

І.В. Бродяк, М.Л. Барська, Р.Є. Манаровська, Н.О. Сибірна

Вплив оксиду азоту на активацію апоптозу в імунокomпетентних клітинах крові при цукровому діабеті 1-го типу

Проведено определение NO-синтазной активности, содержания стабильных продуктов метаболизма NO (нитритов и нитратов), а также биохимического маркера апоптоза – фрагментированной ДНК, в сегментноядерных нейтрофильных гранулоцитах и мононуклеарных лейкоцитах крови здоровых людей и больных сахарным диабетом 1-го типа. Показано, что активация апоптоза в полиморфноядерных и мононуклеарных лейкоцитах крови при сахарном диабете 1-го типа сопровождается возрастанием активности NO-синтазы и содержания конечных продуктов метаболизма NO, что свидетельствует о повышении проапоптического действия оксида азота в иммунокомпетентных клетках крови при исследуемой патологии.

ВСТУП

Патогенетична роль ендогенного оксиду азоту при цукровому діабеті 1-го типу розглядається під двома кутами зору: як фактора етіології самого захворювання та як фактора, гіперпродукція якого відіграє значну роль у формуванні метаболічних і функціональних порушень системи крові [11]. Діючи на сигнальні мережі клітини, NO контролює і такі важливі функції, як проліферація та апоптоз. При цьому цитотоксичний або цитопротекторний його ефект залежить від багатьох зовнішніх стимулів і статусу клітини. Найбільш поширеним у фізіологічних умовах виявом цитотоксичної дії оксиду азоту є активація апоптозу [10]. Останній розглядається як головний механізм підтримки оптимального клітинного балансу в імунній системі [8]. При цукровому діабеті 1-го типу порушується координація процесу апоптозу, що зумовлює виникнення значних змін в імунокomпетентних клітинах крові як у напрямку пригнічення (при розвитку аутоімунної патології), так і посилення (виникнення імунodefіцитного стану) запрограмованої клітинної смерті. Регуляція

тривалості життя клітин імунної системи за допомогою апоптозу зумовлює тонкий баланс між їхнім ефективним функціонуванням та своєчасним і безпечним видаленням цих потенціально небезпечних клітин [12]. Таким чином, осмислення впливу системи оксиду азоту на апоптоз в імунокomпетентних клітин крові при цукровому діабеті 1-го типу може стати додатковим показником оцінки важкості імунodefіцитного стану та сприяти більш детальному вивченню деяких аспектів патогенезу даного захворювання. Попередньо методами визначення апоптичного індексу, вирахованого на основі морфологічних апоптичних ознак, та рівня експресії Fas/APO-1 на поверхні імунокomпетентних клітин крові, нами було показано активацію апоптозу у досліджуваних клітинах [2]. Для підтвердження цих даних іншими методами проведена робота, метою якої було: вивчення NO-синтазної активності, вмісту стабільних продуктів метаболізму NO (нітрит- і нітрат-аніонів), а також дослідження вмісту біохімічного маркера апоптозу фрагментованої ДНК у сегментноядерних гранулоцитах і мононуклеарних лейкоцитах крові здорових людей і хворих на цукровий діабет 1-го типу.

© І.В. Бродяк, М.Л. Барська, Р.Є. Манаровська, Н.О. Сибірна

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були лейкоцити крові 10 людей, хворих на цукровий діабет 1-го типу (7 чоловіків, 3 жінки) віком від 24 до 39 років (тривалість хвороби 9 ± 4 років) і 12 практично здорових донорів (контрольна група) віком від 21 до 35 років (8 чоловіків, 4 жінки).

Забір крові проводили з вени у стерильні силіконізовані пробірки. Процесу зсідання запобігали додаванням у посуд гепарину (кінцеве розведення 1:100) у співвідношенні 1:10 (розведений гепарин : кров).

Нейтрофільні гранулоцити та мононуклеарні лейкоцити виділяли у градієнті густини Gradisol-G ("Aqua-medica", Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (рН 7,2–7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98 %.

Лізис клітин проводили протягом 30 хв на льодяній бані буфером такого складу: 10 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,5), 150 ммоль/л NaCl, 1 % тритону X-100, 5 ммоль/л ЕДТА, 50 ммоль/л NaF, 1 ммоль/л фенілметилсульфонілфториду ("Fluka", Швейцарія), 5 ммоль/л бензамідину ("Sigma", США), 10 мкг/мл апротиніну ("Sigma"), 10 мкг/мл лейпептину ("Sigma", США), 2 мкг/мл пепстатину ("Fluka", Швейцарія), 0,25 ммоль/л Na₃VO₄ 1:10 за об'ємом. Отриманий лізат клітин використовували для визначення активності NO-синтази (NOS) і вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту.

Визначення активності NO-синтази. Активність NOS визначали в реакційній суміші наступного складу: 2,5 мл 0,1 М тріс-НСІ буферу (рН 7,4), який містив 10 ммоль/л CaCl₂ та 5 ммоль/л MgCl₂; 0,3 мл водного розчину 200 мкмоль/л L-аргініну (кінцева концентрація в пробі 20 мкмоль/л); 0,1 мл водного розчину 1 ммоль/л НАДФН.

Реакцію запускали внесенням 0,1 мл лізату досліджуваних клітин. Контрольну пробу готували аналогічно до дослідної, але

без додавання НАДФН. Безсубстратне окиснення останнього досліджували в реакційній суміші, що містила 0,3 мл дистильованої води замість розчину аргініну. Для підвищення специфічності вирахування ступінь окиснення НАДФН, пов'язаного лише з активністю NOS, використовували додаткову пробу, яка замість L-аргініну містила 0,3 мл водного розчину інгібітора NOS (L-NAME) у аналогічній до субстрату концентрації. Різниця між ступенем окиснення НАДФН з L-аргініном і з інгібітором дає ступінь окиснення НАДФН, залежну від конкурентного неселективного інгібітора всіх ізоформ NOS, тобто активність NOS.

Дослідні проби спектрофотометрували відносно контрольних при 340 нм, потім інкубували 20 хв при 37° С, зупиняли реакцію внесенням 0,02 мл 0,02 %-го NaN₃ і реєстрували зниження екстинкції. Активність NOS виражали у наномолях НАДФН, що окиснювався протягом 1 хв на 1 мг білка [13, 19].

Визначення вмісту нітритів. Вміст нітрит-аніона (NO₂⁻) визначали в безбілкових аліквотах лізатів у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса. До 2 мл проби додавали 0,2 мл реактиву, перемішували та вимірювали екстинкцію щодо контрольної проби (обробленої аналогічно) через 15 хв при 540 нм [10, 21]. Результат розраховували за калібрувальним графіком з використанням стандартних розчинів нітриту натрію.

Визначення вмісту нітратів. Вміст нітрат-аніона (NO₃⁻) досліджували в безбілкових аліквотах лізатів після визначення вмісту NO₂⁻. Оскільки діазореакція є специфічною тільки на нітритах, тому для визначення вмісту нітратів необхідно їх попередньо відновити. Як відновник використовували цинковий пил. У пробу додавали 0,7 мл 2,4 N хлорної кислоти та вносили 30 мг "сухого відновника", струшували та вимірювали екстинкцію щодо контрольної проби через 15 хв при 540 нм [7, 10]. Результат

розраховували за калібрувальним графіком з використанням стандартних розчинів нітрату калію.

Визначення фрагментованої ДНК. Біохімічну детекцію апоптозу проводили за визначенням вмісту фрагментованої ДНК [10, 14]. Лізис клітин здійснювали протягом 30 хв на льодяній бані буфером такого складу: 5 ммоль/л тріс-НСІ, 20 ммоль/л ЕДТА (рН 8), 0,5 % тритон Х-100. Аліквоту кожної проби центрифугували (15 хв при 13000 g), відділяючи інтактний хроматин (в осаді) від фрагментованої ДНК (у супернатанті). Далі проби ресуспендували в 500 мкл буфера: 10 ммоль/л тріс-НСІ, 1 ммоль/л ЕДТА (рН 8,0) і преципітували в 600 мкл 12 %-ї трихлороцтової кислоти (ТХО) при 4° С. Одержані суспензії центрифугували (10 хв при 4000 g). До пробірок з осадом для проведення гідролізу додавали 300 мкл 5 %-ї ТХО (90° С, 10 хв). В аліквотах супернатантів проводили кольорову реакцію за допомогою дифеніламінового реагенту. Розчини спектрофотометрували при довжині хвилі 570 нм відносно контрольних значень (дифеніламіновий реагент і 5 % ТХО). Ступінь пошкодження ДНК обчислювали у відсотках як відношення її кількості в супернатанті до сумарного вмісту в осаді та супернатанті.

Визначення концентрації білка. Вміст загального білка в пробах визначали загальноновживаним методом Петерсона [26].

Результати досліджень обробляли статистично з використання середнього арифметичного та стандартної похибки ($M \pm m$), а також довірчого інтервалу, що використовували при оцінці ступеня достовірності (P) за допомогою критерію t Стьюдента. Роз-

біжності вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з отриманих результатів (табл. 1), за умов цукрового діабету 1-го типу у поліморфноядерних лейкоцитах хворих людей активність NO-синтази збільшується приблизно вдвічі, а у мононуклеарних клітинах у 5 разів. Можна припустити, що підвищення активності досліджуваного ферменту відбувається внаслідок збільшення внутрішньоклітинного рівня мРНК індукцйбельної NOS (іNOS) при дії на імунокомпетентні клітини підвищених концентрацій глюкози [16]. Збільшення активності ферменту та, відповідно, вмісту оксиду азоту може призвести, з одного боку до інгібування міграції та адгезії лейкоцитів (пригнічується експресія VCAM-1, ICAM-1, E-селектину, знижується стабільність мРНК моноцитарного хемотаксичного фактора), а, з іншого, до посилення в досліджуваних клітинах вільнорадикальних процесів [6, 23, 28]. Як свідчать літературні дані [6], за умов цукрового діабету 1-го типу в імунокомпетентних клітинах периферичної крові підвищується активність НАДФН-оксидази, яка генерує активні форми кисню. Фактори, які індукують НАДФН-оксидазу, активують і функцію іNOS. При цьому, в процесі синтезу NO із L-аргініну НАДФН бере участь як донор електронів. Отже, утворення супероксиданіон-радикала та оксиду азоту тісно пов'язане з функцією НАДФН. За умов ферментативного та субстратного забезпечення швидка радикал-радикальна взаємо-

Таблиця 1. Активність NO-синтази (нмоль/л НАДФН · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка) у поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитах крові здорових людей і хворих на цукровий діабет 1-го типу ($M \pm m$; n=10)

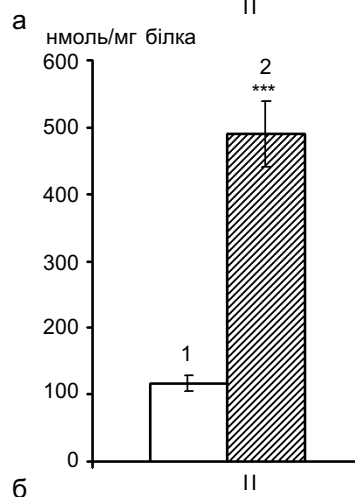
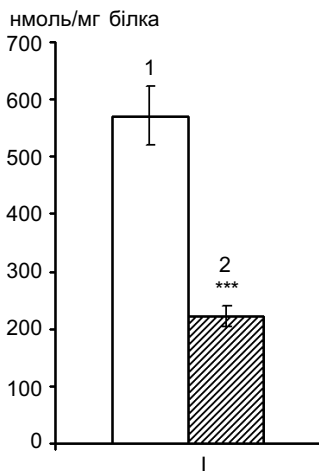
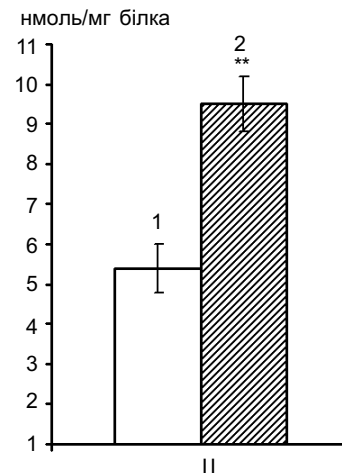
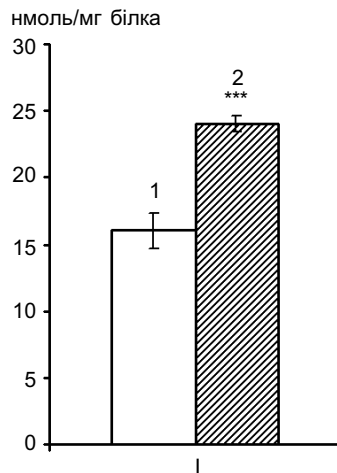
Лейкоцити	Контроль	Діабет
Мононуклеарні	0,98 ± 0,33	5,45 ± 1,01**
Поліморфноядерні	0,43 ± 0,08	1,06 ± 0,06**

Примітка. Тут і в табл. 2 * P < 0,05, ** P < 0,01.

дія між NO і O_2^- призводить до утворення в лейкоцитах високотоксичного пероксинітриду (ONOO^-) [3]. Останній здатний модифікувати біологічні структури за допомогою окиснення або нітрозуювання. Утворені нітрозотіоли, нітрозильовані похідні білків, динітрозильовані комплекси заліза та нітросильні аніон-радикали (NO^-) виконують в організмі функцію депо NO , тому що в результаті зворотної реакції молекула оксиду азоту може вивільнятися знову [16, 17].

При низьких концентраціях аргініну за наявності всіх необхідних кофакторів конститутивна NO -синтаза окиснює воду до пероксиду водню, який виступає додатковим, а іноді і єдиним продуктом реакції

[6]. За наявності металів змінної валентності H_2O_2 неферментативно відновлюється до радикала OH^\cdot . У кислому середовищі пероксинітрид розпадається до OH^\cdot та NO_2^- , які ушкоджують структуру нуклеїнових кислот, білків і вуглеводів [1]. Тому на наступному етапі нами було досліджено вміст стабільних окиснених форм NO : нітрид- та нітрат-аніонів. Отримані результати свідчать, що при цукровому діабеті 1-го типу в лейкоцитах крові вміст NO_2^- був значно вищим, ніж у даних клітинах контрольної групи (рисунок, а). Слід зауважити, що нітрид-аніон може легко відновлюватися до NO , утворюючи замкнений метаболічний цикл [20]. Значне зростання активності NO -синтази та вмісту NO_2^- у лейко-



Вміст нітрид-аніона (а) і нітрат-аніона (б) в мононуклеарних лейкоцитах (I) і нейтрофільних гранулоцитах (II) здорових людей (1) та хворих на цукровий діабет 1-го типу (2). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

цитах крові, які ми спостерігали при цукровому діабеті 1-го типу, вказують на функціональну субактивованість досліджуваних клітин. За таких умов у нейтрофільних гранулоцитах і макрофагах активується киснезалежний метаболізм, що призводить до зменшення вмісту NO внаслідок окиснення його до пероксинітриту, нітритів і нітратів [5, 16]. Продукти метаболізму оксиду азоту, в свою чергу, викликають посилення цитотоксичного ефекту NO, що зумовлює порушення гемоциркуляції, пошкодження ендотелію судин і тканинну дезорганізацію [23].

При цукровому діабеті 1-го типу пул NO_3^- у клітинах моноклеарного ряду був достовірно зниженим, а в сегментоядерних нейтрофілах збільшувався у 4 рази порівняно з контрольною групою (див. рисунок, б). Нітрат-аніон може утворюватись у клітині ферментативно при окисненні оксиду азоту, виступаючи його кінцевою формою обміну. Але більш імовірною причиною підвищення вмісту NO_3^- в поліморфноядерних лейкоцитах ми вважаємо активацію неферментативного шляху розпаду пероксинітриту за умов відсутності клітин-мішеней [1, 10, 18]:



Пероксинітрит має здатність нітрозилувати тирозинові залишки в складі білкових структур, що може бути причиною зменшення вмісту нітрат-аніона в моноклеарних лейкоцитах.

Сучасні дослідження вказують на те, що оксид азоту може виявляти генотоксичний вплив, пошкоджуючи хімічну структуру ДНК [16]. Крім того, NO активує низку ферментів (наприклад полі-(АДФ-рибозо)-полімераза), які утворюють численні

розриви в ДНК [9]. Для підтвердження цього припущення нами було досліджено апоптоз у лейкоцитах периферичної крові. Показано, що вміст фрагментованої ДНК у нейтрофільних гранулоцитах здорових донорів був вищим, ніж у моноклеарах. В імунокомпетентних клітинах крові людей хворих на цукровий діабет 1-го типу також спостерігається посилення процесу деградації ядерної ДНК (табл. 2). Ступінь пошкодження ДНК за своєю інтенсивністю був набагато більш вираженим для поліморфноядерних лейкоцитів (у два рази порівняно з контролем), ніж у клітинах моноклеарного ряду (в 1,5 рази щодо контрольної групи). Інтенсивний прогресуючий апоптоз лімфоцитів і моноцитів підтверджує припущення про розвиток вторинного імунодефіцитного стану при цукровому діабеті 1-го типу. Як відомо, лімфоцити в стані спокою стійкі до апоптозу під впливом високого рівня експресії анти- та проапоптичних ефекторів, особливо, білків родини Bcl-2 і каспаз [25]. В міру активації імунологічної реактивності та поступового переходу в стан проліферації вони стають значно чутливішими до запрограмованої смерті через спеціалізовані та неспеціалізовані тригерні молекули [8, 12, 15]. Отже, підвищення спонтанного апоптозу в моноклеарних лейкоцитах при досліджуваній патології, безперечно, вказує на розвиток імунодефіциту через прогресуючий апоптоз.

Згідно з даними літератури, саме під впливом високих концентрацій NO за умов цукрового діабету 1-го типу спостерігається інгібування проліферації лімфоцитів і зниження експресії антиапоптичних білків [22, 24]. У механізмах індукції процесу апоптозу оксидом азоту важливе значення

Таблиця 2. Вміст фрагментованої ДНК (%) лейкоцитів як маркера апоптозу в здорових людей і хворих на цукровий діабет 1-го типу ($M \pm m$; $n=10$)

Лейкоцити	Контроль	Діабет
Моноклеарні	$12,8 \pm 1,7$	$18,5 \pm 1,7^*$
Поліморфноядерні	$14,7 \pm 2,0$	$31,4 \pm 3,1^{**}$

має активація каспази-1, каспази-3, каспази-6, накопичення білка p53, збільшення вмісту перексиду водню [4, 27].

Значне збільшення вмісту фрагментованої ДНК у поліморфноядерних лейкоцитах може бути зумовлене тим, що нейтрофіли налаштовані на швидкий спонтанний апоптоз, який не потребує “позитивних сигналів смерті”, оскільки внутрішньоклітинний шлях цього процесу є важливим регулятором тривалості їхнього життя [12].

Таким чином, нами показано, що активація апоптозу в поліморфноядерних і мононуклеарних лейкоцитах крові при цукровому діабеті 1-го типу супроводжувалася зростанням активності NO-синтази та вмісту стабільних метаболітів NO, що свідчить про підвищення проапоптотичної дії оксиду азоту в імунокомпетентних клітинах крові за умов досліджуваної патології.

I.V. Brodiak¹, M.L. Barska², R.Y. Manarovska³, N.O. Sybirna¹

EFFECT OF NITRIC OXIDE SYSTEM UPON APOPTOSIS ACTIVATION IN IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS UNDER TYPE 1 DIABETES MELLITUS

NO-synthase activity, the content of stable products of NO metabolism (nitrites and nitrates) as well as fragmented DNA as biochemical marker of apoptosis have been determined in segmentonuclear neutrophilic granulocytes and mononuclear leukocytes in blood of healthy donors and patients with type 1 diabetes mellitus. It was found that activation of apoptosis in polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes under diabetes mellitus was accompanied by an elevation of NO-synthase activity and the content of stable NO metabolites. This suggests an increase of proapoptotic action of nitric oxide in immunocompetent blood cells under the pathology studied.

¹Ivan Franko L'viv National University, Lviv

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, L'viv

³L'viv Regional Endocrinological Hospital

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амосова К.М., Гула Н.М., Гунський Ю.І. та ін. Стан NO-системи в еритроцитах крові хворих з первинною легеневою гіпертензією та його зміни під час лікування дилтаземом // *Серце і судини*. – 2004. – № 2. – С. 76–82.

2. Бродяк І.В., Барська М.Л., Сибірна Н.О. Апоптоз імунокомпетентних клітин крові при цукровому діабеті 1 типу // *Лаб. діагностика*. – 2005. – №3. – С. 22–25.
3. Голиков П.П., Лемєнев В.Л., Николаєва Н.Ю. и др. Продукция оксида азота лейкоцитами и тромбоцитами периферической крови человека в норме и при сосудистой патологии // *Гематология и трансфузиология*. – 2003. – **48**, № 2. – С. 28–32.
4. Запорожан В.Н., Гоженко А.И., Корнеевко Т.В. и др. Роль эндогенного оксида азота в индукции опухолевого роста // *Укр. журн. експерим. медицини ім. Г.О. Можаява*. – 2002 – **3**, № 2. – С. 77–83.
5. Зинкин В.Ю., Годков М.А. Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека // *Клин. лаб. диагностика*. – 2004. – № 8. – С. 26–29.
6. Зотова И.В., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Синтез оксида азота и развитие атеросклероза // *Кардиология*. – 2002. – № 4. – С. 58–67.
7. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // *Лаб. діагностика*. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
8. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Апоптогенные механизмы возникновения иммунодефицитных заболеваний // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 1999. – № 5. – С. 47–52.
9. Колесник Ю.М., Орловский М.А. Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 // *Пробл. эндокринологии*. – 2004. – **50**, № 2. – С. 3–10.
10. Комаревцева І.О., Орлова О.А., Благодаренко С.А. Вміст оксиду азоту в нирках за активації апоптозу // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – **74**, № 4. – С. 116–119.
11. Кондратьєва Е.И., Косянкова Т.В. Гены синтаза оксида азота (NOS) в патогенезе сахарного диабета и его осложнений // *Пробл. эндокринологии*. – 2002. – **98**, № 2. – С. 33–38.
12. Маянский Н.А. Внутренний путь апоптоза нейтрофилов и механизмы антиапоптотного эффекта гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // *Иммунология*. – 2004. – № 6. – С. 329–335.
13. Онуфриев М.В., Гуляева Н.В. Регистрация окисления NADPH как подход к оценке активности NO-синтазы // *Бюл.эксперим. биологии и медицины*. – 1995. – № 8. – С. 148–150.
14. Орлова Е.А., Комаревцев В.Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани – В кн.: *Актуальные проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии и медицинской генетики*. – 2001. – Вып. 6. – С. 206–209.
15. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфология апоптоза при нормальном и патологическом гемопоэзе // *Гематология и трансфузиология*. – 1995. – **40**, № 5. – С. 17–25.

16. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Терап. архив. – 2005. – № 1. – С. 82–87.
17. Проскураков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций // Иммунология. – 2000. – № 4. – С. 9–20.
18. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Присяжна О.Д. та ін. Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів та системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2003. – 49, № 4. – С. 24–32.
19. Сумбаев В.В., Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Совр. проблемы токсикологии. – 2000. – № 3. – С. 3–7.
20. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцючуба А.В. та ін. Ендотелійзалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів // Фізіол. журн. – 2002. – 48, № 4. – С. 2–13.
21. Фотосинтез и биопродуктивность : методы определения / Под ред. А.Т. Мокроносова. – М.: ВО "Агропромиздат", 1989. – 460 с.
22. Cerchiaro G.A., Scavone C., Teixeira S. et al. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin // Biochemical Pharmacology. – 2001. – 62, № 3. – P. 357–362.
23. Iori E., Calo L., Valbusa D. et al. Diabetic ketosis activates lymphomonocyte-inducible nitric oxide synthase // Diabet Med. – 2002. – 19, № 9. – P. 777–783.
24. Mahidhara R.S., Hoffman R.A., Huahg S. et al. Nitric oxide-mediated inhibition of caspase-dependent T lymphocyte proliferation // J. Leukoc. Biol. – 2003. – 74, № 3. – P. 403–411.
25. Modzelewska M., Sikorska-Fic B., Kowalska H. et al. BCL-2 antigen expression in blood cells children suffering from leukemia // Wiad. Lek. – 1998. – 51, № 4. – P. 119–123.
26. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // Anal.Biochem. – 1977. – 83, № 2. – P. 346–356.
27. Pozner G.R., Negrotto S., D'Atri LP. et al. Prostacyclin prevents nitric oxide-induced megakaryocyte apoptosis // Brit. J. Pharmacol. – 2005. – 143, №1. – P. 33–40.
28. Secco D.D., Paron J.A., de Oliveira S.H. et al. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis // Nitric Oxide. – 2003. – 9, № 3. – P. 153–164.

*Львів. ун-т ім. Івана Франка;
 Ін-т біології клітини НАН України, Львів;
 Львів. обл. ендокрин. диспансер*

*Матеріал надійшов до
 редакції 28.04.2005*