“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
“EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Огляди / Reviews
ECPB 2018, 2(82): 77–85. <https://doi.org/>

УДК 576.3+612.013+616–092+57.023

Чим корисна для організму загибель окремих клітин?

Т.І. ДУМИЧ^{1*}, С.Я. ПАРИЖАК^{1*}, С.М. ПЕШКОВА¹, Г.І. БІЛА¹, М.Д. ЛУЦИК²,
О.Д. ЛУЦИК¹, Р.О. БІЛИЙ¹

¹Львівський національний університет імені Данила Галицького,
Львів, Україна

²Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна

* Рівний вклад у написання статті.

E-mail: r.bilyy@gmail.com

Традиційно, коли говоримо про загибель клітини, розрізняємо два основні типи – апоптоз і некроз. Некротичну й апоптичну морфологію контрольованої клітинної загибелі Номенклатурний комітет із загибелі клітини за останньою (2018) класифікацією задіяних молекулярних шляхів поділяє на понад 20 підформ [18]. До того ж у попередніх роботах ми повідомляли про штучно створений шлях загибелі клітини [37].

Апоптоз – скоординований фізіологічний процес запрограмованої загибелі клітин, який часто вважають суїцидальною загибеллю клітини. Щогодини в організмі дорослої людини відмирає близько одного мільярда клітин [15], а при деяких процесах ця кількість може істотно зростати. Зокрема, завдяки негативній селекції у тимусі близько 95 % Т-клітин піддаються апоптозу, що забезпечує імунну толерантність [23], а впродовж 80 років життя людини у кістковому мозку, лімфатичних вузлах та кишках утворюється до двох тонн апоптичних клітин [23]. Саме тому клітини макрофагальної системи мають швидко усувати відмираючі клітини, водночас продукуючи проти-запальні цитокіни, оскільки під час загибелі клітин утворюються активні форми кисню (АФК), внаслідок чого з'являються невідомі імунній системі неопітопи [12], здатні провокувати утворення аутоантитіл [40].

Апоптичним клітинам властиві специфічні морфологічні зміни, а саме: асиметрія мембрани, утворення везикул (або блебінг) плазматичної мембрани (ПМ), втрата мітохондріального мембранного потенціалу, активація каспаз, перебудова цитоскелета, конденсація хроматину та фрагментація ДНК. Під час апоптичної загибелі відбувається чітка часозалежна послідовність подій, що ініціюється дією індуктора апоптозу й завершується поглинанням решток апоптичних клітин. Останнє є ключовою ознакою апоптозу, який запобігає ушкодженню тканини та розвитку запалення у випадку некрозу.

Молекулярні маркери апоптозу виявлено в цитоплазмі, ядрі та мітохондріях [33]. Першою (описаною) ознакою апоптозу було експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні ПМ відмираючих клітин, що широко використовується для їх детекції [16, 44]. Зміни на поверхні клітини допомагають відмираючим клітинам сигналізувати оточенню про свою загибель.

Нещодавно виявлено, що під час апоптичної загибелі змінюється також поверхневий компонент ПМ – глікокалікс. На поверхні апоптичних клітин втрачаються термінальні залишки сіалових кислот і одночасно зростає рі-

вень експонування мембранних манозо- і галактозовмісних олігосахаридних детермінант глікопротеїнів [7, 8]. Крім цього, під час апоптичної загибелі відбувається керована зміна мембран клітини, що забезпечує ефективне розпізнавання й усунення апоптичних клітин макрофагами [6, 51], до того ж відмираючі клітини можуть змінювати глікани оточуючих клітин [48]. Таким чином, глікани діють комплементарно із фосфатидилсерином як сигнальні молекули «з'їж мене» для клітин макрофагальної системи [50]. Відповідно вони можуть слугувати ефективними маркерами відмираючих клітин [5,9].

Оскільки клітина сама запускає молекулярні механізми апоптичної загибелі (при цьому дуже багато механізмів дублюється, забезпечуючи «надійність» загибелі клітини), а також, зважаючи на те, що запуск апоптичної загибелі відбувається при старінні, зараженні вірусом, порушенні клітинного циклу (що може призвести до утворення злоякісних клітин), то апоптичну загибель переважно вважають корисною для організму, а апоптичні клітини – альтруїстами, які жертвують собою заради спасіння організму від потенційного захворювання [1].

Проте чимало патогенів імітують відмирання, щоб, наприклад, бути поглинутими макрофагами і заразити його чи в інший спосіб забезпечити реалізацію циклу свого розвитку. Під апоптичні клітини маскуються віруси віспи, малярійні плазмодії та інші патогени [38]. Є і складніші випадки – оскільки апоптичні клітини, як уже згадано, провокують сильну протизапальну дію, в популяції промастигот *Leishmania* утворюється велика кількість апоптичних промастигот, які викликають вивільнення протизапального цитокіну TGF- β , і таким чином гальмують імунну відповідь, створюючи цим передумови для виживання життєздатних паразитів, а отже, для розвитку захворювання [54].

Процес загибелі клітин тривалий, проте вже за декілька хвилин після дії апоптоз-індукуючих чинників можна зафіксувати перші зміни у клітині [27]. Через 4–6 год порушується асиметрія ліпідного бішару ПМ, через 1 год після цього відбувається деградація ядерного хроматину, а через 2 год після порушення асиметрії ліпідів утворюються апоптичні везикули (блеблінг чи зейоз) [55]. Фрагментація клітини на апоптичні везикули триває від 9 до 24 год [32], однак якщо відмираюча клітина не була усунена фагоцитарною системою організму, її внутрішньоклітинні запаси АТФ вичерпуються, цілісність ПМ порушується і внутрішньоклітинний вміст витікає у міжклітинне середовище, тобто утворюються вторинно-некротичні клітини [24], які спричинятимуть запальну реакцію.

Доволі часто постає питання – коли вважати клітину мертвою чи відмираючою? У праці [1] узагальнено думку більшості учених, що «апоптичною», чи «відмираючою», клітину слід вважати в тому випадку, якщо такою її вважають оточуючі клітини, тобто при першій зміні складу ПМ клітини чи при вивільненні клітиною через ПМ певних внутрішньоклітинних сполук у середовище [22, 41]. Крім цього, останні технічні досягнення дають змогу одночасно аналізувати декілька параметрів загибелі клітини [41] та виявляти клітини, які мають внутрішні ознаки апоптичних процесів, а не поверхневі. Такі клітини класифікують як ранні апоптичні [41].

Некротична загибель клітин супроводжується порушенням цілісності ПМ (а отже, і негайною втратою мембранного потенціалу) та витіканням внутрішньоклітинних компонентів у оточуюче середовище (що спричинятиме запальну реакцію). Такий тип загибелі може виникати як негайна відповідь на екстремальний чинник (гіпертермія чи механічне ушкодження), і тоді загибель клітини класифікується як первинний некроз, або ж порушення цілісності ПМ може відбуватись на пізніх стадіях апоптичної загибелі, коли відмираючі клітини не були вчасно усунені фагоцитарною системою організму й вичерпали свої енергетичні запаси для підтримання цілісності клітинної мембрани [43, 53].

У такому випадку йдеться про вторинний некроз. Первинно- і вторинно-некротичні клітини імунологічно відмінні. Перші негайно вивільняють свої компоненти в середовище, а другі зазнають модифікації компонентів (включаючи окиснення та каспазозалежну деградацію) перед їх вивільненням у позаклітинний простір [24]. Традиційно некроз розглядають як процес, ініційований зовнішніми чинниками, зокрема, токсинами, вірусною чи бактерійною інфекцією. Дослідження останніх років показали участь багатьох сигнальних шляхів у контролі некротичних процесів [18].

Деяким клітинам властиві специфічні форми загибелі, пов'язані з їхніми функціями та розташуванням, які водночас супроводжуються значними змінами поверхні клітини. Наприклад, зовнішні клітинні шари зроговілого епітелію чи волосся кератинізуються, утворюючи покрив на поверхні організму, що є стійким до механічних чинників, непроникним для рідин і патогенних організмів [2]. Стосовно нейтрофільних гранулоцитів крові (нейтрофілів) досить нещодавно виявлено новий специфічний шлях загибелі – утворення позаклітинних нейтрофільних пасток (від англ. Neutrophil Extracellular Traps, NETs) [10].

Уже понад сто років відомо, що основна функція нейтрофілів пов'язана з фагоцитозом мікроорганізмів, утворенням АФК для нейтралізації поглинутих патогенів і з вивільненням антимікробних сполук. Проте при гострій запальній реакції ця стратегія неефективна. Ще 14 років тому виявлено, що у нейтрофілів існує альтернативний механізм захисту організму, який дає змогу вловлювати як великі кількості бактерій, так і набагато більші об'єкти – від наночастинок до гіфів грибів. Цей механізм реалізується через активне руйнування зв'язків ДНК-гістони, що призводить до швидкої деконденсації ДНК та захоплення сторонніх частинок вивільненим хроматином, декорованим токсичними білками, що походять із нейтрофільних гранул [36]. Вивільнені ДНК та гістони подібні на (риболовецькі) сітки й отримали назву «позаклітинні нейтрофільні пастки».

Слід зазначити, що такий суїцидний тип клітинної загибелі є доволі резонним для нейтрофілів, адже це термінально диференційовані клітини, які не здатні до проліферації, з коротким періодом півжиття (близько 20 год). Завдяки високосегментованому ядру, нейтрофіли легко виходять із капілярів і проникають у тканини з високою швидкістю. Нейтрофіли патрулюють епітеліальні поверхні тіла та різноманітних проток. Вони альтруїстично жертвують собою та вивільняють цитотоксичний вміст, що зупиняє інвазію патогенів. Таким чином, утворення позаклітинних нейтрофільних пасток служить для захисту організму. Вивільнений хроматин дає змогу не лише безпосередньо іммобілізувати (нейтралізувати) небезпечні бактерії, що мають чисельну перевагу, і зупинити їх поширення, але й знешкоджувати об'єкти, надто великі для фагоцитозу (наприклад, гіфи грибів).

Нейтрофільні позаклітинні пастки здатні захоплювати сторонній інертний матеріал, зокрема кристали моноуратів натрію, що утворюються при подагрі [47], або штучні наночастинки, які, потрапляючи в тіло людини, не можуть бути ані зруйновані, ані видалені [39]. Наприклад, нанодіаманти або полістиренові наночастинки призводять до активації нейтрофілів та подальшого формування позаклітинних нейтрофільних пасток у ділянці обмеженого запального процесу [3]. Під час деяких гострих запальних процесів внутрішніх органів, зокрема при гострому некротичному панкреатиті, виникає масивний некроз тканин – утворюються панкреатичні псевдокісти [20]. На відміну від звичайних кіст, ці псевдокісти не оточені шаром епітелію. Досліджуючи зразки внутрішніх органів хворих із гострим запаленням органів черевної порожнини, ми виявили межу між інтактними та некротизованими тканинами й показали, що некротизовані ділянки ізольовані від сусідніх здорових тканин агрегованими позаклітинними нейтрофільними пастками [4]. У деяких випадках ензими нейтрофільних гранул здатні

руйнувати прозапальні цитокіни в ділянці позаклітинних нейтрофільних пасток, обмежуючи цим запальний процес [47].

Ще за десятки років до опису нейтрофільних пасток було відомо, що некротичні клітини є джерелом позаклітинної ДНК та пов'язаних із нею гістонів [11]. Вважається, що позаклітинний викид ядерного матеріалу, який раніше слугував ознакою цитолізу [52], є характерним маркером нейтрофільних пасток. Спочатку дослідники намагалися відокремити утворення нейтрофільних пасток від специфічних форм клітинної смерті [10,17]. Однак брак чітких критеріїв дефініції нейтрофільних пасток призвів до того, що будь-який процес, у якому задіяне вивільнення ядерного та цитоплазматичного вмісту з нейтрофілів [19, 29, 43, 49, 56], незалежно від механізму його запуску, вважається ознакою формування позаклітинних нейтрофільних пасток.

Цитоліз, індукований ендогенними (перфорином і комплементом) та бактерійними (токсинами) пороутворювальними білками (ПБ), є механізмом самозахисту, який зазвичай використовують імункомпетентні клітини й вірулентні бактерії для атаки на небажані клітини [46]. Подібно до ПБ, утворення дискретних пор у ПМ нейтрофілів (за допомогою електропермеабілізації) сприяє позаклітинному вивільненню ядерної ДНК, з'єднаної з мієлопероксидазою (МПО). Це свідчить про те, що неспецифічний цитоліз провокує зміни нейтрофілів, які неможливо відрізнити від нейтрофільних пасток [35]. Однак, на відміну від нейтрофільних пасток, ПБ спричинюють значний викид кальцію, який гіперактивує пептидиларгінін деїмінази, внаслідок чого відбувається гіперцитрулінування нейтрофілів (процес називається «лейкотоксичним гіперцитрулінуванням»), яке, ймовірно, використовують вірулентні бактерії для інактивації нейтрофілів [30, 31].

Тоді як цитрулінування, правдоподібно, не є абсолютно необхідним для утворення нейтрофільних пасток у людини [14, 28, 31, 42], цей процес забезпечує деїмування аргініну з утворенням цитруліну, що зменшує позитивний заряд гістонів і відповідно спорідненість ДНК до гістонів, сприяючи деконденсації ДНК. Тому в більшості нейтрофільних пасток можна помітити обмежене цитрулінування гістонів, подібне до того, яке викликається іншими діями та причинами смерті [28, 31, 45]. Таким чином, для виявлення позаклітинних нейтрофільних пасток слід застосовувати насамперед морфологічні критерії – сітки з ДНК, поєднуючи їх із детекцією специфічних маркерів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток – позаклітинної ДНК, нейтрофільної еластази, МПО та цитрулінованих гістонів, зокрема гістону H3.

Незважаючи на важливість детекції нейтрофільних позаклітинних пасток, ними часто ігнорують у рутинному аналізі крові, автоматичні гемоаналізatori також не містять відповідних команд для їх детекції. До прикладу, ми стимулювали утворення позаклітинних нейтрофільних пасток у лейкоконцетратах людини (див. рис. 1), і лікарі-діагности здебільшого правильно ідентифікували клітини, що поглинули бактерії. Водночас сучасні рекомендації вказують на необхідність ігнорування у підрахунок «нерозпізнаних» об'єктів, якими є й новоутворені позаклітинні пастки (див. рис. 1).

Доволі ефективно виявляти утворення позаклітинних нейтрофільних пасток за допомогою цитологічних відбитків із поверхні епітелію, зокрема в ділянках запалення, з наступним забарвленням розчином пропідій йодиду (1 мг/мл) упродовж 10 хв. із детекцією за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Цей підхід дозволяє побачити як окремі нейтрофіли, що утворюють позаклітинні нейтрофільні пастки, так і агреговані нейтрофільні пастки (рис. 2).

Пасивація великих, сторонніх чи токсичних об'єктів, безперечно, корисна для організму, тож самопожертва нейтрофілів не є марною. Проте така масова смерть несе нові виклики для імунної системи. Зазвичай нейтрофіль-

Рис. 1. Мазок крові людини демонструє нейтрофіли в лейкоцитарному концентраті після додавання культури бактерій. Деякі з них (помаранчеві стрілки) поглинули бактерії, а інші утворили нейтрофільні пастки (зелені стрілки). Методичні вказівки до діагностики, які давно не оновлювали, рекомендують ігнорувати цей факт активації клітин, трактуючи його як «артефакт» чи результат забруднення препарату.

Рис. 2. Величезні позаклітинні нейтрофільні пастки можуть займати площу кілька сотень квадратних міліметрів і вкривати поверхню органів, захищаючи організм господаря. Цитологічний відбиток позаклітинних нейтрофільних пасток із поверхні епітелію в ділянці запалення демонструє як нейтрофіли, що лише починають викидати нитки ДНК (жовті стрілки), так і агреговані позаклітинні нейтрофільні пастки (білі стрілки). Флуоресцентна мікроскопія, ДНК зафарбовано червоним пропідій йодидом.

ні позаклітинні пастки вивільняються на відносно невеликих ділянках, і згодом вони мають бути зруйновані ДНКазою-1 та ДНКазою-1L3 [21,26] та врешті поглинуті фагоцитами, забезпечуючи баланс між утворенням позаклітинних нейтрофільних пасток та їх «імунологічно мовчазним» усуненням. У разі порушення пасток або внаслідок їх надпродукції чи недостатності макрофагальної системи організм зіштовхнеться із великою кількістю окиснених, а отже, імунологічно «нових» епітопів. Це і є першопричиною утворення аутоантитіл до гістонів, ДНК, цитоплазматичних компонентів нейтрофілів (ANCA) [25], що є характерними ознаками таких захворювань, як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит.

Як бачимо з рис. 2, агреговані позаклітинні пастки є щільними макроскопічними структурами. Очевидно, що при надмірній інфільтрації панкреатичних проток поведомлялося про їх оклюзію агрегованими позаклітинними нейтрофільними пастками [34]. Водночас ми показали важливу роль, яку відіграють ензими-руйнівники пасток ДНКаз-1 та ДНКаз-1L3 в захисті судин від оклюзії нейтрофільними пастками [26]. Ці два ензими дублюють функції один одного, але якщо вони обидва не функціонують, утворюються тромби із позаклітинних нейтрофільних пасток, що забивають судини та врешті призводять до поліорганної недостатності та/чи смерті. Найдрібніші капіляри в легенях перші зазнають цього деструктивного впливу (рис. 3).

Таким чином, упродовж минулих 15 років тема утворення позаклітинних нейтрофільних пасток стала надзвичайно актуальною. Сучасні дослідження переконливо доводять важливість цих структур. Позаклітинні нейтрофільні пастки допомагають не лише зупинити поширення бактерій чи знешкодити об'єкти, які є завеликими для фагоцитозу, але й намагаються ізолювати пошкоджену (некротизовану) тканину. Водночас, порушення, що призводять до накопичення нейтрофільних пасток можуть слугувати тригерами, які спричиняють поліорганну недостатність чи навіть смерть.

Рис. 3. ДНКаз у крові запобігають утворенню позаклітинних нейтрофільних пасток, а дефект цих ензимів призводить до оклюзії судин і порушення кровопостачання органів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Білий Р. Структурно-функціональні зміни поверхні клітин ссавців за умов апоптозу та їх роль у міжклітинних взаємодіях та імунній відповіді: дис. ... д-ра біол. наук: спец. 03.00.11 «Цитологія, клітинна біологія, гістологія». Львів; 2015. 395 с. (Bilyy R. *Structural and functional changes in the surface of mammalian cells undergoing apoptosis and their role in intercellular interactions and immune response: thesis for a Doctor of Science degree in biology, speciality 03.00.11 "Cytology, cell biology, histology"*. Lviv; 2015. 395 p.).
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. Molecular biology of the cell. New York, USA: Garland Science; 2002. 3786 p.
3. Biermann MHC, Podolska MJ, Knopf J, Reinwald C, Weidner D, Maueröder C, et al. Oxidative burst-dependent NETosis is implicated in the resolution of necrosis-associated sterile inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:557.
4. Bilyy R, Fedorov V, Vovk V, Leppkes M, Dumych T, Chopyak V, et al. Neutrophil extracellular traps form a barrier between necrotic and viable areas in acute abdominal inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:424.
5. Bilyy R, Podhorodecki A, Nyk M, Stoika R, Zaichenko A, Zatoryb G et al. Utilization of GaN:Eu3+ nanocrystals for the detection of programmed cell death. *Phys E Low-dimensional Syst Nanostructures.* 2008;40(6):2096-9.
6. Bilyy RO, Shkandina T, Tomin A, Muñoz LE, Franz S, Antonyuk V et al. Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *J Biol Chem.* 2012;287(1):496-503.
7. Bilyy RO, Stoika RS. Lectinocytochemical detection of apoptotic murine leukemia L1210 cells. *Cytometry A.* 2003;56(2):89-95.
8. Bilyy R, Stoika R. Search for novel cell surface markers of apoptotic cells. *Autoimmunity.* 2007;40(4):249-53.
9. Bilyy R, Tomyn A, Kit Y, Podhorodecki A, Misiewicz J, Nyk M et al. Detection of dying cells using lectin-conjugated fluorescent and luminescent nanoparticles. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik.* 2009. 234-7.
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
11. Bunting H. Interstitial desoxyribonucleic acid following cell death. *Yale J Biol Med.* 1950;22(6):521-5.
12. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994;179(4):1317-30.
13. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2661-71.
14. Douda DN, Khan MA, Grasmann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(9):2817-22.
15. Erwig L-P, Henson PM. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol.* 2007;171(1):2-8.
16. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148(7):2207-16.
17. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
18. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
19. Gloude NJ, Khandelwal P, Luebbering N, Louder DT, Jodele S, Alder MN et al. Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood.* 2017;130(10):1259-66.
20. Gurusamy KS, Pallari E, Hawkins N, Pereira SP, Davidson BR. Management strategies for pancreatic pseudocysts. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;4:CD011392.
21. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(21):9813-8.
22. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a008748.
23. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361(16):1570-83.
24. Janko C, Munoz L, Chaurio R, Maueröder C, Berens C, Lauber K et al. Navigation to the graveyard-induction of various pathways of necrosis and their classification by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2013;1004:3-15.
25. Jiao Y, Li Z, Loughran PA, Fan EK, Scott MJ, Li Y et al. Frontline Science: Macrophage-derived exosomes promote neutrophil necroptosis following hemorrhagic shock. *J Leukoc Biol.* 2018;103(2):175-83.
26. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 2017;358(6367):1202-6.
27. Kaminsky V, Kulachkovskyy O, Stoika R. A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids. *Toxicol Lett.* 2008;177(3):168-81.
28. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017;6:e24437.
29. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2013;5(178):178ra40.
30. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2016;8(369):369ra176.
31. König MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front Immunol.* 2016;7:461.
32. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell.*

2004;14(3):277-87. **33.** Lawen A. Apoptosis-an introduction. Bioessays. 2003;25(9):888-96. **34.** Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, Nowecki S, Günther C, Billmeier U et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. Nat Commun. 2016;7:10973. **35.** Malachowa N, Kobayashi SD, Freedman B, Dorward DW, DeLeo FR. Staphylococcus aureus leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. J Immunol. 2013;191(12):6022-9. **36.** Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytosis vs Make Neutrophil Extracellular Traps. Front Immunol. 2018;9:288. **37.** Maueröder C, Chaurio RA, Dumych T, Podolska M, Lootsik MD, Culemann S et al. A blast without power - cell death induced by the tuberculosis-necrotizing toxin fails to elicit adequate immune responses. Cell Death Differ. 2016;23(6):1016-25. **38.** Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. Nat Cell Biol. 2009;11(5):510-20. **39.** Munoz LE, Bilyy R, Biermann MH, Kienhöfer D, Maueröder C, Hahn J et al. Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(40):E5856-65. **40.** Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi A, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(5):280-9. **41.** Munoz LE, Maueröder C, Chaurio R, Berens C, Herrmann M, Janko C et al. Colourful death: six-parameter classification of cell death by flow cytometry-dead cells tell tales. Autoimmunity. 2013;46(5):336-41. **42.** Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. Front Immunol. 2013;4:38. **43.** Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Exp Cell Res. 2003;283(1):1-16. **44.** Reutelingsperger CP, Reutelingsperger CP, Christiaan Peter M. Method for detecting and/or optionally quantifying and/or separating apoptotic cells in or from a sample. United States; 1998:1-9. **45.** Romero V, Fert-Bober J, Nigrovic PA, Darrah E, Haque UJ, Lee DM et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. Sci Transl Med. 2013;5(209):209ra150. **46.** Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RHP, Buckle AM et al. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. Cell Microbiol. 2008;10(9):1765-74. **47.** Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. Nat Med. 2014;20(5):511-7. **48.** Shkandina T, Herrmann M, Bilyy R. Sweet kiss of dying cell: Sialidase activity on apoptotic cell is able to act toward its neighbors. Autoimmunity. 2012;45(8):574-8. **49.** Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. Arthritis Res Ther. 2014;16(3):R122. **50.** Tomin A, Dumych T, Kril I, Antonyuk V, Chopyak V, Stoika R et al. Magnetic separation of apoptotic cells with lectin-conjugated microparticles. Materwiss Werksttech. 2016;47:189-92. **51.** Tomin A, Dumych T, Tolstyak Y, Kril I, Mahorivska I, Bila E et al. Desialylation of dying cells with catalytically active antibodies possessing sialidase activity facilitate their clearance by human macrophages. Clin Exp Immunol. 2015;179(1):17-23. **52.** Vainio T, Koskimies O, Perlmann P, Perlmann H, Klein G. In vitro cytotoxic effect of lymphoid cells from mice immunized with allogeneic tissue. Nature. 1964;204:453-5. **53.** Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. Curr Mol Med. 2008;8(3):207-20. **54.** van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(37):13837-42. **55.** Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. J Exp Med. 1995;182(5):1597-601. **56.** Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2011;187(1):538-52.

Стаття надійшла до редколегії 25.05.2018

REVIEWS

How Can the Death of Cells Be Useful For a Human Body?

T.J. DUMYCH^{1*}, S.Ja. PARYZHAK^{1*}, S.M. PESHKOVA¹, G.J. BILA¹,
M.D. LOOTSYK², O.D. LUTSYK¹, P.O. BILYY¹

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

²Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine

* These authors have contributed equally to this work

E-mail: r.bilyy@gmail.com

Traditionally, two main types of the cell death (apoptosis and necrosis) are distinguished. The Nomenclature Committee on Cell Death in the last classification of the involved molecular pathways (2018) divided the necrotic and apoptotic morphology of cell death into more than

20 subforms. Besides, earlier it has been also reported about the artificially created cell death pathway.

Apoptosis is a coordinated physiological process of programmed cell death. The cells of the macrophage system should quickly eliminate the dying cells, while producing anti-inflammatory cytokines. During the apoptotic death there is a clear time-dependent sequence of the events initiated by the influence of apoptosis inducer that finally results into the engulf of the apoptotic cell corpses. This is a key sign of the apoptosis that does not cause a damage of the tissue and its inflammation unlike the necrosis.

Necrotic cell death is accompanied by infringement of the plasma membrane integrity and influx of intracellular components into the environment (that causes the inflammation).

Recently a new specific type of death has been discovered for neutrophilic granulocytes of blood (neutrophils): Neutrophil Extracellular Traps (NETs). The formation of neutrophil extracellular traps protects the body. Released chromatin immobilizes and neutralizes dangerous and numerically dominant bacteria and help to stop their spreading. NETs can capture another inert material, for example, natural sodium monourate crystals, formed in the case of gout, or artificial nanoparticles, that after contacting with a human body cannot be destroyed or removed (e.g. nanodiamonds or polystyrene nanoparticles). It leads to neutrophils activation and further formation of extracellular neutrophil traps in the place of self-limiting inflammatory process.

During some acute inflammatory processes in the internal organs, particularly in the case of acute *necrotizing* pancreatitis, massive tissue necrosis occurs. Investigation of the internal organs of the patients with the acute inflammation of abdominal cavity allows to examine the interface of the intact and necrotizing tissues and show that necrotizing areas are isolated from the adjacent healthy tissues by aggregated extracellular neutrophil traps.

Aggregated extracellular traps are dense macroscopic structures. It has been found that during excessive infiltration of pancreatic ducts they have been occluded by aggregated extracellular neutrophil traps. At the same time, DNase-1 and DNase-1L3 enzymes-destroyers of traps play the important role in protection of vessels from occlusion by neutrophil traps. These two enzymes duplicate each other's functions, but when both of them do not function, the blood clots are formed from extracellular neutrophil traps that clog the vessels, and ultimately lead to multiple organ failure and/or death. The smallest capillaries in the lungs are undergo this destructive effect first of all.

Despite the importance of detecting neutrophil extracellular traps, they are often ignored in the routine blood tests, while *automated hemoanalyzers* do not have appropriate commands to detect them. Modern recommendations underline a problem of ignoring "unrecognized" objects, including newly formed extracellular traps, in the process of cell counting.

Thus, over the past 15 years, the issue of the extracellular neutrophil traps formation has become extremely important. Current studies convincingly prove the importance of these structures. Extracellular neutrophil traps help not only to stop the spreading of bacteria or to neutralize the objects that are too large for phagocytosis, but they also help to isolate the damaged (necrotic) tissues. At the same time, problems that lead to accumulation of neutrophil traps can trigger multiple organ failure or death.

Key words: neutrophil extracellular traps, inflammation, apoptosis, necrosis.