминола позволяет оценивать исходное состояние тромбоцитов. АДФ-индуцированная хемилюминесценция тромбоцитов позволяет установить функциональное состояние тромбоцитов, оценивая их способность образовывать свободные радикалы в процессе активации клеток.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
2. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан – изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский и др. // Вopr. мед. химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127–131.
3. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.
4. Кривохижина Л.В. Хемилюминесценция тромбоцитов. Использование метода хемилюминесценции для определения активности тромбоцитов / Л.В. Кривохижина, Е.Н. Ермолаева, С.А. Кантюков, Д.Н. Кривохижин // Вестн. Тюменского гос. ун-та. – 2013. – № 6. – С. 174–181.
5. Пат. 2230322 РФ Способ обнаружения свечения тромбоцитов / А.П. Исаев, Л.В. Кривохижина, С.А. Кантюков, Е.Н. Ермолаева, И.Н. Курилов. – М., 2004. – 5 с.
6. Спектор Е.Б. Определение общей антиоксидательной активности плазмы крови и ликвора / Е.Б. Спектор, А.А. Ананенко, Л.Н. Политова // Лаб. дело. – 1984. – № 1. – С. 26–28.
7. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. – СПб.: Изд-во СПбГМУ; 2000. – С. 226.
8. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. – Уфа: Изд-во БГМИ, 1995. – 90 с.
9. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species—players in the platelet game *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – Т. 24. – P. 1988–1996.
10. Olas B, Wachowicz B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions // *Platelets.* – 2005. – Т. 16. – P. 251–260.
11. Panse M, Block HU, Forster W, Mest HJ. An improved malondialdehyde assay for estimation of thromboxane synthase

activity in washed human blood platelets // *Prostaglandins.* – 1985. – Т. 30. – P. 1031–1040.

12. Sobotková A., Mášová-Chrastinová L., Suttner J. et al. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – Т.47 (12). – P. 1707–1714.

References

1. Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence *Success of Biological Chemistry.* 2009. T. 49. pp. 341–388.
2. Volchegorsky I.A., Nalimov A.G., Yarovinsky B.G. et al. Comparison of different approaches to the definition of lipid peroxidation products in heptane – isopropanol extracts blood *Problems of Medical Chemistry* 1989. Vol. 35 (1). pp. 127–131.
3. Korobeinikova E.N. Modification of the definition of lipid peroxidation products in the reaction with thiobarbituric acid *Laboratory work.* 1989. T. 7. pp. 8–10.
4. Krivohizhina L.V., Yermolayeva E.N., Kanyukov S.A., Krivokhizhin D.N. Chemiluminescence platelets. Using chemiluminescence method for determining the activity of platelets *Vestnik Tyumen State. University.* 2013. T. 6. pp. 174–181.
5. Isaev A.P., Krivohizhina L.V., Kanyukov S.A., Yermolayeva E.N., Kurilov I.N. A method for detecting the glow platelets Patent 2230322 of the Russian Federation. M., 2004. 5 p.
6. Spector E.B., Ananenko A.A., Politova L.N. Determination of total antioxidant activity of blood plasma and spinal fluid *Laboratory work.* 1984. T. 1. pp. 26 – 28.
7. Shitikova A.S. Platelet hemostasis. St. Petersburg.: Publisher SPbGMU. 2000. 226 p.
8. Farkhutdinov R.R., Likhovskiy V.A. Chemiluminescent research methods free – radical oxidation in biology and medicine. Ufa: Izd BGMI, 1995. 90 p.
9. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species—players in the platelet game *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. T. 24. pp. 1988–1996.
10. Olas B, Wachowicz B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions *Platelets.* 2005. T. 16. pp. 251–260.
11. Panse M., Block H.U., Forster W., Mest H.J. An improved malondialdehyde assay for estimation of thromboxane synthase activity in washed human blood platelets *Prostaglandins.* 1985. T. 30. pp. 1031–1040.
12. Sobotková A., Mášová-Chrastinová L., Suttner J. et al. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events *Free Radic Biol Med.* 2009. T.47 (12). pp. 1707–1714.

Рецензенты:

Головлева Е.С., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО ЮУГМУ Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск;

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии, ГБОУ ВПО ЮУГМУ Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 18.04.2014.