

© Л.В. КРИВОХИЖИНА, С.А. КАНТЮКОВ, Е.Н. ЕРМОЛАЕВА,
Д.Н. КРИВОХИЖИН

ermen33@mail.ru; LVK.77@mail.ru

УДК 616.155.2-073.537

**ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ**

АННОТАЦИЯ. Тромбоциты как в интактном, так и в активированном состоянии способны генерировать активные формы кислорода (АФК). Доказано производство АФК тромбоцитами человека и крыс. Интенсивность генерации АФК можно зарегистрировать методом хемилюминесценции (ХЛ). Метод основан на добавлении в обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) люминола и регистрации хемилюминесценции на хемилюминомере ХЛ-003 с графическим отображением хемилюминограмм на компьютере. Добавление физиологического индуктора агрегации АДФ (аденозин дифосфата) в дозе, используемой для лабораторной оценки агрегации тромбоцитов, увеличивает свечение кровяных пластинок более чем в 2 раза. У крыс, вследствие особенностей их тромбоцитарной агрегации, при исследовании индуцированной ХЛ в пробу вместе с АДФ следует добавлять CaCl₂ (1,0мМ). Таким образом, метод хемилюминесценции тромбоцитов позволяет оценить функциональное состояние интактных (ХЛ в присутствии только люминола) и активированных тромбоцитов (ХЛ в присутствии люминола и АДФ) по их способности продуцировать активные метаболиты кислорода.

SUMMARY. Platelets both in intact and in activated condition are capable of generation of active forms of oxygen (AFO). Production of AFO by platelets of humans and rats is proved. Intensity of AFO generation can be registered with the help of chemiluminescence method (HL). The method is based on addition of luminol into platelet-rich plasma (PRP) and chemiluminescence registration with chemiluminometer HL-003 with a graphical display of chemiluminogram on the computer monitor. Addition of the physiological inducer of aggregation ADP (adenosine diphosphate) in the dose used for laboratory evaluation of platelet aggregation more than twice increases emission. For rats, due to the specific nature of platelet aggregation, it is necessary to add CaCl₂ (1,0 mM) into the sample together with ADP. Thus, the platelet chemiluminescence method allows to estimate the functional condition of intact (HL in the presence of only luminol) and activated platelets (HL in the presence of luminol and ADF) according to their ability to produce active metabolites of oxygen.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Тромбоциты, хемилюминесценция, свободнорадикальное окисление.

KEY WORDS. Platelets, chemiluminescence, free radical oxidation.

Введение. На современном этапе тромбоцит рассматривается как клетка крови, принимающая участие в гемостазе, воспалении, репарации, иммунных реакциях. Активация тромбоцитов является следствием развития каскада сложных взаимосвязанных реакций, приводящих к изменению метаболизма кровяных пластинок и их ультраструктурной реорганизации. К данным механизмам относятся мобилизация и движение ионов, гидролиз инозитольных фосфолипидов, высвобождение и окисление арахидоновой кислоты, изменение метаболизма циклических нуклеотидов, перестройка плазматической мембраны и др. [1-2]. Активация тромбоцитов регулируется и модулируется многочисленными факторами, включая АДФ, серотонин, тромбоксан A_2 , тромбин, коллаген, адреналин и пр. [3]. Внутренние и внешние процессы реорганизации завершаются осуществлением специфических тромбоцитарных функций, таких как гемостатическая, репаративная, защитная и др. [4-5]. Внутриклеточная сигнализация, необходимая для реорганизации цитоскелета и гранулярной секреции, осуществляется через фосфоинозитидный путь [6-7], за счет метаболизма эйказаноидов [8]. Образование эйказаноидов из арахидоновой кислоты катализируется ферментами циклооксигеназами 1 и 2 (ЦОГ1; ЦОГ2). ЦОГ1 вовлечена в тромбоцитарную функцию, ЦОГ2 преимущественно представлена при воспалении. Предполагается, что активные формы кислорода (АФК) являются новыми модуляторами тромбоцитарной активности. Показано, что их экзогенная или внутритромбоцитарная продукция влияет на функцию тромбоцитов [9]. Различные АФК тромбоцитарного происхождения, включая $O_2^{\cdot -}$, HO^{\cdot} , H_2O_2 , выступают в качестве посредников активации пластинок после их стимуляции коллагеном [10].

Процессы свободнорадикального окисления, протекающие с образованием радикалов RO^{\cdot} и RO_2^{\cdot} можно оценивать посредством измерения хемилюминесценции (ХЛ). Биохемилюминесцентный метод не выступает в качестве прямого количественного метода определения свободных радикалов, методом ХЛ непосредственно определяется не концентрация радикалов, а скорость реакции, в которой они образуются. Метод хемилюминесценции обладает тем преимуществом, что, во-первых, он обычно не связан с изменением хода процессов в растворах, клетках или даже целых тканях, где регистрируется свечение, во-вторых, весьма чувствителен при обнаружении именно высокореакционных радикалов кислорода. Собственная хемилюминесценция, сопровождающая биохимические реакции в клетках и тканях, обладает, как правило, очень низкой интенсивностью и получила название «сверхслабого свечения». Поэтому применяются специальные вещества, которые повышают процессы хемилюминесценции. В качестве усилителя применяется люминол — это соединение, вступающее в реакции с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое при этом свечение связано с переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов [11].

Цель исследования: разработать метод определения хемилюминесценции тромбоцитов и оценить интенсивность хемилюминесценции при АДФ — индуцированной агрегации тромбоцитов.

Материалы и методы. Проведены исследования крови здоровых людей-доноров (Тюменская областная станция переливания крови) и крови интактных белых беспородных крыс. Исследования на животных выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия (9:1). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали центрифугированием цитратной крови при 200 g в течение 15 минут при комнатной температуре [12]. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали после отбора из пробирок ОТП и последующего центрифугирования образцов крови при 700 g в течение 30 мин. Количество тромбоцитов в ОТП доводили до 3×10^8 кл/мкл добавлением бедной тромбоцитами плазмы. О генерации активных форм кислорода судили по интенсивности хемилюминесценции тромбоцитов. Исследование выполнено на приборе хемилюминометре ХЛ-003. Результаты регистрировались на компьютере и отображались графически. Достоверность различий между группами рассчитывали по парному *t*-критерию Стьюдента.

Результаты. На первом этапе исследования ставилась задача выявить наличие собственного свечения тромбоцитов методом хемилюминесценции. В качестве опытной пробы брали ОТП доноров с содержанием в ней тромбоцитов 300000 кл/мкл, контролем служили пробы с БТП. Объем ОТП был 5 мл. Для усиления ХЛ добавляли 1 мл рабочего люминола. Люминол (м.в.177) готовят на диметил сульфоксиде из расчета 10^{-4} и хранят в холодильнике. Рабочий раствор готовится из маточного раствора разведением на стерильном физиологическом растворе в 1000 раз (рН 7,0-7,2). Время регистрации ХЛ 30 минут, при медленном перемешивании и температуре в камере прибора 37°C [13].

Хемилюминесценция ОТП и БТП без люминола не имела достоверных различий (табл. 1). Добавление люминола не приводило к достоверному возрастанию ХЛ в БТП, но значительно увеличивало ХЛ в ОТП: максимальная светимость возрастала более чем в 16 раз, а светосумма свечения — более чем в 50 раз. ХЛ в присутствии люминола в ОТП значительно выше по всем параметрам аналогичных показателей в БТП. Таким образом, увеличение светосуммы и максимальной светимости при добавлении люминола обусловлено свободнорадикальными процессами в тромбоцитах.

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции ОТП и БТП

Показатели	Базисное свечение		Свечение в присутствии люминола	
	ОТП	БТП	ОТП	БТП
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Светосумма у.е • мин	$1,72 \pm 0,42$ $p_1 > 0,05$	$1,73 \pm 0,46$	$84,6 \pm 21,1$ $p_2 < 0,01$	$3,20 \pm 0,56$
Макс свет. у.е	$0,55 \pm 0,06$ $p_1 > 0,05$	$0,43 \pm 0,07$	$8,97 \pm 2,56$ $p_2 < 0,01$	$0,60 \pm 0,07$

Примечание: *n* (число наблюдений) — 10; p_1 — различия между ХЛ ОТП и БТП без люминола; p_2 — различия между ХЛ ОТП и БТП в присутствии люминола.

Функциональная активность тромбоцитов сохраняется через 1,5 часа инкубации при 37°C, интенсивность ХЛ клеток практически не изменилась во времени. Показатели светосуммы (до инкубации $84,60 \pm 21,1$ у.е • мин, после инкубации $75,93 \pm 14,6$ у.е • мин $p > 0,05$); максимальной светимости (до инкубации $8,97 \pm 2,56$ у.е., после инкубации $7,18 \pm 1,90$ у.е. $p > 0,05$).

Для определения наработки свободных радикалов кислорода в процессе агрегации тромбоцитов использовали АДФ в качестве индуктора агрегации. Все условия приготовления пробы и регистрация были прежними. АДФ добавляли из расчета 0,5 мл в концентрации 1 мг/мл. Снимали хемилюминесценцию тромбоцитов в присутствии люминола — контроль, затем добавляли АДФ, регистрировали показатели, далее пробы инкубировали 60 минут при 37°C и снова снимали показатели хемилюминесценции (табл. 2).

При активации тромбоцитов АДФ происходит достоверное увеличение светосуммы. Таким образом, АДФ — индуцированная агрегация сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления (СРО) в тромбоцитах. Инкубация активированных тромбоцитов приводила к достоверному снижению ХЛ как максимальной светимости, так и светосуммы свечения.

Таблица 2

Показатели АДФ — индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов в присутствии люминола

показатель	ХЛ контроль	АДФ — индуцированная ХЛ	Через 60 минут инкубации
	М ± m (n=10)	М ± m (n=10)	М ± m (n=10)
Светосумма у.е • мин	84,6 ± 21,1	267,7 ± 47,7 $p < 0,01$	26,05 ± 6,07 $P < 0,05$
Макс свет. у.е	8,97 ± 2,56	14,38 ± 2,8 $p > 0,05$	3,07 ± 0,66 $P < 0,05$

Примечание: p — различия с контрольной группой

Для приготовления 5 мл ОТП требуется около 10 мл цельной крови, что осложняет использование данного метода в повседневной практике и в эксперименте на крысах. Поэтому был разработан метод для 1 мл ОТП. В пробу вносили 1мл ОТП доноров с содержанием в ней тромбоцитов 300.000 кл/мкл; рабочий раствор люминола — 0,1 мл; АДФ — 0,1 мл. Время регистрации 30 минут, без перемешивания, температура 37°C. Показатели ХЛ в присутствии люминола и АДФ-индуцированной хемилюминесценции тромбоцитов (светосумма и максимальная светимость), достоверно выше аналогичных показателей базисной светимости тромбоцитов (табл. 3)

При апробации метода на крысах были использованы аналогичные методические приемы получения тромбоцитов, концентрация тромбоцитов в пробе, доза люминола. Но ОТП разводили до нужной концентрации клеток забуференным физиологическим раствором и вместе с АДФ в пробу добавляли CaCl_2 (1,0 мМ) в объеме 0,1 мл [14]. Температура в камере прибора — 37°C, время регистрации 30 минут. Следует отметить, что без люминола достоверных различий ХЛ между ОТП и БТП не было. Показатели светосуммы (ОТП $0,68 \pm 0,11$ у.е • мин.;

БТП $0,49 \pm 0,05$ у.е • мин; $p > 0,05$) и максимальной светимости (ОТП $0,53 \pm 0,04$ у.е.; БТП $0,45 \pm 0,03$ у.е.; $p > 0,05$). Показатели ХЛ БТП остаются неизменными и не зависят от применения люминола. В присутствии люминола ХЛ тромбоцитов значительно возрастает. Активация тромбоцитов АДФ еще более значимо повышает показатели ХЛ (табл. 4).

Таблица 3

Показатели хемилюминесценции тромбоцитов в пробе объемом 1 мл

Показатель	Базисное свечение	ХЛ в присутствии люминола	АДФ — индуцированная ХЛ тромбоцитов
	М ± m (n=10)	М ± m (n=10)	М ± m (n=10)
Светосумма у.е • мин	$1,20 \pm 0,19$	$7,70 \pm 1,20$ $p_1 < 0,01$	$15,57 \pm 3,23$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$
Макс свет. у.е	$0,39 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,08$ $p_1 < 0,01$	$1,96 \pm 0,99$ $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$

Примечание: p_1 — различия с контрольной группой; p_2 — различия между ХЛ в присутствии люминола и АДФ — индуцированной ХЛ тромбоцитов

Таблица 4

Хемилюминесценции тромбоцитов крыс

Показатель	Базисное свечение	ХЛ в присутствии люминола	АДФ — индуцированная ХЛ тромбоцитов
	М ± m (n=20)	М ± m (n=20)	М ± m (n=20)
Светосумма у.е • мин	$0,68 \pm 0,11$	$12,98 \pm 1,6$ $p_1 < 0,01$	$40,64 \pm 5,33$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$
Макс свет. у.е	$0,53 \pm 0,04$	$3,23 \pm 0,35$ $p_1 < 0,01$	$9,40 \pm 1,17$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$

Примечание: p_1 — различия с контрольной группой; p_2 — различия между ХЛ в присутствии люминола и АДФ-индуцированной ХЛ тромбоцитов

Обсуждение. Известно, что АДФ является основным физиологическим индуктором агрегации. В процессе АДФ — индуцированной агрегации тромбоцитов происходит изменение формы клеток, экспозиция мест связи для фибриногена, первичная обратимая агрегация в присутствии физиологических концентраций Ca^{2+} и конечная десентитизация [15]. После связи АДФ с его рецепторами происходит передача сигнала «изнутри-снаружи», приводящая к доступности рецепторных мест связи в комплексе GPIIb-IIIa (интегрине $\alpha_{IIb}\beta_3$) и обеспечению возможности их связывания с фибриногеном. Существует три основных разновидности АДФ-рецепторов: P2X₁, P2Y₁ и P2Y₁₂. Посредством

разных вторичных мессенджеров эти рецепторы приводят к активации тромбоцитов, изменению их формы, секреции и агрегации. Вторичная агрегация опосредована совокупностью нескольких последующих реакций внутримембранной и внутриклеточной передачи сигнала активации. Эти пути различны для разных рецепторов, с которыми может соединяться АДФ после связи АДФ с P2X₁ рецептором тромбоцитарной плазматической мембраны, происходит быстрое поступление в клетку Ca²⁺, опосредованная стимуляция фосфолипазы A₂ и передача сигнала активации через простагландин-тромбоксановую систему, что может являться одним из путей, обеспечивающих развитие секреции и вторичной агрегации. P2Y₁ АДФ рецептор связан с G белком, который опосредует мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺, изменение формы кровяных пластинок и обратимую агрегацию через активацию фосфатидилинозитольного пути. P2Y₁₂ АДФ рецептор связан с G_{i2} субъединицей, ответственной за ингибицию стимулированной аденилатциклазы, что само по себе не вызывает агрегацию кровяных пластинок, но создает фон, благоприятствующий развитию других реакций активации [1-2], [16]. Наличие в тромбоцитах микропероксида, обеспечивающих эндогенный синтез пероксида водорода и его выделение в кровь в ходе реакции освобождения [17], указывает на важную роль АФК в регуляции агрегации-деагрегации тромбоцитов. В настоящее время цитотоксическое влияние АФК не рассматривается как единственно возможное воздействие на клетки организма. Появилось множество данных о регуляторной роли активных форм кислорода. Установлено, что интактные тромбоциты способны постоянно генерировать супероксидные радикалы [18], и супероксид зависимая активация тромбоцитов важна в физиологических и патологических гемостатических реакциях [19]. Показано, что изменение концентраций АФК в тромбоцитах связано с их функциональной активностью [20]. Функция тромбоцитов может быть нарушена при изменении их окислительного статуса в присутствии антиоксидантов. Указывается, что антиокислители, кроме неспецифических радикально подавляющих механизмов, ингибируют СРО за счет взаимодействия со специфическими белками. Подобная регуляция обозначается как рецептор-редокс регуляция [12], [20]. Таким образом, тромбоциты как в состоянии покоя, так и при АДФ-индуцированной агрегации вырабатывают свободные радикалы, которые можно зарегистрировать методом хемилюминесценции.

Выводы. Регистрация собственного свечения тромбоцитов методом хемилюминесценции в присутствии люминола позволяет оценить исходное состояние тромбоцитов. АДФ — индуцированная активация тромбоцитов усиливает хемилюминесценцию и позволяет судить о функциональном состоянии тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2000. С. 226.
2. Bhatt, D.L., Topol, E.J. Scientific and clinical advances antiplatelet therapy // Nat. Rev. Drug. Discov. 2003. Т. 2. № 1. P. 15-28.
3. Offermanns, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors // Circ Res. 2006. Т. 99. P. 1293-1304.
4. Gibbins, J.M. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation // J. Cell Sci. 2004. Т. 117. P. 3415-3425.
5. Ozaki, Y., Asazuma, N., Suzuki-Inoue, K., Berndt, M.C. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling // J. Thromb Haemostasis. 2005. Т. 3. P. 1745-1751.

6. Jackson, S.P., Yap, C.L., Anderson, K.E. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function // *Biochem. Soc. Trans.* 2004. Т. 32. № 2. P. 387-392.
7. Rittenhouse, S.E. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function // *Blood*. 1996. Т. 88. P. 4401-4414.
8. Caughey, G.E., Cleland, L.G., Gamble, J.R., James, M.J. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets // *J. Biol. Chem.* 2001. Т. 276. P. 37839-37845.
9. Krötz, F., Sohn, H.Y., Pohl, U. Reactive oxygen species—players in the platelet game // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2004. Т. 24. P. 1988-1996.
10. Principe, D., Menichelli, A., Matteis, W. et al. Hydrogen peroxide is an intermediate in the platelet activation cascade triggered by collagen, but not by thrombin // *Thromb. Res.* 1991. Т. 62. P. 365-375.
11. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии*. 2009. Т. 49. С. 341-388.
12. Sobotkova, A., Masova-Chrastinova, L., Suttnar, J. et al. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Т. 47. № 12. P. 1707-1714.
13. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. Уфа, 1995. 90 с.
14. Monteiro, P.F., Morganti, R.P., Delbin, M.A. et al. Platelet hyperaggregability in high-fat fed rats: A role for intraplatelet reactive-oxygen species production // *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. Т. 11. P. 5.
15. Brass, L.F., Manning, D.R., Cichowski, K. et al. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond // *Thromb. Haemost.* 1997. Т. 78. P. 581-589.
16. Jantzen, H.M., Gousset, L., Bhaskar, V. et al. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation // *Thromb. Haemost.* 1999. Т. 81. P. 111-117.
16. Horn, E.H. et al. Longitudinal studies of platelet cyclic AMP during healthy pregnancy and pregnancies at risk of pre-eclampsia // *Clin. Sci.* 1995. Т. 89. P. 91-99.
18. Marcus, A.J., Silk, S.T., Safier, L.B. et al. Superoxide production and reducing activity in human platelets // *J. Clin. Invest.* 1977. Т. 59. № 1. P. 149-158.
19. Handin, R.I., Karabin, R., Boxer, G.J. Enhancement of platelet function by superoxide anion // *J. Clin. Invest.* 1977. Т. 59. P. 959-965.
20. Arthur, J.F., Gardiner, E.E., Kenny, D. et al. Platelet receptor redox regulation // *Platelets*. 2008. Т.19. № 1. P. 1-8.

REFERENCES

1. Shitikova, A.S. *Trombocitarnyj gemostaz* [Thrombocytic Hemostasis]. St. Petersburg, 2000. P. 226 (in Russian).
2. Bhatt, D.L., Topol, E.J. Scientific and clinical advances antiplatelet therapy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003. Т. 2. № 1. P. 15-28.
3. Offermanns, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 2006. Т. 99. P. 1293-1304.
4. Gibbins, J.M. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J. Cell Sci.* 2004. Т. 117. P. 3415-3425.
5. Ozaki, Y., Asazuma, N., Suzuki-Inoue, K., Berndt, M.C. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J. Thromb. Haemostasis*. 2005. Т. 3. P. 1745-1751.
6. Jackson, S.P., Yap, C.L., Anderson, K.E. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem. Soc. Trans.* 2004. Т. 32. № 2. P. 387-392.
7. Rittenhouse, S.E. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood*. 1996. Т. 88. P. 4401-4414.

8. Caughey, G.E., Cleland, L.G., Gamble, J.R., James, M.J. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. *J. Biol. Chem.* 2001. T. 276. P. 37839-37845.
9. Krötz, F., Sohn, H.Y., Pohl, U. Reactive oxygen species—players in the platelet game. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2004. T. 24. P. 1988-1996.
10. Principe, D., Menichelli, A., Matteis, W. et al. Hydrogen peroxide is an intermediate in the platelet activation cascade triggered by collagen, but not by thrombin. *Thromb. Res.* 1991. T. 62. P. 365-375.
11. Vladimirov, Ju.A., Proskurnina, E.V. Free Radicals and Cell Chemoluminescence. *Uspehi biologicheskoy himii — Successes of Biological Chemistry.* 2009. Vol. 49. Pp. 341-388 (in Russian).
12. Sobotkova, A., Masova-Chrastinova, L., Suttner, J. et al. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events. *Free Radic. Biol. Med.* 2009. T. 47. № 12. P. 1707-1714.
13. Farhutdinov, R.R., Lihovskih, V.A. *Hemiljuminiscentnyye metody issledovaniya svobodno-radikal'nogo okisleniya v biologii i medicine* [Chemoluminescence Methods of Research of Free-Radical Oxidation in Biology and Medicine]. Ufa, 1995. 90 p. (in Russian).
14. Monteiro, P.F., Morganti, R.P., Delbin, M.A. et al. Platelet hyperaggregability in high-fat fed rats: A role for intraplatelet reactive-oxygen species production. *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. T. 11. P. 5.
15. Brass, L.F., Manning, D.R., Cichowski, K. et al. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb. Haemost.* 1997. T. 78. P. 581-589.
16. Jantzen, H.M Gousset, L., Bhaskar, V. et al. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb. Haemost.* 1999. T. 81. P. 111-117.
16. Horn, E.H. et al. Longitudinal studies of platelet cyclic AMP during healthy pregnancy and pregnancies at risk of pre-eclampsia. *Clin. Sci.* 1995 T. 89. P. 91-99.
18. Marcus, A.J., Silk, S.T., Safier, L.B. et al. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J. Clin. Invest.* 1977. T. 59. № 1. P. 149-158.
19. Handin, R.I., Karabin, R., Boxer, G.J. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J. Clin. Invest.* 1977. T. 59. P. 959-965.
20. Arthur, J.F., Gardiner, E.E., Kenny, D. et al. Platelet receptor redox regulation. *Platelets.* 2008. T. 19. № 1. P. 1-8.