

УДК: 576.314: 576.367: 576.385+612.017.1+616-006

*Ростислав БІЛИЙ*

## **ЗМІНИ ПОВЕРХНІ ВІДМИРАЮЧИХ КЛІТИН ТА ІМУННА ВІДПОВІДЬ**

*Львівський національний університет імені Данила Галицького,  
Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна.  
r.bilyy@gmail.com*

*На поверхні відмираючих клітин відбуваються зміни, необхідні для їхнього усунення фагоцитами. Здатність відмираючих клітин вказувати мікрооточенню на необхідність свого поглинання та перетравлення є ключовою ознакою апоптозу, і запобігає ушкодженню тканин та запаленню, притаманних некрозу. Дефіцит поглинання відмираючих клітин може сприяти накопиченню імуногенних компонентів та утворенню аутоантитіл і наступному розвитку хронічних аутоімунних захворювань. Даний огляд підсумовує сучасні дані щодо змін, які відбуваються на поверхні відмираючих клітин та їх впливу на оточуючі клітини, зокрема клітини імунної системи.*

**Ключові слова:** апоптоз, некроз, плазматична мембрана, глікани, запалення.

*Rostyslav BILYY*

## **CHANGES IN THE SURFACE OF DYING CELLS AND IMMUNE RESPONSE**

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University  
Institute of Cell Biology, NASU, Lviv, Ukraine  
r.bilyy@gmail.com*

**Abstract.** *Surface of dying cells is undergoing changes, needed for their effective clearance by phagocytes. Ability of dying cells to indicate to their microenvironment the necessity of self-elimination is a key feature of apoptosis and is preventing tissue damage and inflammation, attributable to necrosis. Deficiency of dying cell engulfment leads to the accumulation of immunogenic components of dying cells and to the formation of autoantibodies and subsequent development of autoimmune disorders. Current review summarizes latest data regarding changes of the surface of dying cells and their influence of neighboring cells, particularly on cells of immune system. It briefly covers the process of cell death and changes on dying cell surface; processes of dying cell elimination, including signals for attracting phagocytes (“find me” signals), signals for recognition of apoptotic cells (“eat me” signals), signals for recognition of viable cells (“don’t eat me” signals);*

*process of apoptotic cell engulfment and immune response of the organism and deals with the consequences of defective clearance of apoptotic cells.*

*Key words: apoptosis, necrosis, plasma membrane, glycans, inflammation.*

## 1. ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН ТА ЗМІНА ПОВЕРХНІ

Апоптоз — це скоординований фізіологічний процес запрограмованої загибелі клітин, що охоплює серію біохімічних подій, які призводять до загибелі та елімінації клітин. Апоптоз є життєво важливим для ембріологічного розвитку та підтримки тканинного гомеостазу у багатоклітинних організмах і характеризується специфічними морфологічними змінами відмираючих клітин, а саме: втратою мітохондріального мембранного потенціалу та асиметрії мембрани, активацією каспаз, перебудовою цитоскелета, блебінгом (утворенням везикул) плазматичної мембрани (ПМ), конденсацією хроматину та фрагментацією ДНК. Обсяги апоптичних процесів в організмі є значними: щогодини в організмі людини шляхом апоптозу гине близько мільярда клітин (усього в організмі міститься  $10^{13}$ – $10^{14}$  клітин, приблизно  $2,4 \times 10^6$  еритроцитів утворюються щосекунди; обіг циркулюючих нейтрофілів сягає сотні мільярдів клітин на день) (Erwig & Henson, 2007). Близько 95% Т-лімфоцитів знищуються завдяки негативній селекції у тимусі, забезпечуючи імунну толерантність, а за 80 років життя людини у кістковому мозку, лімфатичних вузлах та кишківнику утворюється до двох тон апоптичних клітин (Hotchkiss, Strasser, McDunn, & Swanson, 2009). Отже, відповідна кількість відмираючих клітин повинна видалятися клітинами макрофагінної системи організму, тому навіть незначні порушення у цьому процесі як у бік надмірного зростання його інтенсивності, так і в бік його надмірного гальмування, призводять до розвитку різних патологічних станів, серед яких такі поширені патології, як рак, автоімунні захворювання, нейродегенеративні хвороби, імунодефіцити та ін.

Під час апоптозу у ПМ відбуваються зміни, необхідні для усунення відмираючих клітин фагоцитами. Апоптична загибель клітин характеризується чіткою часозалежною послідовністю подій, яка розпочинається із дії індуктора апоптозу та завершується повним усуненням решток клітини внаслідок фагоцитозу клітинами макрофагінної системи чи сусідніми епітеліоцитами. Здатність апоптичних клітин вказувати мікрооточенню на необхідність свого поглинання та перетравлення є ключовою ознакою апоптозу, що запобігає ушкодженню тканин та запаленню, які притаманні некрозу.

Якщо апоптичні клітини видаляються неефективно, цілісність мембран, що їх вкривають, може порушуватись (особливо після виснаження депо доступного АТФ), вивільняючи внутрішньоклітинні «сигнали небезпеки», здатні викликати

імуностимулюючі реакції (Munoz, Lauber, Schiller, Manfredi, & Herrmann, 2010). Окрім того, під час апоптичної загибелі на поверхні апоптичних утворень, у тому числі апоптичних везикул, відбуваються зміни через окиснювальні процеси, що призводять до появи імунологічно «нових» аутоантигенів (Casciola-Rosen, Anhalt, & Rosen, 1994). Дефіцит поглинання відмираючих клітин може, у такий спосіб, сприяти накопиченню окиснених неоантигенів, які, будучи імуногенними, спричиняють утворення антитіл, здатних зв'язувати не лише компоненти відмираючих клітин, а й здорові клітини та тканини. Утворення таких аутоантитіл призведе до розвитку хронічних аутоімунних захворювань, як описано для системного червоного вовчаку (СЧВ) (Munoz et al., 2010). Відомо, що макрофаги пацієнтів із СЧВ виявляють знижений фагоцитоз аутологічного апоптичного матеріалу *in vitro* (Herrmann et al., 1998).

Кількість описаних клітинних та молекулярних маркерів апоптозу у цитоплазмі, ядрі та мітохондріях зростає щороку (Lawen, 2003). Експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні ПМ було першою історично описаною ознакою ПМ відмираючих клітин (Fadok et al., 1992) та використано для їх детекції (Reutelingsperger & Christiaan Peter, 1998). Зміни на рівні поверхні клітини не є найбільш ранніми відповідями на дію апоптоз-індукуючих чинників, проте такі зміни є першими ознаками, якими відмираюча клітина дає знати своєму оточенню про загибель. До того ж, використання маркерів запрограмованої загибелі клітин на поверхні ПМ має безперечну перевагу у зв'язку з відсутністю необхідності руйнувати клітини чи в якийсь інший спосіб забезпечувати проникнення маркерів апоптозу всередину відмираючих клітин.

Зважаючи на те, що процес загибелі клітин є тривалим у часі, перші зміни у клітині після дії апоптоз-індукуючих чинників можна зафіксувати уже через кілька хвилин (Kaminskyu, Kulachkovskyu, & Stoika, 2008). Водночас порушення асиметрії ліпідного бішару ПМ відбувається через 4-6 год, деградація ядерного хроматину розпочинається приблизно через годину після порушення асиметрії ліпідів, а утворення апоптичних везикул (блебінг чи зейоз) – через 2 год після порушення асиметрії ліпідів (Verhoven, Schlegel, & Williamson, 1995); при цьому фрагментація клітини на апоптичні везикули триває до 9-12 год, а інколи й до 24 год (Lauber, Blumenthal, Waibel, & Wesselborg, 2004). Врешті, у клітини вичерпуються внутрішньоклітинні запаси АТФ, які дозволяють їй залишкам підтримувати цілісність ПМ, що призводить до витоку внутрішньоклітинного вмісту у міжклітинне середовище, тобто до утворення вторинно-некротичних клітин (Janko et al., 2013).

Доволі часто виникає питання – коли ж вважати клітину «мертвою» чи «від-

мираючою»? У даній роботі було дотримано думки більшості учених, що «апоптичною», чи «відмираючою», клітину слід вважати тоді, коли такою її вважають оточуючі клітини, тобто при першій зміні складу ПМ клітини чи при вивільненні клітиною через ПМ певних внутрішньоклітинних сполук у середовище (Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013; Munoz et al., 2013). Крім того, останні технічні досягнення дозволяють одночасно аналізувати кілька параметрів загибелі клітини (Munoz et al., 2013) та виявляти клітини, які містять внутрішні ознаки апоптичних процесів, але не містять їх на своїй поверхні. Такі клітини класифікують як «ранні апоптичні» (Munoz et al., 2013).

Некротична загибель клітин супроводжується порушенням цілісності ПМ (а отже, і негайною втратою мембранного потенціалу) та витоком внутрішньоклітинних компонентів в оточуюче середовище (що спричинятиме запальну реакцію). Даний тип загибелі може виникати як негайна відповідь на екстремальний чинник (гіпертермія чи механічне ушкодження), і тоді клітинна смерть класифікується як первинний некроз, або ж порушення цілісності плазматичної мембрани може відбуватись на пізніх стадіях апоптичної загибелі, коли відмираючі клітини не були своєчасно усунені фагоцитарною системою організму і вже вичерпали свої енергетичні запаси для підтримання цілісності ПМ. У такому випадку має місце вторинний некроз. Незважаючи на подібні назви, первинно- і вторинно-некротичні клітини є імунологічно відмінними, оскільки перші негайно вивільняють свої компоненти у середовище, а останні зазнають модифікації компонентів (включаючи окиснення та каспазо-залежну деградацію) перед їх вивільненням у позаклітинний простір (Janko et al., 2013).

Для деяких типів клітин характерні специфічні форми загибелі, які притаманні саме цим типам клітин, пов'язані з їхніми функціями та розташуванням, і водночас супроводжуються значними змінами поверхні клітини. Так, зовнішні клітинні шари зроговілого епітелію чи волосся гинуть шляхом кератинізації, при цьому створюють покрив на поверхні організму, що є стійким до механічних чинників, непроникним для рідин та патогенних організмів (Alberts et al., 2002). Відносно нещодавно для нейтрофілів було виявлено новий специфічний шлях загибелі – нетоз (від англ. Neutrophil Extracellular Traps, NETs – утворення позаклітинних нейтрофільних пасток), що супроводжується активацією нейтрофілів, вивільненням їхнього внутрішньоклітинного вмісту, насамперед ДНК, гістонів та ензимів нейтрофільних гранул, яке спрямоване на утворення захисної плівки/покриву у місцях активацій нейтрофілів (тобто, ділянках проникнення патогенних мікроорганізмів), для зв'язування сторонніх об'єктів і утворення захисного покриву навколо них (Brinkmann et al., 2004).

Відомо, що основна функція нейтрофілів пов'язана із фагоцитозом мікроорганізмів та вивільненням антимікробних сполук. Проте при гострій запальній реакції ця стратегія є неефективною, а запалення призводить до накопичення нейтрофільних гранулоцитів у ділянці запалення, що врешті супроводжується нетозом. Утворені позаклітинні нейтрофільні пастки створюють механічний бар'єр для поширення джерела інфекції та нейтралізують її причину. Надмірне ж утворення позаклітинних нейтрофільних пасток при системному запаленні може мати згубні віддалені наслідки, оскільки здатне спричинити накопичення окиснених комплексів гістонів і ДНК, що може спровокувати утворення авто-антитіл (Hakkim et al., 2010).

## 2. ЗМІНИ ПОВЕРХНІ КЛІТИН ТА ІМУННА ВІДПОВІДЬ

**2.1. Процеси усунення апоптичних клітин.** Фагоцитоз сторонніх патогенів та аутологічних апоптичних клітин має подібний результат – поглинання позаклітинного елемента, проте ці два процеси опосередковуються різними молекулярними механізмами і призводять до імунологічно відмінних наслідків. Так фагоцитоз опсонізованих патогенів через рецептори комплементу або Fc-рецептори запускає прозапальну відповідь, тоді як поглинання апоптичних клітин призводить до проти-запальної реакції (Erwig & Henson, 2007). Для розрізнення цих двох процесів, останній прийнято називати ефероцитозом, від латинського *efferre* – хоронити (Vandivier, Henson & Douglas, 2006).

Усунення (кліренс) апоптотичних клітин є складним та багатостадійним процесом, який включає, щонайменше, наступні три кроки:

— Приваблення: знаходження апоптичних клітин фагоцитами, шляхом розпізнавання хемо-атрактантів апоптичних клітин (сигнали «знайди мене»);

— Розпізнавання та поглинання: ідентифікація патологічних змін у мембранах, таких як експонування ФС (фосфатидил серину), зміни глікозилювання компонентів у глікокаліксі, та/або зв'язування специфічних адапторних молекул (сигнали «з'їж мене»). Позитивне розпізнавання призводить до фагоцитозу, аналізу (перевірки на патогени) та деградації поглинутого матеріалу;

— Пригнічення імунної відповіді: продукування протизапальних цитокінів (сигнали «терпи мене», такі як IL-10 і TGF- $\beta$ ).

### Приваблення фагоцитів: сигнали «знайди мене»

Фагоцити повинні знаходити апоптичні клітини до того, як відбудеться деструкція їхньої мембрани, що призводить до вивільнення небезпечних внутрішньоклітинних речовин, які генерують небажану запальну відповідь. Для цього є необхідною секреція факторів хемотаксису, що притягують моноцити та макрофаги, оскільки

фагоцити, як правило, не знаходяться у безпосередній близькості до апоптичних клітин. Справді, було описано декілька «приваблювальних» чинників, задіяних у скеруванні фагоцитів до відмираючих клітин. В цілому, спеціалізовані фагоцити, як, наприклад, макрофаги і клітини мікроглії, є рухливими і шукають у навколишньому мікроточенні апоптичні клітини. Вони можуть бути спрямовані шляхом хемотаксису до апоптичних клітин чи місць ураження для здійснення «зачистки» від потенційно шкідливих чинників (Naroli & Neumann, 2009). Неспеціалізовані фагоцити, як, наприклад, пігментовані епітеліальні клітини сітківки, навпаки, в основному є, нерухливими. Згадані епітеліальні клітини розташовані дотично до кінців фоторецепторних елементів, і при зношуванні останніх одразу їх поглинають (Strauss, 2005). Іншими нерухомими фагоцитами є ендотеліальні та епітеліальні клітини. Навіть деякі спеціалізовані фагоцити, такі як клітини Купфера у печінці, можуть бути відносно стаціонарними; вони очікують на появу поряд із собою сторонніх частинок, а не переслідують їх у кровоплинні.

До відомих атрактантів належать деякі фосфоліпіди. Так лізофосфатидилхолін (ЛФХ) і сфінгозин-1-фосфат (С1Ф) виступають у ролі посередників у процесі кліренсу апоптичних клітин. ЛФХ вивільняється із апоптичних клітин під дією каспазо-3 опосередкованої активації кальцій незалежної фосфоліпази А2 (iPLA2), і стимулює залучення моноцитів та макрофагів (Lauber et al., 2003). Використання методів РНК-інтерференції і дослідження експресії показало, що G-білок-зв'язаний рецептор G2A залучений у хемотаксисі моноцитів. Припускають, що ЛФХ та G2A виступають у ролі важливої ліганд/рецепторної системи для приваблення фагоцитів до апоптичних клітин (Peter et al., 2008). ЛФХ залучений в апоптичному розпізнаванні, діючи також як «з'їж мене» сигнал, що призводить до гіпотези бівалентної функції ЛФХ у процесі кліренсу (Mueller, Sheriff, Gaipf, Wesselborg, & Lauber, 2007). С1Ф являє собою біоактивний ліпід, що бере участь у регуляції важливих клітинних процесів, включаючи перебудови цитоскелета, ріст, рухливість та виживання (Spiegel & Milstien, 2003). С1Ф вивільняється із апоптичних клітин, індукуючи хемотаксис моноцитів TLR-1 та клітин U937, а також первинних моноцитів та макрофагів (Gude et al., 2008). Цікаво, що апоптичні клітини Jurkat та U937 можуть активувати утворення та секрецію С1Ф білком сфінгозин кіназою 1 (SphK1), залучаючи клітини макрофагальної системи до їхнього поглинання. Нуклеотиди, а саме АТФ і УДФ, вивільняються із апоптичних клітин через канали із паннексину-1 (Chekeni et al., 2010). Після вивільнення вони формують градієнт концентрації для мікрогліального хемотаксису, зв'язуючись із пуринергічними рецепторами (пуриноцепторами) P2Y12 і P2Y6 відповідно.

У цілому, відомості про сигнали-хемоатрактанти апоптичних клітин наразі доволі обмежені. Оскільки цілісність ПМ апоптичних клітин у процесі запрограмованої загибелі не порушується, тож чи можуть характерні апоптичні білки внутрішньоклітинного вмісту ставати хемоатрактантами, наразі не з'ясовано.

### **Розпізнавання апоптичних клітин: сигнали «з'їж мене»**

Розпізнавання ФС на зовнішній стороні ПМ являє собою ключовий сигнал для запуску фагоцитозу як апоптичних, так і некротичних клітин (Bottcher et al., 2006; Ravichandran & Lorenz, 2007). Розпізнавання ФС відбувається стереоспецифічним чином (L-, але не D-фосфосерин) (Umeda, Igarashi, Nam, & Inoue, 1989). Проте очевидно, що ФС розпізнається або рецепторами безпосередньо як «голий» ліпід, або у поєднанні з іншими розчинними білками, що виступають у якості «моста» чи «адаптерної молекули» між фагоцитами та ФС на клітинах-мішенях. На противагу мембраноасоційованим молекулам розпізнавання із єдиним рецептор-зв'язувальним доменом, розчинні молекули-адаптори мають щонайменш два зв'язуючі домени, один споріднений до рецептора, інший – до ліганда-сигналу (PPBD, від phagocytosis prey-binding domain) (Caberoy, Zhou, & Li, 2010). Розчинні молекули-адаптори, зв'язуючись і експонуючись на апоптичних клітинах, слугують сигналами до видалення і покращують специфічне усунення апоптичних клітин. Досі було вивчено кілька адаптерних молекул, що задіяні у цьому процесі, у тому числі глобулярний білок молочного жиру MFG-E8 (Nanayama et al., 2002), продукт специфічного гену затримки росту GAS-6 (ліганд для рецептора тирозинкінази MerTK) (Scott et al., 2001),  $\beta$ -2-глікопротеїн-1 (Balasubramanian & Schroit, 1998), C-реактивний білок (Lutz, 2004), отриманий із сироватки білок S (Anderson et al., 2003), і анексин I (Aur et al., 2003), а також анексини V та VI (Chaurio et al., 2009). Так, Gas6 і S-білок зв'язуються із ФС через свої N-кінцеві залишки  $\gamma$ -карбоксихлутамінової кислоти (Gla-11) і взаємодіють із рецептором фагоцитозу MerTK через два C-кінцеві глобулярні ламінін-G-подібні домени. Білки Tubby і Tulp1 нещодавно ідентифіковано як нові ліганди рецептора MerTK із N-кінцевими послідовностями Ліз/Arg-(X)1–2-(Ліз)3 для впізнавання рецептора і C-кінцевим PPBD (Caberoy et al., 2010). Ці та інші адаптерні молекули виступають у ролі посередників при розпізнаванні та поглинанні відмираючих клітин макрофагами (рис. 1.7). Цікаво, що делеційна мутація домена розпізнавання об'єкта фагоцитозу у будь-якому із названих білків-адапторів призводить до втрати їхньої здатності стимулювати фагоцитоз епітеліальних пігментованих клітин сітківки, а також до деградації сітківки в цілому за нез'ясованими механізмами (Carroll, Gomez, & Shapiro, 2004). Кілька макрофагальних рецепторів-сміттярів (scavenger receptor) також можуть взаємодіяти із ФС або безпосередньо, або через

адаптерні молекули на поверхні апоптичних клітин (Rigotti, Acton, & Krieger, 1995). Пошук рецепторів до ФС являє собою одну із основних проблем для багатьох дослідників по всьому світу. В.Фадок (Fadok) та її колегами ідентифіковано поверхневий білок на макрофагах і запропоновано, що він являє собою рецептор для ФС (ФСР) (Fadok et al., 2000). Однак, згодом було спростовано роль цього передбачуваного ФСР як поверхневого рецептора (Bose et al., 2004; Mitchell et al., 2006). Іншими авторами, використовуючи системи клонування опосередкованою ретровірусною експресією і бібліотеки кДНК із перитонеальних макрофагів мишей, ідентифіковано білок Tim4 (Т-клітинний імуноглобулін і муциновий-домен-вмісна молекула) як один із важливих ФСР (Miyanishi et al., 2007). Tim4 є трансмембранним білком типу I, який зв'язується із апоптичними клітинами шляхом розпізнавання ФС через їхній імуноглобуліновий (Ig) домен. Крім того, експресія Tim4 у фібробластах підвищує їхню здатність поглинати апоптичні клітини. Цікаво, що серед інших представників родини Tim лише Tim1 здатний зв'язувати ФС, але ні Tim2, ні Tim3 цього не здатні робити. Було показано, що Tim4 та Tim1 специфічно зв'язують ФС на поверхні апоптичних клітин (Kobayashi et al., 2007). Крім того, було виявлено, що Tim4 експресується на людських та мишачих макрофагах, а також дендритних клітинах. Методом кристалічного (рентгено)структурного аналізу мишачого Tim4, ідентифіковано метало-залежний сайт зв'язування лігандів в імуноглобуліновому домені, як ФС-зв'язуючий сайт до рецептора Tim4 (Santiago et al., 2007).

Стабілін-2 (Stabilin-2) було ідентифіковано у якості багатофункціонального рецептора-сміттяря, задіяного в ендцитозі модифікованих ліпопротеїдів низької щільності та кінцевих продуктів глікування (Tamura et al., 2003). Він містить великий позаклітинний домен, який складається із 7-ми FAS1 доменів, 1-го домену X-link і 4-ох повторів (епідермальний фактор росту (EGF))-подібних доменів (EGFrp). Експресію Stabilin-2 було виявлено у людській та мишачій селезінці, людських макрофагах моноцитарного походження, альвеолярних макрофагах, а також кількох клітинних лініях макрофагів (Falkowski, Schledzewski, Hansen, & Goerd, 2003). Крім того, даний рецептор розпізнає зістарені та апоптичні клітини, опосередковуючи їхнє повне поглинання. Пригнічення експресії stabilin-2 у макрофагах значно інгібує фагоцитоз апоптичних клітин. Використовуючи агоністичні антитіла проти stabilin-2, замість природного ліганду ФС, було отримано співмірну проти-запальну реакцію. Цікаво, що надмірна експресія stabilin-2 у фібробластах значно підвищує зв'язування та поглинання зістарених, але не життєздатних, еритроцитів (S. Y. Park, Jung, et al., 2008). Крім того, EGFrp у stabilin-2 можуть безпосередньо та специфічно розпізнавати ФС і конкурентно інгібувати поглинання зістарених еритроцитів і апоптичних клітин за допомогою



прямої та преференційної взаємодії із ФС (S. Y. Park, Kim, Jung, Bae, & Kim, 2008).

Іншим важливим рецептором, залученим у розпізнаванні ФС є brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). BAI1 є поверхневим рецептором модуля сигналювання ELMO/Dock180/Rac, який має здатність зв'язувати ФС на апоптичних клітинах (D. Park et al., 2007). З одного боку, ELMO та Dock180 працюють разом як фактор заміни гуанінового нуклеотиду (GEF) для малої ГТФази Rac, регулюючи організацію актинового цитоскелету фагоцитів під час поглинання апоптичних клітин (Brugnera et al., 2002; Gumienny et al., 2001). З іншого боку, BAI1 є 7-ми-доменним трансмембранним білком, який належить до родини рецепторів спряжених з G-білками, задіяними в адгезії (adhesion-type G-protein coupled receptor family), із протяжною позаклітинною ділянкою (Bjarnadottir et al., 2004). Рецептор BAI1 функціонує як рецептор-захоплення для розпізнавання та подальшої інтерналізації апоптичних клітин. Повтори тромбоспондину типу 1 у межах позаклітинної ділянки BAI1 беруть участь у безпосередньому зв'язуванні із ФС. BAI1 утворює тримерний комплекс із ELMO та Dock180, і функціональні дослідження показали, що BAI1 кооперує із шляхом ELMO/Dock180/Rac для стимулювання максимального поглинання апоптичних клітин. Крім того, експресія BAI1 у фібробластах посилює зв'язування та поглинання апоптичних тимоцитів (D. Park et al., 2007).

Іншими рецепторами поглинання є інтегрини  $\alpha\beta3$  та  $\alpha\beta5$ , які розпізнають MFG-E8 (Hanayama et al., 2002), LRP (CD91), що зв'язується із кальретикуліном (Gardai et al., 2005), манозні рецептори (MBL та MBR) і пускові рецептори-2, експресовані мієлоїдними клітинами (TREM2).  $\beta5$ -Дефіцитні миші, у котрих відсутній інтегрин  $\alpha\beta5$ , страждають дегенерацією сітківки і віковою сліпотою, що виникає внаслідок розладу синхронізованого фагоцитозу пігментованими епітелійними клітинами (Nandrot et al., 2004). Рецептор CD36 здатний впізнавати тромбоспондин-1 і окислені ліпіди (Lauber et al., 2004). Манозні рецептори впізнають власні або сторонні (мікробного походження) глікопротеїни та гліколіпіди. TREM2 належить до родини DAP12-асоційованих рецепторів і відіграє важливу роль у вродженому імунному захисті, головню експресуючись клітинами мікроглії центральної нервової системи (Hsieh et al., 2009). Втрата функціональності TREM2 або DAP12 унаслідок мутації призводить до синдрому Насу-Хакола, рідкісного і фатального нейродегенеративного розладу, внаслідок порушеного видалення мікрогліальними клітинами відмираючих клітин (Thrash, Torbett, & Carson, 2009). Відсутність експресії TREM2 клітинами мікроглії унеможливує видалення ними мембранних везикул і сприяє експресії прозапальних цитокінів (Neumann & Takahashi, 2007). Сайт розпізнавання TREM2 експонується апоптичними клітинами значно сильніше, прискорюючи їхнє

TREM2-опосередковане поглинання (Wu-Hsieh, Chen, & Lee, 1998). Однак, ендогенний ліганд рецептора TREM2 все ще не встановлений.

Отже, із розпізнаванням ФС та його зв'язуванням на поверхні апоптичних клітин пов'язана чимала кількість молекул (Chaurio et al., 2009). Проте багато деталей їхнього функціонування залишаються невідомими. Як ФС взаємодіє із такою кількістю рецепторів на різних клітинах, як ФС розпізнає кожну із цих різних молекулярних структур у вигляді мономерних або мультимерних комплексів у ПМ, чи є ще рецептори, які буде описано, і сигнальні шляхи, які залучені після розпізнавання ФС? Як розпізнавання ФС співвідноситься із розпізнаванням інших сигнальних молекул «з'їж мене», зокрема змінених гліканів? Так, відомо, що ФС експонується на поверхні активованих лімфоцитів та при деяких інших фізіологічних подіях на поверхні життєздатних клітин, при цьому ці клітини не зазнають фагоцитозу, що донедавна залишалось одним із невіршених питань. Пояснення даного феномену подано у нещодавній роботі (Kimani et al., 2014), де показано, що при апоптичній загибелі ФС окиснюється і саме наявність оксо-ФС є необхідним для запуску процесів фагоцитозу.

Існує декілька механізмів, що призводять до екстерналізації сигналів видалення на поверхні апоптичних клітин. Білок S, Gas6 та MFG-E8 секретуються із класич-

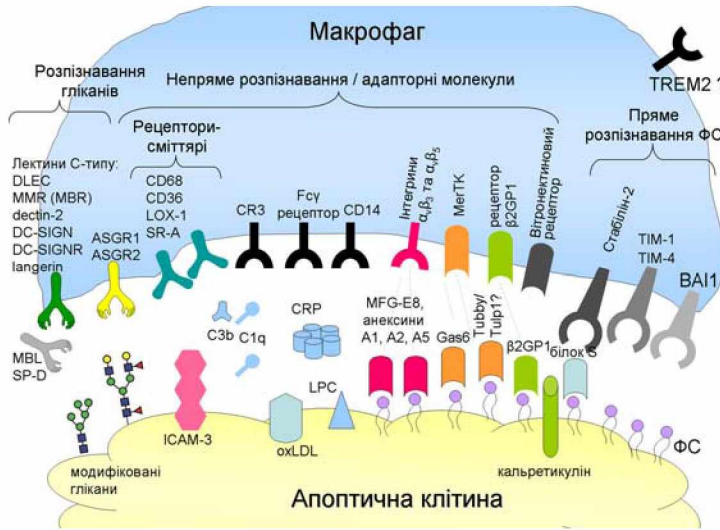


Рис. 1. Основні сигнали поглинання апоптичних клітин і відповідні їм рецептори фагоцитозу (позначені однаковими кольорами). Окрім того, показано відомі макрофагальні рецептори (наприклад, манозо-специфічний лектин, лангерин) та відомі сигнали «з'їж мене» на апоптичних клітинах (наприклад, модифіковані глікани), хоч даних про взаємодію між ними не має. Схема за даними (R. Bilyy & Stoika, 2007; Chaurio et al., 2009; Li, 2012; Scharenberg, Schwaradt, Rabbani, & Ernst, 2012).

ними сигнальними пептидами, тоді як Tubby і Tulp1 не мають сигнальних ділянок і вивільняються нетрадиційними шляхами (Caberoy & Li, 2009). Несекретовані цитоплазматичні білки можуть вивільнитись через пошкодження плазмалеми під час апоптозу, і слугувати сигналами до поглинання. Таким чином функціонує, наприклад, анексин I (Agur et al., 2003), який витікає із клітини під час апоптозу. Подібно, ФС і кальретикулін, будучи мембраноасоційованими сигналами, екстерналізуються під час апоптозу. Нарешті, десіалювання поверхні апоптичних клітин призводить до експонування раніше замаскованих гліканів, які можуть брати участь у процесі впізнання апоптичних клітин фагоцитами (Meesmann et al., 2010) (Рис. 1).

Нашими останніми дослідженнями показано, що при загибелі клітин на їх поверхні зміни гліканів відбуваються двома шляхами: активовані нейрамінідази на поверхні клітини десіалюють існуючі глікани і призводять до утворення десіалованих, галактозовмісних гліканів; а експонування внутрішніх мембран клітини, зокрема компонентів ендоплазматичного ретикулуму, на поверхні клітини супроводжується експонуванням олігоманозильних гліканів (Rostyslav Bilyy et al., 2012). Олігоманозильні, десіаловані глікани, а також ФС діють комплементарно у забезпеченні процесів ефероцитозу (R. Bilyy & Stoika, 2013), а їх комплементарна взаємодія може бути використана для створення мультифакторних систем для елімінації відмираючих клітин (Tomlin et al., 2016).

### **Розпізнавання життєздатних клітин: сигнали «не з'їж мене»**

У той же час, є докази наявності антифагоцитарних сигналів на поверхні здорових клітин, які експонуються для запобігання ненавмисного поглинання макрофагами. Прикладом такої молекули є CD47, котрий широко розповсюджений на клітинах і зв'язується із численними білками, включаючи SIRP $\alpha$  на фагоцитах (Oldenborg et al., 2000) та кластер диференціації CD172a. Взаємодія CD47–SIRP $\alpha$  блокує поглинання апоптичних клітин (Gardai et al., 2005). У роботі (Rodriguez et al., 2013) описано мінімальну пептидну послідовність білка CD47, яка б забезпечувала анти-фагоцитарні функції; кон'югація такого пептиду із терапевтичними наночастинками значно продовжувала час їхнього перебування у кров'яному руслі та пригнічувала фагоцитоз макрофагами. Іншим прикладом такого сигналу є CD31 (S. Brown et al., 2002) або PECAM-1, який запобігає зв'язуванню фагоцитів та пригнічує фагоцитоз (Grimsley & Ravichandran, 2003), а також CD200 та інгібітор активатора плазміногену (plasminogen activator inhibitor) (PAI)-1 (G. C. Brown & Neher, 2012). Іншим сигналом «не з'їж мене» виступає сіалова кислота (G. C. Brown & Neher, 2012), яка зв'язується із сіглеками, наприклад, сіглеком-11 (Elward & Gasque, 2003), запобігає зв'язуванню сигналів «з'їж мене» факторами комплексу C1q та C3b та, відповід-

но, блокує їхню здатність індукувати фагоцитоз. Апоптичні події у клітині супроводжуються втратою на її поверхні сигналів «не з'їж мене» (G. C. Brown & Neher, 2012; Litvack & Palaniyar, 2010).

**2.2. Поглинання апоптичних клітин та імунна відповідь організму.** Характерною ознакою кліренсу апоптичних клітин є незапальна та, зазвичай, неімуногенна природа цього процесу. На відміну від поглинання патогенів або FcR-опосередкованого фагоцитозу, поглинуті апоптичні клітини не викликають продукції запальних цитокінів. У даний час вважається, що фагоцитоз апоптичних клітин LPS-активованими макрофагами індукує секрецію протизапального та імунорегуляторного цитокіну IL-10 та зменшує секрецію запальних цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-12 (Vøll et al., 1997). Крім того, макрофаги, що поглинають апоптичні клітини *in vitro* секретують TGF- $\beta$ , який є головним учасником протизапальних реакцій (Lucas et al., 2006). Цікаво, що клітини, які не експерсують ФС також не спричиняють продукції TGF- $\beta$ 1 макрофагами, у той час як додавання ліпосом, що експонують ФС відновлює утворення згаданого цитокіну, що свідчить про важливу роль аніонного фосфоліпиду ФС як імунного супресора (Huynh, Fadok, & Henson, 2002). Отже, ФС вважається головним сигналом «з'їж мене» та імунним супресором у процесі кліренсу апоптичних клітин. Набагато менше відомо про роль модифікованих глікоєпітопів в усуненні відмираючих клітин (R. Bilyu & Stoika, 2007).

Оскільки у багатоклітинних організмах постійно гинуть мільйони клітин, і оскільки в організмі функціонує надійна система для їхнього швидкого розпізнавання та видалення, «мовчазний кліренс» апоптичних клітин, як вважають, бере участь у деяких станах, пов'язаних із порушеннями клітинного імунітету та зростанням рівня апоптозу. Рак, вплив радіації і деякі паразитарні та вірусні інфекції отримують перевагу над цим загальнопоширеним механізмом. Апоптичні промастиготи із паразитів *Leishmania* викликають вивільнення TGF- $\beta$  нейтрофілами, можа припустити, що наявність апоптичних паразитів надає перевагу для виживання життєздатних паразитів, що сприяють розвитку захворювання (van Zandbergen et al., 2006). Також «під апоптичні» клітини маскуються віруси віспи, малярійні плазмодії та інші, непереборні на сьогоднішній день, патогени (Mercer & Helenius, 2009).

Відмираючі клітини та імунізація. Імуноterapia пухлин є один із найбільш перспективним шляхів боротьби з раком. Вона ґрунтується на активізації імунної відповіді до поверхневих (розташованих на ПМ) антигенів пухлини, із подальшим запуском механізмів знищення пухлини імунними клітинами пацієнта; імуноterapia є персоналізованою і характеризується малою кількістю побічних наслідків. Оскільки пухлини володіють молекулярною ідентичністю, вираженою у пухлинно-

асоційованих антигенах (ТАА), якими можуть виступати змінені поверхневі білки, та найчастіше – глікани/глікопротеїни, індукція імунної відповіді проти них може забезпечити усунення пухлин. При цьому слід відзначити, що імунна система повинна «побачити» чужорідні ознаки пухлини, тобто вони повинні експонуватися на поверхні клітини. Фактично, сам факт появи таких антигенів повинен спричиняти імунну відповідь, і у багатьох випадках окремі виникаючі ракові клітини чи мікропухлини усуваються імунною системою на ранніх стадіях свого розвитку. Проте в інших випадках (які зазвичай клінічно діагностуються) імунна відповідь є недостатньою. Логічним підходом є імунізація пацієнта з метою посилення імунної відповіді, та цей на перший погляд простий підхід має ряд особливостей.

Як уже обговорювалось, апоптичні клітини, втрачаючи асиметрію ПМ експонують на своїй поверхні ФС (Fadok et al., 1992), при цьому самі апоптичні клітини володіють протизапальними властивостями (Voll et al., 1997), спрямованими на пригнічення імунної відповіді, які частково реалізуються через зв'язування ФС із молекулами анексіну А5 на поверхні апоптичних клітин (Chaurio et al., 2009; Munoz et al., 2007). Для посилення імуногенних властивостей апоптичних клітин авторами (Weiss et al., 2010) запропоновано для імунізації використовувати апоптичні клітини разом із анексіном А5, який маскує ФС на їхній поверхні, нівелює протизапальні сигнали і виконує роль ад'юванту. Проте такий підхід робить протипухлинну терапію малодоступною, спричиняючи додаткове імунне навантаження через імунізацію білком анексіном А5.

Тому одним із підходів для представлення імунній системі поверхневих маркерів клітин (у т.ч. пухлинних), забезпечуючи інактивіацію пухлинних клітин та адекватну імунну відповідь, є використання для імунізації мембранних везикул (Berthet et al., 2002). Утворення вип'ячувань ПМ (блебінг) характерне для різних біологічних процесів, зокрема, росту бактерій, проліферації евкаріотичних клітин, апоптозу евкаріотичних клітин, зокрема клітин крові, тощо (Charras, 2008). Вип'ячування ПМ, відділяючись від клітини, утворюють мембранні везикули. Останні зберігають усі імунологічні та біохімічні властивості мембран, і тому можуть бути використані для дослідження ПМ, зокрема проникнення фармакологічних чи інших препаратів через ПМ. Мембранні везикули також зберігають усі імунологічні властивості ПМ клітини, а отже, можуть бути використані для індукції імунної відповіді, як це описано для везикул бактерійних мембран у патентній заявці (Berthet et al., 2002). Так, внаслідок генно-інженерних модифікацій у грам-негативних бактерій видів *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* індуковано утворення мембранних везикул, які після відповідної очистки викорис-

тано у ролі бактерійного антигену чи ад'юванту (у поєднанні з іншим бактерійним антигеном) для імунізації з метою утворення імунної відповіді проти антигенів поверхні мембранних везикул (наприклад, ліпополісахариду). При імунотерапії з використанням мембранних везикул виникає потреба в ефективних способах індукції утворення МВ, які б не містили ФС, але зберігали інші мембранні компоненти, такі методи на момент початку виконання даної роботи були невідомими.

**2.3. Наслідки порушення усунення апоптичних клітин.** Видалення апоптичних клітин здійснюється за допомогою широкомасштабної та добре описаної (Ravishankar & McGaha, 2013) фагоцитарної системи організму, що складається із макрофагів, дендритних клітини, клітин Купфера, мікроглії та альвеолярних макрофагів. Епітеліальні клітини також здатні до поглинання відмираючих клітин зі свого мікрооточення, а в деяких ділянках організму, таких як сітківка, поглинання зістарених частин паличок і колбочок здійснюється виключно клітинами (пігментного) епітелію (Sparrow, Hicks, & Hamel, 2010). Видалення фрагментів зовнішніх сегментів фоторецепторів пігментними епітелійними клітинами сітківки є ключовим для збереження гомеостазу сітківки і регенерації фоторецепторів (Strauss, 2005). Зовнішні сегменти фоторецепторів повністю оновлюються приблизно за 10 днів, що означає поглинання епітелійними клітинами приблизно 75-кратного власного об'єму зношених фрагментів фоторецепторів упродовж одного року. Порушення цього процесу призводить до важких уражень сітківки (Kevany & Palczewski, 2010).

Якщо апоптичні клітини видаляються неефективно, цілісність мембран, що їх вкриває, може порушуватись (особливо після виснаження депо доступного АТФ), вивільняючи внутрішньоклітинні «сигнали небезпеки», здатні викликати імуностимулюючі реакції (U. S. Gaip et al., 2006; Pauling, 1948). Окрім того, під час апоптичної загибелі на поверхні апоптичних утворень, у тому числі апоптичних везикул, відбуваються зміни через окислювальні процеси, що призводять до появи імунологічно «нових» аутоантигенів (Casciola-Rosen et al., 1994). Дефіцит поглинання відмираючих клітин може, у такий спосіб, сприяти розвитку хронічних аутоімунних захворювань, як описано для системного червоного вовчаку (СЧВ) (Munoz et al., 2010). Макрофаги пацієнтів із СЧВ виявляли знижений фагоцитоз аутологічного апоптичного матеріалу *in vitro* (Herrmann et al., 1998). Крім того, у зрізах лімфатичних вузлів деяких пацієнтів із СЧВ, кількість зафарбованих макрофагів, що містили поглинутий апоптичний матеріал, була значно нижчою; такі макрофаги втратили типову морфологію і були менші, ніж ті, що виявлено у лімфатичних вузлах здорових осіб. У пацієнтів із СЧВ апоптичні ядерні залишки асоціювались із фолікулярними

дендритними клітинами у зародкових центрах (Baumann et al., 2002), таким чином, ймовірно, забезпечуючи сигнали виживання для В-клітин, які розвинули автореактивність під час випадкової соматичної мутації. Розвиток імунної відповіді на ядерні та апоптичні (окиснені) автоантигени є першим прямим наслідком накопичення апоптичних залишків, обумовлених порушенням кліренсу (Udo S. Gaipl et al., 2007). Це спостереження є прямим доказом ролі автоімунної відповіді в етіології СЧВ.

Другим наслідком порушення кліренсу є утворення антитіл до власних антигенів, наприклад, антиядерних автоантитіл, які зв'язують нуклеїново-вмісні апоптичні залишки у кров'яному руслі чи у тканинах із наступним утворенням імунних комплексів. Згодом ці імунні комплекси видаляються фагоцитами, що циркулюють у крові, макрофагами та ДК через Fc $\gamma$ -рецептор-опосередкований шлях фагоцитозу. Останній є асоційованим із секрецією великої кількості запальних цитокинів (Munoz et al., 2009). Кінцевим результатом є множинне ушкодження органів, що призводить до виникнення хронічного запалення.

Автоімунні захворювання – це патологічний стан, коли імунітет організму мобілізується не проти сторонньої сполуки, біологічного організму (вірусів, мікроорганізмів тощо) в якості антигену, а проти клітин та тканин власного організму. Внаслідок вироблення автоімунних антитіл, що з'єднуються із антигеном (яким стають власні тканини) і комплементом, імунна система атакує клітини і тканин власного організму, що призводить до пошкодження тканин і виникнення запальних процесів (Lim & Zouali, 2006). За нормальних умов такі процеси не відбуваються.

До автоімунних захворювань відноситься велика кількість системних хвороб сполучної тканини (СЧВ, ревматоїдний артрит, синдром Бехчета) та інших систем організму – розсіяний склероз, кардіоміопатія, дерматози тощо.

Зараз основний тип лікування автоімунних захворювань базується на реалізації імунодепресивної терапії із використанням кортикостероїдних гормонів, імунодепресантів та елімінації (виведення) автоімунних комплексів із організму шляхом проведення гемосорбції. Тобто, терапія спрямована на усунення симптомів, а не причин захворювання.

СЧВ це хронічне, зазвичай довготривале, потенційно летальне захворювання із непередбачуваними періодами загострення та ремісії та різноманітними клінічними проявами. СЧВ вражає переважно жінок (близько 90 % випадків) із частотою 1:200 (500 хворих на 100 000 населення) (Belmont, 2010), здебільшого дітородного віку. Близько 44,8 % жінок хворих на СЧВ нездатні зачати дитину (Al Arfaj & Khalil, 2010), а 22 % вагітностей у хворих на СЧВ закінчуються викиднем (Georgiou, Politi, Katsimbri, Sakka, & Drosos, 2000).

Однією із характерних ознак хворих на СЧВ є наявність великої кількості циркулюючих автоантитіл. Зокрема, вміст автоантитіл до внутрішньоклітинних компонентів – клітинного ядра (антиядерні антитіла), у сироватці крові хворих на СЧВ безпосередньо корелює із важкістю перебігу цього захворювання (Gomez-Puerta, Burlingame, & Cervera, 2008). Серед антиядерних антитіл значний відсоток займають антитіла із спорідненістю до ДНК (анти-ДНК антитіла) і гістонів (антигістонові антитіла) (Kurien & Scofield, 2006).

### ПІДСУМОК

Зміни поверхні клітини, а також вивільнення відмираючими клітинами сигнальних молекул є ключовими факторами, що вказують клітинному мікрооточенню на необхідність елімінації відмираючого матеріалу, яке зазвичай відбувається без ініціації запальних процесів. Порушення процесів усунення залишків апоптичних клітин призводить до їх перетворення у вторинно некротичні клітини, перманентної присутності в організмі імуногенних клітинних залишків, що і є ініціатором системних автоімунних захворювань на зразок СЧВ (Munoz et al., 2010). А відновлення здатності організму усувати (шляхом поглинання (ефероцитозу) та наступного перетравлення) відмираючий матеріал може стати перспективним підходом до терапії автоімунних розладів та досягнення клінічної ремісії.

### БІБЛІОГРАФІЧНІ ПОСИЛАННЯ

1. Al Arfaj, A. S., & Khalil, N. (2010). Pregnancy outcome in 396 pregnancies in patients with SLE in Saudi Arabia. *Lupus*, 19(14), 1665-1673.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
3. Anderson, H. A., Maylock, C. A., Williams, J. A., Paweletz, C. P., Shu, H., & Shacter, E. (2003). Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nature Immunol*, 4(1), 87-91.
4. Arur, S., Uche, U. E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A. E., et al. (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*, 4(4), 587-598.
5. Balasubramanian, K., & Schroit, A. J. (1998). Characterization of phosphatidylserine-dependent beta2-glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes. *Biol. Chem.*, 273(44), 29272-29277.
6. Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R. E., Manger, B., Gaipl, U., Neuhuber, W. L., et al. (2002). Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 46(1), 191-201.
7. Belmont, M. (2010). *Lupus Clinical Overview*.



8. Berthet J., Dalemans W., Denoel P., Dequesne G., Feron C., Garcon N., Lobet Y., Poolman J., Thiry G., Thonnard J., Voet P., Vaccines comprising outer membrane vesicles from gram negative bacteria. (2002) Patent application WO/2002/009746, A61K 39/102, A61K 39/39.
9. Bilyy, R., Shkandina, T., Tomin, A., Munoz, L. E., Franz, S., Antonyuk, V., et al. (2012). Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 496-503.
10. Bilyy, R., & Stoika, R. (2007). Search for novel cell surface markers of apoptotic cells. *Autoimmunity*, 40(4), 249-253.
11. Bilyy, R., & Stoika, R. (2013). Sweet taste of cell death: Role of carbohydrate recognition systems. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 85(6), 183-196.
12. Bjarnadottir, T. K., Fredriksson, R., Hoglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerstrom, M. C., & Schioth, H. B. (2004). The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, 84(1), 23-33.
13. Bose, J., Gruber, A. D., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., et al. (2004). The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol*, 3(4), 15.
14. Bottcher, A., Gaipf, U. S., Furnrohr, B. G., Herrmann, M., Girkontaite, I., Kalden, J. R., et al. (2006). Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arthritis Rheum*, 54(3), 927-938.
15. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
16. Brown, G. C., & Neher, J. J. (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci*, 37(8), 325-332.
17. Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., & Savill, J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, 418(6894), 200-203.
18. Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Trampont, A. C., et al. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*, 4(8), 574-582.
19. Caberoy, N. B., & Li, W. (2009). Unconventional secretion of tubby and tubby-like protein 1. *FEBS Lett*, 583(18), 3057-3062.
20. Caberoy, N. B., Zhou, Y., & Li, W. (2010). Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J*, 29(23), 3898-3910.
21. Carroll, K., Gomez, C., & Shapiro, L. (2004). Tubby proteins: the plot thickens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(1), 55-63.
22. Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., & Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 179(4), 1317-1330.
23. Charras, G. T. (2008). A short history of blebbing. *J Microsc*, 231(3), 466-478.
24. Chaurio, R. A., Janko, C., Munoz, L. E., Frey, B., Herrmann, M., & Gaipf, U. S. (2009). Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules*, 14(12), 4892-4914.
25. Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski,

- E. R., et al. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), 863-867.
26. Elward, K., & Gasque, P. (2003). "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol*, 40(2-4), 85-94.
27. Erwig, L. P., & Henson, P. M. (2007). Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol*, 171(1), 2-8.
28. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., & Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405(6782), 85-90.
29. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.*, 148(7), 2207-2216.
30. Falkowski, M., Schledzewski, K., Hansen, B., & Goerdts, S. (2003). Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces. *Histochem Cell Biol*, 120(5), 361-369.
31. Gaipal, U. S., Kuhn, A., Sheriff, A., Munoz, L. E., Franz, S., Voll, R. E., et al. (2006). Clearance of apoptotic cells in human SLE. *Curr. Dir. Autoimmun.*, 9, 173-187.
32. Gaipal, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., et al. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of Autoimmunity*, 28(2-3), 114-121.
33. Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., et al. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 123(2), 321-334.
34. Georgiou, P. E., Politi, E. N., Katsimbri, P., Sakka, V., & Drosos, A. A. (2000). Outcome of lupus pregnancy: a controlled study. *Rheumatology*, 39(9), 1014-1019.
35. Gomez-Puerta, J. A., Burlingame, R. W., & Cervera, R. (2008). Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev*, 7(8), 606-611.
36. Grimsley, C., & Ravichandran, K. S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol*, 13(12), 648-656.
37. Gude, D. R., Alvarez, S. E., Paugh, S. W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., et al. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J*, 22(8), 2629-2638.
38. Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., et al. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, 107(1), 27-41.
39. Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., et al. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21), 9813-9818.
40. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 417(6885), 182-187.

41. Herrmann, M., Voll, R. E., Zoller, O. M., Hagenhofer, M., Ponner, B. B., & Kalden, J. R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 41(7), 1241-1250.
42. Hochreiter-Hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1), a008748.
43. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *N Engl J Med*, 361(16), 1570-1583.
44. Hsieh, C. L., Koike, M., Spusta, S. C., Niemi, E. C., Yenari, M., Nakamura, M. C., et al. (2009). A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia. *J Neurochem*, 109(4), 1144-1156.
45. Huynh, M. L., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*, 109(1), 41-50.
46. Janko, C., Munoz, L., Chaurio, R., Maueroder, C., Berens, C., Lauber, K., et al. (2013). Navigation to the graveyard-induction of various pathways of necrosis and their classification by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 1004, 3-15.
47. Kaminsky, V., Kulachkovskyy, O., & Stoika, R. (2008). A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids. *Toxicol Lett*, 177(3), 168-181.
48. Kevany, B. M., & Palczewski, K. (2010). Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)*, 25(1), 8-15.
49. Kimani, S. G., Geng, K., Kasikara, C., Kumar, S., Sriram, G., Wu, Y., et al. (2014). Contribution of Defective PS Recognition and Efferocytosis to Chronic Inflammation and Autoimmunity. *Front Immunol*, 5, 566.
50. Kobayashi, N., Karisola, P., Pena-Cruz, V., Dorfman, D. M., Jinushi, M., Umetsu, S. E., et al. (2007). TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*, 27(6), 927-940.
51. Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*, 64(3), 227-235.
52. Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., & Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*, 14(3), 277-287.
53. Lauber, K., Bohn, E., Krober, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., et al. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 113(6), 717-730.
54. Lawen, A. (2003). Apoptosis - an introduction. *BioEssays*, 25(9), 888-896.
55. Li, W. (2012). Eat-me signals: Keys to molecular phagocyte biology and "Appetite" control. *Journal of Cellular Physiology*, 227(4), 1291-1297.
56. Lim, P. L., & Zouali, M. (2006). Pathogenic autoantibodies: emerging insights into tissue injury. [Research Support, Non-U.S. Gov't
57. Review]. *Immunol Lett*, 103(1), 17-26.
58. Litvack, M. L., & Palaniyar, N. (2010). Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun*, 16(3), 191-200.

59. Lucas, M., Stuart, L. M., Zhang, A., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M., Silverstein, R., et al. (2006). Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J Immunol*, 177(6), 4047-4054.
60. Lutz, H. U. (2004). Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50(2), 107-116.
61. Meesmann, H. M., Fehr, E.-M., Kierschke, S., Herrmann, M., Bilyy, R., Heyder, P., et al. (2010). Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J Cell Sci*, 123(19), 3347-3356.
62. Mercer, J., & Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. [10.1038/ncb0509-510]. *Nat Cell Biol*, 11(5), 510-520.
63. Mitchell, J. E., Cvetanovic, M., Tibrewal, N., Patel, V., Colamonici, O. R., Li, M. O., et al. (2006). The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 281(9), 5718-5725.
64. Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450(7168), 435-439.
65. Mueller, R. B., Sheriff, A., Gaip, U. S., Wesselborg, S., & Lauber, K. (2007). Attraction of phagocytes by apoptotic cells is mediated by lysophosphatidylcholine. *Autoimmunity*, 40(4), 342-344.
66. Munoz, L. E., Frey, B., Pausch, F., Baum, W., Mueller, R. B., Brachvogel, B., et al. (2007). The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. *Curr Med Chem*, 14(3), 271-277.
67. Munoz, L. E., Janko, C., Grossmayer, G. E., Frey, B., Voll, R. E., Kern, P., et al. (2009). Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 60(6), 1733-1742.
68. Munoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*, 6(5), 280-289.
69. Munoz, L. E., Maueroeder, C., Chaurio, R., Berens, C., Herrmann, M., & Janko, C. (2013). Colourful death: Six-parameter classification of cell death by flow cytometry-Dead cells tell tales. *Autoimmunity*, 46(5), 336-341.
70. Nandrot, E. F., Kim, Y., Brodie, S. E., Huang, X., Sheppard, D., & Finnemann, S. C. (2004). Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alpha5beta1 integrin. *J Exp Med*, 200(12), 1539-1545.
71. Napoli, I., & Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 158(3), 1030-1038.
72. Neumann, H., & Takahashi, K. (2007). Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J Neuroimmunol*, 184(1-2), 92-99.
73. Oldenburg, P. A., Zheleznyak, A., Fang, Y. F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D., & Lindberg, F. P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 288(5473), 2051-2054.
74. Park, D., Tosello-Trampont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., et al. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 450(7168), 430-434.

75. Park, S. Y., Jung, M. Y., Kim, H. J., Lee, S. J., Kim, S. Y., Lee, B. H., et al. (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ*, 15(1), 192-201.
76. Park, S. Y., Kim, S. Y., Jung, M. Y., Bae, D. J., & Kim, I. S. (2008). Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance. *Mol Cell Biol*, 28(17), 5288-5298.
77. Pauling, L. (1948). Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*, 161(4097), 707-709.
78. Peter, C., Waibel, M., Radu, C. G., Yang, L. V., Witte, O. N., Schulze-Osthoff, K., et al. (2008). Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. *J Biol Chem*, 283(9), 5296-5305.
79. Ravichandran, K. S., & Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*, 7(12), 964-974.
80. Ravishankar, B., & McGaha, T. L. (2013). O death where is thy sting? Immunologic tolerance to apoptotic self. *Cell Mol Life Sci*, 70(19), 3571-3589.
81. Reutelingsperger, C. P., & Christiaan Peter, M. (1998). United States Patent No. 5,834,196.
82. Rigotti, A., Acton, S. L., & Krieger, M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*, 270(27), 16221-16224.
83. Rodriguez, P. L., Harada, T., Christian, D. A., Pantano, D. A., Tsai, R. K., & Discher, D. E. (2013). Minimal "Self" Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *Science*, 339(6122), 971-975.
84. Santiago, C., Ballesteros, A., Tami, C., Martinez-Munoz, L., Kaplan, G. G., & Casanovas, J. M. (2007). Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity*, 26(3), 299-310.
85. Scharenberg, M., Schwardt, O., Rabbani, S., & Ernst, B. (2012). Target Selectivity of FimH Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 9810-9816.
86. Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., et al. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 411(6834), 207-211.
87. Sparrow, J. R., Hicks, D., & Hamel, C. P. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*, 10(9), 802-823.
88. Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(5), 397-407.
89. Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3), 845-881.
90. Tamura, Y., Adachi, H., Osuga, J., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., et al. (2003). FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 278(15), 12613-12617.
91. Thrash, J. C., Torbett, B. E., & Carson, M. J. (2009). Developmental regulation of TREM2 and DAP12 expression in the murine CNS: implications for Nasu-Hakola disease. *Neurochem Res*, 34(1), 38-45.
92. Tomin, A., Dumych, T., Kril, I., Antonyuk, V., Chopyak, V., Stoika, R., et al. (2016). Magnetic separation of apoptotic cells with lectin-conjugated microparticles.

- Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik, 47, doi: 10.1002/mawe.201600470.
93. Umeda, M., Igarashi, K., Nam, K. S., & Inoue, K. (1989). Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody. *J Immunol*, 143(7), 2273-2279.
  94. van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., et al. (2006). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(37), 13837-13842.
  95. Vandivier, R. W., Henson, P. M., & Douglas, I. S. (2006). Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*, 129(6), 1673-1682.
  96. Verhoven, B., Schlegel, R. A., & Williamson, P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, 182(5), 1597-1601.
  97. Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390(6658), 350-351.
  98. Weiss, E.-M., Frey, B., Rödel, F., Herrmann, M., Schlücker, E., Voll, R. E., et al. (2010). Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1209(1), 109-117.
  99. Wu-Hsieh, B. A., Chen, W., & Lee, H. J. (1998). Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. *Infect.Immun.*, 66(11), 5520-5526.

### Подяка

Автор вдячний за підтримку Західно Українському Біомедичному Центру, та НАН України, в рамках проекту «Створення новітніх превентивних технологій лікування гострих ревматичних захворювань шляхом пригнічення дії прозапальних компонентів ядра відмираючих клітин» 0115U004199, МОЗ України в рамках проекту «Дослідження взаємозв'язку апоптозу нейтрофілів і фагоцитарно-лімфоцитарних механізмів із ступенем активності та клінічними проявами у хворих на системні захворювання сполучної тканини» 0115U000055.

Стаття надійшла 14. 10. 2015  
Після доопрацювання 08. 12. 2015  
Прийнята до друку 15. 12. 2015