

DOI: 10.7868/S0869813918090095

**ВЫСОКОАФФИННЫЙ ИНГИБИТОР БЕЛКА BCL-X_L
АКТИВИРУЕТ ПРОТЕИНКИНАЗУ А В ТРОМБОЦИТАХ
И БЛОКИРУЕТ ИХ АКТИВАЦИЮ**

© В. С. Шпакова, С. П. Гамбарян, Н. И. Рукояткина,
А. И. Кривченко

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: spakovavalentina@gmail.com

При лечении раковых заболеваний противоопухолевыми препаратами частыми побочными эффектами являются тромбоцитопения и нарушение активации тромбоцитов. Некоторые низкомолекулярные ингибиторы антиапоптотических BCL-2 белков могут вызывать апоптоз тромбоцитов и блокировать их активацию. Были исследованы пять ингибиторов (MIM-1, АВТ-199, обатоклак, госсипол и WEHI-539) и обнаружено, что обатоклак и госсипол вызывали прокоагулянтное состояние тромбоцитов и блокировали их активацию. WEHI-539 индуцировал каспаз-зависимый апоптоз и вызывал блокирование активации тромбоцитов за счет активации протеинкиназы А (ПКА), которая не связана с увеличением количества циклического аденозинмонофосфата в тромбоцитах. Действие обатоклакса и госсипола не зависит от активации ПКА и обусловлено другими механизмами. Ингибиторы белков MCL-1 и BCL-2 (MIM1 и АВТ-199 соответственно) не вызывали гибель тромбоцитов и не оказывали действия на их активацию.

Ключевые слова: тромбоциты, апоптоз, протеинкиназа А, ингибиторы BCL-2 белков.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 9. С. 1106—1115. 2018

V. S. Shpakova, S. P. Gambaryan, N. I. Rukoyatkina, A. I. Krivchenko. HIGH-AFFINITY INHIBITOR OF BCL-X_L PROTEIN ACTIVATES PROTEIN KINASE A IN PLATELETS AND BLOCKS THEIR ACTIVATION. I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; e-mail: spakovavalentina@gmail.com.

Thrombocytopenia and impairing platelets activation are common side effects of anticancer therapy. It is known that some low-molecular inhibitors of the pro-survival BCL-2 family proteins can cause apoptosis in platelets and block their activation. Here five inhibitors (MIM-1, АВТ-199, obatoclast, gossypol and WEHI-539) were explored and we found that obatoclast and gossypol induce procoagulant platelets and impair platelets activation. WEHI-539 induces caspase-dependent apoptosis and blocks platelets functions via cAMP-independent PKA activation. Platelets activation is inhibited by obatoclast and gossypol independently from PKA and cause by other mechanisms. MIM1 and АВТ-199 (MCL-1 and BCL-2 proteins inhibitors, respectively) have no effects on platelets function.

В противоопухолевой терапии одним из частых побочных эффектов является развитие тромбоцитопении, которая опасна риском образования кровотечений у пациентов [31]. Тромбоцитопения может возникать вследствие нарушения продукции или апоптоза тромбоцитов. Одним из ключевых признаков апоптоза, как и прокоагулянтной активности тромбоцитов, является экстернализация фосфатидилсерина (ФС), которая служит сигналом для макрофагов о необходимости элиминации клетки из организма [7]. В прокоагулянтных (способных обеспечивать генерацию тромбина) тромбоцитах экстернализация ФС является сигналом для сборки комплекса протромбиназы, катализирующей превращение неактивного протромбина в активный тромбин [13, 38]. В норме асимметричное распределение липидов во внешнем и внутреннем слое мембраны поддерживается за счет активности флиппаз АТР11А и АТР11С [18]. В прокоагулянтных тромбоцитах концентрация внутриклеточного Ca^{2+} резко увеличивается, что приводит к активации Ca^{2+} -зависимой скрамблазы ТМЕМ16F [23], переносящий ФС из внутреннего слоя мембраны во внешний, и обратной инактивации флиппаз АТР11А и АТР11С [18]. При апоптозе каспазы-3 и 7 путем расщепления активируют скрамблазу Xrk8, что приводит к конститутивной экстернализации ФС, необходимой для распознавания макрофагом апоптотической клетки [28], а также расщепляют флиппазы АТР11А и АТР11С, делая экстернализацию ФС необратимой [1, 29].

Основными регуляторами апоптоза в клетках являются белки семейства BCL-2, среди которых выделяют проапоптотические, регуляторные и антиапоптотические белки [30]. Считается, что регуляция апоптоза белками данного семейства осуществляется за счет поддержания баланса между содержанием про- и антиапоптотических BCL-2 белков в клетке [20]. При запуске апоптоза основные эффекторные белки Вах и/или Вак образуют поры во внешней мембране митохондрий, инициируя выход цитохрома с из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль [24]. Цитохром с активирует регуляторную каспазу-9 и запускает сборку комплекса апоптосом, активирующих эффекторные каспазы-3 и -7, — протеазы, ответственные за большинство морфологических и биохимических изменений в клетке, связанных с апоптозом [16].

Несмотря на то что тромбоциты являются безъядерными образованиями, они имеют практически полный набор белков, участвующих в реализации внутреннего пути апоптоза [12]. Основным антиапоптотическим белком в тромбоцитах является белок BCL-X_L [15, 37]. Было показано, что некоторые низкомолекулярные ингибиторы антиапоптотических белков BCL-2 семейства, такие как АВТ-737 или навитоклакс, способствуют развитию тромбоцитопении и даже при увеличении генерации тромбина ингибируют активацию тромбоцитов, что вынуждает приостанавливать лечение, снижать дозу и частоту применения препаратов [21, 30].

Цель работы заключалась в исследовании механизма действия различных ингибиторов антиапоптотических BCL-2 белков на апоптоз и активацию тромбоцитов. В работе использовались следующие ингибиторы антиапоптотических BCL-2 белков: ММ1, ингибитор белка MCL1 [5]; АВТ-199, селективный ингибитор белка BCL-2 [26]; обатоклакс, блокирующий все антиапоптотические белки BCL-2 семейства [19], госсипол, ингибирующий белки BCL-2 и BCL-X_L [11]; WENI-539, ингибитор белка BCL-X_L [14]. Все эти соединения с разной аффинностью связываются BCL-2 белками.

МЕТОДИКА

Реактивы. АВТ-199, АВТ-737, обатоклак (Selleck Chemicals, Германия); MIM1, TRAP-6, H89 (Tocris Bioscience, Германия); госсипол, форсколин, SNP (Sigma-Aldrich, Германия); WENI-539 (MedChem Express, Германия); аннексин V-PE, антитела к каспазе-3 (BD-Bioscience, Германия); вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Amersham, Pharmacia Biotech, Германия), VASP^{S239} антитела (Nano Tools, Германия), антитела к актину (Cell Signaling, Германия).

Выделение тромбоцитов. Кровь здоровых доноров собирали в пробирку с цитратным буфером (мМ): 12 лимонной кислоты, 15 цитрата натрия, 25 D-глюкозы, 2 мкМ ЭГТА. Плазму, обогащенную тромбоцитами (PRP), получали центрифугированием при 200 g (центрифуга CM-6M ELM1) в течение 7 мин, затем центрифугировали 2.5 мин при 330 g. Осадок промывали раствором CGS (мМ): 120 NaCl, 12 цитрата натрия, 30 D-глюкозы, pH 6.5 и ресуспендировали в HEPES буфере (мМ): 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-глюкозы, 10 HEPES, pH 7.4. Для проведения опытов использовали рабочую концентрацию тромбоцитов $3 \cdot 10^8$ /мл.

Проточная цитометрия. Для оценки экстернализации фосфатидилсерина (ФС) отмывые тромбоциты инкубировали 10 мин с аннексином 5-PE при комнатной температуре в пропорции 10 : 1. Далее тромбоциты разбавляли в 10 раз аннексин-5 связывающим раствором (мМ): 140 NaCl, 10 HEPES, 2.5 CaCl₂. Для оценки активации интегринов α IIb β 3 тромбоциты инкубировали 10 мин с меченым фибриногеном (15 мг/мл) (Alexa-647) при комнатной температуре в пропорции 1 : 100, затем тромбоциты разбавляли в 10 раз фосфатным буфером.

Анализ проводился на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Каждый образец оценивался по 15 000 событиям.

Вестерн-блот анализ. Для проведения вестерн-блот анализа в отмывые тромбоциты добавляли буфер, содержащий додецил сульфат натрия (SDS), затем проводили электрофорез в SDS полиакриламидном геле (PAGE). Выделенные белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану с использованием полусухого трансфера. Неспецифическое связывание блокировали 3%-ным раствором обезжиренного молока в трис-буфере, содержащим 0.1 % твин-20. В течение ночи белки инкубировали с первичными антителами при 4°C. Для регистрации хемилюминесценции к пробам добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Статистическая обработка. Все эксперименты были выполнены в количестве не менее 4. Данные выражены как среднее арифметическое \pm ошибка среднего. Различия между группами определялось с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения $p < 0.05$ принимались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения гибели тромбоцитов измерялся уровень экстернализации ФС и активация каспазы-3. Было показано, что обатоклак (40 мкМ) и госсипол (30 мкМ) уже через 10 мин после введения вызывали связывание аннексина-5 (рис. 1, А). WENI-539 (1 мкМ) вызывал увеличение экстернализации ФС через 1 ч после введения (рис. 1, А), тогда как MIM-1 (5 мкМ) и АВТ-199 (10 мкМ) не оказывали существенного влияния на экстернализацию

PS ни через 10 мин, ни через 1 ч (рис. 1, А). При этом обатоклак (40 мкМ) и госсипол (30 мкМ) не влияли на активность каспазы-3, что указывает на возникновение прокоагулянтного состояния в тромбоцитах (рис. 1, Б). WENI-539 вызывал расщепление каспазы-3 через 1 ч после введения (рис. 1, Б).

Обатоклак и госсипол через 10 мин снижали активацию интегрина $\alpha\text{IIb}\beta_3$, вызванную TRAP-6, который является агонистом тромбинового рецеп-

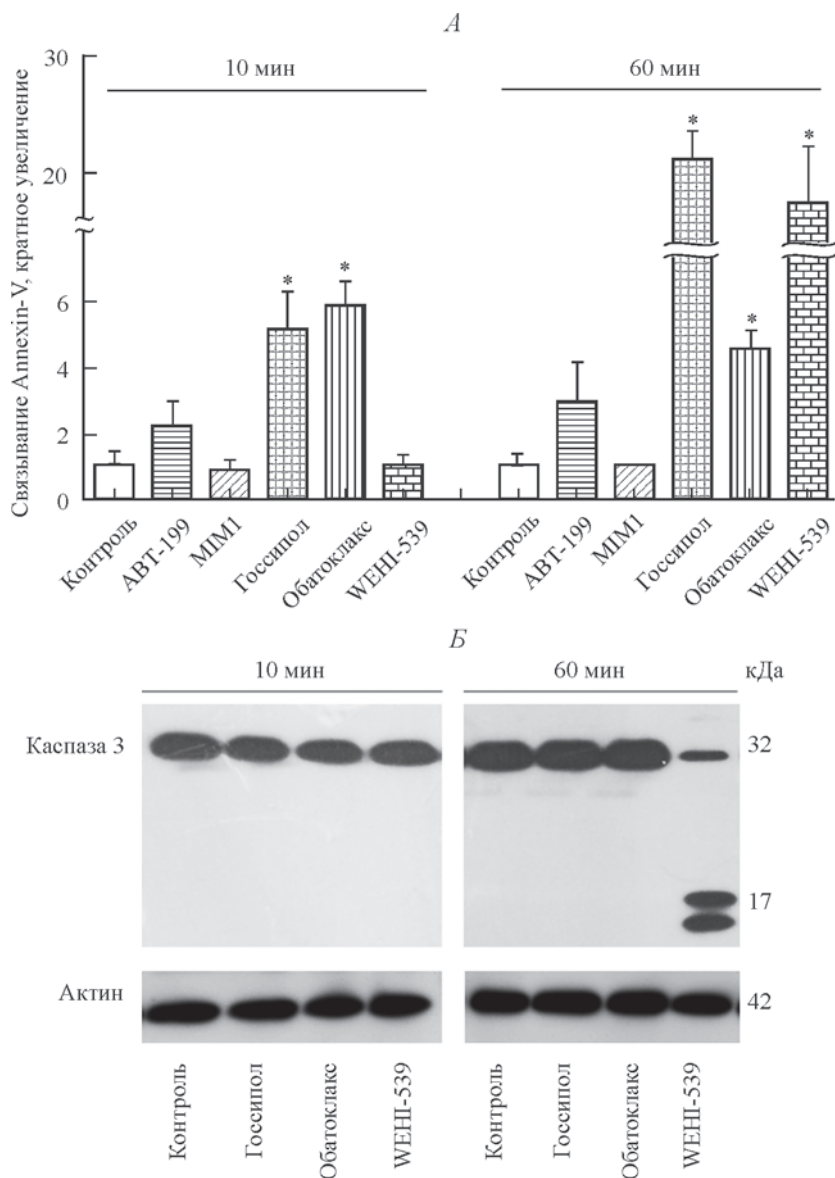


Рис. 1. Влияние исследуемых ингибиторов на экстернализацию PS на поверхности тромбоцитов и на активацию каспазы-3.

А — экстернализация ФС (связывание с аннексином-5); Б — вестерн-блот каспазы-3. Актин использовали как контроль количества белка. Аннексиновое связывание представлено как кратное увеличение от контроля, принятого за единицу, $n = 4$. * Различия достоверны при $p < 0.05$.

тора PAR-1 (рис. 2, А). WENI-539 вызывал существенное снижение активации интегринов через 1 ч после введения (рис. 2, А). MIM1 и АВТ-199 не оказывали влияния на активацию тромбоцитов (рис. 2, А). Ингибирование активации, вызванное исследуемыми веществами, совпадало по времени с возникновением апоптоза и прокоагулянтного состояния тромбоцитов.

Основными ингибирующими системами в тромбоцитах являются аденилат- и гуанилатциклазы (АЦ и ГЦ), которые через синтез циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) активируют киназы А и G (ПКА и ПКГ). Эти киназы воздействуют на ключевые сигнальные молекулы в тромбоцитах, блокируя освобождение Ca^{2+} , активацию интегринов, высвобождение гранул, изменение формы тромбоцитов, их агрегацию и адгезию [2]. Определить активность ПКА и ПКГ в тромбоцитах можно по степени фосфорилирования белка VASP (Vasolidator-stimulated protein), который является известным субстратом этих киназ, и фосфорилируется ими по сайтам S239 и S157 [25].

Мы показали, что обатоклакс и госсипол ни через 10 мин, ни через 1 ч не вызывают фосфорилирования VASP (рис. 2, Б, В). В качестве позитивного контроля использовался активатор АЦ форсколин (1 мкМ). WENI-539 вызывал дозозависимое фосфорилирование белка VASP по Ser239 (рис. 2, Г), что свидетельствует об активации ингибирующих сигнальных путей в тромбоцитах. Фосфорилирование VASP совпадало по времени с экстернализацией PS и ингибированием активации интегрин $\alpha IIb\beta 3$.

Для определения механизма активации ПКА/ПКГ сигнальных систем исследуемыми ингибиторами было проверено, влияет ли WENI-539, селектив-

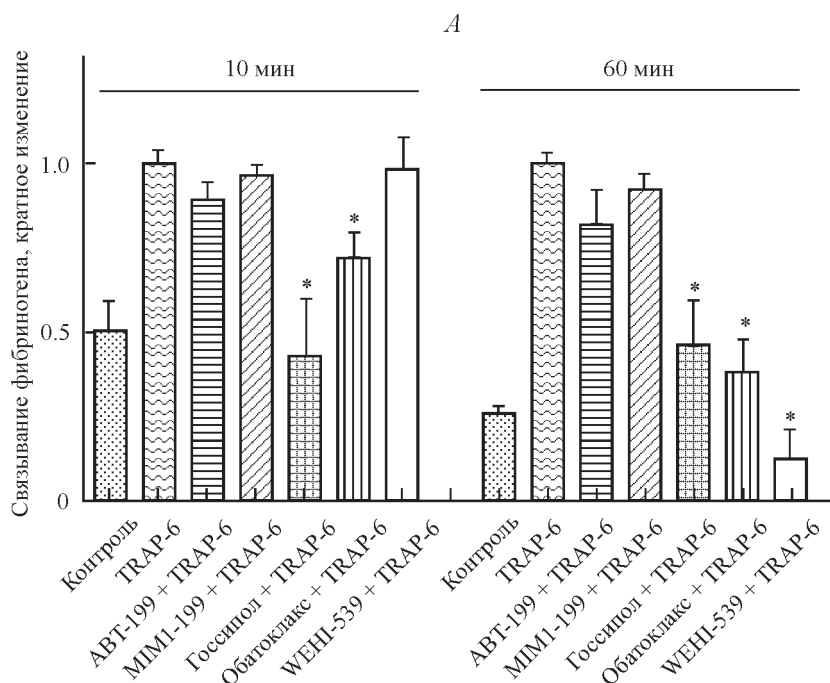


Рис. 2. Влияние исследуемых веществ на активацию тромбоцитов и на фосфорилирование белка VASP в тромбоцитах.

А — активацию тромбоцитов вызывали инкубацией в течение 5 мин с TRAP-6 и оценивали по связыванию с меченым фибриногеном; Б — вестерн-блот белка VASP. Актин использовали как контроль количества белка. Активация интегринов, вызванная TRAP-6, принята за 100 %, $n = 4$. * Различия достоверны при $p < 0.05$.

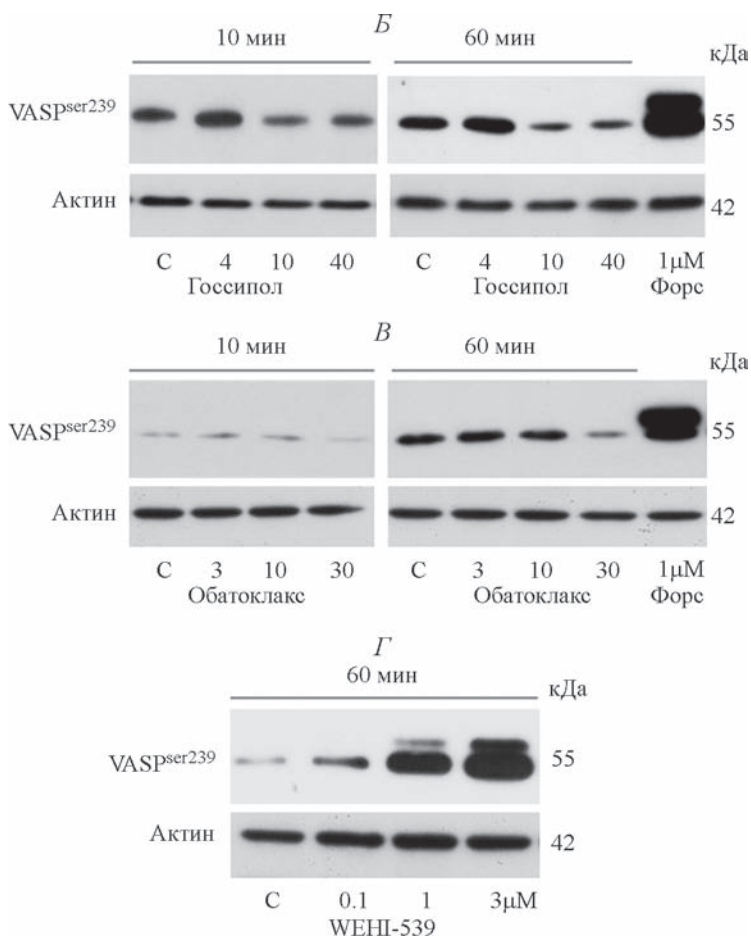


Рис. 2 (продолжение).

ный ингибитор белка BCL-X_L, на активность АЦ и ГЦ в тромбоцитах. Для этого тромбоциты в течение 10 мин преинкубировали с SQ22536 и ODQ, блокирующими АЦ и ГЦ соответственно, после чего вводили WENI-539 и далее анализировали при помощи вестерн-блот анализа. Было показано, что SQ22536 (30 мкМ) и ODQ (20 мкМ) не блокируют фосфорилирование VASP, вызванное WENI-539 (рис. 3, А). Эти данные свидетельствуют, что активация ингибирующих сигнальных систем в тромбоцитах веществом WENI-539 происходит за счет механизма, не связанного с активацией АЦ и ГЦ и последующим увеличением уровня цАМФ и цГМФ. В качестве контроля активности ингибиторов АЦ и ГЦ использовали форсколин, активатор АЦ и SNP, донор NO.

Мы предположили, что механизм действия WENI-539 может быть опосредован активацией протеинкиназ А или G, не связанной с увеличением уровня циклических нуклеотидов в тромбоцитах. Фосфорилирование VASP, вызванное WENI-539, высокоаффинным ингибитором BCL-X_L, блокировалось преинкубацией в течение 10 мин с H89 (20 мкМ), ингибитором PKA (рис. 3, Б). Полученные данные позволяют сделать заключение, что WENI-539 запускает апоптоз и активирует ингибиторные сигнальные системы в тромбоцитах, блокируя тем самым возможность активации тромбоцита, вступившего в апоптоз.

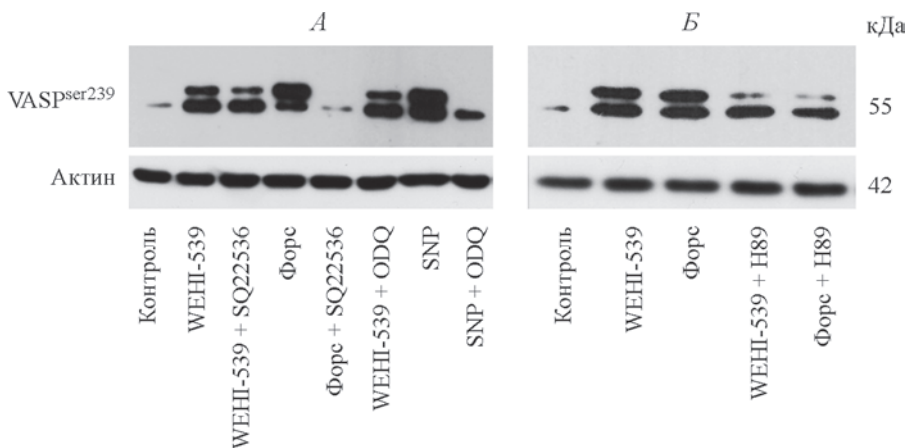


Рис. 3. WENI-539, селективный ингибитор белка $VCL-X_L$, активирует ПКА, не влияя на активность АЦ и ГЦ в тромбоцитах.

A — SQ22536 и ODQ не блокируют фосфорилирование VASP, вызванное WENI-539; *B* — ингибитор ПКА H89 блокирует действие WENI-539. Актин использовали как контроль количества белка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для АВТ-737, ингибирующего белки $VCL-2$, $VCL-X_L$ и $VCL-w$, была показана способность блокировать активацию тромбоцитов, однако механизм этого ингибирования не был изучен [32]. Впоследствии нам удалось определить, что АВТ-737 вызывает апоптоз тромбоцитов и блокирует их активацию за счет цАМФ — независимой активации ПКА [22]. Непонятным оставался вопрос, с каким из белков $VCL-2$ семейства связано нарушение активации тромбоцитов, вызванное АВТ-737. В данной работе использовались различные ингибиторы $VCL-2$ белков, но только для WENI-539, селективного ингибитора $VCL-X_L$, был показан аналогичный с АВТ-737 эффект. АВТ-199 и MIM1, ингибирующие белки $VCL-2$ и $MCL-1$ соответственно в нашей работе не оказывали существенного влияния ни на апоптоз (рис. 1, *A*), ни на активацию тромбоцитов (рис. 2, *A*).

Активация ПКА, вызванная АВТ-737, по крайней мере отчасти блокируется ингибиторами каспазы-3, что свидетельствует о каспаз-зависимой активации ПКА в тромбоцитах [22]. Важно отметить, что АВТ-737 и WENI-539 обладают высокой аффинностью к белку $VCL-X_L$ и способны связывать его в наномолярных концентрациях [14, 32] в отличие от обатоклакса и госсипола [35].

На ядерных клетках было показано, что среди шести исследуемых ингибиторов (обатоклак, госсипол, апогоссипол, EM20-25, хелеретрин и АВТ-737) только АВТ-737 способен специфически ингибировать антиапоптотические $VCL-2$ белки и запускать Вах/Вах-зависимый путь апоптоза с активацией каспазы-9 [32]. Остальные вещества, в том числе обатоклак и госсипол, помимо способности индуцировать высвобождение цитохрома с и активировать каспазы могут запускать апоптоз Вах/Вах-независимым путем, что говорит о наличии у данных веществ других мишеней [32]. Госсипол, природный полифенол, получаемый из семян хлопчатника, в настоящее время активно исследуется [10]. Установлено, что госсипол и его производные обладают противоопухолевыми [11, 34, 36], антиоксидантными [6], контрацептивными [33] и противоинфекционными [10] свойствами. Известно, что госсипол помимо связывания с $VCL-2$ белками дей-

ствуется как ингибитор некоторых дегидрогеназ, конкурируя с NADH за связывание с лактатдегидрогеназой, ингибирует липоксигеназу, подавляет активность NF-κB и связывается кальмодулином [4, 17]. Обатоклакс (GX15-070) был разработан для преодоления устойчивости к апоптозу клеток с повышенным синтезом белков BCL-2, BCL-X_L или MCL-1 [19]. Недавно для обатоклакса на некоторых типах раковых клеток была показана возможность вызывать каспаз-независимый тип гибели клеток: аутофагия-зависимый некроптоз или некроз [3, 27].

В тромбоцитах госсипол и обатоклакс (вещества с низкой аффинностью к BCL-X_L белку) инициировали прокоагулянтное состояние тромбоцитов, несмотря на способность активировать каспазы при запуске клеточной гибели в некоторых линиях раковых клеток (рис. 1). Экстернализация ФС и ингибирование активации, вызванной TRAP-6, развиваются в течение 10 мин (рис. 1, А; 2, А). При этом не наблюдается активации ПКА и ПКГ ингибиторных систем (рис. 2, Б, В). Ингибирование активации тромбоцитов, вызванное госсиполом или обатоклаксом, не зависит от активации ПКА и ПКГ сигнальных систем, а, возможно, обусловлено другими механизмами. В случае госсипола ингибирование активации может происходить за счет подавления активности липоксигеназы и/или за счет связывания кальмодулина [8, 9].

Изучение механизма гибели тромбоцитов имеет не только важное практическое значение в разработке новых подходов к терапии различных патологий, но и позволяет понять фундаментальные процессы регуляции и реализации апоптоза в клетках. Вероятно, блокирование активации вступившего в апоптоз тромбоцита позволяет предотвращать спонтанные процессы активации и тромбообразования. В нашей работе при запуске апоптоза в тромбоцитах происходила активация ПКА, которая не была опосредована запуском АЦ и последующим синтезом цАМФ, что свидетельствует о наличии в тромбоцитах неканонического пути активации ПКА, который реализуется в апоптотической клетке. Полученные данные дают представления о внутриклеточных процессах, запускаемых ингибиторами антиапоптотических BCL-2 белков в тромбоцитах.

Работа поддержана грантом КОМФИ № 17-00-00141 (17-00-00139) (проточная цитометрия). Исследование выполнено в рамках государственного задания ФАНО России № АААА-А18-118012290371-3(вестерн-блот анализ). Исследования выполнены методом проточной цитометрии на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Bratton D. L., Fadok V. A., Richter D. A., Kailey J. M., Guthrie L. A., Henson P. M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272(42): 26 159—26 165. 1997.
- [2] Bye A. P., Unsworth A. J., Gibbins J. M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J. Thromb. Haemost.* 14(5): 918—930. 2016.
- [3] Champa D., Orlicchio A., Patel B., Ranieri M., Shemetov A. A., Verkhusha V. V., Cuervo A. M., Di Cristofano A. Obatoclax kills anaplastic thyroid cancer cells by inducing lysosome neutralization and necrosis. *Oncotarget.* 7(23): 34 453—34 471. 2016.
- [4] Cheong H., Lu C., Lindsten T., Thompson C. B. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat. Biotechnol.* 30(7): 671—678. 2012.
- [5] Cohen N. A., Stewart M. L., Gavathiotis E., Tepper J. L., Bruekner S. R., Koss B., Opferman J. T., Walensky L. D. A competitive stapled peptide screen identifies a selective small molecule that overcomes MCL-1—dependent leukemia cell survival. *Chem. Biol.* 19(9): 1175—1186. 2012.

- [6] *Dodou K., Anderson R. J., Lough W. J., Small D. A., Shelley M. D., Groundwater P. W.* Synthesis of gossypol atropisomers and derivatives and evaluation of their anti-proliferative and anti-oxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* 13(13) : 4228—4237. 2005.
- [7] *Fadok V. A., De Cathelineau A., Daleke D. L., Henson P. M., Bratton D. L.* Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276(2): 1071—1077. 2001.
- [8] *Hamasaki Y., Tai H. H.* Gossypol, a potent inhibitor of arachidonate 5- and 12-lipoxygenases. *Biochim. Biophys. Acta.* 834(1): 37—41. 1985.
- [9] *Jinsart W., Ternai B., Polya G. M.* Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and avian myosin light chain kinase by flavonoids and related compounds. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 372(9): 819—827. 1991.
- [10] *Keshmiri-Neghab H., Goliaei B.* Therapeutic potential of gossypol: an overview. *Pharm. Biol.* 52(1): 124—128. 2014.
- [11] *Kitada S., Leone M., Sareth S., Zhai D., Reed J. C., Pellecchia M.* Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J. Med. Chem.* 46(20): 4259—4264. 2003.
- [12] *Lebois M., Dowling M. R., Gangatirkar P., Hodgkin P. D., Kile B. T., Alexander W. S., Josefsson E. C.* Regulation of platelet lifespan in the presence and absence of thrombopoietin signaling. *J. Thromb. Haemost.* 14(9): 1882—1887. 2016.
- [13] *Lentz B. R.* Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog. Lipid Res.* 42(5): 423—438. 2003.
- [14] *Lessene G., Czabotar P. E., Sleebbs B. E., Zobel K., Lowes K. N., Adams J. M., Baell J. B., Colman P. M., Deshayes K., Fairbrother W. J., Flygare J. A., Gibbons P., Kersten W. J., Kulasegaram S., Moss R. M., Parisot J. P., Smith B. J., Street I. P., Yang H., Huang D. C., Watson K. G.* Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* 9(6): 390—397. 2013.
- [15] *Mason K. D., Carpinelli M. R., Fletcher J. I., Collinge J. E., Hilton A. A., Ellis S., Kelly P. N., Ekert P. G., Metcalf D., Roberts A. W., Huang D. C., Kile B. T.* Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell.* 128(6): 1173—1186. 2007.
- [16] *McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W.* Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(4): a008656. 2013.
- [17] *Moon D. O., Kim M. O., Choi Y. H., Lee H. G., Kim N. D., Kim G. Y.* Gossypol suppresses telomerase activity in human leukemia cells via regulating hTERT. *FEBS Lett.* 582(23—24): 3367—3373. 2008.
- [18] *Nagata S., Suzuki J., Segawa K., Fujii T.* Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* 23(6): 952—961. 2016.
- [19] *Nguyen M., Marcellus R. C., Roulston A., Watson M., Serfass L., Murthy Madiraju S. R., Goulet D., Viallet J., Bélec L., Billot X., Acoca S., Purisima E., Wiegman A., Cluse L., Johnstone R. W., Beauparlant P., Shore G. C.* Small molecule obatoclox (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(49): 19 512—19 517. 2007.
- [20] *Petros A. M., Olejniczak E. T., Fesik S. W.* Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644(2—3): 83—94. 2004.
- [21] *Rudin C. M., Hann C. L., Garon E. B., Ribeiro de Oliveira M., Bonomi P. D., Camidge D. R., Chu Q., Giaccone G., Khaira D., Ramalingam S. S., Ranson M. R., Dive C., McKeegan E. M., Chyla B. J., Dowell B. L., Chakravarty A., Nolan C. E., Rudersdorf N., Busman T. A., Mabry M. H., Krivoshik A. P., Humerickhouse R. A., Shapiro G. I., Gandhi L.* Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 18(11): 3163—3169. 2012.
- [22] *Rukoyatkina N., Butt E., Subramanian H., Nikolaev V. O., Mindukshev I., Walter U., Gambaryan S., Benz P. M.* 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(6): e2898. 2017.
- [23] *Segawa K., Suzuki J., Nagata S.* Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(48): 19 246—19 251. 2011.
- [24] *Shamas-Din A., Kale J., Leber B., Andrews D. W.* Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(4): a008714. 2013.
- [25] *Smolenski A.* Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 10(2): 167—176. 2012.

[26] Souers A. J., Levenson J. D., Boghaert E. R., Ackler S. L., Catron N. D., Chen J., Dayton B. D., Ding H., Enschede S. H., Fairbrother W. J., Huang D. C., Hymowitz S. G., Jin S., Khaw S. L., Kovar P. J., Lam L. T., Lee J., Maecker H. L., Marsh K. C., Mason K. D., Mitten M. J., Nimmer P. M., Oleksijew A., Park C. H., Park C. M., Phillips D. C., Roberts A. W., Sampath D., Seymour J. F., Smith M. L., Sullivan G. M., Tahir S. K., Tse C., Wendt M. D., Xiao Y., Xue J. C., Zhang H., Humerickhouse R. A., Rosenberg S. H., Elmore S. W. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19(2): 202—208. 2013.

[27] Sulkshane P., Teni T. BH3 mimetic Obatoclax (GX15—070) mediates mitochondrial stress predominantly via MCL-1 inhibition and induces autophagy-dependent necroptosis in human oral cancer cells. *Oncotarget.* 8(36): 60 060—60 079. 2017.

[28] Suzuki J., Denning D. P., Imanishi E., Horvitz H. R., Nagata S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science.* 341(6144): 403—406. 2013.

[29] Verhoven B., Schlegel R. A., Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182(5): 1597—1601. 1995.

[30] Vogler M. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Adv. Med.* 2014: 943648. 2014.

[31] Vogler M., Hamali H. A., Sun X. M., Bampton E. T., Dinsdale D., Snowden R. T., Dyer M. J., Goodall A. H., Cohen G. M. BCL2/BCL-X(L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood.* 117(26): 7145—7154. 2011.

[32] Vogler M., Weber K., Dinsdale D., Schmitz I., Schulze-Osthoff K., Dyer M. J., Cohen G. M. Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ.* 16(7): 1030—1039. 2009.

[33] Wang X., Howell C. P., Chen F., Yin J., Jiang Y. Gossypol-a polyphenolic compound from cotton plant. *Adv. Food Nutr. Res.* 58: 215—263. 2009.

[34] Wei J., Kitada S., Rega M. F., Emdadi A., Yuan H., Cellitti J., Stebbins J. L., Zhai D., Sun J., Yang L., Dahl R., Zhang Z., Wu B., Wang S., Reed T. A., Wang H. G., Lawrence N., Sebt S., Reed J. C., Pellecchia M. Apogossypol derivatives as antagonists of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Mol. Cancer Ther.* 8(4): 904—913. 2009.

[35] Zhai D., Jin C., Satterthwait A. C., Reed J. C. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ.* 13(8): 1419—1421. 2006.

[36] Zhan W., Hu X., Yi J., An Q., Huang X. Inhibitory activity of apogossypol in human prostate cancer in vitro and in vivo. *Mol. Med. Rep.* 11(6): 4142—4148. 2015.

[37] Zhang H., Nimmer P. M., Tahir S. K., Chen J., Fryer R. M., Hahn K. R., Iciek L. A., Morgan S. J., Nasarre M. C., Nelson R., Preusser L. C., Reinhart G. A., Smith M. L., Rosenberg S. H., Elmore S. W., Tse C. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ.* 14(5): 943—951. 2007.

[38] Zwaal R. F., Comfurius P., Bevers E. M. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376(3): 433—453. 1998.

Поступила 3 VII 2018