

С.А. Таланов, Т.І. Ляшенко, І.І. Паталах

## Роль NADPH-оксидази в паракринній та аутокринній регуляції функціональної активності тромбоцитів

*NADPH-оксидаза (NOX) – трансмембранний ензим, нещодавно виявлений у тромбоцитах, має важливе значення для регуляції клітинних сигнальних шляхів. Активність NOX тромбоцитів контролюється агоністами рецепторів, дія яких підпадає під модулювальний вплив NOX. У цьому огляді увагу зосереджено на оцінці участі останнього в аутокринній та паракринній регуляції процесів активації, агрегації, секреції, синтезу білків і рекрутування тромбоцитів під час утворення тромбу. Обговорюється можливість залучення NOX до формування комунікативного зв'язку між сусідніми клітинами, а також до регуляції узгодженої відповіді субпопуляції тромбоцитів на тромбогенний стимул.*

*Ключові слова: тромбоцити, NADPH-оксидаза, рецептори, редокс-сигналізація.*

### ВСТУП

Тромбоцити відіграють важливу роль у підтриманні гемостазу, репарації судинної стінки та розвитку тромбозів у разі порушення механізмів тромбоутворення. За звичайних умов тромбоцит циркулює у кровотоці в неактивному стані, не вступаючи в контакт з іншими клітинами. Під дією гемодинамічного удару чи інших пошкоджень ендотелію вмикаються гемостатичні механізми, спрямовані на попередження крововиливів і репарацію судинної стінки. Тромбоцити активуються, фіксуються в місці пошкодження, утворюють нерозчинні згустки та продукують гуморальні регулятори гемостазу. Отже, ініціація тромбоутворення супроводжується зміною функціонального стану тромбоцитів, які набувають здатності до адгезії, агрегації та секреції біологічно активних сполук. Система активації тромбоцитів потребує складної регуляції, модулюється численними факторами та координує різні клітинні сигнальні шляхи. На відміну від інших клітин тромбоцити не мають ядра, тому не можуть формувати клітинну від-

© С.А. Таланов, Т.І. Ляшенко, І.І. Паталах

повідь на рівні регуляції генів-виконавців. Утім, вони зберігають здатність до білкового синтезу за участю мРНК мегакаріоцитів, частина клітинних білків існує в секреторних гранулах як резервний пул. Регуляторні механізми залучення цих білків до підтримки функціональної активності тромбоцитів нині ретельно вивчаються [22, 24, 28]. Зокрема, накопичуються експериментальні дані щодо важливої ролі активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА) як медіаторів вхідних та вихідних сигналів, задіяних у змінах функціонального стану тромбоцитів через аутокринні та паракринні механізми регуляції сигнальних білків та білків-рецепторів [9, 10, 12, 27]. По новому висвітлюється роль NADPH-оксидази (NOX), нещодавно виявленої на плазматичній мембрані тромбоцитів.

NOX тромбоцитів належить до унікальної родини оксидоредуктаз, які транспортують електрони через плазматичні мембрани та продукують супероксид-аніон ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). На відміну від фагоцитувальних клітин, NOX тромбоцитів утворює  $\cdot\text{O}_2^-$  у низьких концентраціях, недостатніх для забезпечення бакте-

рицидної функції. Донедавна, функціональне призначення цієї властивості тромбоцитів та інших нефагоцитувальних клітин залишалося неясним. Нині з'явилася значна кількість фактів, підтверджених експериментально, які свідчать про важливу участь NOX у регуляції активації тромбоцитів. Зокрема, доведено, що активність NOX тромбоцитів контролюється агоністами рецепторів, дія яких у свою чергу підпадає під модульовальний вплив NOX [5, 6, 8, 32, 33]. У цьому огляді увагу зосереджено на особливостях регуляторної дії NOX на сигналізацію тромбоцитів як без'ядерних клітин, а також розглянуто шляхи залучення NOX до аутокринної та паракринної регуляції взаємодії агоніста та рецептора під час активації тромбоцитів, її впливу на агрегацію та рекрутування інтактних клітин до процесу тромбоутворення.

#### *Структура та функції NOX тромбоцитів.*

Докази щодо експресії NOX у тромбоцитах уперше з'явилися на початку 90-х, коли було доведено, що дифенілен йодонію хлорид (від англ. diphenylene iodonium chloride, DPI) – низькоспецифічний інгібітор флавіновмісних ферментів – пригнічує агрегацію тромбоцитів [31]. Пізніше кількома незалежними групами дослідників було виявлено гальмування продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  в тромбоцитах під дією DPI. Наявність NOX у лізатах тромбоцитів була підтверджена ідентифікацією її субодиниць: спочатку p22<sup>phox</sup> і p67<sup>phox</sup> [21, 32], а пізніше gp91<sup>phox</sup> та p47<sup>phox</sup> [26, 29]. Доведено, що каталітична субодиниця gp91<sup>phox</sup> (ізоформа NOX2) та регуляторна субодиниця p22<sup>phox</sup> утворюють ензиматично активний домен цитохрому b558, резидентно розташований на плазматичній мембрані [4]. Локалізацію NOX підтверджено в дослідях з апоциніном – інгібітором асоціації її цитозольних субодиниць з мембранними [4], яка здійснюється в процесі активації тромбоцита. Зокрема, внаслідок дії зовнішнього стимулу дві цитозольні регуляторні субодиниці p47<sup>phox</sup> та p67<sup>phox</sup> та маленький G-протеїн Ras транслокуються на внутрішню поверхню

плазматичної мембрани з наступною їхньою асоціацією з цитохромом b558. Переміщення p47<sup>phox</sup> на мембрану є також сигналом для приєднання до NOX2 маленької цитозольної субодиниці p40<sup>phox</sup>. Асоційовані субодиниці утворюють активний ензимний комплекс, здатний генерувати  $\cdot\text{O}_2^-$  у примембранному просторі завдяки перенесенню електронів з цитозольного NADPH (донор електронів) на екзосайти NOX. На цьому етапі відбувається одноелектронне відновлення молекул кисню, тимчасово приєднаних до гему білкового комплексу NOX:



Слід зазначити, що NOX2 є індукцибельним ензимом [13, 19]. Оскільки тромбоцити є без'ядерними клітинами, додаткова експресія NOX2 відбувається на посттранскрипційному рівні. Нещодавно було встановлено, що тромбоцити здатні протягом певного часу зберігати білоксинтетичний потенціал завдяки наявності великого пулу відповідних мРНК та діючих полірибосом. Зокрема, NOX, продукуючи  $\text{H}_2\text{O}_2$ , підсилює експресію власної субодиниці p22<sup>phox</sup>, що забезпечує пролонговану активацію ензиму [1]. Активаторами NOX є також фактори росту та індуктори запалення, хемотактичні пептиди, форболові ефіри та опсонізовані частки [4].

На відміну від імунокомпетентних клітин (нейтрофіли, лімфоцити), де NOX утворює  $\cdot\text{O}_2^-$  у високій концентрації (до 0,1 моль/л) концентрація утвореного  $\cdot\text{O}_2^-$  у тромбоцитах значно нижча ( $10^{-6}$  моль/л) і недостатня для виконання бактерицидної функції [20, 21].

Численними дослідженнями встановлено, що фізіологічна функція NOX2 полягає в регуляції редоксчутливих сигнальних шляхів згенерованими нею АФК, які модулюють амплітуду і напрямок редокс-сигналів [16, 25]. Унікальність NOX як рецептора полягає в здатності розпізнавати зовнішні стимули, які дуже розрізняються за природою та інтенсивністю. Встановлено, що NOX реагує на широкий спектр хімічних, фізичних і біологічних факторів [16]. Вважають, що її

основна функція – це генерування «сигналу тривоги», який змушує клітини або адаптуватися до умов стресу, або перейти до апоптозу. Механізм специфічного розпізнавання природи стимулу й адекватні зміни активності NOX пов'язують зі здатністю до диференційованої експресії її окремих субодиниць. Цитокіни, фактори запалення, гормони, фізичні фактори та фармакологічні сполуки можуть здійснювати up- чи down-регуляцію рівня mRNA окремих субодиниць NOX через сенсорний білок протеїнкіназу С та NF-κB-залежний сигнальний шлях [17].

Первинним медіатором такого сигналу є  $\cdot\text{O}_2^-$ , який накопичується у позамембранному просторі та швидко перетворюється на перекис водню у реакціях спонтанної або СОД-залежної дисмутації. Новоутворений  $\text{H}_2\text{O}_2$  як більш стабільна АФК здатний змінювати редокс-потенціал плазми. Втім, частина перекису обов'язково повертається до клітини, долаючи плазматичну мембрану за допомогою дифузії або аніонного транспорту (рис. 1).

Включаючись у редоксзалежну клітинну сигналізацію,  $\text{H}_2\text{O}_2$  може безпосередньо інгібувати тирозинові протеїнфосфатази, активувати тирозинові протеїнкінази та деякі редоксчутливі фактори транскрипції, модулювати функції іонних каналів [4].

*Аутокринна регуляція активності NOX тромбоцитів.* Показано [2], що приєднання ліганду (зокрема, тромбіну чи колагену) до активованого рецептора призводить до фосфорилування цитозольних (розчинних) субодиниць  $\text{p67}^{\text{phox}}$  та  $\text{p47}^{\text{phox}}$  фосфатидилінозитол-3-кіназою (PI3-K) та протеїнкіназою С відповідно. Фосфорилування спонукає  $\text{p67}^{\text{phox}}$  та  $\text{p47}^{\text{phox}}$  до транслокації на внутрішню поверхню плазматичної мембрани. Активна форма NOX утворюється приєднанням  $\text{p67}^{\text{phox}}$  до Rac1/2, а  $\text{p47}^{\text{phox}}$  – до субодиниці  $\text{p22}^{\text{phox}}$ .

Для NOX2 нейтрофілів показано, що фосфорилування цитозольних субодиниць NOX залежить від природи агоніста. Дія одних агоністів спричинює швидку (протягом

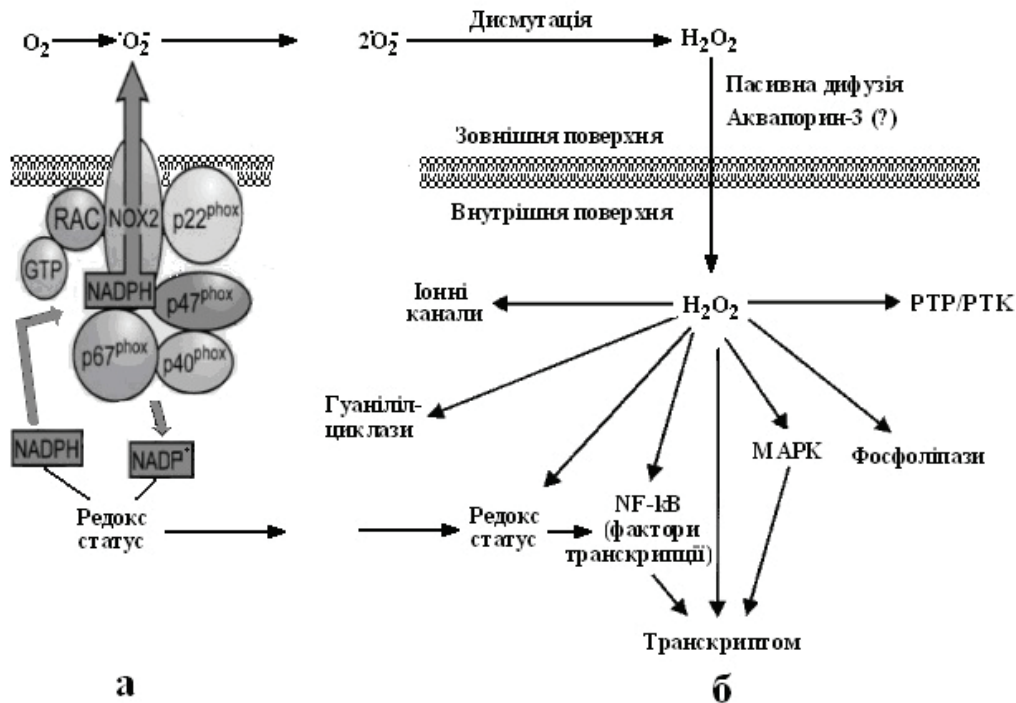


Рис. 1. NOX2-залежна вихідна – inside-out (а) та вхідна – outside-in (б) сигналізація тромбоцитів

3–5 хв) активацію NOX. Інші агоністи забезпечують пролонговану активацію NOX, яка розвивається протягом 15–60 хв [17]. Показано, що швидкість активації NOX пов'язана зі ступенем фосфорилування цитозольних субодиниць і вибірковістю їх залучення до асоціації на плазматичній мембрані. Зокрема, за асоціацію цитозольних субодиниць на мембрані зазвичай відповідає фосфорильована субодиниця p47<sup>phox</sup>, отже, саме ступінь фосфорилування p47<sup>phox</sup> корелює з ригідністю агоністів повільної дії. Натомість, активація NOX таким агоністом швидкої дії, як тромбоцитарний фактор (PAF) здійснюється за допомогою більш повного фосфорилування p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> та Rac2 та взагалі не потребує фосфорилування та транслокації p47<sup>phox</sup> [17]. Напевно, регуляція NOX2 тромбоцитів може мати свої особливості, проте наведений приклад дає змогу окреслити потенційні механізми агоністзалежної продукції АФК, зумовленої процесом вибіркового фосфорилування й транслокації цитозольних субодиниць оксидази на плазматичну мембрану.

У свою чергу тривалий контакт з низькими концентраціями  $\cdot\text{O}_2^-$  сенсibiliзує реакцію тромбоцитів на тромбін. Подібна узгодженість указує на синергію активаторної дії  $\cdot\text{O}_2^-$  та агоністів рецепторзалежної агрегації. Пронаявність описаного синергічного ефекту свідчать експериментальні дані щодо пригнічення інгібіторами PI3-кінази та протеїнкінази С продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  з поверхні тромбоцитів, активованих тромбіном [9].

У клітині NOX-продуковані АФК залучаються до системи сигнальної трансдукції за участі редоксчутливих посередників. Насамперед це стосується регуляції балансу тирозинових протеїнфосфатаз і протеїнкіназ, що стабілізує фосфорильований стан PI3-кінази, протеїнкінази С та інших сигнальних білків, які реципрокно підтримують активний стан NOX.

Вважають, що першою ланкою, чутливою до конформаційних змін інтегринових рецепторів, а також рецепторів GPCR (від англ. G-protein coupled receptors), є протеїнкіназа

з родини Src [7]. Src притаманна двофазна активація: перша фаза (слабка рання активація) – редоксnezалежна, зумовлена формуванням фокального контакту з активованим рецептором; друга фаза (потужна завершена активація) потребує окиснення двох редоксчутливих залишків цистеїну та утворення дисульфідного зв'язку. Протягом першої фази з участю протеїнфосфатази дефосфорильовується залишок тирозину в С-кінцевій ділянці Src та утворюється «відкрита» конформація (рис. 2,а), що забезпечує доступ до тирозину в активному центрі та його аутофосфорилування.

Як відомо, на першій фазі активації тромбоцити неспроможні самостійно підтримати адекватне збудження сигнальної мережі для формування клітинної відповіді. Воно відбувається протягом другої фази, яка збігається з етапом пізньої адгезії тромбоцитів, протягом якого підсилюється дія агоністів і суттєво збільшується продукція АФК. Саме на цьому етапі відбувається пряме окиснення Src та утворюється її максимально активна конформація завдяки формуванню S-S-зв'язку (див. рис. 2,б). За умов підсилення продукції ендогенних АФК Src кіназа може також переходити в максимально активний стан за лігандnezалежним механізмом (див. рис. 2, I та II) та конститутивно підтримувати процеси фосфорилування інших протеїнкіназ. Зокрема, кіназа Src може регулювати активність NOX через позитивну редокс-регуляцію ГТФази Rac1 (див. рис. 2,в), тим самим стабілізуючи власну гіперактивність за рахунок підвищення вмісту клітинних АФК (див. рис. 2, II).

*Аутокринна NOX-залежна регуляція функціональної активності тромбоцитів.* Порівнюючи активність кількох АФК-генеруючих оксидоредуктазозалежних систем тромбоцитів, короткочасно (протягом 1 хв) стимульованих тромбіном, Begonia та співавт. [5] з'ясували, що дихальний ланцюг мітохондрій, ксантин-оксидаза та NO-синтаза майже не змінюють рівень цитозольного пулу АФК, тоді як активація циклооксигенази (COX) та NOX суттєво його збільшує. COX та NOX

діють незалежно, забезпечуючи приблизно однаковий внесок у зміни кількості  $\cdot\text{O}_2^-$  в стимульованій клітині. Важливо, що тільки та частка цитозольного  $\cdot\text{O}_2^-$ , яку продукує NOX (але не COX), має проагрегаційний вплив на тромбоцити, стимульовані тромбіном. Встановлено, що активація NOX, індукована тромбіном, призводить до прямого підсилення активності інтегринового рецептора  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  та не впливає на зміни форми стимульованих клітин, на ступінь фосфорилування легкого ланцюга міозину, на активацію білка RhoA, а також майже не діє на секрецію  $\delta$ - та  $\alpha$ -гранул [5]. Короткотривалий контакт з агоністами (тромбіном, АДФ, нефізіологічними аналогами тромбоксану A2 та колагену) не підсилює АФК-продукуючу здатність тромбоцитів [5].

Більш тривала стимуляція тромбіном (протягом 15 хв) супроводжувалася нако-

пиченням АФК у позамембранному середовищі, тоді як конвулксин (аналог колагену, ліганд для рецептора GP VI) підвищував вміст цитозольних АФК. Антиоксиданти та інгібітори NOX суттєво знижували вміст тромбін-залежну продукцію АФК та пригнічували секрецію з  $\alpha$ -гранул [3], що свідчить про залучення NOX до регуляції секреторної функції тромбоцитів.

NOX також здатна підсилювати агрегацію та секрецію, ініційовані стимульованим рецептором GP VI, бо NOX-продукований  $\cdot\text{O}_2^-$  підвищує афінність рецептора до колагену [2].

Як відомо, агрегація тромбоцитів, активованих слабкими агоністами, стримується протилежно спрямованим механізмом дезагрегації, який зумовлено насамперед інгібіторною дією ендогенного NO. Останній

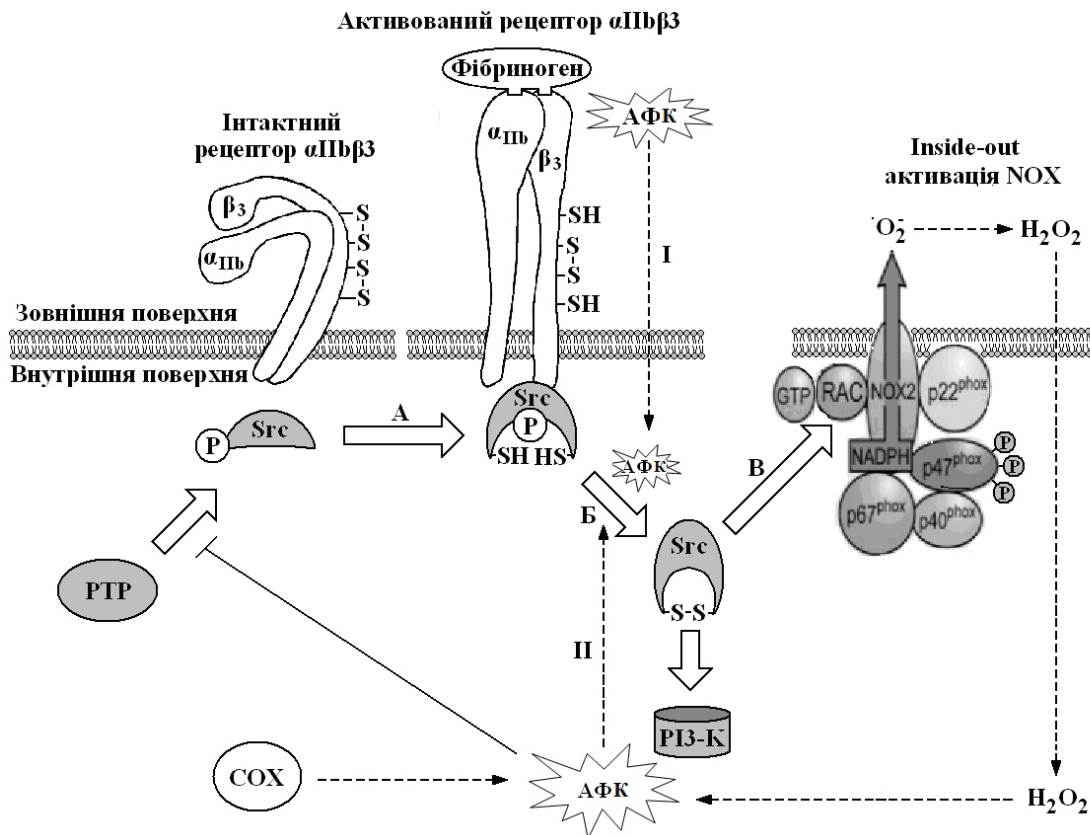


Рис.2. Уявна схема NOX-залежної сигналізації тромбоцитів на етапі розпізнавання зовнішнього сигналу (ліганд – фібриноген, рецептор – інтегрин  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ). Пояснення у тексті.

накопичується в цитозолі внаслідок активності NO-синтази (NOS) та впливає на агрегацію через сигнальну систему цГМФ/РКГ. Встановлено, що цГМФ/РКГ-шлях здійснює бімодальний вплив на процес активації тромбоцитів: через вихідну активацію рецепторів адгезії низькими концентраціями та їх пригнічення високими концентраціями протеїнкінази G (РКГ) [23]. Зростання вмісту  $\cdot\text{O}_2^-$  у тромбоцитах сприяє процесу адгезії та агрегації, відмінюючи дію NO. До того ж, пероксинітрит, продукт дисмутації  $\cdot\text{O}_2^-$  та NO, є набагато потужнішим прооксидантом, ніж власне  $\cdot\text{O}_2^-$ , він здатний підсилювати продукцію АФК вже агрегованими тромбоцитами.

Вирішальну роль у регуляції агрегації–деагрегації відіграє РІЗ-кіназа, активність якої контролює протеїнкіназу С [9]. РІЗ-кіназа через downstream-регуляцію підтримує баланс активностей NOX та NOS. У цьому тандемі NOX виступає активатором процесів агрегації/секреції тромбоцитів, NOS – інгібітором цих подій. NOS-залежна протидія агрегації обмежується тим суттєвіше, чим вищою є активність NOX та чим значніше проявляється нейтралізуючий вплив  $\cdot\text{O}_2^-$  на NO [15]. Крім того, за певних патологічних умов (низький вміст субстрату L-аргініну) NOS може перемикатися на продукцію  $\cdot\text{O}_2^-$  замість NO. Підсилення продукції АФК та АФА ампліфікує реакції послідовного фосфорилування низки сигнальних білків, задіяних у вихідній регуляції інтегрину  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Останній є рецептором, який відіграє провідну роль у процесах адгезії та агрегації як головний первинний медіатор контактзалежної сигналізації тромбоцитів. Активація тромбоцитів таким потужним агоністом, як тромбін, вмикає фосфоінозитидзалежний метаболічний каскад, що забезпечує агоністзалежну стабілізацію активної форми  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . З цього моменту агрегація стає незворотною.

NOX-залежна продукція АФК може пригнічувати активність цитозольних фосфатаз і стабілізувати фосфорильований стан низки цитоскелетних білків, таких, як талін. Талін,

активованій фосфорилуванням, приєднується до цитоплазматичного домену  $\beta_3$  та спричинює конформаційні зміни в структурі інтегринового рецептора  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Наслідком цих конформаційних перебудов є роз'єднання цитоплазматичних «хвостів» трансмембранних доменів  $\alpha_{\text{IIb}}$  і  $\beta_3$  та олігомеризація ектодоменів, які, з'єднуючись, формують сайт зв'язування для фібриногену (див. рис. 2) [38]. Активація  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  компетентними лігандами призводить спочатку до змін конформації рецепторів (афінна модуляція), а потім (не завжди) до їхньої кластеризації (авідна модуляція) [34]. Набута структурна перебудова рецептора надає йому властивості сигнальної молекули, бо приєднання ліганду ініціює низку реакцій фосфорилування, починаючи з залишків тирозину у короткому внутрішньоклітинному хвості  $\beta_3$ -інтегрину – складової частини лігандзв'язувальної ділянки.

Доведено, що етап формування вхідного сигналу від рецептора  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  є редоксчутливим, бо підвищення вмісту АФК полегшує активацію (передактивацію) рецептора. Показано, що  $\text{H}_2\text{O}_2$  (400–900 мкмоль/л) підсилює фосфорилування тирозину субодиниці  $\beta_3$  через пригнічення активності протеїнфосфатази [14], та перебудову тіолдисульфідних внутрішньомолекулярних зв'язків.

Отже, афінна модуляція є тригером вхідних сигналів, які швидко розповсюджуються та розгалужуються протягом зворотної фази агрегації. Під контролем цих сигналів зокрема знаходяться процеси білкового синтезу та дегрануляції (секреції) тромбоцитів.

Вважають, що виконавчими елементами механізму активації NOX можуть бути як ферментативні так і неферментативні антиоксиданти. Зокрема, тромбоцити експресують антиоксидантні ферменти не лише для захисту в умовах оксидативного стресу, але й для їхнього залучення до аутокринної редокс-регуляції. Одним із таких ферментів-антиоксидантів є глутатіон-пероксидаза (GPx). Використовуючи глутатіон (GSH) як косубстрат, GPx відновлює  $\text{H}_2\text{O}_2$  до води

та підвищує рівень окисненого глутатіону (GSSG) [12]. За певних умов у тромбоцитах утворюється  $\cdot\text{O}_2^-$  NOX- чи COX-залежним шляхом. Цитозольний  $\cdot\text{O}_2^-$  може безпосередньо взаємодіяти з GSH і, в ході ланцюгової реакції, утворювати GSSG та додатковий  $\cdot\text{O}_2^-$  [36, 37]. Таким чином,  $\cdot\text{O}_2^-$  та GPx здатні знижувати GSH/GSSG-рівновагу, яка є визначальною для редокс-регуляції функціональних білків. Збереження редокс-гомеостазу клітини забезпечується ферментом глутатіонредуктазою через реакцію відновлення GSSG до GSH. Відновлення GSH потребує витрачання цитозольного NADPH. Регулюючи вміст NADPH та NADPH-опосередкований рівень тіювання сигнальних білків, NOX може контролювати процеси трансляції та посттрансляційної модифікації білків у тромбоцитах. За нормальних умов у клітинному середовищі GSH/GSSG є високим (~100/1), тому сульфгідрильні групи білків знаходяться у відновленій формі (-SH) [11]. Показано, що зміна редокс-балансу в бік зниження внутрішньоклітинного GSH/GSSG підвищує чутливість тромбоцитів до активуючих агентів [35]. Напевно, протидія антиоксидантів, спрямована на нейтралізацію АФК у клітинному просторі, забезпечує NO-незалежний шлях регуляції активності NOX [10, 12].

*Паракринна регуляція та рекрутування тромбоцитів.* Збільшується число експериментальних фактів, які свідчать про значне підвищення вмісту АФК у позаклітинному просторі після стимуляції тромбоцитів колагеном чи тромбіном. Подібний ефект спричиняють також певні медіатори активації клітин крові та судинної стінки. Зокрема, медіатор запалення фактор некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) стимулює продукцію АФК тромбоцитами. Гіпертонія також супроводжується посиленням утворення тромбоцитарних АФК [10].

Доведено, що витік  $\cdot\text{O}_2^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$  з поверхні тромбоцитів під впливом агоністів вимірюється наномольними кількостями та зумовлений активністю NOX [1, 21]. Показано, що

короткотривала (1 хв) дія таких агоністів, як тромбін, конвулксин, синтетичний аналог  $\text{TXA}_2$  та АДФ не супроводжувалась продукуванням АФК у позаклітинний простір [6]. Лише колагенстимульовані тромбоцити підсилюють здатність NOX утворювати  $\cdot\text{O}_2^-$  на зовнішній поверхні плазматичної мембрани. Не впливаючи на колагенові рецептори,  $\cdot\text{O}_2^-$  сприяє підвищенню позаклітинного вмісту та посиленню аутокринної дії АДФ. Цей агоніст у низькій концентрації (1 мкмоль/л) здатен індукувати лише зворотну агрегацію тромбоцитів, наявність  $\cdot\text{O}_2^-$  забезпечує повну незворотну агрегацію тією самою кількістю АДФ [21].

Більш тривалі експозиції із застосуванням синтетичних стимуляторів (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) або кальцієвий іонофор A23187) дозволили виявити достовірне підвищення вмісту  $\cdot\text{O}_2^-$  на 20-й та 30-й хвилини від початку впливу, який протягом години зростав в 2 і 3 рази відповідно для TPA і A23187 [32]. Порівняння у часі кінетики агрегації та генерації агоністіндукованих АФК довело, що вони вивільнюються наприкінці агрегації.

Цікаво, що тромбоцити, стимульовані колагеном, починають агрегувати через 1–2 хв після контакту з агоністом, а початок активації NOX припадає на третю–п'яту хвилину. Отже, роль NOX в ініціації агрегації має бути мінімальною, втім її внесок зростає на останніх етапах тромбоутворення, де NOX забезпечує незворотну агрегацію та стабілізацію тромбів. Вочевидь, виділені під час агрегації вільнорадикальні сполуки впливають більшою мірою на незадіяні тромбоцити, які наближаються до місця утворення тромбу. Це явище відомо як «рекрутування» тромбоцитів [21].

Відтерміноване у часі зростання вмісту АФК, які генерує NOX у плазму крові, напевно, має вирішальне значення саме для паракринної регуляції агрегації. Слід зауважити, що агрегація тромбоцитів *in vitro* є процесом, що відбувається за принципом

«все або нічого», в якому всі тромбоцити дають відповідь одночасно. Це підтверджує, що речовини, секретовані вже під час агрегації, слабо впливатимуть на популяцію тромбоцитів, яка їх продукує, тобто втрачають функцію аутокринних регуляторів.

Підсумовуючи, варто зазначити, що сукупність встановлених на сьогодні експериментальних фактів указує на можливе існування ще однієї, досі невисвітленої функції NOX. Очевидно, що кількість  $\cdot\text{O}_2^-$ , продукованого NOX в позаклітинний простір, стехіометрично пов'язана з концентрацією відновлених еквівалентів у клітині (NADH та NADPH). Отже, субстратзалежні зміни активності NOX і, відповідно, позаклітинного вмісту  $\cdot\text{O}_2^-$ , можуть бути способом передачі вихідної інформації про редокс-стан клітини. Сума редокс-сигналів окремих клітин, змінюючи загальний окисно-відновний фон позаклітинного середовища, створює своєрідний міжклітинний комунікаційний простір. Таким чином, можна очікувати, що вміст  $\cdot\text{O}_2^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$ , транслюкованих назад у клітину, буде нести інформацію про редокс-стан мікросередовища та розташованих поряд клітин. На нашу думку, цей гіпотетичний механізм має бути винятково важливим для забезпечення паракринного комунікативного зв'язку між сусідніми клітинами та для узгодженої одночасної відповіді субпопуляції тромбоцитів на тромбогенний стимул. До подібного способу комунікації, імовірно можуть залучатись інші клітини крові та судинної стінки. Треба відмітити, що перші спроби розглянути організацію «оркестру» міжклітинних взаємодій з урахуванням редокс-системи плазматичних мембран та залученням редокскомпетентних гуморальних факторів вже з'являються в сучасній науковій літературі [18, 30].

На жаль, незважаючи на значні досягнення в пошуках ефективних регуляторних мішеней для терапевтичного втручання в процес тромбогенезу, нині ця проблема залишається відкритою. Новітні уявлення про спектр властивостей NOX та особливості її регуляції на

плазматичній мембрані тромбоцитів мають стати підґрунтям для принципово інших терапевтичних підходів, заснованих на контролі активності цього ферменту та її корекції. Можливо, застосування цих підходів дасть змогу реабілітувати антиоксидантну терапію, з якою було пов'язано багато сподівань, не реалізованих і до цього часу.

**С.А. Таланов, Т.И. Ляшенко, И.И. Паталах**

## **РОЛЬ NADPH-ОКСИДАЗЫ В ПАРАКРИННОЙ И АУТОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ**

NADPH-оксидаза (NOX) – трансмембранный фермент, недавно обнаруженный в тромбоцитах, рассматривается в контексте ее ведущего значения для регуляции клеточных сигнальных систем. Активность NOX тромбоцитов контролируется агонистами активации рецепторов, действие которых в свою очередь подвергается модулирующему влиянию NOX. В данном обзоре внимание сосредоточено на оценке участия NOX в аутокринной и паракринной регуляции процессов активации, агрегации, секреции, синтеза белков и рекрутирования тромбоцитов при формировании тромба. Обсуждается возможность участия NOX в формировании коммуникативной связи между соседними клетками, а также в координации ответа субпопуляции тромбоцитов на тромбогенный стимул.

Ключевые слова: тромбоциты, NADPH-оксидаза, рецепторы, редокс-сигналинг.

**S.A. Talanov, T.I. Lyashenko, I.I. Patalakh**

## **THE ROLE OF NADPH-OXIDASE IN PARACRINE AND AUTOCRINE REGULATION OF PLATELET FUNCTIONAL ACTIVITY**

NADPH-oxidase (NOX) is a novel transmembrane enzyme that appears to have pivotal role in the control of platelet signal pathways. The NOX activity in platelets is controlled by agonist receptors activation, which, in turn are modulated by NOX. This review focuses on participation of NOX in autocrine and paracrine regulation of platelet activation, aggregation secretion, protein synthesis and cell recruitment processes during thrombus formation. Possible involving of NOX in the cell-to-cell communication and coordination in response to thrombogenic stimulus is discussed.

Key words: platelet, NADPH-oxidase, reactive oxygen species, ROS-signaling.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;*

*Київ. міськ. центр крові;*

*Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ardanaz N., Pagano P.J. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction // *Exp. Biol. Med.* – 2006. – **231**, № 3. – P.237–251.
2. Arthur J.F., Gardiner E.E., Kenny D. Platelet receptor redox regulation // *Platelets.* – 2008. – **19**, № 1. – P. 1–8.
3. Bakdash N., Williams M.S. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – 45, № 2. – P. 158–166.
4. Bedard K., Krause K.-H. The NOX-family of ROS-generating NADPH oxidase: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**, № 1. – P. 245–313.
5. Begonja A.J., Gambaryan S., Geiger J. Platelet NAD(P)H-oxidase generated ROS production regulates  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway // *Blood.* – 2005. – **106**, № 8. – P. 2757–2760.
6. Begonja A.J., Teichmann L., Geiger J. Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS // *Blood Cells, Mol. Dis.* – 2006. – **36**, № 2. – P. 166–170.
7. Chiarugi P. Src redox regulation: there is more than meets the eye // *Mol. Cells.* – 2008. – 26, № 4. – P. 329–337.
8. Chlopicki S., Olszanecki R., Janiszewski M. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2004. – **6**, № 4. – P. 691–698.
9. Clutton P., Miermont A., Freedman J.E. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**, № 1. – P. 187–192.
10. Essex D.W. Redox Control of Platelet Function // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – 11, № 5. – P. 1191–1225.
11. Essex D.W., Li M., Feinman R.D., Miller A. Platelet surface glutathione reductase-like activity // *Blood.* – 2004. – **104**, № 5. – P. 1383–1385.
12. Freedman J.E. Oxidative stress and platelets // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – **28**. – P. 11–16.
13. Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S.J., Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of NADPH oxidase // *Cell.* – 2003. – **113**, № 3. – P. 343–355.
14. Irani K., Pham Y., Coleman L.D. et al. Priming of platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of beta3 // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**, № 11. – P. 1698–1706.
15. Iuliano L., Colavita A.R., Leo R., Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – **22**, № 6. – P. 999–1006.
16. Jiang F., Zhang Y., Dusting G. J. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – **63**, № 1. – P. 218–242.
17. Jin S., Zhou F., Katirai F., Li P.-L. Lipid Raft Redox Signaling: Molecular Mechanisms in Health and Disease // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – **15**, № 4. – P. 1043–1083.
18. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – 295, № 4. – P. C849–C868.
19. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signaling // *Cell. Signal.* – 1999. – **11**, № 1. – P. 1–14.
20. Krötz F., Sohn H., Pohl U. Reactive oxygen species: players in platelets game // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**, № 11. – P. 1988–1996.
21. Krötz F., Sohn H.Y., Gloe T. NAD(P)H-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment // *Blood.* – 2002. – **100**, № 3. – P. 917–924.
22. Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – **30**, № 12. – P. 2341–2349.
23. Li Z., Zhang G., Marjanovic J.A. A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, № 41. – P. 42469–42475.
24. Lindemann S, Gawaz M. The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2007. – **33**, № 2. – P.144–150.
25. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. et al. ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci.* – 2011. – **16**, № 6. – P. 300–309.
26. Nardi M., Feinmark S.J., Hu L. Complement-independent Ab-induced peroxide lysis of platelets requires 12-lipoxygenase and a platelet NADPH oxidase pathway // *J. Clin. Invest.* – 2004. – **113**, № 7. – P. 973–980.
27. Naseem K.M, Bruckdorfer K.R. Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets // *Biochem. J.* – 1995. – **310** (Pt 1). – P. 149–153.
28. Piersma S.R., Broxterman H.J., Kapci M. Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate // *J. Proteomics.* – 2009. – **72**, № 1. – P. 91–109.
29. Pignatelli P., Sanguigni V., Lenti L. gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand // *Circulation.* – 2004. – **110**, № 10. – P. 1326–1329.
30. Principe D.D., Frega G., Savini I. The plasma membrane redox system in human platelet functions and platelet-leukocyte interactions // *Thromb. Haemost.* – 2009. – **101**, № 2. – P. 284–289.
31. Salvemini D., Radziszewski W., Mollace V. Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – **199**, № 1. – P. 15–18.
32. Seno T., Inoue N., Gao D. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production // *Thromb. Res.* – 2001. – **103**, № 5. – P. 399–409.
33. Stef G., Csiszar A., Xiangmin Z. Inhibition of NAD(P)H oxidase attenuates aggregation of platelets from high-risk cardiac patients with aspirin resistance // *Pharmacol. Rep.* – 2007. – **59**, № 4. – P. 428–436.
34. Stouffer G.A. and Smyth S.S. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – **23**, № 11. – P. 1971–1978.
35. Van Gorp R.M., Dam-Mieras M.C., Hornstra G., Heemskerk J.W. Effect of membrane-permeable sul-

- thiyl reagents and depletion of glutathione on calcium mobilisation in human platelets // *Biochem. Pharmacol.* – 1997. – 53, № 10. – P. 1533–1542.
36. Winterbourn C.C., Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – 27, № 3-4. – P. 322–328.
37. Winterbourn C.C., Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – 314, № 2. – P. 284–290.
38. Zou Z., Chen H., Schmaier A.A. Structure-function analysis reveals discrete beta3 integrin inside-out and outside-in signaling pathways in platelets // *Blood.* – 2007. – 109, № 8. – P. 3284–3290.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Київ. міськ. центр крові;  
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ  
E-mail: ipatalakh@ukr.net*

*Матеріал надійшов до  
редакції 09.10.2012*