

УДК 543.426; 577.169

МИТОХОНДРИИ КАК ИСТОЧНИКИ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В ТРОМБОЦИТАХ

© 2017 г. А. А. Джатдоева^{1*}, Е. В. Проскурнина¹, А. М. Нестерова², И. В. Дубинкин³, Т. В. Гапонова³, С. И. Обыденный⁴, Ю. А. Владимиров^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 117192, Россия, Москва, Ломоносовский просп., 27, корп. 1

²Федеральный научно-исследовательский центр “Кристаллография и фотоника”, 119333, Россия, Москва, Ленинский просп., 59

³Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

⁴ННПЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, 117198, Россия, Москва, ул. Саморы Машела, 1

*e-mail: ayshatdj@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2017

Принята к печати 23.06.17

Методом активированной хемилюминесценции (ХЛ) исследована радикал-продуцирующая способность тромбоцитов человека. Показано, что только в присутствии селективного зонда на супероксид-анион люцигенина регистрируется хемилюминесценция изолированных тромбоцитов, причем это свечение усиливается многократно при добавлении субстратов окислительных цепей NADH и NADPH. На хемилюминесценцию не влияет ингибитор NADPH-оксидазы дифенилйодоний, но ее ингибируют дозозависимо разобщители фосфорилирования динитрофенол и ротенон. Таким образом, основным свободным радикалом, генерируемым тромбоцитами, является супероксидный анион-радикал, а одним из источников супероксидного анион-радикала в тромбоцитах – митохондрии.

Ключевые слова: тромбоциты, активированная хемилюминесценция, активные формы кислорода

DOI: 10.7868/S0233475517060056

ВВЕДЕНИЕ

В клетках имеется несколько основных систем, в которых свободные радикалы (активные формы кислорода, АФК) образуются в качестве основного или побочного продукта. Прежде всего, это NADPH-оксидазы, мембранные ферменты, продуцирующие супероксидный анион-радикал (САР) по реакции одноэлектронного восстановления. Известно семь изоформ этого ферментного комплекса, из которых лучше всего изучена фагоцитарная Nox2. Многие клетки, в том числе эндотелиоциты и фибробласты, используют NADPH-оксидазу для АФК-сигналинга и перекрестных взаимодействий (crosstalk) с клетками иммунной системы [1].

Важной системой продукции (САР) являются митохондрии. Известно, что в результате работы NADH-зависимой цепи на внутренней мембране

утечка САР происходит в 11 местах, главным образом, в комплексах I, II, III, причем САР продуцируется как в матрикс, так и в межмембранное пространство [2]. Кроме митохондриальной дыхательной цепи, значительную роль в продукции САР играет митохондриальная дыхательная цепь (система цитохрома P-450), количество АФК, образующееся в которой, сопоставимо с количеством АФК в митохондриях [3], особенно значимой митохондриальной системой является в клетках печени.

САР-продуцирующий фермент ксантиноксидоредуктаза экспрессируется в виде ксантиндегидрогеназы, а затем в результате посттрансляционной модификации превращается в ксантиноксидазу. Этот фермент участвует в обмене пуринов, окисляя различные субстраты, но, в первую очередь, ксантин и гипоксантин с образованием САР [4].

В последнее время методом ЭПР доказано, что промежуточными продуктами в превращениях арахидоновой кислоты, катализируемых циклооксигеназой, являются пероксильные радикалы [5]. Арахидоновая кислота (АК) также может метаболизироваться монооксигеназами эндоплазматического ретикулаума.

Все эти источники свободных радикалов присутствуют в тромбоцитах, особенно циклооксигеназа, и теоретически могут вносить тот или иной вклад в продукцию АФК. Еще в 1977 году Маркус показал, что тромбоциты способны продуцировать АФК, однако, по поводу их источника до сих пор существуют разные мнения [6, 7]. Тромбоциты как нестимулированные, так и стимулированные такими агонистами, как коллаген и тромбин, продуцируют АФК, в том числе САР, гидроксильный радикал и пероксид водорода [8–11]. Эндогенный синтез АФК указывает на их аутокринную или паракринную роль в активации тромбоцитов, аналогичную описанной для экзогенных АФК [12].

Тромбоциты содержат NADPH-оксидазу – многие из ее субъединиц обнаружены в тромбоцитах [13, 14]. Тромбоцитарная NADPH-оксидаза Nox2 генерирует мало внеклеточных АФК по сравнению с нейтрофилами – количество продуцируемого САР составляет порядка нмоль/мин/10⁵ клеток, что примерно столько же, сколько в эндотелиальных клетках, но составляет всего 1% от САР, высвобождаемого активированными нейтрофилами [15]. Это делает ее важной скорее для внутриклеточных сигнальных механизмов, нежели для защитного ответа организма, хотя дыхательный взрыв и усиливается в присутствии тромбоцитов [13, 16–18]. Тромбоцитарную NADPH-оксидазу стимулируют коллаген и тромбин.

Ингибирование образования тромбоцитарного САР хлоридом дифенилйодония показано независимо несколькими исследовательскими группами [13, 14]. Krötz F. и соавт. [13] показали, что химерный пептид gp91 ds-tat, специфически ингибирующий взаимодействие между субъединицами gp91 и p47, также предотвращает выработку тромбоцитарного САР.

Имеются сведения, что ксантинооксидаза в тромбоцитах вносит вклад в тромбин-индуцированную продукцию АФК [13]. По данным других наблюдений дополнительная роль принадлежит зависимому от фосфолипазы А₂ высвобождению АК [19, 20]. Другие ферменты АК-метаболизма, такие как липоксигеназа, также могут принимать участие в высвобождении АФК [21, 22], но пока нет данных о функциональной

роли липоксигеназо- и циклооксигеназо-зависимого образования АФК в тромбоцитах.

Суммируя сказанное, можно утверждать, что основным источником АФК в тромбоцитах в настоящее время считается система NADPH-оксидазы, хотя возможный вклад может вносить ксантинооксидаза. Мало внимания уделено другим источникам АФК – митохондриям, микросомальной дыхательной цепи и каскаду АК. Цель настоящей работе состояла в изучении возможных источников АФК в тромбоцитах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хемилюминесценцию (ХЛ) регистрировали на 12-канальном хемилюминометре Lum-1200 (ДИСофт, Россия). В кювету хемилюминометра помещали выделенные тромбоциты и регистрировали собственное свечение в течение 5 мин. Затем добавляли активатор ХЛ и регистрировали сигнал в течение 10 мин, потом добавляли NADH или NADPH, полученные растворением препаратов NADH или NADPH (оба Sigma-Aldrich, США) в бидистиллированной воде (Milli-Q). Общий объем системы составлял 1.000 мл. Все эксперименты проводили в среде Хенкса (ПанЭко, Россия, pH 7.4) с добавлением НЕРЕС (Sigma, США).

Исходный раствор 1 мМ люминола (Sigma-Aldrich, США) готовили растворением навески в фосфатном буферном растворе (ФБ); 0.5 мМ родамина 6Ж (Реахим, Россия) в бидистиллированной воде (Milli-Q), а 1 мМ люцигенина (Sigma-Aldrich, США) и 0.5 мМ кумаринов С-525 (ООО Ниопик, Россия) и С-334 (Sigma, США) – в метаноле (Merck, Германия).

Использовали супероксиддисмутазу (СОД из эритроцитов быка, 5030 Ед/мг белка, Sigma, США), разбавитель окислительного фосфорилирования – 2,4-динитрофенол (ДНФ, Sigma, США), ингибитор комплекса I – ротенон (Sigma, США), ингибитор NADPH-оксидазы – хлорид дифенилйодония (Fluka, США).

В качестве растворителей использовали: метиловый спирт (Merck, Германия), диметилсульфоксид (ДМСО, Helicon, Россия).

Микроскопические эксперименты. Проникновение ХЛ-зондов в тромбоциты изучали методом конфокальной микроскопии на приборе Zeiss Na1 100, длина волны возбуждения лазера 405 нм, фильтра 520 ± 17 нм.

Тромбоциты выделяли из цельной крови (практически здоровые доноры, кровь получена из ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева), стабилизированной цитратом, в присутствии простагландина Е1 (конечная концентрация 1 мкМ) и апиразы

(конечная концентрация 0.1 ед/мл). Первое центрифугирование проводили при 100 g в течение 8 мин, отделяли обогащенную тромбоцитами плазму от эритроцитарно-лейкоцитарного осадка, добавляли тройной объем 3.8% цитрата, далее центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, отделяли верхний слой плазмы от осадка тромбоцитов, ресуспендировали буферным раствором до состояния опалесцирующего раствора [23].

Аликвоту объемом 30 мкл суспензии тромбоцитов наносили на стекло, модифицированное фибриногеном, и смешивали с равным объемом ХЛ-зондов. Спустя 10 мин раствор аккуратно удаляли с подложки, адгезированные тромбоциты несколько раз промывали раствором Хенкса + HEPES и анализировали под микроскопом.

Выделение изолированных тромбоцитов из обогащенной тромбоцитами плазмы. Обогащенная тромбоцитами плазма практически здоровых доноров для ХЛ-экспериментов была предоставлена Гематологическим научным центром Минздрава РФ. Всего было исследовано 25 образцов обогащенной тромбоцитами плазмы практически здоровых доноров. Для каждой пробы проводили по три параллельных измерения.

Во время проведения экспериментов плазму хранили при комнатной температуре и постоянном покачивании не более 3 ч. Обогащенную тромбоцитами плазму центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g и $t = 25^\circ\text{C}$. Осадок ресуспендировали в растворе Хенкса/Непес pH 7.4 (объемом, равным объему исходной плазмы) и центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g и $t = 25^\circ\text{C}$. Процедуру отмывания тромбоцитов повторяли 2 раза. Количество тромбоцитов в исследуемых объектах контролировали с помощью гематологического анализатора Abacus Junior 30 (Австрия, Diatron). Суспензия изолированных тромбоцитов содержала около $600\text{--}800 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ тромбоцитов.

Выделение митохондрий из печени крыс. Митохондрии выделяли из печени самцов крыс Wistar (275 ± 25 г) согласно [24]. Крыс декапитировали под наркозом (эфир). Все манипуляции проводили при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$ на льду. Образец печени массой около 4 г промывали в буфере выделения (10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 70 mM сахараза и 200 mM маннитол, pH 7.50, все реагенты Sigma-Aldrich). Образец гомогенизировали в 40 мл буфера выделения, содержащем 1 мг/мл делипидированного бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Полученную суспензию центрифугировали при 600 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отделяли и центрифугировали при 11000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали

в 40 мл буфера выделения. Полученную суспензию центрифугировали при 600 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отделяли и центрифугировали при 11000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в буфере хранения (10 mM HEPES, 250 mM сахараза, 1 mM АТР, 0.08 mM АDP, 5 mM сукцинат натрия и 2 mM K_2HPO_4 , pH 7.50) при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$ на льду.

Концентрацию белка в митохондриях определяли стандартным методом с помощью Total protein reagent (Sigma, США) с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Во всех экспериментах использовали митохондрии с концентрацией белка около 10 мг/мл.

Жизнеспособность митохондрий контролировали с помощью электрохимического измерения дыхательного контроля митохондрий (Эксперт, Эконикс, Россия). Дыхательный контроль во всех экспериментах составлял от 4 до 6.

Образцы центрифугировали на центрифуге Hermle Z 32 НК (Hermle Labortechnik, Германия) с охлаждением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект активаторов ХЛ и воздействия NADH и NADPH. Для определения природы свободных радикалов, продуцируемых тромбоцитами, использовали различные химические и физические активаторы ХЛ. С помощью неселективного активатора люминола оценивали общее образование свободных радикалов; в качестве зонда на САР использовали люцигенин. Вклад образования липидных радикалов оценивали с помощью родамина 6Ж и хинолизиновых производных кумарина С-334 и С-525 (рис. 1). Слабая собственная ХЛ изолированных тромбоцитов наблюдалась только в присутствии люцигенина.

При добавлении источника восстановленных эквивалентов NADH или NADPH (0.10 mM) в присутствии люцигенина наблюдали значимый рост ХЛ (рис. 1), в присутствии других активаторов свечение оставалось на уровне фона. В качестве контроля использовали фосфатный буферный раствор.

Степень усиления ХЛ (отношение стационарной интенсивности стимулированной ХЛ к уровню спонтанного свечения) зависит от конкретного образца крови и состояния тромбоцитов, но NADH во всех исследованных случаях ($n = 25$) оказывался в несколько раз более эффективным стимулом, чем NADPH.

Влияние ингибиторов на стимулированную продукцию АФК. В серии опытов исследовали

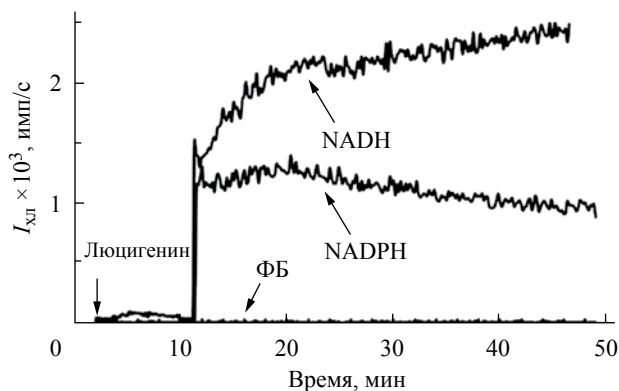


Рис. 1. Хемилюминесценция изолированных тромбоцитов, стимулированных NADH и NADPH, в присутствии 200 мкМ люцигенина. Стрелкой указан момент добавления люцигенина и развитие собственной ХЛ. В качестве контроля добавляли фосфатный буферный раствор (ФБ). Объем системы 1.000 мл: 800 мкл тромбоцитов в растворе Хенкс/Нерес, 0.2 мМ активатор, 0.10 мМ NADH. Концентрация клеток около $400 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$.

действие СОД на развитие NADH-стимулированной ХЛ изолированных тромбоцитов. Для этого в систему, содержащую около 320 млн изолированных тромбоцитов, 0.2 мМ люцигенин, 0.1 мМ NADH, добавляли различное количество СОД (рис. 2).

Добавление СОД приводило к резкому падению интенсивности ХЛ, причем форма ХЛ-кривой не зависела от концентрации добавленного фермента (рис. 2а). Подавление ХЛ выходило на насыщение (рис. 2б), что свидетельствует

о выходе части образовавшегося САР из митохондрий наружу тромбоцита.

Влияние на продукцию ингибиторов САР дыхательных систем. Добавление к ХЛ-системам тромбоциты/люцигенин/NADH и тромбоциты/люцигенин/NADPH дифенилиодония (ДФИ), ингибитора NADPH-оксидазы, даже при концентрации 1 мМ не влияет на ХЛ (рис. 3а). Ингибитор комплекса I дыхательной цепи ротенон также не влияет на ХЛ, стимулированную NADH и NADPH (данные не приведены, кривые аналогичны показанной на рис. 3), в отличие от ДНФ, разобщителя фосфорилирования (рис. 3б).

NADH-стимулированная люцигенин-ХЛ как метод изучения продукции САР митохондриями. Для интерпретации данных по активированной люцигенином ХЛ тромбоцитов были исследованы изолированные митохондрии. Известно, что митохондрии активно генерируют САР, главным образом, дыхательной цепью, расположенной на внутренней мембране [25], преимущественно NADH-убихинон-оксидоредуктазой (дыхательный комплекс I). На внешней мембране митохондрий располагается NADPH-зависимая окислительная цепь [26], способная продуцировать свободные радикалы [27].

Как и в серии с тромбоцитами, к изолированным митохондриям добавляли либо NADH, либо NADPH, либо фосфатный буферный раствор в качестве контроля (рис. 4).

Добавление NADH к митохондриям приводило, как и в случае с изолированными тромбоцитами, к резкому увеличению интенсивности

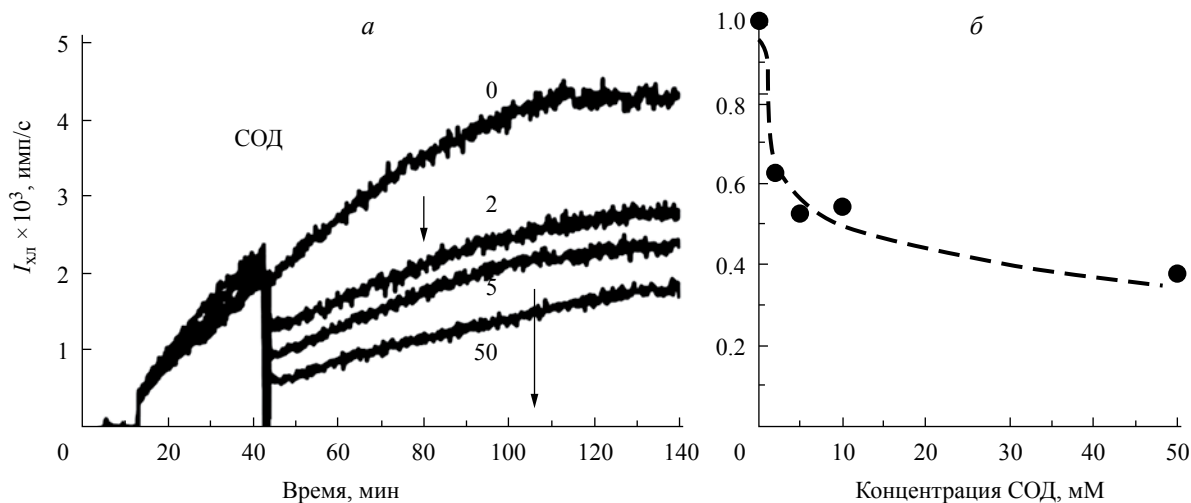


Рис. 2. Тушение люцигенин-активированной хемилюминесценции (ХЛ) изолированных тромбоцитов, стимулированных NADH, супероксиддисмутазой (СОД) различной концентрации. а – Кривые развития ХЛ, стрелкой указан момент добавления СОД, цифры у кривых – концентрация СОД, мкМ; б – доля подавления ХЛ, рассчитанная по отношению суммарной интенсивности ХЛ за 2 ч после добавления СОД к контрольному значению.

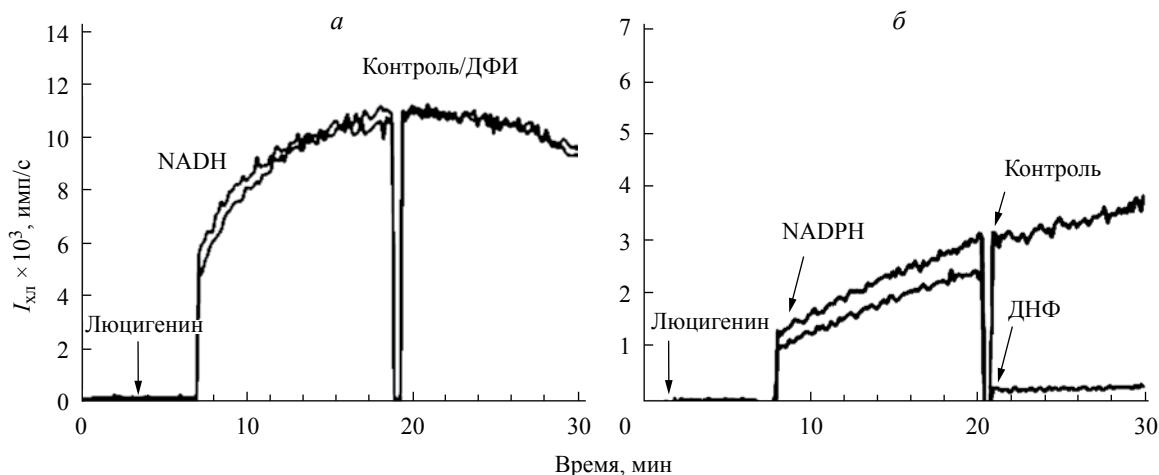


Рис. 3. Добавление в систему: *а*) 0.1 мМ дифенилйодония (ДФИ) к изолированным тромбоцитам, стимулированным NADH (0.1 мМ), не приводит к изменению люцигенин-ХЛ по сравнению с контрольным опытом, стрелкой указан момент добавления раствора Хенкса (контроль) и дифенилйодония, *б*) 2 мМ 2,4-динитрофенол (ДНФ) ингибирует люцигенин-активированную ХЛ, стимулированную NADH. Концентрации люцигенина 0.2 мМ, NADH 0.1 мМ.

активированной люцигенином ХЛ, однако оно происходило с последующим медленным спадом. Такие различия в кинетике ХЛ митохондрий и тромбоцитов можно объяснить более высокой концентрацией митохондрий в исследуемой системе, которые быстро поглощают как кислород, так и субстрат. При добавлении NADPH, как и в случае с тромбоцитами, наблюдали выход ХЛ на стационарный уровень. Из рис. 4 видно, что NADH стимулирует продукцию САР в митохондриях на целый порядок величин сильнее, чем NADPH.

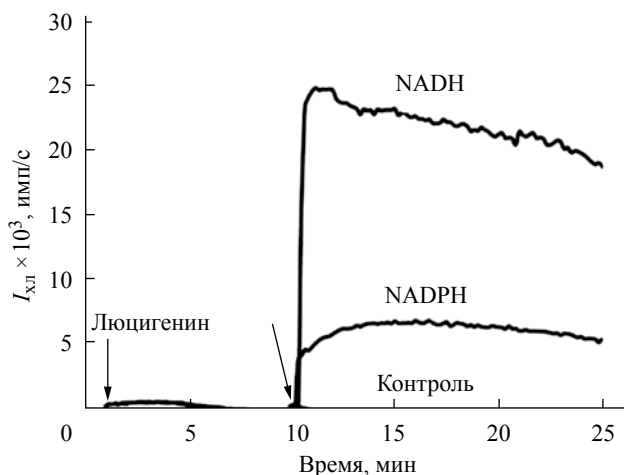


Рис. 4. Отклик ХЛ изолированных митохондрий на действие стимулов NADH и NADPH. В качестве контроля добавляли фосфатный буферный раствор. Состав системы: 800 мкл митохондрий (10 мг/мл), люцигенин 0.2 мМ, NADH или NADPH – 0.1 мМ. Стрелкой указан момент внесения NADH и NADPH.

Измерение флуоресценции NADH ($\lambda_{ex} = 340$ нм, $\lambda_{fl} = 460$ нм) показало, что спад ХЛ обусловлен именно расходом NADH. При уменьшении количества митохондрий в системе сигнал приобретает стационарный характер; повторное добавление NADH после его частичного расходования возвращает ХЛ на первоначальный уровень.

ХЛ и митохондрий, и тромбоцитов дозозависимо тушится СОД (рис. 5).

Концентрационная кривая характеризуется насыщением, из чего следует, что часть САР не может быть нейтрализована СОД, т.е. САР является внутримитохондриальным.

Дифенилйодоний в концентрации до 0.1 мМ не влияет на активированную люцигенином ХЛ митохондрий, в то время как ДНФ в концентрации 2 мМ практически полностью ингибирует продукцию САР. По обоим этим показателям образование САР митохондриями печени крысы не отличалось от образования САР тромбоцитами крови человека.

Проникновение люцигенина в тромбоциты. Данные о способности люцигенина проникать в клетки противоречивы, и нет данных о его проникновении в тромбоциты. С помощью конфокального микроскопа показано, что после инкубации изолированных тромбоцитов на стекле, покрытом фибриногеном, с люцигенином (10 мин), люцигенин проникает в тромбоцит, неравномерно заполняя весь объем (рис. 6).

Аналогичные эксперименты с добавлением NADH и NADPH показали, что стимулы практически не влияют на проникновение люцигенина в тромбоциты. Изучение проникновения самих

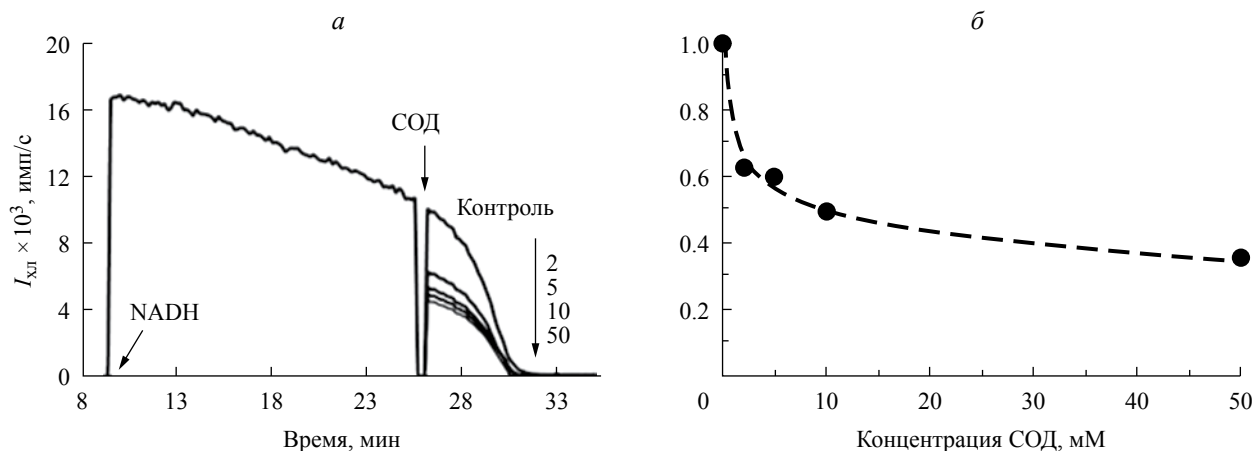


Рис. 5. Тушение люцигенин-ХЛ изолированных митохондрий, стимулированных NADH, супероксиддисмутазой различной концентрации. *а* – Кривые развития ХЛ, стрелкой указан момент добавления СОД, цифры у кривых – концентрация СОД, мкМ; *б* – снижение светосуммы ХЛ, измеренной в течение 2 ч после добавления СОД, по сравнению с к контролем без СОД.

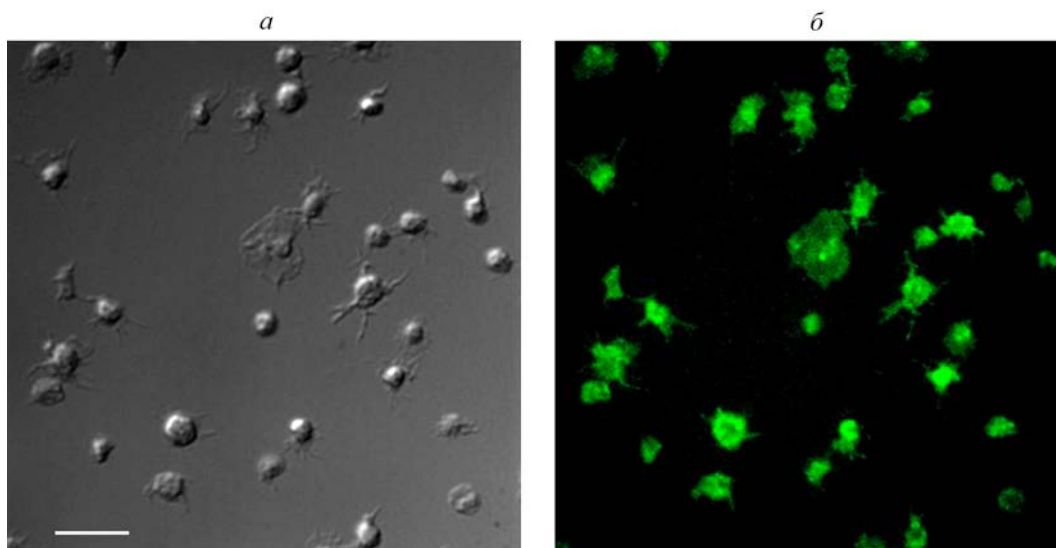


Рис. 6. Изображение тромбоцитов, инкубированных с люцигенином, полученное методом конфокальной микроскопии. *а* – Дифференциально-интерференционный контраст; *б* – флуоресценция, $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, фильтр 520 ± 17 нм. Метка соответствует 10 мкМ.

стимулов в тромбоцит требует отдельного исследования, но на основании единичных экспериментов можно заключить, что эти вещества в небольшом количестве проходят в тромбоциты через цитоплазматическую мембрану.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнений, что клетки крови, находящиеся в пристеночном кровотоке, тромбоциты и нейтрофилы, обмениваются информацией друг с другом и с эндотелиальными клетками на языке химических посредников, к которым относят АФК, причем тромбоциты служат не

только мишенью действия свободных радикалов, но и их источником. Считается, что тромбоциты генерируют САР за счет мембранного комплекса NADPH-оксидаза Nox2, возможно, за счет цитоплазматической ксантинооксидазы.

Однако тромбоциты содержат счетное число митохондрий (от трех–четырех до десяти), которые, тем не менее, занимают значительную часть объема такой небольшой клетки, как тромбоцит (размер около 3–4 мкМ), следовательно, могут служить важным источником САР. Люцигенин считается селективным зондом на САР [28], поэтому его активно используют для изучения

продукции АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [29].

Ни люминол, ни кумарины, ни родамин не реагировали на стимулированные NADH и NADPH тромбоциты, из чего можно сделать вывод, что при стимуляции не происходит перекисного окисления липидов с образованием возбужденного кетона, с которого энергия переносится на кумарины, также не образуется пероксид водорода, о чем свидетельствует отсутствие свечения с люминолом. Можно предположить, что образуется CAP, поскольку регистрируется слабое люцигенин-активированное свечение, которое многократно усиливается при добавлении NADH и NADPH, и предположить их митохондриальный источник, поскольку положительно заряженный люцигенин накапливается в митохондриях. Аналогичный эффект от стимуляции NADH и NADPH получен при использовании люцигенин-активированной ХЛ изолированных митохондрий.

С использованием конфокальной микроскопии нами показано, что при инкубации в условиях эксперимента люцигенин проникает в тромбоцит и относительно равномерно распределяется по всему его объему. Таким образом, действительно, люцигениновая ХЛ может генерироваться внутри тромбоцитов. Вопрос о проникновении в тромбоцит NADH и NADPH остается открытым, но известно, что NADH может проникать, например, в астроциты, рецепторным путем [30].

Неполное тушение ХЛ СОД свидетельствует о том, что часть CAP выходит из тромбоцитов, а часть остается внутри митохондрий этих клеток. Отсутствие ингибирующего эффекта от дифенилйодония делает сомнительным утверждение о том, что NADPH-оксидаза является основным источником CAP в тромбоцитах. ДНФ, разобщитель окислительного фосфорилирования, одинаковым образом ингибирует продукцию CAP в тромбоцитах и митохондриях. Таким образом, можно предположить, что, по крайней мере, одним из источников CAP в тромбоцитах являются митохондрии.

Этот подход дает возможность не только оценивать АФК-продуцирующую функцию митохондрий самих тромбоцитов и изучать их влияние на процессы активации и агрегации, но и использовать тромбоциты в качестве доступных из крови “лабораторных животных” при оценке радикал-продуцирующей функции митохондрий, например, нейронов центральной нервной системы. Этот подход с недавнего времени пытаются использовать, в частности в психиатрии, для изучения патогенеза эндогенных психозов [31]. В дальнейшем предоставляется целесообразным изучить влияние активаторов тромбоцитов, таких как коллаген, ADP, тромбин на их

радикал-продуцирующую функцию, а также исследовать тромбоциты представительной группы здоровых доноров с целью определения референсного интервала нормальных значений АФК-продуцирующей функции тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Panday A., Sahoo M.K., Osorio D., Batra S. 2015. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol. Immunol.* **12**, 5–23.
2. Kozjak-Pavlovic V. 2017. The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res.* **367** (1), 83–93.
3. Bae Y.S., Oh H., Rhee S.G., Yoo Y.D. 2011. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol. Cells.* **32**, 491–509.
4. Labat-Robert J., Robert L. 2014. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. *Pathol. Biol. (Paris)*. **62**, 61–66.
5. Gu Y., Xu Y., Law B., Qian S.Y. 2013. The first characterization of free radicals formed from cellular COX-catalyzed peroxidation. *Free Radic. Biol Med.* **57**, 49–60.
6. Pratico D., Pasin M., Barry O.P., Ghiselli A., Sabatino G., Iuliano L., FitzGerald G.A., Violi F. 1999. Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation.* **99**, 3118–3124.
7. Caccese D., Pratico D., Ghiselli A., Natoli S., Pignatelli P., Sanguigni V., Iuliano L., Violi F. 2000. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation – role of arachidonic acid metabolism. *Thromb. Haemost.* **83**, 485–490.
8. Ferroni P., Vazzana N., Riondino S., Cuccurullo C., Guadagni F., Davi G. 2012. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation – role of arachidonic acid metabolism. *Thromb. Haemost.* **83**, 485–490.
9. Finazzi-Agro A., Menichelli A., Persiani M., Biancini G., Del Principe D. 1982. Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta.* **718**, 21–25.
10. Loscalzo J. 1985. N-Acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin. *J. Clin. Invest.* **76**, 703–708.
11. Wachowicz B., Olas B., Zbikowska H.M., Buczynski A. 2002. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* **13**, 175–182.
12. Krotz F., Sohn H.Y., Pohl U. 2004. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1988–1996.
13. Krotz F., Sohn H.Y., Gloe T., Zahler S., Riexinger T., Schiele T.M., Becker B.F., Theisen K., Klauss V., Pohl U. 2002. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* **100**, 917–924.
14. McVeigh G.E., Hamilton P., Wilson M., Hanratty C.G., Leahy W.J., Devine A.B., Morgan D.G., Dixon L.J.,

- McGrath L.T. 2002. Platelet nitric oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of supplemental ascorbate. *Circulation*. **106**, 208–213.
15. Lassegue B., Clempus R.E. 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**, R277–297.
16. Begonja A.J., Gambaryan S., Geiger J., Aktas B., Pozgajova M., Nieswandt B., Walter U. 2005. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alphaIIb beta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*. **106**, 2757–2760.
17. Chlopicki S., Olszanecki R., Janiszewski M., Laurindo F.R., Panz T., Miedzobrodzki J. 2004. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets. *Antioxid. Redox Signal*. **6**, 691–698.
18. Zalavary S., Grenegard M., Stendahl O., Bengtsson T. 1996. Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 58–68.
19. FitzGerald G.A. 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 879–890.
20. Niwa K., Haensel C., Ross M.E., Iadecola C. 2001. Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ. Res.* **88**, 600–608.
21. Jahn B., Hansch G.M. 1990. Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **93**, 7–3–79.
22. Singh D., Greenwald J.E., Bianchine J., Metz E.N., Sagone A.L., Jr. 1981. Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. *Am. J. Hematol.* **11**, 233–240.
23. Gilbert G.E., Sims P.J., Wiedmer T., Furie B., Furie B.C., Shattil S.J. 1991. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J. Biol. Chem.* **266**, 17261–17268.
24. Storrie B., Madden E.A. 1990. Isolation of subcellular organelles. *Meth. Enzymol.* **182**, 203–225.
25. Jezek P., Hlavata L. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **37**, 2478–2503.
26. Sottocasa G.L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A. 1967. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* **32**, 415–438.
27. Арчаков А.И. 1975. *Микросомальное окисление*. М.: Наука, 327 с.
28. Aasen T.B., Bolann B., Glette J., Ulvik R.J., Schreiner A. 1987. Lucigenin-dependent chemiluminescence in mononuclear phagocytes. Role of superoxide anion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **47**, 673–679.
29. Kruglov A.G., Yurkov I.S., Teplova V.V., Evtodienko Y.V. 2002. Lucigenin-derived chemiluminescence in intact isolated mitochondria. *Biochemistry (Moscow)* **67**, 1262–1270.
30. Lu H., Burns D., Garnier P., Wei G., Zhu K., Ying W. 2007. P2X7 receptors mediate NADH transport across the plasma membranes of astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 946–950.
31. Dietrich-Muszalska A., Kwiatkowska A. 2014. Generation of superoxide anion radicals and platelet glutathione peroxidase activity in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric Dis. Treat.* **10**, 703–709.

Mitochondria As a Source of Superoxide in Human Platelets

A. A. Dzhatdoeva¹, E. V. Proskurnina¹, A. M. Nesterova², I. V. Dubinkin³,
T. V. Gaponova³, S. I. Obydenny⁴, Yu. A. Vladimirov^{1,2}

¹Moscow Lomonosov State University, Faculty of Fundamental Medicine,
Lomonosovskii pr. 27, build. 1, Moscow, 117192 Russia

²Federal Research Centre 'Crystallography and Photonics', Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 59, Moscow, 119333 Russia

³National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russian Federation,
Novy Zykovskii proezd 4, Moscow, 125167 Russia

⁴Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and immunology,
ul. Samory Mashela 1, Moscow, 117198 Russia

*e-mail: ayshatdj@gmail.com

The radical-producing activity of human platelets was studied using the method of activated chemiluminescence. Lucigenin, a selective probe for superoxide anion, enhanced the chemiluminescence of isolated platelets. The addition of NADH and NADPH as substrates of the oxidative systems significantly amplified the production of superoxide. The NADH- and NADPH-stimulated chemiluminescence was not affected by diphenyliodonium, an inhibitor of NADPH-oxidase, but it was lowered by 2,4-dinitrophenol. Thus, superoxide anion radical is a key free radical generated by the platelets, and one of the sources of superoxide anion radical is the mitochondria of platelets.

Keywords: platelets, enhanced chemiluminescence, reactive oxygen species