

НЕАПОПТОТИЧЕСКАЯ РОЛЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Обзор

© 2022 М.А. Савицкая, И.И. Захаров, Г.Е. Онищенко*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: galina22@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.06.2021

После доработки 02.01.2022

Принята к публикации 15.01.2022

Апоптоз – наиболее подробно охарактеризованный вариант регулируемой клеточной гибели. Ряд событий, которые широко используются исследователями для идентификации апоптоза и которые традиционно считались необратимыми, такие как появление фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны, пермеабилзация внешней мембраны митохондрий, активация каспаз, фрагментация ДНК и блеббинг цитоплазмы, как выясняется, также могут участвовать в процессах нормальной жизнедеятельности клетки, не связанных с индукцией апоптоза и с гибелью клеток в целом. Более того, такие процессы нередко оказываются обратимыми. В данном обзоре описаны события, характерные для апоптоза, однако не приводящие к гибели, но играющие немаловажную роль в дифференцировке, делении и подвижности клеток, а также участвующие в процессах воспаления, клиренса стареющих эритроцитов и свертывания крови, в инфицировании клеток вирусами и в неапоптотической гибели клеток. В статье уделяется внимание трем процессам: экстернализации фосфатидилсерина, блеббингу и активации каспаз. Нарушение проницаемости внешней митохондриальной мембраны и фрагментация ДНК в настоящем обзоре не обсуждаются.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, активация каспаз, МОМР, экстернализация фосфатидилсерина, блеббинг.

DOI: 10.31857/S0320972522030034

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз – это наиболее полно охарактеризованный вариант регулируемой клеточной гибели [1]. Апоптоз играет крайне важную роль в развитии организма в ходе онтогенеза и в поддержании гомеостаза. Он представляет собой определенную последовательность событий, происходящих как на молекулярном, так и на морфологическом уровне. Многие из этих событий рассматриваются как характерные признаки апоптоза, и их обнаружение часто используется для идентификации исследуемого типа гибели клеток в качестве апоптотической. Апоптоз может происходить с участием множества механизмов и сигнальных путей, но в большинстве случаев для него характерно появление

фосфатидилсерина (ФС) в наружном монослое плазматической мембраны, считающееся одним из наиболее ранних апоптотических событий, пермеабилзация внешней мембраны митохондрий (МОМР), блеббинг цитоплазмы, фрагментация ДНК и активация каспаз. Экстернализация ФС служит для узнавания гибнущей клетки фагоцитами и соседними клетками (сигнал «eat me»), в то время как МОМР обеспечивает выход в цитоплазму белков межмембранного пространства. Часть из этих белков (AIF, ENDOG) способны разрушать мишени напрямую – в частности, наряду с ДНКазой CAD вызывать фрагментацию ДНК, в то время как другие (цитохром *c*) способствуют активации каспаз – цистеиновых протеиназ, вызывающих разрушение белков клетки.

Данные признаки считаются характерными для апоптоза и часто используются при доказательстве апоптотической гибели клеток [2]. Тем не менее уже достаточно долгое время известно, что все перечисленные события могут происходить и вне апоптотического контекста. При этом можно выделить два аспекта: участие в процессах нормальной жизнедеятельности клетки, таких как подвижность, деление, дифференцировка; и участие в неапоптотических формах регулируемой клеточной гибели. Инте-

Принятые сокращения: ФС – фосфатидилсерин; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; AIF – фактор, индуцирующий апоптоз; BCR – рецептор В-клетки; ENDOG – эндонуклеаза G; IAPs – ингибиторы апоптоза; IL – интерлейкин; TNF α – фактор некроза опухоли α ; МНС – главный комплекс гистосовместимости; МОМР – пермеабилзация внешней мембраны митохондрий; PARP – поли(ADP-рибоза)-полимераза; RAC – Ras-ассоциированный субстрат ботулотоксина С3; TLR – toll-подобный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

ресно, что данные события могут быть обратимыми – как будучи частью не связанных с гибелью клетки физиологических процессов, так и при регулируемой гибели, в том числе при апоптозе. Проблема обратимости апоптоза подробно рассмотрена в нашем другом обзоре [3]; здесь же мы остановимся на характеристике роли таких апоптотических событий, как экстернализация ФС, блеббинг и активация каспаз, в неапоптотических процессах.

ЭКСТЕРНАЛИЗАЦИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА

Для плазматической мембраны живых клеток характерна асимметрия распределения липидных молекул. Так, фосфатидилхолин и сфингомиелин расположены преимущественно в наружном монослое, в то время как большая часть фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и практически весь ФС локализируются во внутреннем. Так, молекулы ФС составляют всего ~4% всех фосфолипидов клеточной мембраны, при этом во внутреннем монослое ФС формирует ~20–30% всех молекул фосфолипидов, а во внешнем – лишь 0–2%. Такое распределение обеспечивается с помощью термодинамических ловушек, активного транспорта и низкой подвижности липидов между двумя монослоями [4]. Появление ФС во внешнем монослое клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, было описано в 1992 г. [5].

Переход ФС в наружный монослой плазматической мембраны на протяжении долгого времени считался характерным и уникальным маркером апоптоза. Наряду с другими сигналами «eat me», такими как аminosахара, манноза, кальретикулин, молекула межклеточной адгезии ICAM3 (intercellular adhesion molecule 3), Tubby и TULP1 (Tubby-like protein 1), а также молекулами-«мостиками» GAS6, белком S, MFGE8 (milk fat globule EGF factor 8) [6], экстернализованный ФС способствует распознаванию и фагоцитозу (эффероцитозу) гибнущих клеток. Благодаря этому апоптотическая гибель не сопровождается воспалительным ответом.

Тем не менее обнаружено, что ФС может переходить в наружный монослой плазматической мембраны и в ходе процессов, не связанных с апоптозом, таких как дифференцировка клеток, в т.ч. слияние клеток с формированием симпласта [4, 7, 8] и накопление минеральных веществ остеобластами [9], активация ооцитов [10] и тромбоцитов [11], ишемическое повреждение [12], злокачественная трансформация [13, 14], миграция клеток [15]. ФС на поверх-

ности клеток не распознается макрофагами в том случае, если он связан с ФС-связывающими белками [6]. Появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны также встречается при неапоптотических формах гибели клеток, например, некроптозе (регулируемом некрозе) [16]. Во многих случаях появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны живых клеток имеет сигнальное значение [4].

Несмотря на то что появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны в качестве характерного признака апоптоза известно давно, к пониманию молекулярного механизма этого процесса исследователи приблизились только в течение последнего десятилетия. В живой неапоптотической клетке асимметрия плазматической мембраны поддерживается АТР-зависимыми аминофосфолипидтранслоказами, или флиппазами, которые осуществляют транспорт фосфолипидов в соответствующий монослой против градиента концентрации. В частности, важную роль в таком переносе играют члены семейства P-АТРаз IV типа, АТР11С (adenosine triphosphatase type 11C) и АТР11А (adenosine triphosphatase type 11A), а также их шаперон CDC50А (cell division cycle protein 50A). Эти белки обеспечивают флип-флоп ФС и ФЭ из внешнего монослоя плазматической мембраны во внутренний [17]. АТР11С и АТР11А имеют сайты узнавания каспазами; в клетках, содержащих устойчивые к действию каспаз формы АТР11А/С, экстернализация ФС не происходит. Segawa et al. показали, что клетки хронической миелогенной лейкемии человека KBM7, дефицитные по АТР11А и АТР11С, демонстрируют снижение флиппазной активности без исчезновения асимметрии. Таким образом, инактивации флиппаз недостаточно для быстрой экстернализации ФС; пассивная транслокация происходит слишком медленно. При этом в CDC50А-дефицитных клетках флиппазная активность плазматической мембраны исчезает, и ФС постоянно присутствует на их поверхности. По-видимому, АТР11С принадлежит большая часть флиппазной активности, но при этом в клетке присутствуют и другие, менее активные флиппазы, которые тем не менее способны к поддержанию липидной асимметрии [6]. Показано, что белки ТМЕМ16F (transmembrane protein 16F) и ХКР8 (ХК-related protein 8) способны к неспецифическому транспорту фосфолипидов между монослоями мембраны и, таким образом, могут считаться скрамблазами. Скрамблаза ТМЕМ16F является Ca²⁺-зависимой; для большинства случаев экстернализации ФС показано, что переход ФС в наружный монослой плазматической мембраны стимулируется ионами Ca²⁺ [18–20]. Таким об-

разом, можно предположить, что в создании липидной асимметрии наряду с флиппазами участвуют определенные варианты скрамблаз.

В настоящее время механизм работы TMEM16 описан достаточно подробно. Этот фермент создает в мембране гидрофильный «вырез». Когда такой гидрофильный путь открывается, «головкам» молекул липидов предоставляется «мостик» между монослоями, в то время как их углеводородные «хвосты» остаются в гидрофобном центре. После создания «мостика» фосфолипиды неселективно перемещаются по своим градиентам концентрации, предварительно созданным транспортерами [4].

В отличие от скрамблазы TMEM16, белки из семейства ХКР активируются каспазами и обеспечивают экстернализацию ФС при апоптозе; эти скрамблазы различаются по своим механизмам действия, что позволяет им работать независимо друг от друга. Помимо каспаз, белки ХКР могут активироваться с помощью фосфорилирования; хотя биологический смысл такого пути остается неясным. В активном состоянии они производят неспецифический скремблинг фосфолипидов, в результате чего, среди прочего, ФС попадает в наружный монослой плазматической мембраны.

Хотя как Ca^{2+} -зависимые, так и каспазозависимые скрамблазы обеспечивают экстернализацию ФС, сигнальная роль ФС при этом значительно отличается. Так, отличается время, необходимое для появления ФС в наружном монослое, пространственная организация этого процесса и его обратимость. Например, экстернализация ФС под действием Ca^{2+} -зависимых скрамблаз происходит в течение 5–15 мин после стимуляции, в то время как при апоптозе и действии каспазозависимых скрамблаз ФС появляется на поверхности клетки не менее чем через час. Скорее всего, такое временное различие обуславливается разницей в скорости высвобождения Ca^{2+} и многоступенчатой активацией каскада каспаз с последующим расщеплением ими субстратов. Различия между этими сигнальными процессами выражаются и в пространственном распределении ФС по поверхности плазматической мембраны клетки. При неапоптотической экстернализации ФС образуются дискретные, точечные области, богатые ФС, в то время как при апоптозе ФС распределяется по поверхности клетки равномерно и в большом количестве. Каким именно образом ФС формирует отдельные области, остается неясным. Экстернализованный ФС может преимущественно скапливаться в отдельных доменах плазматической мембраны, таких как рафты, обогащенные холестерином. И действительно,

но, липидные рафты оказались обогащены и ФС, и TMEM16F. Также богатые ФС точки могут формироваться и стабилизироваться с помощью связывания с белками, такими как аннексин А5. Наконец, домены ФС могут быть результатом локальной активации Ca^{2+} -зависимых скрамблаз и деактивации P4-АТРаз. Сигналинг с участием Ca^{2+} может обеспечивать обратимость локальной экстернализации ФС: если ФС будет диффундировать за пределы соответствующего домена, вне зоны повышенной концентрации Ca^{2+} , транспортеры будут возвращать его во внутренний монослой. При апоптозе же ФС обычно обнаруживается по всему наружному монослою плазматической мембраны, и такая экстернализация будет уже необратимой. По-видимому, данное различие связано с тем, как по-разному в каждом случае ингибируются P4-АТРаза, которые предотвращают переход ФС в наружный монослой. При неапоптотической экстернализации ФС P4-АТРаза ингибируются связыванием с ионами Ca^{2+} – как прямым, так и непрямым, и этот процесс является обратимым. В ходе же апоптоза P4-АТРаза расщепляются каспазами и теряют способность выполнять свою функцию. Таким образом, в первом случае, при отсутствии апоптоза, зависимые от Ca^{2+} скрамблазы сохраняют способность работать в качестве транзиторного клеточного сигнала, в то время как каспазозависимые скрамблазы делают экстернализацию ФС сигналом постоянным и необратимым.

Помимо активности скрамблаз, экстернализация ФС может происходить и за счет других механизмов. Так, поскольку ФС концентрируется в люминальном монослое мембраны некоторых органелл клетки, обогащенные ФС зоны могут возникать в местах слияния этих органелл с плазматической мембраной. И действительно, кластеры ФС характерны для сайтов слияния везикул и плазматической мембраны. Стоит отметить, что в последнем случае появление ФС в наружном монослое может сопровождаться активностью PLSCR-1 как в плазматической мембране, так и в мембране везикулы. Также сайты, обогащенные ФС, могут соответствовать местам отщепления внеклеточных везикул. Механизмы экстернализации ФС во многих биологических процессах остаются неясными – как, например, у *C. elegans* в поврежденных аксонах с участием ABC-транспортера CED-7, при индукции галектином в клетках лейкемии человека HL-60, при введении вирусных белков (Gag ВИЧ или VP40 вируса Эбола) в клетки гепатокарциномы человека, эмбриональных почек человека, легкого человека и яичников китайского хомячка [4].

В ряде случаев ФС играет роль в дифференцировке клеток. Так, ФС участвует в слиянии миобластов с формированием миотубул. Экстернализация ФС при этом происходит, согласно некоторым данным, транзиторно [8], а согласно другим – на протяжении по крайней мере 48 ч в условиях, при которых активно формируются миотубулы [21, 22]. При этом его наибольшая концентрация наблюдается в области контакта между соседними миобластами [8, 22]. Отметим, что признаки апоптоза, такие как нарушение проницаемости митохондриальных мембран, конденсация хроматина или активация каспазы 3, в миобластах не наблюдаются [8]. Фосфолипид узнается рецепторами ФС, что запускает сигнальный каскад, приводящий к слиянию миобластов. На поверхности клетки ФС ингибирует активность механочувствительного Ca^{2+} -канала PIEZO1, который служит ключевым регулятором формирования миотубул. По-видимому, в ингибировании важную роль играет сериновая группа в молекуле ФС. Активация PIEZO1 происходит при транслокации ФС во внутренний монослой с участием флиппазного комплекса ATP11A и CDC50A. PIEZO1 опосредует ток Ca^{2+} в клетку и способствует сборке актомиозиновых комплексов при участии RhoA/ROCK. Таким образом, в данном случае флип-флоп ФС служит молекулярным переключателем для активации PIEZO1 и морфогенеза поперечно-полосатых мышечных волокон [20]. Экстернализация ФС обнаруживается также в кардиомиоцитах и может участвовать в формировании вставочных дисков между кардиомиоцитами, способствуя таким образом организации функциональных волокон миокарда [8].

Интересно, что ФС участвует не только в слиянии одних клеток с другими, но также и в проникновении в клетку вирусов, которое требует слияния мембран. Среди таких вирусов – ВИЧ, вирусы Зика, Эбола и множество других оболочечных вирусов; для их проникновения в клетку необходимо присутствие ФС в мембране вируса, которое обеспечивается скрамблазами (такими как Xkr8) и наличием рецепторов ФС на поверхности клетки-хозяина. Для проникновения некоторых вирусов требуется также присутствие ФС в наружном монослое плазматической мембраны клетки-хозяина, которое может вызываться взаимодействием вируса с клеткой; так, например, гликопротеин Н альфа-герпесвируса связывается с интегринами $\alpha 4$ и $\beta 1$, активирует сигналинг с участием Ca^{2+} и вызывает экстернализацию ФС на плазматической мембране клетки-хозяина. Блокирование сигнальных путей, связанных как с

Ca^{2+} , так и с ФС, препятствует инфекции альфа-герпесвирусом. Сходным образом, при проникновении в клетку ВИЧ-1 взаимодействия между вирусным белком gp120 и рецепторами CD4 и корецепторами, связанными с G-белком клетки-хозяина, запускают в инфицированных клетках сигнальный путь с участием Ca^{2+} и экстернализацию ФС с участием TMEM16F, что благоприятствует слиянию. Кроме того, считается, что ФС на мембране клетки-мишени способствует изменению структуры и олигомеризации фузогенов вирусов везикулярного стоматита и ВИЧ, притягивая их положительно заряженные области [4].

Экстернализованный ФС обнаруживается на поверхности созревающих В-лимфоцитов в красном костном мозге при лимфопоезе на стадии перехода от про-В к пре-В; при этом его содержание ниже, нежели у клеток, гибнущих в процессе апоптоза [19]. По-видимому, увеличение концентрации Ca^{2+} , способствующее экстернализации ФС, происходит вследствие активации сигнальных путей при переходе пре-BCR в BCR. В костном мозге в ходе развития в предшественниках В-лимфоцитов после стадии пре-про-В исчезает экспрессия ATP11A. Также ФС присутствует в наружном монослое плазматической мембраны зрелых В-лимфоцитов, активированных с помощью антител к IgM, где он располагается в составе микродоменов вблизи IgM, CD19 и MHC1 [19]. Segawa et al. показали, что при активации В-лимфоцитов Ca^{2+} -зависимая скрамблаза обеспечивает экстернализацию ФС, а флиппазы плазматической мембраны быстро возвращают его во внутренний монослой [19]. Недавно было обнаружено, что у ATP11C-дефицитных мышей развивается В-клеточная лимфопения. Выяснено, что при отсутствии ATP11C популяция предшественников В-клеток, несущих на поверхности ФС, значительно увеличивается. В норме ATP11C обеспечивает интернализацию ФС, в то время как у *Atp11c*^{-/-} В-клеточных предшественников ФС сохраняется в наружном монослое; такие клетки эффективно поглощаются макрофагами, что и приводит к лимфопении [19].

Примечательно, что экстернализация ФС участвует не только в созревании иммунных клеток, но и в их активации. Так, ФС транзиторно появляется в наружном монослое плазматической мембраны нейтрофилов под действием хемотаксического пептида fMet-Leu-Phe (fMLP). В активированных нейтрофилах и некоторых лейкоцитарных клеточных линиях человека ряд белков семейства галектинов (галектины 1, 2 и 4) вызывают экстернализацию ФС [22].

ФС присутствует в наружном монослое плазматической мембраны в субпопуляции Т-лимфоцитов, где он необходим для активации катионного канала P2X7, которая запускает воспаление [22].

ФС также играет роль в дифференцировке клеток костной ткани [9, 23]. Для слияния митохондриальных предшественников остеокластов необходима DC-STAMP-зависимая неапоптотическая экстернализация ФС (DC-STAMP, dendrocyte-expressed seven transmembrane protein). Кроме того, в этом процессе ключевую роль играют внеклеточные аннексины (A1 и A5), взаимодействующие с ФС, которые наряду с аннексин-связывающим белком S100A4 регулируют активность белка синцитина 1, участвующего в слиянии клеток. Судя по всему, комплексы аннексинов, связанных с ФС, и S100A4 формируют мостикоподобные структуры между сливающимися клетками, что вместе с изменением конформации синцитина 1 способствует процессу слияния [23]. У остеобластов появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны принимает участие в образовании матричных пузырьков, мембрана которых богата экстернализованным ФС, и отложении гидроксиапатитов; экстернализация ФС показана также для образующих матричные пузырьки гипертрофированных хондроцитов. Возможно, ФС связывается с аннексинами, которые осуществляют ассоциацию матричных пузырьков с фибриллами коллагена. Известно, что комплекс ФС–аннексин–коллаген может регулировать ток Ca^{2+} в матричные пузырьки и в клетки *in vitro*, влияя таким образом на его концентрацию как в самих клетках, так и в мембранных компонентах внеклеточного матрикса [9, 18].

Также экстернализация ФС обнаружена у макрофагов, сливающихся с образованием гигантских клеток инородных тел [24], и у трофобластов, образующих синцитиотрофобласт [25, 26].

Транзиторная Ca^{2+} -зависимая экстернализация ФС происходит в ооците мыши при партеногенетической активации или оплодотворении. Обработка ооцитов перед активацией джасплакинолидом, стабилизирующим F-актин, показала, что появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны представляет собой актин-зависимый процесс. На стадии двух бластомеров ФС на поверхности клеток уже не выявляется [10]. Экстернализация ФС наблюдается также при капацитации сперматозоидов; в этом случае ФС локализуется вблизи акросомы и, вероятно, участвует в слиянии гамет [27].

ФС может присутствовать на поверхности некоторых нормальных постклеточных струк-

тур, в частности форменных элементов крови – эритроцитов и тромбоцитов, где он выступает в качестве кофактора превращения протромбина в тромбин протромбиназным комплексом при активации свертывания крови и способствует формированию вторичного тромба. Интересно, что свертывание крови, как и апоптоз, связано с высоким уровнем выделения внеклеточных везикул, содержащих на поверхности ФС [4]. Кроме того, ФС на поверхности активированных тромбоцитов, который скапливается в результате активации скрамблазы TMEM16F, служит каталитической платформой для запуска каскада свертывания крови. Активация TMEM16F происходит с помощью Ca^{2+} , который поступает в клетку из внеклеточной среды и ЭПР в результате открытия Ca^{2+} каналов. Такая оптимальная анионная поверхность способствует повышению уровня тромбина в миллион раз и дальнейшему процессу свертывания крови. Далее происходит блеббинг тромбоцитов и формирование экзозом или микрочастиц, которые продолжают усиливать образование тромбина [22, 28]. Вероятно, биологический смысл формирования таких структур состоит в увеличении площади каталитической поверхности. Роль липидной асимметрии в свертывании крови наглядно демонстрирует молекулярный механизм синдрома Скотта – заболевания с нарушением гемокоагуляции, описанного в 1979 г., для которого характерны тяжелые кровотечения. Исследования с участием пациентов с синдромом Скотта показали, что у них не происходит экстернализации ФС в плазматической мембране тромбоцитов вследствие нарушения активности скрамблазы; генетическими методами было показано, что у таких людей имеются гомозиготные или компаунд-гетерозиготные мутации в гене, кодирующем белок TMEM16F [28]. При синдроме Скотта также нарушается образование микрочастиц. Фенотип, похожий на таковой у пациентов с синдромом Скотта, наблюдается у мышей со специфической тромбоцитарной мутацией в *Tmem16f* [22].

У эритроцитов изменения распределения липидов по монослоям плазматической мембраны – в том числе экстернализация ФС – связаны с процессом старения. Для объяснения появления ФС в наружном монослое было предложено несколько механизмов. Один из них связан с окислительными процессами: известно, что при старении эритроцитов усиливается перекисное окисление липидов и окисление ФС, что делает его неспособным выступать в роли субстрата аминоксидолитической трансферазы, переносящей ФС из наружного монослоя во внутренний. Это приводит к его удержанию в наружном монослое

и дальнейшему распознаванию макрофагами. Другой вероятный механизм связан с цитоскелетом, который играет немаловажную роль в поддержании асимметричного распределения липидов. ФС взаимодействует с одним из основных белков, связанных с цитоскелетом эритроцитов, — спектрином. К экстернализации ФС может приводить нарушение взаимодействий между плазматической мембраной эритроцита и цитоскелетом, связанное с формированием агрегатов белка полосы 3 при старении. У модельных мышей вследствие усиленной экстернализации ФС в эритроцитах, дефицитных по белку полосы 3, наблюдался обширный тромбоз и тяжелый гемолиз. Таким образом, это позволяет предположить роль белка полосы 3 в сохранении липидной асимметрии мембраны. Тем не менее при наследственном сфероцитозе эритроциты полностью сохраняют асимметричное распределение липидов, несмотря на нарушение структуры кортикального цитоскелета [29].

Увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах активирует скрамблазу: этот процесс похож на тот, что происходит при апоптозе. Механизм, который приводит к повышению концентрации Ca^{2+} при старении эритроцитов, неясен [29].

Эриптоз — процесс сжатия эритроцита и появления ФС на его поверхности вследствие поступления в эритроцит ионов кальция и активации скрамблазы, приводящей к перераспределению фосфолипидов в обоих монослоях мембраны. Эриптоз может участвовать в клиренсе эритроцитов при патологических состояниях, однако его роль при старении эритроцитов остается спорной [29].

Лактадгерин (MFGE8) — опсонин, который связывается с ФС, в том числе на поверхности эритроцитов. Опосредованный лактадгерином эритрофагоцитоз, как предполагается, может служить механизмом клиренса стареющих эритроцитов активированными клетками эндотелия. Тем не менее у дефицитных по лактадгерину мышей выживаемость эритроцитов нормальная; и, как упоминалось выше, вопрос о том, действительно ли у стареющих эритроцитов больше экстернализованного ФС, остается предметом оживленных споров [29].

Предполагают, что другие белки макрофагов, связывающие экстернализованный ФС, в том числе CD36, SR-B1, CD68, CD14, Mer, LOX-1, Vav1, TIM-4, RAGE и стабиллин 2 могут также участвовать в клиренсе стареющих эритроцитов [29]. Кроме того, присутствие ФС в наружном монослое плазматической мембраны характерно для эритроцитов при серповидноклеточной анемии и талассемии [30, 31].

В норме экстернализация ФС может происходить у эндотелиоцитов в ответ на усиление токов Ca^{2+} под действием тромбина [32], гиперлипидемии [33] и нелигандных концентраций компонента комплемента C5b-9 [34]. ФС опосредует прикрепление Т-лимфоцитов к активированным тромбоцитам эндотелиальных клеткам [32], активирует систему комплемента, участвуя в лизисе ФС-положительных клеток [30]. Наконец, ФС в наружном монослое плазматической мембраны эндотелиоцитов участвует в обеспечении отрицательно заряженной липидной поверхности для сборки и активации комплексов свертывания крови [35].

ФС был найден на поверхности тучных клеток после их дегрануляции как у грызунов, так и у человека [35, 36]. Возможно, он присутствует во внутреннем монослое мембраны гранул, который при экзоцитозе становится внешним. Согласно другой версии, фосфолипиды перераспределяются между монослоями плазматической мембраны вследствие самого процесса слияния, или такое перераспределение является предпосылкой для слияния мембран. Экстернализация происходит транзиторно (в течение нескольких минут), обратимо и не связана с апоптотической гибелью [36].

Интересно, что ФС был обнаружен во внешнем монослое плазматической мембраны ряда опухолевых клеток, причем как в культуре, в том числе в первичной, так и в клетках метастазов. Таковы клетки лейкозов, меланомы, карциномы предстательной железы, желудка и почки, глиобластомы и рабдомиосаркомы [13, 14, 37–42]. При этом такие клетки не были апоптотическими. Интересно отметить, что при количественной оценке общего содержания фосфолипидов в меланоцитах человека (FOM101) и двух линиях клеток меланомы (SBcl-2 и WM164) не было обнаружено различия в содержании ФС у опухолевых клеток по сравнению с нормальными [13]. Таким образом, у злокачественных клеток оказывается измененным именно распределение ФС между монослоями плазматической мембраны, но не его общее содержание. При этом, как было показано с помощью метода флуоресцентной микроскопии, ФС, визуализируемый с помощью меченого аннексина V, локализуется на плазматической мембране опухолевых клеток в виде кластеров, которые способны отпочковываться в составе бляшек и даже передаваться от одной клетки к другой. В связи с этим отметим, что бляшки и последующее образование экзозом нередко сопровождается случаями потери мембраной асимметрии [41].

Оказалось, что существует корреляция между степенью злокачественности клеточных ли-

ний, полученных на разных стадиях прогрессии опухоли, и количеством экстернализованного ФС. Авторы предполагают, что такие клетки, возможно, должны были бы погибнуть, но определенным образом избегают всех последующих стадий апоптоза [14]. В этом случае можно говорить о явлении обратимости апоптоза — анастазе [3]. Таким образом, ФС может служить маркером злокачественности, а также стать потенциальной мишенью для разработки новых терапевтических подходов при лечении злокачественных новообразований [13].

Кроме того, *in vivo* ФС встречается на поверхности эндотелиальных клеток в сосудах опухоли [13, 14, 42]. Считается, что экстернализация ФС в эндотелиоцитах сосудов опухоли может быть вызвана воздействием цитокинов (TNF α и IL-1), гипоксии/реоксигенации, повышенной кислотности или кислородных радикалов [42].

Существует мнение, что в опухолях взаимодействие ФС с его рецептором активирует ряд иммуносупрессорных путей, которые могут использоваться опухолевыми клетками с целью избегания иммунного ответа. По-видимому, ФС может функционировать как важный иммунный чекпоинт и служить одной из мишеней опухолевой терапии [13].

Наконец, экстернализация ФС может присутствовать при отличных от апоптоза формах регулируемой гибели клеток, а также при дегенерации определенных частей клетки — как это происходит при дегенерации отростков нейронов. Так, при некроптозе ФС появляется в наружном монослое после поступления в клетку Ca²⁺ и активации и транслокации на мембрану псевдокиназы MLKL, но до нарушения целостности плазматической мембраны [43]. При некроптозе в этом процессе не участвуют активируемая Ca²⁺ скрамблаза TMEM16F [43] и каспазы [44]. Ключевые молекулы, которые отвечают за появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны в этом случае, до сих пор остаются неизвестными. Авторы предполагают, что в экстернализации может участвовать MLKL, поскольку ФС появляется на поверхности клетки в течение 5 мин после активации данного белка, а ингибирование активации MLKL некрсульфонамидом предотвращало экстернализацию ФС. Как и при апоптозе, при некроптозе ФС может играть роль сигнала «eat me» и способствовать фагоцитозу гибнущей клетки до нарушения ее целостности. Это, в свою очередь, снижает воспалительный ответ [43].

Есть данные, согласно которым экстернализация ФС и следующий за этим фагоцитоз встречаются при пироптозе [45] и ферроптозе [46].

Описана транслокация ФС во внешний монослой плазматической мембраны при онкозе [47], а также при неканонической гибели клеток острого миелоидного лейкоза под действием финголимода (FTY720) [48]. Механизмы этих процессов практически не изучены. При ферроптозе, в отличие от некроптоза, задействована TMEM16F, а в случае неканонической гибели показано, что для экстернализации ФС необходима активность фосфатазы PP2A и вакуолизация, связанная с нарушением эндоцитоза: так, при ингибировании PP2A и вакуолизации экстернализация ФС не происходит. Известно, что ФС обогащены рециклирующие эндосомы; авторы предполагают, что появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны может быть связано с изменением его распределения в рециклирующих эндосомах, что, возможно, нарушает внутриклеточный транспорт мембран. При этом типе гибели клеток, как и при некроптозе, не требуется активация каспаз.

Недавно появились данные о связи экстернализации ФС и дегенерации нейритов. Поскольку находящийся на поверхности клетки ФС служит сигналом «eat me», он привлекает фагоциты к разрушающимся отросткам нейронов. Это способствует поддержанию тканевого гомеостаза и препятствует нейровоспалению. При дегенерации аксонов в культуре нейронов спинального ганглия мыши в экстернализации ФС участвуют скрамблаза Xkr8 и транслоказа липидов ABC1, относящаяся к семейству ABC-транспортеров. У дрозофилы ФС появляется на поверхности дегенерирующих дендритов при прунинге в ходе онтогенеза и после физического повреждения. Экстернализацию ФС у мух также можно вызвать путем нокаута флиппазы фосфолипидов ATRP8A и гиперэкспрессии скрамблазы TMEM16. Более того, нокаут CDC50 и гиперэкспрессия скрамблазы могут приводить к редукции дендритов. Ортологи ATRP8A у млекопитающих — ATRP8A1 и ATRP8A2 — способны переносить ФС между монослоями плазматической мембраны, что позволяет предположить участие ATRP8A в распределении ФС в дегенерирующих нейритах. Было показано, что у *C. elegans* экстернализация ФС после повреждения аксона выступает в качестве сигнала, способствующего последующему восстановлению целостности аксона. В сигнальной функции ФС после повреждения аксона участвуют белки апоптотического клиренса CED-7 и CED-3. Тиретин TTR-11, ассоциированный с ФС, может активировать интегрин, что способствует регенерации аксона. Таким образом, в этом процессе участвует сразу несколько компонентов апоптотической программы [22].

БЛЕББИНГ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Блеббинг плазматической мембраны представляет собой образование и втягивание выростов на поверхности клетки. Блеббинг вызывается разборкой кортикального актинового цитоскелета, в результате которой под действием давления цитоплазмы она выдавливается, образуя пузырьвидную структуру. Если актиновый цитоскелет реорганизуется, рост блеба прекращается. Актиновые филаменты собираются под поверхностью блеба, далее к ним привлекается миозин, и блеб втягивается [49]. Сначала формируются блебы небольшого размера, также называемые поверхностными блебами, затем их размер увеличивается, в их образовании задействуется практически весь объем клетки. При апоптозе в процессе блеббинга важную роль играет ряд протеинкиназ; в частности, ROCK1 (rho associated kinase 1), серин-треониновая киназа, которая активируется, когда каспаза 3 отщепляет от ее молекулы аутоингибиторный домен. ROCK1 фосфорилирует легкую цепь миозина, вызывая сокращение актомиозинового комплекса. Также положительным регулятором блеббинга служит PAK2 (p21 activated kinase 2). Активная каспаза 3 может усиливать блеббинг путем протеолиза и деактивации MYPT1, субъединицы миозинфосфатазы. Кроме того, показано, что блеббинг может регулировать и киназа LIMK1 (LIM domain kinase 1), ингибирующая белок кофилин, который способствует деполимеризации актина. Вопрос о том, требуется ли для осуществления блеббинга согласованная активность данных регуляторов или же они могут работать по отдельности, остается открытым. Блеббинг может также быть связан с другими протеинкиназами, такими как DAPK (death-associated protein kinase), SRC и MET (MNNG HOS transforming gene) [50].

Помимо блеббинга при апоптозе существует и неапоптотический блеббинг. Такой блеббинг имеет место при цитокинезе, распластывании клеток на субстрате, миграции, созревании и активации клеток иммунной системы, при защитных реакциях на стресс, а также при пассировании культивируемых клеток. Как и в процессе апоптоза, при неапоптотическом блеббинге важную роль играет сигнальный путь RhoA-ROCK1 [51, 52]. В процессе свертывания крови участвует блеббинг тромбоцитов [28].

Динамический блеббинг происходит сразу после резкого открепления клеток от субстрата, а также в течение первых нескольких минут при распластывании клеток, предшествуя формированию ламеллоподий [51, 52]. Роль его в данном

случае неясна [51]. Возможно, что при откреплении и распластывании резко изменяется натяжение плазматической мембраны, и в условиях медленного (около 30 мин) рециклирования мембран блеббинг служит одним из способов поддержания гомеостаза [52].

Неапоптотический блеббинг часто связан с процессами клеточной подвижности. При этом, в отличие от псевдоподий или ламеллоподий, движущей силой которых служит полимеризация актиновых филаментов, образование и рост блебов происходят за счет давления жидкости, создающегося вследствие сокращения актомиозиновых комплексов в кортикальной цитоплазме клетки, а уменьшение и втягивание блебов — благодаря сборке и сокращению компонентов кортекса, которые формируются внутри блеба [53, 54]. Также блеббинг может происходить при дестабилизации кортикальных филаментов, как это имеет место в клетках, дефицитных по филамину [53]. На активном крае клетки блебы могут сосуществовать наряду с протрузиями, движимыми F-актином [54, 55]. Клеточная подвижность, связанная с блеббингом, наблюдается при инвазии и метастазировании опухолевых клеток [51], при миграции клеток HEK-293 [56], первичных зародышевых клеток у рыбы *Danio rerio* [57], иммунных клеток морского ежа [58] и лимфоцитов млекопитающих [59], при снижении адгезии к субстрату нейтрофилов и лимфоцитов [51], при миграции *Dictyostelium discoideum* [60]. Опухолевые клетки способны переходить от движения с помощью F-актин-зависимых протрузий к амебоидному с участием блебов и обратно в зависимости от окружающей среды, при этом переключение происходит быстро, в течение нескольких секунд, и не связано с мезенхимно-амебоидным переходом [51, 61, 62]. Также клетки могут формировать неапоптотические блебы и в том случае, если нарушен механизм полимеризации актина, как это происходит с клетками HeLa, в которых заблокирован комплекс WAVE (WASp-family verprolin-homologous) [63]. Блеббинг можно вызвать блокировкой белка p53, причем как в нормальных клетках, таких как эмбриональные фибробласты мыши, так и в клетках меланомы; при этом наблюдается повышенная активация сигнального пути RhoA-ROCK [64]. Для опухолевых клеток амебоидный способ движения не требует деградации внеклеточного матрикса. Это позволяет злокачественным клеткам противостоять противоопухолевой терапии, основанной на ингибиторах металлопротеаз [51]. Блеббинг может способствовать инвазии метастазирующих клеток меланомы в различные ткани через эндотелий сосудов [65]. Паразитическое простейшее *Entamoeba histo-*

lytica использует движение с участием блебов для проникновения во внутренние органы, например, в печень; подобно клеткам опухоли, этот одноклеточный организм может переключаться между амебоидным типом движения с участием блебов и мезенхимным типом движения [66]. Интересно, что неинвазивные клетки способны приобретать инвазивный фенотип при экспериментальной индукции мембранных блебов [64]. Таким образом, блебы могут служить дополнительным способом локомоции клеток в случае повреждения структур, связанных с F-актином. Интересно отметить, что блеббинг бластомеров при эмбриогенезе иногда морфологически отличается от других типов блеббинга: в таких клетках единственный блеб может перемещаться по периметру клетки («circus movement») [67].

При рассмотрении роли блеббинга в подвижности клеток возникает вопрос, служат ли блебы необходимыми участниками в процессе перемещения клетки или же появляются как побочный эффект при усилении сократительной активности кортекса. Для объяснения участия блебов в движении клеток были предложены различные модели. Kardash et al. предположили [68], что у первичных зародышевых клеток *D. rerio* блебы играют важную роль при перемещении тела клетки за счет движения вперед цитоплазмы и, таким образом, смещения центра массы. В этой модели актиновые структуры, получившие название «актиновых кистей», связаны с молекулой клеточной адгезии E-кадгерин в основании блеба и прикрепляют клетки к окружающему субстрату. Таким образом, блеб в передней части клетки может продвигаться вперед, в то время как остальная часть клетки закреплена, что приводит к переносу цитоплазмы в направлении миграции. Сходный механизм может работать и на двумерном субстрате, если удается достичь достаточной тяги путем адгезии к субстрату или к соседним клеткам.

Для объяснения миграции клеток в трехмерной среде при отсутствии специфической адгезии был предложен другой механизм, называемый в литературе «chimneying», поскольку он напоминает технику, которую применяют трубочисты для перемещения в дымоходе или альпинисты для передвижения вверх в трещинах скал. Так, например, лейкоциты, лишённые рецепторов, которые могли бы поддерживать адгезионные связи с внеклеточным окружением, мигрируют путем сжимания и создания давящих сил, направленных перпендикулярно к границе клетки. При этом ток богатого актином кортекса по краям клетки совместно с силой трения о субстрат проталкивают клетку вперед.

В этой модели трение может возникать как благодаря специфической адгезии, так и за счет неспецифических взаимодействий между клеткой и субстратом. По-видимому, скорость такого движения оказывается больше той, что достигается за счет полимеризации актина при образовании ламеллы. В неоднородной среде, такой как сеть внеклеточного матрикса, блеббинг также может способствовать миграции за счет проникновения клеточных протрузий в промежутки в структуре субстрата. Согласно теоретической модели, такая миграция должна быть особенно эффективной в условиях слабой адгезии или ее отсутствия. Наконец, была создана компьютерная модель, предполагающая, что клетки могут использовать блеббинг для движения наподобие плавания — она предложена для объяснения способности *D. discoideum* и нейтрофилов перемещаться по хемотаксическому градиенту, находясь в суспензии.

Некоторые стимулы могут вызывать формирование как неапоптотических блебов, участвующих в локомоции клеток, так и апоптотических, в зависимости от длительности воздействия. Так, короткое (5 мин) воздействие щелочной среды на эстроген-независимую линию клеток карциномы молочной железы вызывает блеббинг плазматической мембраны [55]. При этом в цитоплазматическую часть образовавшихся блебов поступают молекулы, играющие важную роль в подвижности и инвазии клеток, такие как интегрин $\alpha 2$, JAM-1 (junctional adhesion molecule 1) и FAK (focal adhesion kinase). Блебы обладают высокой динамичностью, в присутствии хемоаттрактанта (в данном случае EGF) они поляризуются в направлении его действия. При возвращении клеток к прежним условиям с физиологическим значением pH (7,4) блеббинг оказывается полностью обратимым, однако пролонгированная инкубация в щелочной среде длительностью более 4 ч приводит к индукции апоптоза [50].

Амебоидное движение с участием блебов, по всей видимости, представляет собой более простой способ передвижения, нежели локомоция с участием ламеллоподий. Так, для образования и роста блебов достаточно только сократительной активности кортекса с участием миозина II, в то время как рост ламеллоподий требует координации сборки актиновых филаментов, поляризованного роста разветвленной актиновой сети, адгезии к субстрату и в некоторых случаях протеолиза матрикса. Кроме того, образование и рост блебов происходит быстрее, чем рост филоподий и ламеллоподий [50]. Данные по расплыванию клеток указывают на то, что рост блебов требует меньших затрат энергии, чем формиро-

вание ламеллоподий. Таким образом, локомоция с участием блеббинга, возможно, представляет собой эволюционно более древний, простой и энергетически менее затратный способ передвижения, нежели ламеллоподии [51].

Неапоптотический блеббинг сопровождает процессы клеточного деления и длится с начала анафазы до позднего цитокинеза. Блебы формируются на полюсах клетки вдали от борозды деления [69]. Несмотря на то что митотический блеббинг был обнаружен столетие назад, его роль в цитокинезе остается неясной. Не исключено, что он представляет собой побочный эффект напряжения в кортексе, возникающего при разделении клеточного тела. Другое возможное объяснение состоит в том, что блебы могут формировать дополнительную мембранную поверхность, которая будет использоваться в процессе цитокинеза и дальнейшего расплывания дочерних клеток [51].

Примечательно, что неапоптотический блеббинг может сопровождать вирусные инфекции [51]. Так, было показано, что вирус осповакцины при проникновении в клетки вызывает формирование крупного округлого блеба в месте контакта вирусной частицы с плазматической мембраной, за которым следует появление блебов по всему клеточному телу. Когда вирус оказывается внутри клетки, происходит реорганизация кортикального актинового цитоскелета, и блеббинг прекращается. Обработка клеток блеббистатином или дефицит Ras1 подавляет формирование блебов и значительно ингибирует инфицирование, что говорит об участии блеббинга в процессе проникновения вирусных частиц внутрь клеток [70].

Бабийчук с соавт. обнаружили [71], что блебы способны участвовать в защите клеток при химическом или механическом повреждении плазматической мембраны. Блебы образуются вследствие того, что при повреждении мембраны нарушается ее проницаемость, происходит увеличение внутриклеточного содержания Ca^{2+} , что, в свою очередь, способствует фосфорилированию миозина II Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой киназой легких цепей миозина. Сокращение кортекса вызывает локальное повышение гидростатического давления в цитозоле, и плазматическая мембрана выпячивается, формируя блеб, содержащий поврежденный участок. В случае, если клетка способна справиться с повреждением, Ca^{2+} выкачивается из блеба, и блеб втягивается. В противном случае концентрация Ca^{2+} внутри блеба продолжает нарастать, и по достижении величины 10 μM с плазматической мембраной начинает ассоциировать Ca^{2+} -связывающий белок аннексин A1. Такие блебы, бу-

дучи отграничены от остальной цитоплазмы «затычками», образованными аннексином A1, изолируют поврежденные области плазматической мембраны от прилегающих к ней участков цитозоля. В результате предотвращается утечка цитозоля и приток содержимого межклеточного пространства, в частности, Ca^{2+} . В присутствии Ca^{2+} аннексин A1 способствует слиянию биологических мембран; в данном случае он связывает мембрану блеба в наиболее тонкой области присоединения блеба к остальному телу клетки («шейки»). Таким образом, блеббинг можно рассматривать как механизм контроля повреждения, который запускается, если первоначальные попытки репарации мембраны не увенчались успехом. Если мембрана репарируется уже в составе блеба, то концентрация Ca^{2+} в нем постепенно снижается. В случае, когда повреждение оказывается необратимым и не поддается восстановлению, ограниченный аннексином A1 блеб отделяется от клетки и деградирует.

Блеббинг может сопровождать неапоптотические формы регулируемой клеточной гибели. Так, он предшествует некроптозу с участием церрамида в клетках карциномы легкого человека A549 и карциномы яичника человека [72], участвует в пироптозе [73], онкозе в клетках глиомы при действии берберина [74]. Блеббинг обнаружен в клетках плоскоклеточного рака и в клетках лейкоза при действии соламагрина и аденокарциномы молочной железы при действии флуопсина C [75, 76]. При типах регулируемой гибели с некротической морфологией, по-видимому, блеббинг обеспечивается повреждениями кортикального цитоскелета при нехватке АТФ и/или сильном окислительном стрессе, а также дальнейшим набуханием клетки, при котором нарастает внутриклеточное давление. Основной движущей силой этого процесса служит ток Na^{+} внутрь клетки, и цитоплазма выдавливается в блебы. Чем выше осмотическое давление внутри клетки, тем быстрее наступает блеббинг. Затем возрастает проницаемость плазматической мембраны и происходит ее разрыв [77]. Блеббинг является характерной чертой регулируемой гибели эритроцитов – эриптоза [78, 79]. Интересно отметить, для эриптоза показано, что в блеббинге участвует цистеиновая эндопептидаза кальпаин, разрушающая элементы цитоскелета; помимо блеббинга, как уже упоминалось, происходит и экстернализация ФС [78].

АКТИВАЦИЯ КАСПАЗ

Роль каспаз в апоптозе хорошо известна. У млекопитающих к апоптотическим относятся

каспазы 2, 3, 6–10. В последнее время накапливается все больше и больше свидетельств того, что каспазы могут работать и вне апоптотических процессов. Так, они принимают участие в дифференцировке волокон хрусталика, эритроцитов, сперматогенезе, активации микроглии, воспалении, поддержании гомеостаза В-лимфоцитов, регенерации и развитии нейронов, образовании опухолей, заживлении ран, старении. Каспазы вовлечены в такие внутриклеточные процессы, как аутофагия и поддержание стабильности генома. Также они активны в неапоптотических типах регулируемой клеточной гибели – например, в пироптозе [80–82].

Впервые участие каспаз в процессе дифференцировки клеток было обнаружено при образовании волокон хрусталика. Оказалось, что *in vitro* ингибирование каспаз с помощью z-VAD-FMK препятствовало формированию энуклеированных хрусталикоподобных телец (лентоидов). Эти результаты наводили на мысль, что каспазы могут участвовать в дифференцировке клеток, на определенном этапе теряющих ядро, таких как предшественники эритроцитов или роговых чешуек. Сейчас известно, что при формировании хрусталиковых волокон активируется каспаза 3; кроме того, происходит МOMP, и цитохром *c* выходит из митохондрий в цитозоль. Считается, что в этом случае митохондриальный путь апоптоза действительно активируется, но сдерживается с помощью определенных механизмов, таких как усиление экспрессии белков-ингибиторов апоптоза (IAPs) и ограничение активности каспаз определенными компартментами [82]. Возможно также, что после выполнения своих функций каспазы могут деградировать в протеасомах [81]. Такое развитие событий открывает вопрос не только о роли активации каспаз в неапоптотических процессах, но в большей степени о роли анастаза, т.е. обратимости апоптоза в дифференцировке определённых специализированных структур организма.

Каспаза 14 присутствует только у наземных млекопитающих, а ее экспрессия ограничена эпителиальными тканями – в частности, эпидермисом кожи, где она встречается в дифференцирующихся кератиноцитах и отсутствует в пролиферирующих клетках. Показано, что каспаза 14 участвует в корнификации клеток эпидермиса и защите от УФ-излучения, процессируя белок профилагрин и превращая его в филаггин, необходимый для образования роговых чешуек. На этапе коммитирования кератиноцитов на терминальную дифференцировку наряду с каспазой 14 действует каспаза 3, которая индуцируется сигнальным путем Notch1 и опосредует протеолиз и активацию PKC δ , являющейся

положительным регулятором процессов ороговения. Данная роль каспазы 3 подтверждается тем, что у мышей, дефицитных по этой каспазе, в ходе эмбриогенеза наблюдается усиление пролиферации кератиноцитов и при этом снижение уровня их дифференцировки. Таким образом, в процессе дифференцировки кератиноцитов и корнификации принимают участие как неапоптотическая каспаза 14, так и апоптотическая эффекторная каспаза 3 [80].

Описанные выше процессы терминальной дифференцировки приводят к превращению клеток в безъядерные структуры. Но существуют и другие примеры участия каспаз в клеточной дифференцировке. Таким примером служит дифференцировка моноцитов в макрофаги, которая блокируется при обработке клеток синтетическими ингибиторами каспаз. Кроме того, делеция гена каспазы 8 предотвращает макрофагальную дифференцировку клеток миеломоноцитарного ряда под действием M-CSF. Каспаза 8, как было показано в экспериментах с использованием антисенс-олигонуклеотидов и ингибиторов каспаз, необходима для дифференцировки трофобластов плаценты [82].

Активная форма каспазы 3 ассоциирована с пролиферацией и миграцией клеток при нейральной дифференцировке. При моделировании инсульта у мышей уровень активной каспазы 3 повышается в нейральных клетках-предшественниках (NPCs) в ходе восстановления после инсульта; в это время не наблюдается активации апоптоза. При ингибировании же каспазы 3 в данных условиях пролиферация и миграция NPCs значительно усиливаются. Негативная регуляция пролиферации обеспечивается с помощью снижения уровня фосфорилирования Akt. Таким образом, каспаза 3 принимает участие в механизме, сдерживающем индуцированный инсультом эндогенный нейрогенез [83]. Каспазы 3 и 9 также участвуют в дифференцировке мышечных клеток-предшественников в миотубулы [80].

Активность каспазы 3 необходима для остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток. При дифференцировке остеобласта также происходит транзиторная и значительная активация других каспаз, в том числе каспаз 8 и 2, причем такая активация не сопровождается повышением уровня апоптотической гибели остеобластов. Каспаза 7 необходима для нормального функционирования одонтобластов. Показано, что у мышей, нокаутных по данному ферменту, нарушается минерализация зубов. При дифференцировке моноцитов в макрофаги с участием M-CSF важна активность каспаз 3 и 8 [80].

Базальная активность каспазы 3 необходима для дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), в которых каспаза осуществляет процессинг белка Nanog [84]. Было показано, что в ЭСК мыши активность каспазы 3 повышается при отсутствии апоптотической гибели: в таких клетках не обнаруживалась конденсация хроматина, фрагментация ядра, блеббинг плазматической мембраны. Интересно отметить, что при этом, однако, происходило расщепление PARP-1. Использование ингибитора каспаз пептида VAD приводило к ингибированию дифференцировки ЭСК в присутствии ретиноевой кислоты. В ЭСК, нокаутных по каспазе 3, дифференцировка также значительно подавлялась. Также было показано, что *in vitro* каспаза 3 вызывает протеолиз транскрипционного фактора Nanog, но не расщепляет Sox2 и Oct4 – другие факторы, участвующие в дифференцировке [85].

Показано, что каспаза 3 участвует в дифференцировке волокон поперечнополосатой мышечной ткани: дефицит по каспазе 3 в миобlastах нарушает формирование миотубул. Это связано с тем, что каспаза 3 способна протеолитически активировать киназы, в частности – серин/треониновую киназу MST1 (Mammalian Sterile Twenty-like 1), служащую вышележащим эффектором для MAP-киназного пути [86].

Также важны каспазы в процессе развития нервной ткани. Так, каспазы 2, 3, 6, 9 участвуют в направленности формирования и роста аксонов и образовании нервных окончаний (в том числе, устранении неправильно сформированных и избыточных) и синапсов. Каспаза 2, активируя сигнальный путь RhoA/ROCK-II, способствует снижению количества дендритных шипиков. У мышей, дефицитных по каспазе 9 и Araf1, нарушается направленность формирования аксонов и синаптогенез, при этом уровень гибели нейронов не изменяется. Механизм участия каспазы 9 в направленном росте аксонов связан с расщеплением необходимого для этого процесса белка семафорина 7A. Также каспазы могут играть существенную роль в обеспечении функциональной активности мозга. Каспаза 3, например, необходима для долговременной потенциации, в ходе которой рецептор AMPA на постсинаптической мембране интернализуется с ее участием. Процесс блокируется ингибиторами как каспазы 3, так и каспазы 9. Следует отметить, что при долговременной потенциации транзиторная активация каспаз не связана с гибелью клеток [80]. Недавно появились данные об участии прокаспазы 3 в биогенезе митохондрий в нервной ткани. Так, Kim et al. [87] с помощью нокаута гена прокас-

пазы 3 показали, что она осуществляет регуляцию транскрипционных активаторов биогенеза митохондрий TFAM (mitochondrial transcription factor A), NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) и PGC-1 α (proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) в дофаминергических нейронах. При таком нокауте в этих клетках значительно подавляется активность комплексов дыхательной цепи I, II и IV, нарушается морфология митохондрий, что проявляется в их набухании, фрагментации, разрушении крист и в конечном итоге митофагии; при этом химическое ингибирование активной каспазы 3 такого эффекта не оказывает [87]. Механизм участия прокаспазы 3 в регуляции транскрипционных активаторов биогенеза митохондрий до сих пор остается неисследованным.

Каспазы могут модулировать секрецию паракринных факторов, регулируя регенерацию. Так, *Casp3*^{-/-} и/или *Casp7*^{-/-} MEFs при сокультивировании со стволовыми или прогениторными клетками менее эффективно стимулируют их пролиферацию, чем фибробласты дикого типа, причем дефицит по обоим каспазам имеет более выраженный эффект, чем дефицит лишь по одной из них, что свидетельствует о перекрывающихся функциях каспаз 3 и 7. У нокаутных по каспазам 3 и 7 мышей значительно нарушаются процессы заживления ран и регенерации печени после частичной гепатэктомии. Это связано с тем, что данные каспазы расщепляют фосфолипазу iPLA2 и таким образом активируют ее, что приводит к усилению секреции арахидоновой кислоты и лизофосфохолина и, в конечном счете, простагландина E2. Последний способствует пролиферации клеток, заживлению ран и регенерации тканей [80].

Такое явление может быть неблагоприятным в случае радиотерапии: каспазы в гибнущих под действием ионизирующего излучения клетках активируют пролиферацию соседних клеток опухоли и способствуют их репопуляции. Как было показано на клетках опухоли молочной железы у мышей, дефицит по каспазе 3 как в самих опухолевых клетках, так и в клетках стромы значительно повышает чувствительность опухоли к радиотерапии. У пациентов с карциномами органов головы и шеи, а также карциномой молочной железы высокий уровень активации каспазы 3 связан с повышением числа рецидивов и летальных исходов [88].

В клетках микроглии стимуляция TLR4 липополисахаридами приводит к активации каспаз 8 и 3, не сопровождающейся гибелью клеток. Каспаза 3 расщепляет PKC δ и таким образом активирует ее. В свою очередь, PKC δ активирует комплекс ИКК (киназа IkB), который

фосфорилирует I κ B, что приводит к его деградации. В результате освободившийся от ингибитора NF- κ B транслируется в ядро и там запускает транскрипцию провоспалительных факторов, таких как NOS2 (NO synthase 2), TNF α и IL-1 β . Таким образом, умеренная активация каспазы 3 в микроглиоцитах способствует приобретению провоспалительного фенотипа и может вызывать нейротоксичность. Интересно, что в данном случае механизм активации каспазы без запуска апоптотической гибели известен. Дело в том, что для активации каспазы 3 требуется ее протеолиз инициаторной каспазой. В клетках микроглии такой процессинг происходит с образованием промежуточной формы эффекторной каспазы, p19/p12, которая обладает неполной активностью. Дальнейшему аутокаталитическому расщеплению каспазы 3 до полностью активной формы p17/p12 препятствует повышение экспрессии белка-ингибитора апоптоза cIAP2 [89].

Недавно появились данные о том, что помимо провоспалительных каспаз в регуляции процессов воспаления может участвовать каспаза 8. Примечательно, что она может как способствовать развитию воспаления, так и препятствовать ему. Так, с одной стороны, наряду с каспазой 1 каспаза 8 способна осуществлять расщепление про-IL-1 β и таким образом участвовать в созревании провоспалительного цитокина [90]. Причем каспаза 8 может процессировать IL-1 β как в составе инфламмосом, так и напрямую, а также модулировать экспрессию мРНК IL-1 β через NF- κ B; эта антиапоптотическая функция не требует протеазной активности [91]. Показано, что каталитически активная каспаза 8 также может ингибировать инфламмосому, содержащую ASC и каспазу 1; при этом в неактивной форме она служит скэффолдом для ее активации. Молекулярные механизмы такой регуляции остаются практически неизвестными. Стоит отметить, что у пациентов, дефицитных по каспазе 8, наблюдается раннее развитие воспалительного заболевания кишечника [92]. Делеция каспазы 8 в кератиноцитах эпидермиса сопровождается развитием хронической воспалительной болезни кожи. Противовоспалительный эффект каспазы 8 не зависит от сигнальных путей с участием TNF, IL-1 β или TLR-рецепторов, а также NF- κ B, но задействует киназу TBK1 (I κ K-related, TANK-related, TANK-binding kinase 1) и IRF3. Мутации по каспазе 8 (и 10) ассоциированы с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом [80].

Каспаза 8 может расщеплять гасдермин D (GSDMD) при заражении клетки чумной палочкой (*Yersinia pestis*). В нормальных условиях

киназа TAK1 (transforming growth factor β activated kinase 1) ингибирует NLRP3-инфламмосому и фосфорилирование RIPK1. YopJ, эффекторная молекула *Y. pestis*, связывает TAK1 и устраняет репрессию RIPK1. Активированная RIPK1 рекрутирует FADD и прокаспазу 8, формируя комплекс под названием рипоптосома. В составе рипоптосомы каспаза 8 активируется путем аутопроцессирования, после чего она расщепляет GSDMD и запускает пироптоз. Каспаза 3 способна расщеплять гасдермин E (GSDME), в результате чего его N-концевые фрагменты p30 формируют мембранные поры и активируют пироптоз. Интересно отметить, что GSDME работает как опухолевый супрессор, запуская пироптоз в ответ на химиотерапевтические воздействия, приводящие к активации каспазы 3. GSDMD, в отличие от GSDME, расщепляется каспазой 3 (а также каспазой 7) в неканоническом сайте, который располагается в N-концевом домене, что подавляет его способность образовывать поры [93].

Интересно отметить и то, что каспазы могут быть задействованы в регуляции миграции клеток. Так, у дрозофилы ингибирование гомолога каспаз 2 и 9 DRONC с помощью эндогенного ингибитора (DIAP) делает возможной миграцию пограничных клеток яичника, необходимых для правильного созревания ооцитов. При этом DIAP взаимодействует с RAC [94].

Регуляция клеточной подвижности с участием каспаз имеет место и у млекопитающих. Так, у клеток, дефицитных по каспазе 8, значительно затрудняется миграция. У MEFs, полученных из нокаутных по каспазе 8 мышей, а также у опухолевых клеток, таких как клетки нейробластомы и опухоли молочной железы человека с дефицитом каспазы 8, заметно снижается подвижность. Предполагают, что каспаза 8 способствует активации белка Rac и таким образом запускает перестройку актинового цитоскелета. Кроме того, ранняя эмбриональная летальность у мышей, дефицитных по каспазе 8 (*caspase 8^{-/-}*), связана с невозможностью формирования функциональной кровеносной системы, которая, в свою очередь, может быть обусловлена нарушением миграции эндотелиоцитов [82].

Каспазы играют большую роль в процессах, связанных с образованием и прогрессией опухолей. Очевидно, что, осуществляя программу гибели клеток, они предотвращают опухолевый рост, однако их участие в туморогенезе не ограничивается апоптотическими путями: каспазы могут влиять на пролиферацию, инвазию и миграцию. Так, каспаза 8 взаимодействует с фокальными адгезивными комплексами опухолевых клеток, способствуя миграции клеток *in vitro*

и метастазированию *in vivo*. Каспаза 8 способна также взаимодействовать с ранними эндосомами, усиливая обновление компонентов фокальных контактов и рециклирование интегринов на поверхность клетки [95]. Так, каспаза 8 участвует в передаче сигнала от интегринов с участием малой GTPазы ранних эндосом RAB5 к RAC. Показано, что в клетках нейробластомы, дефицитных по каспазе 8, активация RAB5 не происходит. Активация RAB5 способствует колокализации интегринов с каспазой 8: каспаза обнаруживается в составе фракции выделенных фокальных контактов из клеток нейробластомы. Методом иммунопреципитации и с помощью исследования колокализации продемонстрировано, что активация RAB5 приводит к усилению формирования комплексов каспазы 8 с интегринными $\beta 1$ на периферии клетки. Кроме того, экспрессия каспазы 8 способствует опосредованной RAB5 интернализации и рециклированию интегринного $\beta 1$ [96].

Остается открытым вопрос, каким образом активация апоптотических каспаз не всегда приводит к гибели клеток. Возможно, это достигается с помощью низкого уровня активности каспаз, недостаточного для индукции регулируемой гибели [97], либо благодаря ограничению их активности в пределах отдельных внутриклеточных компартментов или расщепления субстратов, не связанных с гибелью [98]. До сих пор остается нерешенным важный вопрос о том, как в каждом конкретном неапоптотическом процессе происходит активация апоптотических инициаторных и эффекторных каспаз и как это может быть связано с анастазом [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстернализация фосфатидилсерина может сопутствовать множеству неапоптотических клеточных процессов, включая дифференцировку клеток мышечной и костной тканей, В-лимфоцитов, иммунный ответ и свертывание крови. Также она участвует в дегрануляции тучных клеток, клиренсе стареющих эритроцитов, а также оплодотворении и партеногенетической активации. Наличие фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны также может служить маркером злокачественности опухолевых клеток (рисунок).

Блеббинг цитоплазмы также не является достаточным признаком апоптоза. Согласно данным литературы, блеббинг участвует в клеточной подвижности, включая амебоидное движение, открепление и прикрепление клеток к субстрату, делении клетки, защите клетки от хи-

мических и механических повреждений плазматической мембраны, а также может сопутствовать вирусным инфекциям (рисунок). Молекулярные механизмы блеббинга во многих случаях неизвестны или неясны. Их изучение прольет свет на существование различных видов блебов. Это может способствовать разработке противоопухолевых препаратов с минимальными побочными эффектами. Исследование блеббинга при амебоидном движении также необходимо для лучшего понимания возможностей метастазирующих клеток опухолей.

Каспазы участвуют в дифференцировке, регуляции процесса воспаления, регенерации, миграции клеток. Механизмы их активации в ходе апоптотической гибели достаточно хорошо охарактеризованы, однако о множестве неапоптотических функций каспаз данных недостаточно. Активность каспаз связана с расщеплением белковых субстратов; характер этих субстратов определяет направление изменений и процессов, происходящих в клетке (рисунок). Углубление понимания неапоптотических функций каспаз может стать основой при разработке терапевтических подходов для лечения патологий, связанных с клеточной миграцией, регенерацией, воспалением, канцерогенезом.

Таким образом, ни один из упомянутых признаков сам по себе не является однозначным маркером апоптоза, и для его идентификации необходимо использовать совокупность признаков.

Изучение роли апоптотических событий в неапоптотических процессах позволит расширить понимание апоптоза и связи между его составляющими. Это особенно актуально для изучения обратимости апоптоза — анастаза. Для выживания клетки после инициации апоптоза необходимо остановить и обратить вспять все отдельные апоптотические события — от экстернализации ФС, пермеабиллизации внешней мембраны митохондрий и каскада эффекторных каспаз до разрушения ДНК апоптотическими нуклеазами и блеббинга цитоплазмы. Интересно, что экстернализация ФС, блеббинг и активация каспаз в отсутствие гибели клетки оказываются обратимы. Изучение каждого апоптотического события по отдельности в неапоптотических условиях может способствовать обнаружению путей его обратимости. Механизмы ингибирования апоптотических каспаз в процессе анастаза до сих пор неясны.

Систематизация информации об участии апоптотических событий в неапоптотических процессах поможет в исследовании молекулярных механизмов, ассоциированных с этими событиями, и их роли в более сложных клеточных

Экстернализация ФС

- Слияние миобластов;
- Дифференцировка остеобластов;
- Минерализация костной ткани;
- Созревание В-лимфоцитов;
- Активация тромбоцитов;
- Активация ооцитов;
- Злокачественная трансформация;
- Миграция клеток;
- Эндотелиоциты сосудов опухоли;
- Свертывание крови;
- Ишемическое повреждение;
- Дегрануляция тучных клеток;
- Некроптоз, пирроптоз, ферроптоз, онкоз

Блеббинг

- Цитокинез;
- Распластывание на субстрате;
- Миграция клеток, в т.ч. инвазия и метастазирование;
- Амебоидное движение;
- Созревание и активация клеток иммунной системы;
- Пассирование клеток;
- Движение бластомеров в эмбриогенезе (circus movement);
- Защита клеток при химическом или механическом повреждении плазматической мембраны

Активация каспаз

- Дифференцировка клеток:
 - волокна хрусталика;
 - трофобласты плаценты;
 - корнификация кератиноцитов;
 - моноциты в макрофаги;
 - миотубулы;
 - одонтобласты;
 - нейральные предшественники;
 - ЭСК;
- Модуляция секреции паракринных факторов;
- Регуляция воспаления;
- Регуляция подвижности и миграции;
- Образование и прогрессия опухолей;
- Обновление белков межклеточных контактов

Неапоптотические функции экстернализации фосфатидилсерина, блеббинга цитоплазмы и активации каскада каспаз

процессах, таких как поддержание гомеостаза, дифференцировка, воспаление, канцерогенез и пр.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-015-00233а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death. Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
2. Saraste, A., and Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc. Res.*, **45**, 528-537, doi: 10.1016/s0008-6363(99)00384-3.
3. Захаров И. И., Савицкая М. А., Онищенко Г. Е. (2020) Проблема обратимости апоптотических процессов, *Биохимия*, **85**, 1344-1360, doi: 10.31857/S0320972520100036.
4. Whitlock, J. M., and Chernomordik, L. V. (2021) Flagging fusion: Phosphatidylserine signaling in cell-cell fusion, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100411, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100411.
5. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., et al. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J. Immunol.*, **148**, 2207-2216.
6. Segawa, K., and Nagata, S. (2015) An apoptotic "Eat Me" signal: Phosphatidylserine exposure, *Trends Cell Biol.*, **25**, 639-650, doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.003.
7. Sessions, A., and Horwitz, A. F. (1981) Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts, *FEBS Lett.*, **134**, 75-78, doi: 10.1016/0014-5793(81)80554-6.
8. Van den Eijnde, S.M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., et al. (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation, *J. Cell. Sci.*, **114 (Pt. 20)**, 3631-3642.
9. Ehlen, H. W., Chinenkova, M., Moser, M., Munter, H. M., Krause, Y., et al. (2013) Inactivation of anoctamin-6/Tmem16f, a regulator of phosphatidylserine scrambling in osteoblasts, leads to decreased mineral deposition in skeletal tissues, *J. Bone Miner. Res.*, **28**, 246-259, doi: 10.1002/jbmr.1751.
10. Curia, C. A., Ernesto, J. I., Stein, P., Busso, D., Schultz, R. M., Cuasnicu, P. S., et al. (2013) Fertilization induces a transient exposure of phosphatidylserine in mouse eggs, *PLoS One*, **8**, e71995, doi: 10.1371/journal.pone.0071995.
11. Zwaal, R. F., Bevers, E. M., Comfurius, P., Rosing, J., Tilly, R. H., et al. (1989) Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance, *Mol. Cell. Biochem.*, **91**, 23-31, doi: 10.1007/BF00228075.
12. Boyle, E. M., Pohlman, T. H., Cornejo, C. J., and Verrier, E. D. (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: Ischemia-reperfusion, *Ann. Thor. Surg.*, **62**, 1868-1875, doi: 10.1016/s0003-4975(96)00950-2.
13. Park, M., and Kang, K. W. (2019) Phosphatidylserine receptor-targeting therapies for the treatment of cancer, *Arch. Pharm. Res.*, **42**, 617-628, doi: 10.1007/s12272-019-01167-4.
14. Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., et al. (2011) In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 2638-2645, doi: 10.1016/j.bbame.2011.07.026.
15. Vogt, E., Ng, A. K., and Rote, N. S. (1996) A model for the antiphospholipid antibody syndrome: Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **174**, 700-777, doi: 10.1016/s0002-9378(96)70453-2.
16. Gong, Y. N., Crawford, J. C., Heckmann, B. L., and Green, D. R. (2019) To the edge of cell death and back, *FEBS J.*, **286**, 430-440, doi: 10.1111/febs.14714.
17. Segawa, K., Suzuki, J., and Nagata, S. (2014) Flippases and scramblases in the plasma membrane, *Cell Cycle*, **13**, 2990-2991, doi: 10.4161/15384101.2014.962865.
18. Damek-Poprawa, M., Golub, E., Otis, L., Harrison, G., Phillips, C., et al. (2006) Chondrocytes utilize a cholesterol-dependent lipid translocator to externalize phosphatidylserine, *Biochemistry*, **45**, 3325-3336, doi: 10.1021/bi0515927.
19. Segawa, K., Yanagihashi, Y., Yamada, K., Suzuki, C., Uchiyama, Y., et al. (2018) Phospholipid flippases enable precursor B cells to flee engulfment by macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 12212-12217, doi: 10.1073/pnas.1814323115.
20. Tsuchiya, M., Hara, Y., Okuda, M., Itoh, K., Nishioka, R., et al. (2018) Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation, *Nat. Commun.*, **9**, 2049, doi: 10.1038/s41467-018-04436-w.
21. Jeong, J., and Conboy, I. M. (2011) Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 9-13, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.128.
22. Shin, H.-W., and Takatsu, H. (2020) Phosphatidylserine exposure in living cells, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **55**, 166-178, doi: 10.1080/10409238.2020.1758624.
23. Verma, S. K., Leikina, E., Melikov, K., Gebert, C., Kram, V., et al. (2018) Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion, *J. Biol. Chem.*, **293**, 254-270, doi: 10.1074/jbc.M117.809681.
24. Helming, L., Winter, J., and Gordon, S. (2009) The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion, *J. Cell Sci.*, **122(Pt 4)**, 453-459, doi: 10.1242/jcs.037200.
25. Lyden, T. W., Ng, A. K., and Rote, N. S. (1993) Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment, *Placenta*, **14**, 177-186, doi: 10.1016/s0143-4004(05)80259-0.
26. Das, M., Xu, B., Lin, L., Chakrabarti, S., Shivaswamy, V., et al. (2004) Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast, *Placenta*, **25**, 396-407, doi: 10.1016/j.placenta.2003.11.004.
27. Gadella, B. M., and Harrison, R. A. (2002) Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells, *Biol. Reprod.*, **67**, 340-350, doi: 10.1095/biolreprod67.1.340.
28. Clarke, R. J., Hossain, K. R., and Cao, K. (2020) Physiological roles of transverse lipid asymmetry of animal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 183382, doi: 10.1016/j.bbame.2020.183382.
29. Thiagarajan, P., Parker, C. J., and Prchal, J. T. (2021) How do red blood cells die? *Front. Physiol.*, **12**, 655393, doi: 10.3389/fphys.2021.655393.
30. Test, S. T., and Mitsuyoshi, J. (1997) Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry, *J. Lab. Clin. Med.*, **130**, 169-182, doi: 10.1016/s0022-2143(97)90093-7.
31. Zwaal, R. F., Comfurius, P., and Bevers, E. M. (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 971-988, doi: 10.1007/s00018-005-4527-3.

32. Qu, J., Conroy, L. A., Walker, J. H., Wooding, F. B., and Lucy, J. A. (1996) Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells, *Biochem. J.*, **317** (Pt. 2), 343-346, doi: 10.1042/bj3170343.
33. Lupu, F., Moldovan, N., Ryan, J., Stern, D., and Simionescu, N. (1993) Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholesterolaemia on rabbit aortic endothelium, *Blood Coagul. Fibrinol. Int. J. Haemost. Thromb.*, **4**, 743-752.
34. Christiansen, V. J., Sims, P. J., and Hamilton, K. K. (1997) Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 164-171, doi: 10.1161/01.atv.17.1.164.
35. Bevers, E. M., Rosing, J., and Zwaal, R. F. (1985) Development of procoagulant binding sites on the platelet surface, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **192**, 359-371, doi: 10.1007/978-1-4615-9442-0_25.
36. Martin, S., Pombo, I., Poncet, P., David, B., Arock, M., et al. (2000) Immunologic stimulation of mast cells leads to the reversible exposure of phosphatidylserine in the absence of apoptosis, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **123**, 249-258, doi: 10.1159/000024451.
37. Connor, J., Bucana, C., Fidler, I. J., and Schroit, A. J. (1989) Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3184-3188, doi: 10.1073/pnas.86.9.3184.
38. Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (1991) Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes, *Cancer Res.*, **51**, 3062-3066.
39. Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H., and Herrmann, A. (2003) Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2), *Biochem. J.*, **376** (Pt. 2), 489-495, doi: 10.1042/BJ20030886.
40. Schröder-Borm, H., Bakalova, R., and Andrä, J. (2005) The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine, *FEBS Lett.*, **579**, 6128-6134, doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.084.
41. Comfurius, P., Senden, J. M., Tilly, R. H., Schroit, A. J., Bevers, E. M., et al. (1990) Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1026**, 153-160, doi: 10.1016/0005-2736(90)90058-v.
42. Ran, S., Downes, A., and Thorpe, P. E. (2002) Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer Res.*, **62**, 6132-6140.
43. Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., et al. (2017) Phosphatidylserine externalization, "necroptotic bodies" release, and phagocytosis during necroptosis, *PLoS Biol.*, **15**, e2002711, doi: 10.1371/journal.pbio.2002711.
44. Maeda, A., and Fadeel, B. (2014) Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals, *Cell Death Dis.*, **5**, e1312, doi: 10.1038/cddis.2014.277.
45. Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiyama, H., Nagata, S., et al. (2013) Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages, *Int. Immunol.*, **25**, 363-372, doi: 10.1093/intimm/dxs161.
46. Klöditz, K., and Fadeel, B. (2019) Three cell deaths and a funeral: Macrophage clearance of cells undergoing distinct modes of cell death, *Cell Death Discov.*, **5**, 65, doi: 10.1038/s41420-019-0146-x.
47. Krysko, O., De Ridder, L., and Cornelissen, M. (2004) Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique, *Apoptosis Int. J. Programm. Cell Death*, **9**, 495-500, doi: 10.1023/B:APPT.0000031452.75162.75.
48. Young, M. M., Bui, V., Chen, C., and Wang, H. G. (2019) FTY720 induces non-canonical phosphatidylserine externalization and cell death in acute myeloid leukemia, *Cell Death Dis.*, **10**, 847, doi: 10.1038/s41419-019-2080-5.
49. Ikenouchi, J., and Aoki, K. (2017) Membrane bleb: A see-saw game of two small GTPases, *Small GTPases*, **8**, 85-89, doi: 10.1080/21541248.2016.1199266.
50. Khajah, M. A., and Luqmani, Y. A. (2016) Involvement of membrane blebbing in immunological disorders and cancer, *Med. Princ. Pract.*, **25** Suppl. 2, 18-27, doi: 10.1159/000441848.
51. Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: How to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 730-736, doi: 10.1038/nrm2453.
52. Norman, L. L., Brugués, J., Sengupta, K., Sens, P., and Aranda-Espinoza, H. (2010) Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells, *Biophys. J.*, **99**, 1726-1733, doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.031.
53. Ridley, A. J. (2011) Life at the leading edge, *Cell*, **145**, 1012-1022, doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010.
54. Zatulovskiy, E., Tyson, R., Bretschneider, T., and Kay, R. R. (2014) Bleb-driven chemotaxis of Dictyostelium cells, *J. Cell Biol.*, **204**, 1027-1044, doi: 10.1083/jcb.201306147.
55. Khajah, M. A., Mathew, P. M., Alam-Eldin, N. S., and Luqmani, Y. A. (2015) Bleb formation is induced by alkaline but not acidic pH in estrogen receptor silenced breast cancer cells, *Int. J. Oncol.*, **46**, 1685-1698, doi: 10.3892/ijo.2015.2884.
56. Karlsson, T., Bolshakova, A., Magalhães, M. A., Loitto, V. M., and Magnusson, K. E. (2013) Fluxes of water through aquaporin 9 weaken membrane-cytoskeleton anchorage and promote formation of membrane protrusions, *PLoS One*, **8**, e59901, doi: 10.1371/journal.pone.0059901.
57. Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F. L., et al. (2006) Migration of zebrafish primordial germ cells: A role for myosin contraction and cytoplasmic flow, *Dev. Cell*, **11**, 613-627, doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.023.
58. D'Andrea-Winslow, L., and Novitski, A. K. (2008) Active bleb formation is abated in *Lytechinus variegatus* red spherule coelomocytes after disruption of acto-myosin contractility, *Integr. Zool.*, **3**, 115-122, doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00086.x.
59. Haston, W. S., and Shields, J. M. (1984) Contraction waves in lymphocyte locomotion, *J. Cell Sci.*, **68**, 227-241.
60. Zatulovskiy, E., and Kay, R. R. (2016) Chemotactic blebbing in dictyostelium cells, *Methods Mol. Biol.*, **1407**, 97-105, doi: 10.1007/978-1-4939-3480-5_7.
61. Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., et al. (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoebooid transition after blocking of pericellular proteolysis, *J. Cell Biol.*, **160**, 267-277, doi: 10.1083/jcb.200209006.
62. Bergert, M., Chandradoss, S. D., Desai, R. A., and Paluch, E. (2012) Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 14434-14439, doi: 10.1073/pnas.1207968109.

63. Derivery, E., Fink, J., Martin, D., Houdusse, A., Piel, M., et al. (2008) Free Brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex, *PLoS One*, **3**, e2462, doi: 10.1371/journal.pone.0002462.
64. Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., and Roux, P. (2007) Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices, *J. Cell Biol.*, **178**, 23-30, doi: 10.1083/jcb.200701120.
65. Voura, E. B., Sandig, M., Kalnins, V. I., and Siu, C. (1998) Cell shape changes and cytoskeleton reorganization during transendothelial migration of human melanoma cells, *Cell Tissue Res.*, **293**, 375-387, doi: 10.1007/s004410051129.
66. Maugis, B., Brugués, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., et al. (2010) Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility, *J. Cell Sci.*, **123** (Pt. 22), 3884-3892, doi: 10.1242/jcs.065672.
67. Olson, E. C. (1996) Onset of electrical excitability during a period of circus plasma membrane movements in differentiating *Xenopus neurons*, *J. Neurosci.*, **16**, 5117-5129, doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-16-05117.1996.
68. Kardash, E., Reichman-Fried, M., Maitre, J. L., Boldajipour, B., Papisheva, E., et al. (2010) A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility *in vivo*, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 47-53, doi: 10.1038/ncb2003.
69. Charras, G. T. (2008) A short history of blebbing, *J. Microsc.*, **231**, 466-478, doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02059.x.
70. Mercer, J., and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells, *Science*, **320**, 531-535, doi: 10.1126/science.1155164.
71. Babychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. (2011) Blebbing confers resistance against cell lysis, *Cell Death Differ.*, **18**, 80-89, doi: 10.1038/cdd.2010.81.
72. Nganga, R., Oleinik, N., Kim, J., Selvam, S. P., De Palma, R., et al. (2019) Receptor-interacting Ser/Thr kinase 1 (RIPK1) and myosin IIA-dependent ceramidosomes form membrane pores that mediate blebbing and necroptosis, *J. Biol. Chem.*, **294**, 502-519, doi: 10.1074/jbc.RA118.005865.
73. Chen, X., He, W. T., Hu, L., Li, J., Fang, Y., et al. (2016) Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis, *Cell Res.*, **26**, 1007-1020, doi: 10.1038/cr.2016.100.
74. Sun, Y., Yu, J., Liu, X., Zhang, C., Cao, J., et al. (2018) Oncosis-like cell death is induced by berberine through ERK1/2-mediated impairment of mitochondrial aerobic respiration in gliomas, *Biomed. Pharmacother.*, **102**, 699-710, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.132.
75. Ma, L. S., Jiang, C. Y., Cui, M., Lu, R., Liu, S. S., et al. (2013) Fluopirin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, **34**, 1093-1100, doi: 10.1038/aps.2013.44.
76. Sun, L., Zhao, Y., Yuan, H., Li, X., Cheng, A., et al. (2010) Solamargine, a steroidal alkaloid glycoside, induces oncosis in human K562 leukemia and squamous cell carcinoma KB cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **67**, 813-821, doi: 10.1007/s00280-010-1387-9.
77. Simard, J. M., Woo, S. K., and Gerzanich, V. (2012) Transient receptor potential melastatin 4 and cell death, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, **464**, 573-582, doi: 10.1007/s00424-012-1166-z.
78. Repsold, L., and Joubert, A. M. (2018) Eryptosis: An erythrocyte's suicidal type of cell death, *BioMed Res. Int.*, **2018**, 1-10, doi: 10.1155/2018/9405617.
79. Naveed, A., Jilani, K., Siddique, A. B., Akbar, M., Riaz, M., et al. (2020) Induction of erythrocyte shrinkage by omeprazole, *Dose Response*, **18**, doi: 10.1177/1559325820946941.
80. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.*, **22**, 526-539, doi: 10.1038/cdd.2014.216.
81. Julien, O., and Wells, J. A. (2017) Caspases and their substrates, *Cell Death Differ.*, **24**, 1380-1389, doi: 10.1038/cdd.2017.44.
82. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vandenberghe, T., and Vandennebeele, P. (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation, *Cell Death Differ.*, **14**, 44-55, doi: 10.1038/sj.cdd.4402047.
83. Fan, W., Dai, Y., Xu, H., Zhu, X., Cai, P., et al. (2014) Caspase-3 modulates regenerative response after stroke, *Stem Cells*, **32**, 473-486, doi: 10.1002/stem.1503.
84. Baena-Lopez, L. A., Artherton, L., Xu, D. C., and Galasso, A. (2018) Non-apoptotic Caspase regulation of stem cell properties, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **82**, 118-126, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.10.034.
85. Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., et al. (2008) Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **2**, 595-601, doi: 10.1016/j.stem.2008.04.001.
86. Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S., and Megeney, L. A. (2002) Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11025-11030, doi: 10.1073/pnas.162172899.
87. Kim, J.-S., Ha, J.-Y., Yang, S., and Son, J. H. (2017) A novel non-apoptotic role of procaspase-3 in the regulation of mitochondrial biogenesis activators, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 347-357, doi: 10.1002/jcb.26186.
88. Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., et al. (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy, *Nat. Med.*, **17**, 860-866, doi: 10.1038/nm.2385.
89. Shen, X., Venero, J. L., Joseph, B., and Burguillos, M. A. (2018) Caspases orchestrate microglia instrumental functions, *Progr. Neurobiol.*, **171**, 50-71, doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.09.007.
90. Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., et al. (2008) Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 β maturation by caspase-8, *J. Exp. Med.*, **205**, 1967-1973, doi: 10.1084/jem.20071632.
91. Gurung, P., and Kanneganti, T. D. (2015) Novel roles for caspase-8 in IL-1 β and inflammasome regulation, *Am. J. Pathol.*, **185**, 17-25, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.08.025.
92. Schwarzer, R., Laurien, L., and Pasparakis, M. (2020) New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **63**, 186-193, doi: 10.1016/j.ceb.2020.02.004.
93. Xia, S., Hollingsworth, L. R., 4th, and Wu, H. (2020) Mechanism and regulation of gasdermin-mediated cell death, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **12**, a036400, doi: 10.1101/cshperspect.a036400.
94. Geisbrecht, E. R., and Montell, D. J. (2004) A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration, *Cell*, **118**, 111-125, doi: 10.1016/j.cell.2004.06.020.
95. Graf, R. P., Keller, N., Barbero, S., and Stupack, D. (2014) Caspase-8 as a regulator of tumor cell motility, *Curr. Mol. Med.*, **14**, 246-254, doi: 10.2174/1566524014666140128111951.
96. Torres, V. A., Mielgo, A., Barbero, S., Hsiao, R., Wilkins, J. A., et al. (2010) Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis, *Mol. Biol. Cell*, **21**, 369-376, doi: 10.1091/mbc.e09-09-0769.

97. Aram, L., Yakobi-Sharon, K., and Arama, E. (2017) CDPs: Caspase-dependent non-lethal cellular processes, *Cell Death Differ.*, **24**, 1307-1310, doi: 10.1038/cdd.2017.111.
98. Espinosa-Oliva, A.M., García-Revilla, J., Alonso-Bellido, I. M., and Burguillos, M. A. (2019) Brainiac caspases: Beyond the wall of apoptosis, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 500, doi: 10.3389/fncel.2019.00500.

THE APOPTOTIC FEATURES IN NON-APOPTOTIC PROCESSES

Review

M. A. Savitskaya, I. I. Zakharov, and G. E. Onishchenko*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; e-mail: galina22@mail.ru

Apoptosis is the most thoroughly studied type of regulated cell death. Certain events, such as externalization of phosphatidylserine into the outer leaflet of plasma membrane, mitochondrial outer membrane permeabilization, caspase cascade activation, DNA fragmentation and blebbing, are widely considered to be hallmarks of apoptosis as well as being traditionally viewed as irreversible. This review shows that these events can also under particular circumstances participate in normal cell life processes not associated with induction of apoptosis – cell differentiation, division, and motility, as well as non-apoptotic types of cell death. Moreover, these processes may often be reversible. The article focuses on three processes phosphatidylserine: externalization, blebbing and activation of caspases. Mitochondrial outer membrane permeabilization and DNA fragmentation are not discussed in this review.

Keywords: apoptosis, caspase activation, MOMP, PS externalization, blebbing