

УДК 616.155.2

## ПРОГРАММИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2020 А.А. Мартьянов<sup>1,2,3,4</sup>, А.А. Игнатова<sup>2</sup>, Г.С. Свидельская<sup>2</sup>, Е.А. Пономаренко<sup>2</sup>,  
С.П. Гамбарян<sup>5</sup>, А.Н. Свешникова<sup>1,2,3,6</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,  
109029 Москва, Россия; электронная почта: [mapanteleev@yandex.ru](mailto:mapanteleev@yandex.ru)

<sup>2</sup> НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, 117997 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
физический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУН Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

<sup>5</sup> ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет),  
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.07.2020

После доработки 24.07.2020

Принята к публикации 24.07.2020

Программируемая клеточная смерть безъядерных клеток крови – тромбоцитов – при онкологических и онкогематологических заболеваниях может играть важную роль в их патофизиологии. Она вносит вклад как в кровотечения (вызванные тромбоцитопенией, связанной с элиминацией тромбоцитов), так и тромбозы (обусловленные процессами свертывания на мембранах экспрессирующих фосфатидилсерин тромбоцитов). В настоящей работе проведена оценка функциональных характеристик и внутриклеточной сигнализации тромбоцитов пациентов с различными онкологическими заболеваниями, находящихся на химиотерапии, в сравнении с тромбоцитами здоровых доноров, а также тромбоцитами, у которых был индуцирован апоптоз АВТ-737. У ряда пациентов выявлена сниженная способность тромбоцитов к агрегации. Иммунофенотипирование этих тромбоцитов показало их преактивацию по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. Анализ кальциевой сигнализации показал, что в тромбоцитах пациентов, как и в апоптотических, происходит повышение внутриклеточного кальция в покое. Однако умеренность этого повышения и экспрессии фосфатидилсерина предполагает ограниченность процессов апоптоза тромбоцитов, остающихся в циркуляции у исследованной группы пациентов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тромбоциты, апоптоз, химиотерапия, проточная цитометрия, агрегометрия.

DOI: 10.31857/S0320972520100140

### ВВЕДЕНИЕ

Термин «апоптоз» для обозначения программируемой клеточной смерти впервые был предложен J. Kerr в 1972 г. [1], что послужило началом многочисленных исследований определения молекулярных механизмов, вовлеченных в процессы гибели клеток. Первые упоминания о клеточной смерти безъядерных тромбоцитов

начинаются с 1993 г. [2], в то время как каспаз-зависимый апоптоз тромбоцитов был показан в 1997 г. [3]. При этом ранее (в 1994 г.) было убедительно показано, что наличие ядра не является необходимым условием для развития процессов каспаз-зависимого апоптоза в клетке [4]. В тромбоцитах экспрессируются практически все белки, принимающие непосредственное участие в апоптозе [5]. Характерные маркеры и признаки разных видов клеточной смерти сначала обнаружили у тромбоцитов при хранении тромбоконцентратов [6], потом при старении *in vivo* [7], при иммунной тромбоцитопении [8], иных заболеваниях, воздействии определенных препаратов и продуктов, а также при физиологической активации [9]. Сейчас распространенность этих процессов *in vivo* и *in vitro* стала оче-

Принятые сокращения: фосфатидилсерин – PS; Vcl-гомологичный домен 3 – VN3; циклический аденозин монофосфат – cAMP; циклический гуанозин монофосфат – цГМФ; острый лимфобластный лейкоз – ОЛЛ; богатая тромбоцитами плазма – PRP; активируемый протеазами рецептор 1 – PAR1; гликопротеин Ib – GPIb.

\* Адресат для корреспонденции.

видной, но список продолжает пополняться. Так, последние работы указывают на важность апоптоза в процессе жизни артериального тромба и регуляции его стабильности [10].

Однако в существующей сейчас картине есть два зияющих пробела. Первый из них связан с плохим пониманием молекулярных механизмов клеточной смерти тромбоцитов в разных ситуациях. Большинство работ до последнего времени предпочитало термин «апоптоз»; как сейчас понятно, это глубоко некорректно [11]. Выявляется [12–14] как минимум два различных механизма клеточной смерти тромбоцитов с принципиально разной динамикой и регуляцией. Апоптоз тромбоцитов является достаточно медленным процессом (часы), независимым от концентрации кальция в окружающей среде, и, похоже, идущим по классическому внутреннему пути апоптоза до момента активации каспазы-3 [3, 15–17]. Программируемая клеточная смерть тромбоцитов при их физиологической активации, скорее всего, относящаяся к типу митохондриально-зависимого некроза [13, 18], происходит за гораздо более короткие времена (минуты), требует физиологической концентрации внеклеточного кальция и ингибируется циклоспорином А, но не ингибиторами каспаз [17, 19, 20].

Вторая проблема связана со значимостью разных вариантов программируемой клеточной смерти тромбоцитов. Наши последние работы выявили способность умерших тромбоцитов встраиваться в тромбы [21], открыли новый механизм их агрегации [22] и способность стимулировать контактный путь свертывания [23], распространенность апоптотических тромбоцитов при гематологических нарушениях и их корреляцию с кровоточивостью [24]. Показано, что специальные механизмы инактивации адгезивной способности этих тромбоцитов могут быть отрицательными регуляторами тромбообразования [25], в то время как специфическая мембранная структура участвует в реакции свертывания [26]. Однако, хотя роль программируемой клеточной смерти тромбоцитов в норме и патологии сейчас кажется все более важной (если не центральной), прямых доказательств и ясности в этом вопросе еще нет.

Тромбоциты, являясь ключевым звеном гемостаза, в то же время принимают активное участие в иммунных реакциях при воспалительных процессах и в развитии онкологических процессов с образованием метастазов. При активации происходит секреция тромбоцитарных  $\alpha$ -гранул, содержащих факторы роста и хемокины, а также фибриноген, фактор фон Виллебранда, фибронектин и другие важные для систе-

мы свертывания белки [27]. Кроме  $\alpha$ -гранул при активации тромбоцитов также происходит секреция  $\delta$ -гранул (также называемых плотными гранулами), содержащих АДФ, АТФ, серотонин [28]. Тромбоциты образуют агрегаты с раковыми клетками, что пролонгирует рост опухоли, изолируя ее от иммунной атаки, и способствует образованию вторичных очагов опухолевого роста. В свою очередь, раковые клетки и их микрочастицы секретируют прокоагулянтные факторы, которые вызывают активацию тромбоцитов и образование тромбов [29]. Исследование роли тромбоцитов в развитии онкологических процессов и при противоопухолевой терапии в последнее время становится особенно актуальным, поскольку показано нами и другими [12, 15, 16, 30], что многие противораковые препараты могут напрямую действовать на тромбоциты, вызывая их активацию/ингибирование, а также гибель этих клеток, что приводит к тромбоцитопении. Гибель тромбоцитов, сопровождаемая падением митохондриального потенциала, появлением на поверхности клеток фосфатидилсерина (PS), образованием микрочастиц и высвобождением цитохрома *c*, может развиваться по нескольким сценариям, включающим как классический механизм каспаз-зависимого апоптоза, так и механизм каспаз-независимого образования прокоагулянтных тромбоцитов, которые играют существенную роль в коагуляции крови. Одни из наиболее широко применяемых при онкологии крови противоопухолевых препаратов – ингибиторы семейства антиапоптотических белков Bcl-2, которые, наряду с позитивным противоопухолевым эффектом, вызывают глубокую тромбоцитопению, вследствие чего приходится прерывать или прекращать курс химиотерапии. Как в наших работах, так и в работах коллег [12, 15, 31] было показано, что противораковые препараты АВТ-263 (navitoclax) и АВТ-737, являясь ВНЗ-миметиками, индуцируют классический каспаз-зависимый апоптоз тромбоцитов, что приводит к уменьшению циркулирующих в крови клеток.

Еще одним важным фактором, влияющим на гемостаз при онкологических заболеваниях и применении противоопухолевых препаратов, является то, что при этом происходит ингибирование индуцированной агонистами активации тромбоцитов. Из хорошо известных агонистов тромбоцитов изучена только реакция на тромбин и показано, что при каспаз-зависимом апоптозе тромбоциты не активируются тромбином. Однако неизвестно, будут ли эти препараты также ингибировать активацию тромбоцитов, вызванную другими агонистами. Также мало изучен механизм, лежащий в основе ингиби-

рования тромбоцитов при применении противоопухолевых препаратов. Активация системы циклических нуклеотидов (сАМР, сGMP) и соответствующих им протеинкиназ (РКА, PKG), которые фосфорилируют множественные субстраты [32, 33], является одним из основных механизмов, ответственных за ингибирование тромбоцитов. Недавно [15] нам удалось показать, что ингибирование активации тромбоцитов при каспаз-зависимом апоптозе обусловлено активацией РКА. Сама РКА является тетрамером, состоящим из двух регуляторных субъединиц, на которые прикрепляются две молекулы сАМР, и двух каталитических субъединиц. Для активации РКА необходимо присоединение молекул сАМР к регуляторным субъединицам, при этом каталитические субъединицы диссоциируют от регуляторных и РКА активируется. Мы показали, что активация РКА непосредственно коррелирует с активностью каспазы-3. Однако сама каспаза-3 в опытах *in vitro* не приводит к диссоциации каталитической субъединицы. Эти данные указывают на существование более сложного механизма активации РКА при индукции каспаз-зависимого апоптоза в тромбоцитах.

В настоящей работе проведены исследование активности тромбоцитов пациентов, находящихся на противоопухолевой терапии, и сравнение тромбоцитов пациентов с тромбоцитами здоровых доноров, проинкубированными с индуктором апоптоза (АВТ-737). Наши результаты и данные предыдущих работ позволили предложить схему воздействия ВНЗ-миметиков на тромбоцит.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

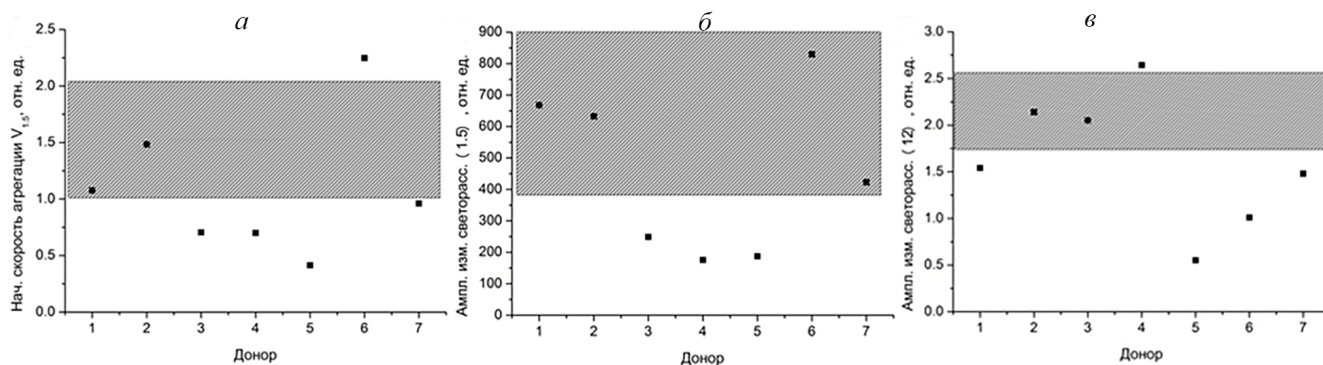
**Материалы.** В исследовании были использованы следующие материалы: чувствительный к концентрации кальция, проникающий сквозь липидные мембраны клеток флуорофор Fura-Red-AM («Molecular Probes», Eugene, OR); АДФ, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), SFLLRN, фибриноген человека, аннексин-V-Alexa-647, краситель Alexa-488 («Sigma-Aldrich», США); NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> («Агат-Мед», Россия), CD62p-Alexa-647, PAC-1-FITC («Sony Biotechnology», США).

**Критерии включения пациентов в исследование.** В исследование на проточной цитометрии было включено 14 пациентов с диагнозом ОЛЛ (4 девочки и 10 мальчиков, 2–16 лет, медиана 7,5 лет), получавших лечение по протоколу Москва–Берлин ALL-MB 2008. Кровь для анализа

функционального состояния тромбоцитов забирала на разных этапах терапии в 8 точках. Точки 1, 5 и 8 – перед началом курсов консолидации 1, 2 и 3 соответственно; точки 4 и 7 в конце курсов консолидации 1 и 2, точки 3, 4 – в середине курса консолидации 1 до и после введения L-аспарагиназы, точка 6 – в середине курса консолидации 2. В данном исследовании у одного из пациентов случился неокклюзивный тромбоз брахиоцефальной вены справа в месте стояния центрального венозного катетера между точками 4 и 5. Также было два пациента с тромботическими наложениями на конце центрального венозного катетера: у одного пациента в точке 2, у другого между точками 6 и 7.

Помимо пациентов с ОЛЛ, в исследование также были включены пациенты со следующими заболеваниями: ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (пациент 1), острый миелоидный лейкоз (пациент 2), агранулоцитоз (пациент 3), острый промиелоцитарный лейкоз (пациент 4), злокачественное новообразование почки (пациенты 5 и 7), злокачественное новообразование забрюшинного пространства (пациент 6). Данным пациентам, по причине разнообразия их диагнозов, было проведено расширенное исследование тромбоцитов на проточном цитометре (анализ внутриклеточной сигнализации), а также исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния.

**Анализ малоуглового светорассеяния тромбоцитами при агрегации.** Методика исследования агрегации тромбоцитов посредством малоуглового светорассеяния на лазерном анализаторе LaSca TM («БиоМедСистем», Россия) была описана ранее в работе [34]. Метод основан на измерении малоуглового светорассеяния суспензии тромбоцитов. Этот метод был использован для характеристики функции тромбоцитов, позволяя одновременно исследовать изменение формы тромбоцитов и формирование диагрегатов тромбоцитов (светорассеяние под углом 1,5°), а также обычную агрегацию тромбоцитов (светорассеяние под углом 12°) при стимуляции малыми дозами АДФ. Для исследования посредством центрифугирования крови (забранной в вакуумные пробирки с 3,8%-ным цитрата натрия) при 100 g была получена богатая тромбоцитами плазма (PRP). Полученная PRP была разведена буфером Тирода (150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 мМ HEPES, 5 мМ глюкозы, 0,5%-ного бычьего сывороточного альбумина, pH 7,3) до концентрации 10 000 тромбоцитов/мкл. Полученная суспензия клеток была стимулирована 500 нМ АДФ, начальная скорость агрегации и максимальная амплитуда агрегации были измерены.



**Рис. 1.** Исследование проагрегантного ответа тромбоцитов пациентов методом малоуглового светорассеяния. *a* – Начальная скорость формирования диагрегатов была снижена (или на нижней границе нормы) для всех пациентов, кроме пациентов 2 и 6, у которых, наоборот, наблюдалось повышение начальной скорости формирования диагрегатов тромбоцитов; *б* – максимальная амплитуда светорассеяния, соответствующего диагрегатам была снижена у пациентов 3, 4, 5, а также находилась на нижней границе нормы для пациента 7; *в* – максимальная степень агрегации тромбоцитов пациентов была снижена у всех пациентов, кроме пациентов 2, 3, 4. Серым фоном обозначены границы нормы для здоровых доноров

**Цитофлуориметрическое исследование функциональной активности тромбоцитов.** Кровь пациентов забирали в пробирки с 3,8%-ным цитратом натрия, получали богатую тромбоцитами плазму центрифугированием 100 g в течение 8 мин и довели концентрацию тромбоцитов до 50 тыс/мкл разбавлением модифицированным буфером Тирода. Затем тромбоциты инкубировали с мепакрином для окраски плотных гранул, стимулировали пептидом SFLLRN (активатор тромбинового рецептора PAR1) и инкубировали с антителами против ключевых тромбоцитарных антигенов: PAC1-FITC, CD62P-Alexa-647, Annexin-V-Alexa-647. В качестве контроля использовали кровь 14 здоровых добровольцев. Подробное описание методики приведено в работе [35]. Сравнение между группами пациентов и здоровых добровольцев проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

**Цитофлуориметрическое исследование внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах.** Исследование проводили посредством проточного цитометра BD FACS Canto II. К пробам добавляли конъюгированный с Alexa-488 фибриноген человека в концентрации 100 мкг/мл. После этого пробы анализировали в кинетическом режиме. Через 60 с после начала исследования к пробам добавляли активатор (2 мкМ АДФ). Для пересчёта флуоресценции Fuga-Red в концентрации кальция последовательно добавляли 1 мкМ иономицина и 10 мМ EGTA. Пересчет проводили по формуле Гринкевича [36]. Дополнительно производили нормировку на теоретически рассчитанную концентрацию кальция в присутствии 10 мМ EGTA на основе [36, 37]. Связывание фибриногена считалось максимальным после инкубации пробы с 1 мкМ иономицина в

течение 3 мин. Подробное описание методики приведено в работах [38, 39].

**Статистическая обработка данных.** Результаты анализа малоуглового светорассеяния, а также проточной цитофлуориметрии были обработаны посредством программного обеспечения Origin Pro (<https://www.originlab.com/origin>) и FlowJo (<https://www.flowjo.com/>) соответственно. Статистический анализ данных был проведен посредством Python 3.6, статистическую значимость оценивали по критерию Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Агрегационная способность апоптотических тромбоцитов снижена.** Ключевым функциональным ответом тромбоцитов крови человека является их способность к агрегации при активации. Золотым стандартом для лабораторного анализа агрегационной способности тромбоцитов является агрегометрия светопропускания [40, 41]. Одним из подходов к усовершенствованию данного метода является метод малоуглового светорассеяния, позволяющий более точно исследовать не только агрегационную кривую тромбоцитов (образование диагрегатов наблюдается по светорассеянию под углом  $1,5^\circ$ ), но и изменение ими формы (светорассеяние под углом  $12^\circ$ ) в ответ на слабую активацию [34].

Данным методом была оценена агрегация тромбоцитов у семи пациентов (см. Дополнительные материалы), находящихся на химиотерапии. Получено, что у половины пациентов наблюдалось ослабление агрегации тромбоцитов или агрегация тромбоцитов находится на нижней границе нормы (рис. 1, *a, б*, пациенты 3,

4, 5, 7). С другой стороны, изменение формы у тромбоцитов доноров 2 и 3 не было нарушено, а у пациента 4 было даже повышено (рис. 1, *в*), в то время как наблюдалось сниженное изменение формы тромбоцитов у пациентов 1, 5, 6, 7.

**Функциональные характеристики тромбоцитов пациентов на химиотерапии.** Для оценки причин полученных выше различий между пациентами, находящимися на химиотерапии, а также здоровыми донорами было проведено исследование функциональных характеристик активации тромбоцитов в покое и при активации SFLLRN (20 мкМ). Функциональные характеристики тромбоцитов оценивались в различные моменты терапии, схема терапии приведена в дополнительных материалах.

При секреции тромбоцитарных  $\alpha$ -гранул также происходит выставление на внешнюю мембрану тромбоцитов Р-селектина (CD62p) — мембранного белка, важного для взаимодействия тромбоцитов с иммунными клетками (через PSGL рецепторы). В точках 1–5 наблюдали достоверное повышение Р-селектина в покоящихся тромбоцитах, однако при активации не было значимых отличий по выставлению Р-селектина по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2, *а, б*).

В плотных гранулах тромбоцитов наблюдается снижение рН по сравнению с другими внутриклеточными органеллами, что позволяет использовать для их исследования мепакрин. В покоящихся тромбоцитах пациентов наблюдалось снижение флуоресценции мепакрина по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров (рис. 2, *в*). При активации тромбоцитов различий не наблюдалось (рис. 2, *г*). Таким образом, можно сделать вывод, что тромбоциты пациентов в покоящемся состоянии дегранулированы по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. Анализ активации тромбоцитарных интегринов (посредством антитела PAC-1) — первичного проагрегантного ответа тромбоцитов — показал отсутствие различий между тромбоцитами пациентов в покоящемся состоянии и при активации (рис. 1, *д, е*), за исключением первой точки при активации (рис. 1, *е*).

**Сравнение внутриклеточной сигнализации тромбоцитов пациентов на химиотерапии и апоптотических тромбоцитов.** Для исследования причин наблюдаемой первичной дегрануляции тромбоцитов (рис. 1, *а, в*) было проведено исследование кальциевой сигнализации тромбоцитов пациентов, а также тромбоцитов здоровых доноров, прединкубированных с АВТ-737. Кальций является ключевым вторичным мессенджером активации тромбоцита, запускающим как дегрануляцию, так и проагрегантный ответ

тромбоцита. Ранее было убедительно продемонстрировано, что перегрузка митохондрий кальцием также запускает и некроз тромбоцитов [18, 42], характеризующийся выставлением на внешнюю поверхность тромбоцитарной мембраны отрицательно заряженного фосфолипида фосфатидилсерина.

Методом проточной цитометрии в кинетическом режиме получено, что в покоящихся тромбоцитах пациентов наблюдается повышение концентрации свободных ионов кальция (17 нМ) по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров (9 нМ, рис. 3, *а*). При инкубации с АВТ-737 в течение 1 ч в тромбоцитах наблюдалось более значительное увеличение концентрации кальция (39 нМ, рис. 3, *а*). При активации тромбоцитов 2 мкМ АДФ, как и при более сильной стимуляции 20 мкМ SFLLRN (рис. 2), наблюдался одинаковый максимальный уровень концентрации кальция. Данные результаты также могут свидетельствовать об преактивации тромбоцитов у пациентов, находящихся на химиотерапии, а также о том, что это может быть следствием запуска апоптоза в тромбоцитах этих пациентов.

Исследование связывания фибриногена показало, что апоптотические (инкубированные с АВТ-737) тромбоциты значительно слабее связывают фибриноген, нежели тромбоциты здоровых доноров или тромбоциты пациентов (рис. 3, *в*). Наконец, в популяции инкубированных с АВТ-737 тромбоцитов наблюдалась наибольшая доля положительных по аннексину-V тромбоцитов (рис. 3, *г*). Таким образом, можно заключить, что на более поздних этапах запуска апоптоза можно наблюдать ингибирование активации тромбоцитов, которое происходит из их изначальной преактивации, вероятно, наблюдаемой у пациентов на химиотерапии (рис. 3).

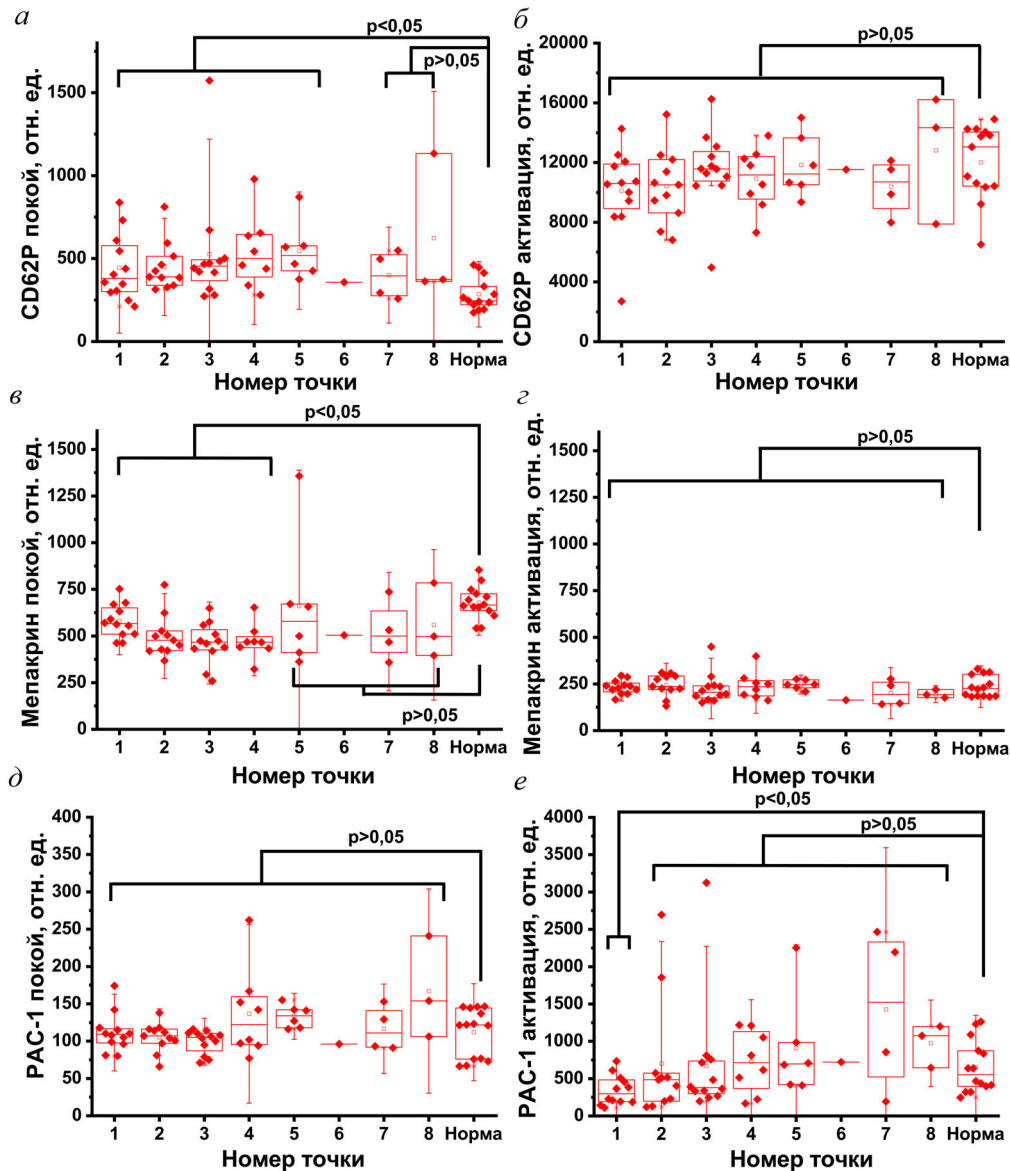
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение количества и функциональности тромбоцитов при онкогематологических заболеваниях является давно установленным феноменом, однако причины этих изменений могут быть различны. Одной из причин тромбоцитопатий является индукция химиотерапией апоптоза тромбоцитов [43]. В настоящей работе проведено исследование функциональной активности тромбоцитов пациентов с онкогематологическими заболеваниями, находящихся на химиотерапии. Показано, что тромбоциты пациентов обладают признаками преактивации, а именно повышенной экспрессией Р-селектина,

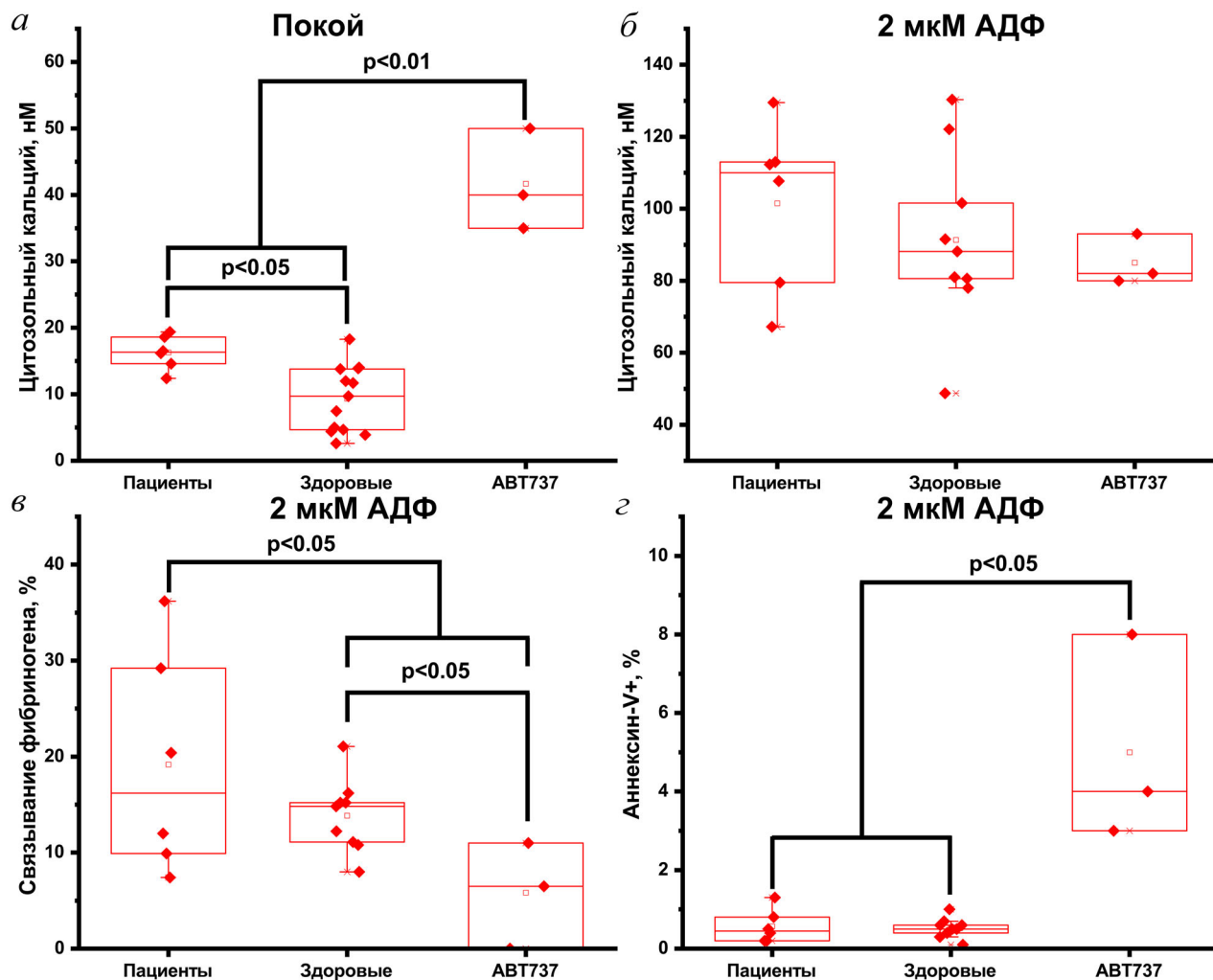
сниженным количеством плотных гранул и повышенной концентрацией цитозольного кальция. При этом при активации тромбоцитов наблюдается сниженная способность к агрегации и активации интегринов. На основании настоящего исследования и наших предыдущих работ мы предлагаем схему апоптоза тромбоцитов, при котором преактивация тромбоцитов является следствием повышенной концентрации

цитозольного кальция, а ингибирование интегринов связано с активацией каспазы-3 и зависимой от нее активацией протеинкиназы А (см. рис. 4).

Известно, что химиотерапия способна вызывать тромбоцитопению благодаря индукции каспаз-зависимой гибели тромбоцитов и мегакариоцитов [20, 43]. Однако открытым остается вопрос о функциональной активности остав-



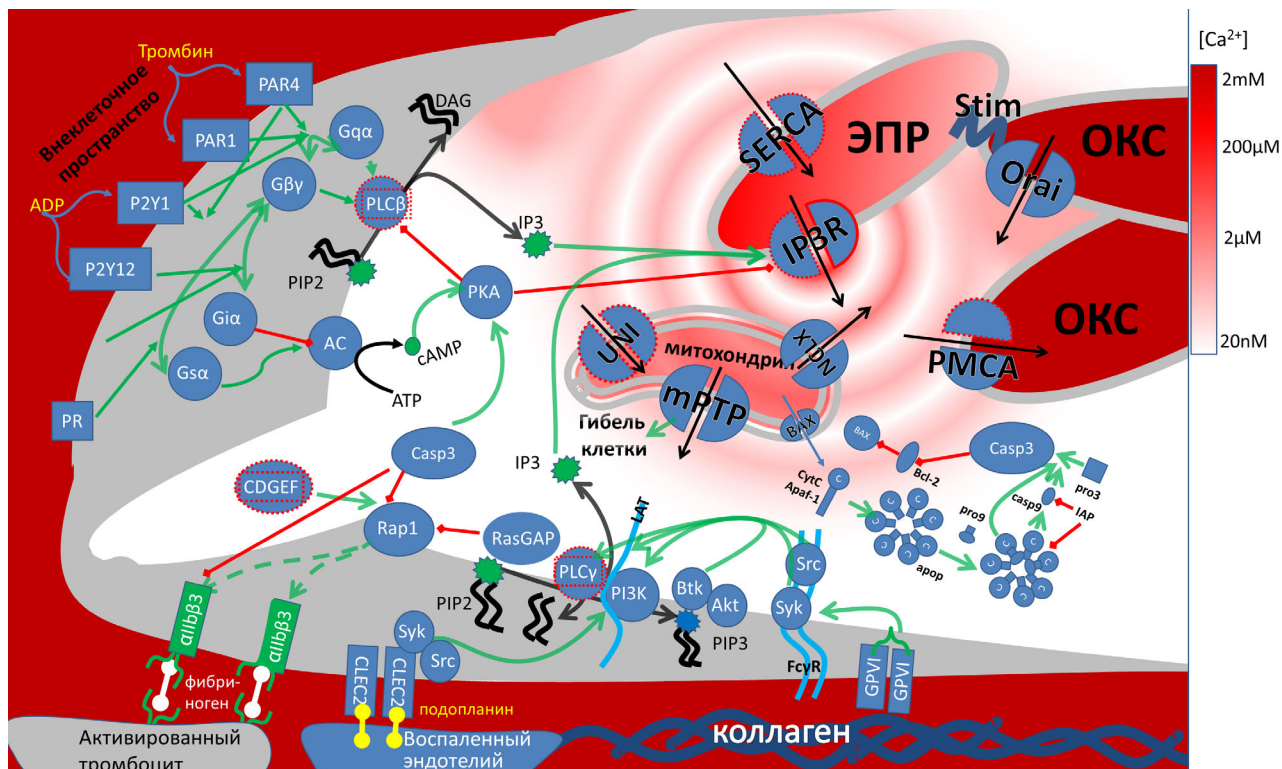
**Рис. 2.** Функциональные характеристики тромбоцитов пациентов в различные дни исследования. *а, б* – На тромбоцитах пациентов повышено выставление Р-селектина (выход  $\alpha$ -гранул) по сравнению со здоровыми донорами в начальных точках исследования в покое (*а*), однако при активации количества Р-селектина на тромбоцитах пациентов лежат в пределах нормы (*б*); *в, з* – в покоящихся тромбоцитах пациентов в начальных точках эксперимента наблюдалась сниженная флуоресценция мелакрина, что свидетельствует о выходе из них  $\delta$ -гранул (*в*), в то время как при активации флуоресценция мелакрина в тромбоцитах доноров лежала в пределах нормы (*з*); *д, е* – активация тромбоцитарных интегринов GPIIb-IIIa (связывание РАС-1) у пациентов не была нарушена в покое (*д*), в то время как при активации только в начальной точке исследования наблюдалось снижение активации интегринов (*е*). Статистическая значимость была оценена по критерию Манна–Уитни. (С цветными вариантами рис. 2–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)



**Рис. 3.** Сравнение внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах пациентов, здоровых доноров и апоптотических тромбоцитах (АВТ-737). *а* – В покоящихся тромбоцитах пациентов повышен кальций, однако в тромбоцитах, прединкубированных с АВТ-737, повышение кальция более значительно; *б* – при активации 2 мкМ АДФ не наблюдается значительных различий между тромбоцитами пациентов, здоровых доноров, а также апоптотическими тромбоцитами по кальциевому ответу; *в* – связывание фибриногена апоптотическими тромбоцитами было снижено по сравнению с тромбоцитами пациентов и здоровых доноров; *г* – выставление фосфатидилсерина (связывание Аннексина-V) апоптотическими тромбоцитами было значительно усилено по сравнению с тромбоцитами пациентов и здоровых доноров. Статистическая значимость была оценена по критерию Манна–Уитни

шихся «в живых» тромбоцитов. Для мышей ранее была показана сниженная способность к активации и агрегации тромбоцитов при воздействии ВНЗ-миметиков [44]. В настоящем исследовании мы показываем, что способность тромбоцитов пациентов на химиотерапии образовывать агрегаты и активировать интегрины заметно снижена по сравнению со здоровыми донорами. Этот результат находится в соответствии с нашими ранее полученными данными о том, что тромбоциты, инкубированные с АВТ-737, не образуют агрегаты и не связывают РАС-1 (антитело к активированным тромбоцитарным интегринам) [15]. Эти же результаты (ингибирование способности тромбоцитов к активации при

воздействии ВНЗ-миметиков) подтверждаются работами других авторов [44, 45]. Следует подчеркнуть, что в настоящем исследовании мы впервые показываем гипоагрегационную способность не всей популяции тромбоцитов, а только той субпопуляции, которая не испытала клеточную смерть (тромбоциты не экспонируют фосфатидилсерин). Гипоагрегация тромбоцитов находящихся на онкотерапии пациентов не была показана ранее, так как классический метод агрегометрии требует концентрации тромбоцитов выше 150 тыс/мкл, в то время как используемый в настоящей работе метод LaScs позволяет наблюдать агрегационную способность тромбоцитов, начиная с концентрации 10 тыс/мкл [34, 46].



**Рис. 4.** Схема сигнализации, запускающей апоптоз или некроз в тромбоцитах крови. Оттенками красного (серого в ч/б версии) цвета обозначена концентрация ионов кальция. Стрелками показана активация, ромбами – ингибирование, черными линиями показаны потоки вещества. Синими (сплошными) овалами обозначены ферменты с приведенными общепринятыми сокращениями их названий. Точечный контур означает зависимость активности фермента от концентрации кальция. Синими прямоугольниками обозначены рецепторы плазматической мембраны. Серые прямоугольники и овалы – белки апоптоического аппарата. ароп – Комплекс белков апоптосомы, включающий Араф-1 и цитохром с, а в последствии прокаспазы 3 и 9. ЭПР – эндоплазматический ретикулум, ОКС – открытая канальцевая система (внеклеточное пространство)

Механизмы сниженной активации интегринов тромбоцитов при воздействии ВНЗ-миметиков были показаны в работе [15], а именно, АВТ-737 через активацию каспазы-3 стимулирует активацию протеинкиназы А без повышения уровня цАМФ, протеинкиназа А, в свою очередь, ингибирует активацию тромбоцита. Кроме того, нами было показано, что АВТ-737 ингибирует активацию тромбоцитов путем каспаза 3 – зависимого ингибирования цитозольной фосфолипазы А2, отвечающей за синтез тромбоксана А2 и вторичную активацию тромбоцитов [5]. Эти результаты также подтверждаются тем, что активация тромбоцитов через P2Y<sub>12</sub> (рецептор, ассоциированный с Gi-белком) снижает эффекты ВНЗ-миметиков на активацию тромбоцита [6]. Возможно, что механизм ингибирования активации интегринов у пациентов на химиотерапии аналогичен, но для проверки этого необходимо оценить уровень фосфорилирования мишеней протеинкиназы А у данных пациентов.

В настоящей работе показано наличие предактивации тромбоцитов пациентов по следую-

щим параметрам. Во-первых, у пациентов на ВНЗ-миметиках происходит частичная секреция как α-, так и плотных гранул. Несмотря на то, что везикуляция мембраны тромбоцитов при воздействии ВНЗ-миметиков была многократно показана [17, 47], мы предполагаем, что наблюдаемая в данном исследовании предактивация тромбоцитов имеет другую природу. При этом количество рецепторов-гликопротеинов соответствует норме. Следует заметить, что здесь наши результаты противоречат работам [44], которые показывают шеддинг рецептора GPIIb в ответ на воздействие ВНЗ-миметиков. Противоречие в результатах может быть связано как с особенностями пациентов, так и с используемыми временами воздействия препаратов: в работе [44] проводили временную (90 мин) инкубацию тромбоцитов здоровых доноров с препаратами либо проводили наблюдения на мышах, в работе [45] также наблюдали за пациентами с лимфолифферативными расстройствами, однако шеддинг рецепторов наблюдался как до, так и после терапии.



Далее мы показываем повышенную концентрацию цитозольного кальция тромбоцитов пациентов в покоем состоянии или тромбоцитов, испытавших воздействие АВТ-737. Последний результат находится в согласии с работами предыдущих авторов, которые наблюдали повышение концентрации цитозольного кальция при воздействии АВТ-263 [16, 45], в то время как в работе других авторов [44] АВТ-737 не вызывал повышения концентрации кальция. Эти результаты не противоречат друг другу, потому, как аргументируется в работе [45], повышение концентрации кальция наблюдалось только в первые минуты воздействия препарата. Кроме того, в настоящей работе используется метод нормирования концентрации кальция по буферному раствору, содержащему 40 нМ кальция, что позволяет различать низкие концентрации [39]. Благодаря этому можно увидеть небольшие, но достоверные различия концентрации кальция в тромбоцитах пациентов и здоровых доноров.

Механизмы преактивации тромбоцитов у пациентов, находящихся на химиотерапии, будут являться предметом дальнейших исследований. Возможно, как предполагается в работе [45] и по аналогии с иммунной тромбоцитопенией [39], происходит изменение проницаемости плазматической мембраны (вероятно, каспаз-зависимое [17]) или мембраны эндоплазматического ретикулума [47] для ионов кальция. Это может быть связано с деполяризацией мембраны митохондрий [5, 8], в результате чего митохондрии не могут выступать как дополнительные резервуары для ионов кальция. С другой стороны, в наших исследованиях и в работе [14] деполяризация мембраны наблюдается только у тромбоцитов, «вступивших» на путь клеточной смерти. Требуется дополнительное

исследование тромбоцитов пациентов на предмет содержания кальция в ЭПР и потенциала митохондрий для прояснения этого вопроса. Следует отметить, что, как предполагается в работе [17], тромбоциты пациентов могут находиться «на пути в некроз». Однако при наблюдении методом проточной цитометрии, выполненной в настоящем исследовании, субпопуляций тромбоцитов пациентов ни по одному показателю не наблюдалось, что может служить аргументом против скорого потенциального некроза тромбоцитов пациентов.

**Финансирование.** Работа была поддержана грантом Фонда «Наука – детям», а также грантом РФФИ 17-00-00141-комфи (17-00-00138/17-00-00139/17-00-00140).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Надежде Александровне Подоплеловой (ЦТП ФХФ РАН) за ценные дискуссии при выполнении данной работы. Авторы благодарны Марии Григорьевне Степанян (ЦТП ФХФ РАН) и Ольге Ильиничне Ан (МГМА им. Сеченова) за помощь при выполнении экспериментов по проточной цитометрии.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящее исследование было одобрено независимым этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (решение N 1 от 12.01.2018).

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 10, 2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, **26**, 4, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Dachary-Prigent, J., Freyssinet, J. M., Pasquet, J. M., Carron, J. C., and Nurden, A. T. (1993) Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups, *Blood*, **81**, 2554-2565.
- Vanags, D. M., Orrenius, S., and Aguilar-Santelises, M. (1997) Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis, *Brit. J. Haemat.*, **99**, 824-831, doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.4813284.x.
- Jacobson, M. D., Burne, F., and Raff, M. C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus, *EMBO J.*, **13**, 1899-1910.
- Burkhardt, J. M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R. P. (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways, *Blood*, **120**, 73-82.
- Leytin, V., and Freedman, J. (2003) Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models, *Transfus. Apher. Sci.*, **28**, 285-295, doi: 10.1016/S1473-0502(03)00048-X.
- Mason K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., et al. (2007) Programmed anuclear cell death delimits platelet life span, *Cell*, **128**, 1173-1186, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.037.
- Li, J., van der Wal, D. E., Guangheng, Z., Xu, M., Yougbare, I., et al. (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia, *Nat. Commun.*, **6**, 1-16, doi: 10.1038/ncomms8737.
- Leytin, V. D., Allen, J., Mykhaylov, S., Lyubimov, E., and Freedman, J. (2006) Thrombin-triggered platelet apopto-

- sis, *J. Thromb. Haem.*, **4**, 2656-2663, doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02200.x.
10. Maagdenberg, C. G., de Boer, O. J., Li, X., Mackaay, C., Niessen, H. W., Winter, R. J., and van der Wal, A. C. (2016) Time dependent apoptotic rates in the evolving coronary thrombus mass of myocardial infarction patients, *Thromb. Res.*, **145**, 12-17, doi: 10.1016/j.thromres.2016.07.003.
  11. Hua, V. M., and Chen, V. M. Y. (2015) Procoagulant platelets and the pathways leading to cell death, *Semin. Thromb. Hemost.*, **41**, 405-412, doi: 10.1055/s-0034-1544002.
  12. Rukoyatkina, N., Mindukshev, I., Walter, U., and Gambaryan, S. (2013) Dual role of the p38 MAPK/cPLA2 pathway in the regulation of platelet apoptosis induced by ABT-737 and strong platelet agonists, *Cell Death Dis.*, **4**, 931, doi: 10.1038/cddis.2013.459.
  13. Sveshnikova, A. N., Ataulakhanov, F. I., and Pantelev, M. A. (2015) Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1, *Mol. Biosyst.*, **11**, 1052-1060, doi: 10.1039/c4mb00667d.
  14. Obydenny, S. I., Sveshnikova, A. N., Ataulakhanov, F. I., and Pantelev, M. A. (2016) Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation, *J. Thromb. Haemost.*, **14**, 1867-1881, doi: 10.1111/jth.13395.
  15. Rukoyatkina, N., Butt, E., Subramanian, H., Nikolaev, V. O., Mindukshev, I., Walter, U., Gambaryan, S., and Benz, P. M. (2017) Protein kinase A activation by the anti-cancer drugs ABT-737 and thymoquinone is caspase-3-dependent and correlates with platelet inhibition and apoptosis, *Cell Death Dis.*, **8**, 2898, doi: 10.1038/cddis.2017.290.
  16. Vögler, M., Hamali, H. A., Sun, X., Bampton, E. T. W., Dinsdale, D., et al. (2011) BCL2/BCL-XL inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation, *Blood*, **117**, 7145-7154, doi: 10.1182/blood-2011-03-344812.
  17. Wei, H., and Harper, M. T. (2019) ABT-737 triggers caspase-dependent inhibition of platelet procoagulant extracellular vesicle release during apoptosis and secondary necrosis *in vitro*, *Thromb. Haemost.*, **119**, 1665-1674, doi: 10.1055/s-0039-1693694.
  18. Arachiche, A., Kerbiriou-Nabias, D., Garcin, I., Letellier, T., and Dachary-Prigent, J. (2009) Rapid procoagulant phosphatidylserine exposure relies on high cytosolic calcium rather than on mitochondrial depolarization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 1883-1889, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190926.
  19. Dasgupta, S. K., Argaiz, E. R., Chedid Mercado, J. E., Elizondo Maul, H. O., Garza, J., et al. (2010) Platelet senescence and phosphatidylserine exposure: phosphatidylserine in stored platelets, *Transfusion*, **50**, 2167-2175, doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02676.x.
  20. Yakimenko, A. O., Verholomova, F. Y., Kotova, Y. N., Ataulakhanov, F. I., and Pantelev, M. A. (2012) Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations, *Biophys. J.*, **102**, 2261-2269, doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.004.
  21. Abaeva, A. A., Canault, M., Kotova, Y. N., Obydenny, S. I., Yakimenko, A. O., et al. (2013) Procoagulant platelets form an  $\alpha$ -granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29621-29632, doi: 10.1074/jbc.M113.474163.
  22. Zakharova, N. V., Artemenko, E. O., Podoplelova, N. A., Sveshnikova, A. N., Demina, I. A., Ataulakhanov, F. I., and Pantelev, M. A. (2015) Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII, *PLoS One*, **10**, 0116665, doi: 10.1371/journal.pone.0116665.
  23. Suntsova, E. V., Demina, I. M., Ignatova, A. A., Ershov, N. M., Trubina, N. M., et al. (2017) Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura, *Int. J. Hematol.*, **105**, 841-848, doi: 10.1007/s12185-017-2207-3.
  24. Artemenko, E. O., Yakimenko, A. O., Pichugin, A. V., Ataulakhanov, F. I., and Pantelev, M. A. (2016) Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets, *Biochem. J.*, **473**, 435-448, doi: 10.1042/BJ20150779.
  25. Podoplelova, N. A., Sveshnikova, A. N., Kotova, Y. N., Eckly, Y. N., Receveur, N., et al. (2016) Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting, *Blood*, **128**, 1745-1755, doi: 10.1182/blood-2016-02-696898.
  26. Versteeg, H. H., Heemskerk, W. M., Levi, M., and Reitsman, P. H. (2013) New fundamentals in hemostasis, *Physiol. Rev.*, **93**, 327-358, doi: 10.1152/physrev.00016.2011.
  27. De Meyer, S. F. (2017) Platelet granules in vascular integrity, *Blood*, **129**, 1573-1574, doi: 10.1182/blood-2017-02-763540.
  28. Meikle, C. K. S., Kelly, C. A., Garg, P., Wuescher, L. M., Ali, R. A., and Worth, R. G. (2016) Cancer and thrombosis: the platelet perspective, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **4**, 147, doi: 10.3389/fcell.2016.00147.
  29. Thushara, R. M., Hemshekhar, M., Kemparaju, K., Rangappa, K. S., Devaraja, S., and Girish, K. S. (2014) Therapeutic drug-induced platelet apoptosis: an overlooked issue in pharmacotoxicology, *Arch. Toxicol.*, **88**, 185-198, doi: 10.1007/s00204-013-1185-3.
  30. Walter, U., and Gabaryan, S. (2009) cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **191**, 533-548, doi: 10.1007/978-3-540-68964-5\_23.
  31. Gambaryan, S., and Tsikas, D. (2015) A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? *Amino Acids*, **47**, 1779-1793, doi: 10.1007/s00726-015-1986-1.
  32. Mindukshev, I., Gambaryan, S., Kehrer, L., Schuetz, C., Kobsar, A., et al. (2012) Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors, *Clinical Chem. Labor. Med.*, **50**, 125, doi: 10.1515/CCLM.2011.817.
  33. Ignatova, A. A., Ponomarenko, E. A., Polokhov, D. M., Suntsova, E. V., Zharkov, P. A., et al. (2019) Flow cytometry for pediatric platelets, *Platelets*, **30**, 428-437, doi: 10.1080/09537104.2018.1513473.
  34. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
  35. Bers, D. M., Patton, C. W., and Nuccitelli, R. (2010) A practical guide to the preparation of  $Ca^{2+}$  buffers, *Methods Cell Biol.*, **99**, 1-26, 2010, doi: 10.1016/B978-0-12-374841-6.00001-3.
  36. Мартьянов А. А., Морозова Д. С., Хорева А. Л., Пantelev М. А., Щербина А. Ю., Свешникова Ю. Н. (2020) Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта-Олдрича, *Вопросы онкологии/гематологии и иммунопатологии в педиатрии*, **19**, 100-107.
  37. Martyanov, A. A., Morozova, D. S., Sorokina, M. A., Filkova, A. A., Fedorova, D. V., et al. (2020) Heterogeneity of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 function in pediatric immune thrombocytopenia revealed by continuous flow cytometry analysis, *IJMS*, **21**, 3035, doi: 10.3390/ijms21093035.

38. Filkova, A. A., Martyanov, A. A., Garzon Dasgupta, A. K., Pantelev, M. A., and Sveshnikova, A. N. (2019) Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments, *Sci. Rep.*, **9**, 6217, doi: 10.1038/s41598-019-42701-0.
39. Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A., and Toth, K. (2017) Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, doi: 10.3390/ijms18081803.
40. Kile, B. T. (2014) The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets, *Br. J. Haematol.*, **165**, 217-226, doi: 10.1111/bjh.12757.
41. Schoenwaelder, S. M., Jarman, K. E., Gardiner, E. E., Hua, M., Qiao, J., et al. (2011) Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets, *Blood*, **118**, 1663-1674, doi: 10.1182/blood-2011-04-347849.
42. Vogler, M., Goodall, A. H., and Cohen, G. M. (2012) Response: BH3 mimetics modulate calcium homeostasis in platelets, *Blood*, **119**, 1321-1322, doi: 10.1182/blood-2011-12-393397.
43. Gupta, R. C. (2016) *Nutraceuticals: Efficacy, Safety, and Toxicity*, Elsevier, Academic Press, Amsterdam.
44. Gyulxhandanyan, A. V., Mutlu, A., Allen, D. J., Freedman, J., and Leytin, V. (2014) BH3-mimetic ABT-737 induces strong mitochondrial membrane depolarization in platelets but only weakly stimulates apoptotic morphological changes, platelet shrinkage and microparticle formation, *Thromb. Res.*, **133**, 73-79, doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.041.
45. Qiao, J., Schoenwaelder, S. M., Mason, K. D., Tran, H., Davis, A. K., et al. (2013) Low adhesion receptor levels on circulating platelets in patients with lymphoproliferative diseases before receiving Navitoclax (ABT-263), *Blood*, **121**, 1479-1481, doi: 10.1182/blood-2012-12-467415.
46. Akl, H., Vandecaetsbeek, I., Monaco, G., Kauskot, A., Luyten, T., et al. (2013) HA14-1, but not the BH3 mimetic ABT-737, causes Ca<sup>2+</sup> dysregulation in platelets and human cell lines, *Haematologica*, **98**, 49-51, doi: 10.3324/haematol.2012.080598.
47. Harper, M. T., and Poole, A. W. (2012) Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores, *Blood*, **119**, 4337-4338, doi: 10.1182/blood-2012-02-413070.

## PROGRAMMED CELL DEATH AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS IN CASE OF ONCOHEMATOLOGIC DISEASES

A. A. Martyanov<sup>1,2,3,4</sup>, A.A. Ignatova<sup>2</sup>, G.S. Svidelskaya<sup>2</sup>, E.A. Ponomarenko<sup>2</sup>, S.P. Gambaryan<sup>5</sup>, A.N. Sveshnikova<sup>1,2,3,6</sup>, and M.A. Pantelev<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 109029 Moscow, Russia; E-mail: mapantelev@yandex.ru

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, 117997 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute for Biochemical Physics (IBCP), Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119334 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia

<sup>6</sup> Department of Normal Physiology, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia

Received July 16, 2020

Revised July 24, 2020

Accepted July 24, 2020

Programmed cell death of non-nucleated blood cells – platelets – in case of oncologic and oncohematologic diseases, can be involved in their pathophysiology. It contributes to both bleedings (caused by the thrombocytopenia, which is induced by the elimination of the platelets) and thrombosis (caused by the processes of blood coagulation on the surface of phosphatidylserine exposing platelets). Here we have characterized the functional responses of platelets of patients with various oncological disorders, which were receiving chemotherapy and compared them to the platelets of healthy donors and platelets, pre-incubated with apoptosis inducer ABT-737. Some patients exhibited diminished capability of platelets to aggregate. Immunophenotyping of these platelets revealed their pre-activation in comparison to the platelets of healthy donors. Calcium signaling analysis revealed that in patients' platelets, as well as in apoptotic platelets, intracellular calcium levels were increased in resting cells. However, the modesty of this increase alongside weak phosphatidylserine expression allows us to assume that apoptotic processes in the circulating patients' platelets are limited.

**Keywords:** platelets, apoptosis, chemotherapy, flow cytometry, aggregometry