

Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, Р.І. Янчій

Генотоксичний стрес і шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишей за умов системної імунокомплексної патології

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
E-mail: grusha@i.ua, tas@biph.kiev.ua

Вивчали генотоксичний стрес та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин (ІКК) (апоптоз і некроз) при моделюванні системного імунокомплексного пошкодження за допомогою імунізації мишей лінії СВА бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Імунофлюоресцентними дослідженнями імунізованих мишей встановили фіксацію імунних комплексів у тканинах печінки, селезінки, нирок і аорти. Гістологічний аналіз цих органів показав ураження судинної системи і меншою мірою паренхіми. Встановлено, що при імунізації БСА індекс ДНК-комет збільшувався в 1,4 раза в клітинах лімфовузлів і в 1,5 раза у клітинах тимуса. Спостерігалось підвищення кількості клітин з максимальним пошкодженням ДНК в препаратах тимуса (у 3,4 раза) і лімфовузлів (в 3,3 раза), що свідчить про сильний генотоксичний стрес. Знижувалася кількість живих ІКК і збільшувалася їх загибель, у тому числі прозапальним і імуногенним некротичним шляхами. Показано, що генералізований імунокомплексний патологічний процес призводить до пошкодження ДНК і загибелі ІКК як центрального (тимуса), так і периферичних органів імунної системи (лімфовузлів, селезінки). Генотоксичний стрес ІКК і посилення їх загибелі некротичним шляхом можуть відігравати значну роль у розвитку імунокомплексних захворювань. Ці показники кількості лімфоцитів периферичної крові можуть бути перспективною тест-системою для оцінки тяжкості аутоімунних та імунокомплексних захворювань і ефективності їх лікування.

Ключові слова: пошкодження ДНК; апоптоз; некроз; лімфоцити; імунокомплексна патологія.

ВСТУП

Однією з найважливіших функцій імунної системи є підтримання клітинного та гуморального гомеостазу організму. Відомо, що проліферація й активація клітин вродженого та адаптивного імунітету підвищує їх загибель, яка за фізіологічних умов відбувається через апоптоз і не викликає запалення та імунної відповіді. Однак запальні процеси, які супроводжуються зростанням генерації активних радикалів кисню й азоту, можуть посилити перекисне окиснення ліпідів, ушкодження білків та ДНК (генотоксичний стрес) і переключати загибель з апоптозу на некроз. Некроз є прозапальним і імуногенним

шляхом загибелі, оскільки вихід клітинного вмісту в тканини спричиняє активацію клітин вродженого й адаптивного імунітету та може викликати імунну реакцію проти власних антигенів і розвиток аутоімунних захворювань [1]. Виділяють ще один різновид загибелі з розривом плазматичної мембрани клітини – вторинний (постапоптотичний) некроз, патогенетичній ролі якого останнім часом приділяють велику увагу. Він відбувається при недостатніх енергетичних ресурсах для завершення апоптозу, а також недостатньому фагоцитозі апоптотичних клітин [2]. Некроз клітин, у тому числі імунокомпетентних (ІКК), які у великій кількості мігрують в ушкодженій тканині, буде багаторазово посилю-

© Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, Р.І. Янчій

вати запальну та імунну реакцію. Таким чином, дослідження генотоксичного стресу, апоптозу і некрозу ІКК актуальне з точки зору патофізіології, оскільки клітинна загибель, в залежності від її шляху, може бути як важливим механізмом обмеження імунної реакції та запалення, так і посилювати імунозапальні процеси. Слід зазначити, що це питання практично не досліджене за умов, пов'язаних із імунокомплексною патологією. Виділяють низку захворювань, при яких ІКК є визначальним ушкоджувальним агентом (тип 3 алергічних реакцій за класифікацією Джела і Кумбса). Однак останнім часом визнають наявність імунокомплексного механізму як складової частини патогенезу таких імунозапальних хвороб як системні васкуліти, вірусні гепатити В і С, системний червоний вовчак, артрит тощо [3–5]. Один з методів моделювання аутоімунних захворювань, зокрема їх імунокомплексного компонента, базується на імунізації – інтенсивному впливі антигенного стимулу.

Мета нашої роботи – дослідження генотоксичного стресу та шляхів загибелі ІКК при моделюванні системного імунокомплексного ушкодження за допомогою імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Усі тварини на початку експерименту (2–2,5 міс) мали масу 16–18 г. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи (Страсбург, 1986).

Модель системного хронічного патологічного процесу імунокомплексного генезу відтворювали за допомогою імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном (БСА, «Sigma», США) протягом 6 тиж внутрішньовенно раз на тиждень за такою схемою: 1=й тиждень введення 150 мг БСА/кг; 2=й - 175 мг/кг; 3=й - 200 мг/кг; 4=й - 225 мг/кг; 5=й -

250 мг/кг; 6=й - 275 мг/кг маси миші. На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу та брали кров, тимус, лімфовузли, печінку, селезінку, нирки й аорту для подальших досліджень. Контрольними були миші, яким вводили фізіологічний розчин за цією самою схемою. ІКК тимуса та лімфовузлів виділяли за загальноприйнятою методикою м'якого механічного диспергування органів з наступним відмиванням клітин центрифугуванням у забуференому фосфатами фізіологічному розчині. Відсоток живих та ушкоджених ІКК в отриманих суспензіях встановлювали рутинним методом виключення барвника – трипанового синього.

Ступінь ушкодження ДНК визначали на клітинах тимуса та лімфовузлів мишей методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») за Afanasieva та співавт. [6] з деякими модифікаціями. Суть методу полягає в тому, що при електрофорезі клітин в агарозному гелі петлі і фрагменти ушкодженої ДНК в електричному полі витягуються в напрямку до анода, що надає їм вигляд комет. Розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [7,8,9]. Електрофорез препаратів (після їх стабілізації протягом 20 хв в лужному електрофоретичному буфері) проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція) при напрузі 24 В та силі току 100 мА протягом 30 хв. Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮМАМ И-1, Росія) та відеосистему передачі зображення на комп'ютер при застосуванні водно-імерсійного об'єктива ($\times 30$). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 100 окремо розташованих ДНК-комет. Їх поділяли за загальновизнаною класифікацією на 5 класів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від

співвідношення ДНК у “голові” та “хвості” комети [10]. Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс «ДНК – комет» ($I_{\text{ДК}}$), який обчислювали за формулою:

$I_{\text{ДК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$, де $n_0 - n_4$ – число ДНК–комет кожного типу, Σ – сума підрахованих ДНК–комет [9].

Шляхи клітинної загибелі вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (йодидом пропідіуму і Хехст 33342) [11,12]. Клітини (не менш як 200) досліджували на люмінесцентному мікроскопі з водно-імерсійним об’єктивом х85.

Шматочки печінки, селезінки та черевної аорти після фіксації 10% м нейтральним формаліном обробляли за загальноприйнятою гістологічною методикою та заливали у парафін. Гістологічне дослідження зрізів проводили при забарвленні гематоксилін-еозином, дослідження клітин крові – при забарвленні мазків за Романовським–Папенгеймом.

Імунофлуоресцентні дослідження проводили на відбитках печінки, селезінки, нирок та внутрішньої поверхні черевної аорти, які висушували при кімнатній температурі, фіксували 1%-ю спирт-пікриновою сумішшю та обробляли міченими флуоресцеїнізотіоціанатом антитілами проти імуноглобулінів миші («Sigma», США).

Перевірку розподілу отриманих результатів на нормальність проводили за тестом Колмогорова–Смирнова. У разі нормального розподілу статистичну обробку результатів при порівнянні значень двох груп даних проводили з використанням критерію t Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, США); $P < 0,05$ вважалося статистично вірогідним. Результати виражали як середнє \pm стандартне відхилення ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імунофлуоресцентними дослідженнями фіксації імуноглобулінів в тканинах вста-

новилено наявність специфічного світіння в усіх зразках (печінки, селезінки, нирок та аорти), проте кількість клітин, що світяться та інтенсивність світіння суттєво відрізнялася. Найбільш інтенсивне світіння клітин визначалося у всіх препаратах печінки та селезінки та в окремих препаратах аорти. В нирках спостерігалось незначне світіння поодиноких клітин в деяких препаратах. Ці результати свідчать про різну ступінь фіксації антитіл у досліджуваних органах. В наших попередніх дослідженнях встановлено, що багатократне тривале введення БСА викликало імунозапальні процеси, як в окремих органах, так і на рівні організму [13].

Макроскопічно внутрішні органи дослідних тварин відрізнялися від контрольних бугристою структурою селезінки, неоднорідністю судинного рисунку та темнішим кольором тканини печінки, у деяких випадках – вираженим судинним рисунком легень. Вивчення препаратів виявило дистрофічні зміни тканин печінки, селезінки, нирок та аорти. Морфоструктурні порушення судинного русла були більш виражені. Вони включали набряки навколо судин, набрякання судинних стінок та їх помірне розшарування. Відмічалася проліферація та вогнищева десквамація ендотеліоцитів у просвіт судин. Подекуди спостерігалася наявність незначних червоних змішаних тромбів з наявністю лімфоцитів, плазмоцитів та поодиноких поліморфноядерних лейкоцитів. Таким чином, гістологічні дослідження виявили ураження судинної системи і меншою мірою паренхіми органів. За показниками лейкограми крові імунізація призводила до збільшення відносної кількості клітин-ефекторів запалення нейтрофілів (з $6,3 \pm 0,6$ % до $28,8 \pm 3,0$ %), в тому числі відсоток паличкоядерних нейтрофілів збільшувався в 4,4 раза ($P < 0,001$).

Встановлено, що через 6 тиж після початку імунізації БСА $I_{\text{ДК}}$ збільшувався в 1,4 раза ($P < 0,01$ порівняно з контролем) в клітинах лімфовузлів та в 1,5 раза ($P < 0,001$) в клітинах тимуса, що свідчить про зростання

пошкодження ДНК. Більшість комет ІКК імунізованих мишей відносилася до 4-го класу, який характеризує максимальне ушкодження ДНК (Рис 1,2). Ми спостерігали подібне у разі збільшення кількості клітин з сильним пошкодженням ДНК у препаратах тимуса (в 3,4 раза) і лімфовузлів (в 3,3 раза, $P < 0,001$ відносно контролю в обох випадках). $I_{ДК}$ – це загальноприйнятий інтегральний показник [9], який враховує зміни кількості всіх типів комет із різною інтенсивністю світіння, тобто ступенем ушкодження ДНК. Так, якщо за умов імунізації в клітинах лімфовузлів збільшувався відсоток комет 4-го типу (в 3,3 раза), а відсоток комет 1-го та 2-го типів зменшувався (в 1,7 та 2,2 раза відповідно), ми маємо збільшення сумарного показника ушкодження ДНК ($I_{ДК}$) в 1,4 раза. Це вказує на розвиток генотоксичного стресу за умов імунокомплексного патологічного процесу в ІКК як центрального, так і периферичного органів імунної системи.

Відомо, що за умов імунокомплексного синдрому активуються клітини вродженого імунітету із посиленою продукцією прозапальних чинників. Збільшується генерація активних форм кисню нейтрофілами, що було показано як у наших попередніх дослідженнях, так і на інших моделях гіперімунно-

комплексемії [3,13]. Запалення, індуковане ІКК, призводить також до експресії індукцибельної NO-синтази та до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [4]. Ці сполуки за умов недостатнього антиоксидантного захисту можуть спричинити генотоксичний стрес, що було встановлено в наших дослідженнях методом ДНК-комет на моделі імунокомплексного патологічного процесу.

При ушкодженні ДНК може відбутися або її репарація, або клітинна загибель. Реалізація програми апоптотичної загибелі - найважливіший механізм захисту від трансформації клітин. Однак за сильних ушкоджувальних впливів або при недостатніх енергетичних ресурсах клітини може розвинути некроз, який є прозапальним і імуногенним шляхом клітинної загибелі. Тому в наших дослідженнях визначено життєздатність та шляхи загибелі ІКК за допомогою барвників йодидом пропідіуму і Хехст 33342. Вони дають змогу встановити ушкодження плазматичної мембрани, а також морфологічні характеристики ядерного матеріалу, притаманні апоптозу, тобто оцінити кількість живих, апоптотичних, некротичних і вториннонекротичних клітин.

Доведено, що за умов імунокомплексної патології суттєво зменшувався відсоток жи-

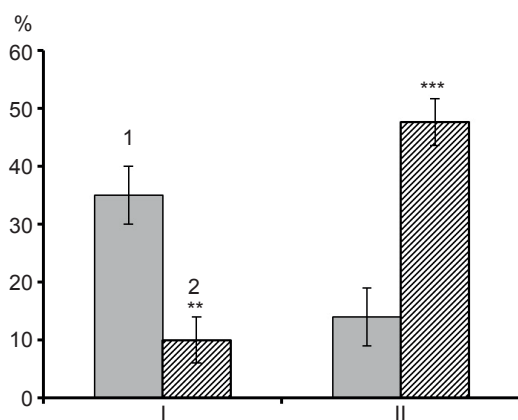


Рис. 1. Зміни кількості ДНК-комет клітин тимуса з інтактною або з мінімально ушкодженою (I) та з максимально ушкодженою ДНК (II) за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном; 1- контроль, 2 – імунізація. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ - відносно контролю

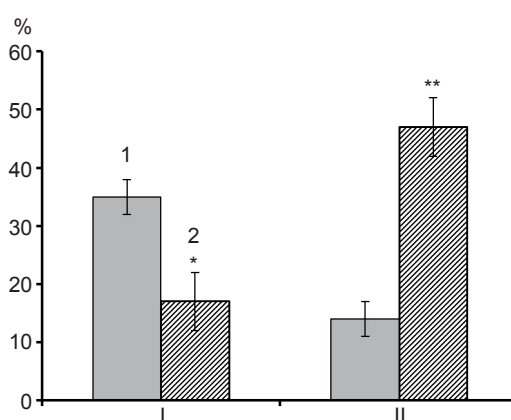


Рис. 2. Зміни кількості ДНК-комет клітин лімфовузлів з інтактною або з мінімально ушкодженою (I) та з максимально ушкодженою ДНК (II) за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном; 1-контроль, 2- імунізація. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ - відносно контролю

вих лімфоцитів, виділених з лімфовузлів, який становив $87,1 \pm 1,5$ в контролі і $76,9 \pm 1,2$ ($P < 0,001$) у імунізованих тварин. Введення БСА викликало послаблення життєздатності внаслідок підвищення кількості клітин лімфовузлів з морфологічними ознаками як апоптозу, так і некрозу (рис.3.). Показники клітинної загибелі (відсоток апоптотичних і некротичних клітин) та $I_{\text{ДНК}}$ характеризують різне їхнє ушкодження. Клітина може репарувати ушкодження ДНК і бути живою. За умов сильного ураження ДНК може відбуватися як некротична, так і апоптотична клітинна загибель, в залежності від енергетичних ресурсів, прозапальних факторів тощо. Так, клітини з максимально ушкодженою ДНК можуть мати як апоптотичний, так і некротичний фенотип. Хоча з літератури відомо, що після опромінення збільшення комет 4-го класу з сильним ушкодженням ДНК вказує на реалізацію загибелі частини лімфоцитів по типу некрозу. Однак це не є загальнопринятною точкою зору, оскільки некроз може розвиватися як самостійний процес, який протікає паралельно з апоптозом, а також як вторинний процес, що завершує апоптоз (постапоптотичний некроз), що було показано в наших дослідженнях. Виявлено також

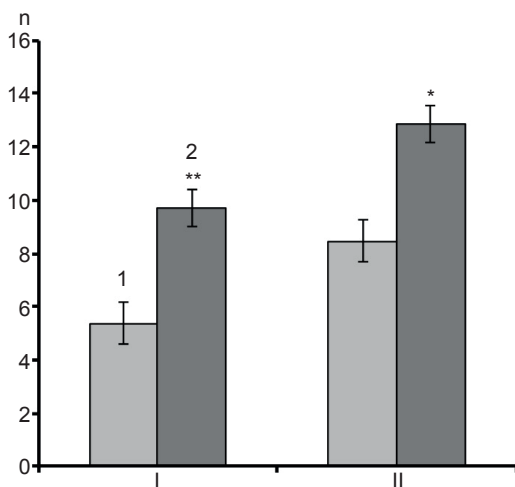


Рис. 3. Вплив імунізації бичачим сироватковим альбуміном на кількість некротичних (I) та апоптотичних (II) клітин лімфовузлів мишей; 1- контроль, 2- імунізація. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ - відносно контролю

посилення вторинного постапоптотичного некрозу цих клітин в 1,6 раза, з $3,6 \pm 0,9$ до $5,9 \pm 0,6$ % ($P < 0,05$ порівняно з контролем). Однією з можливих причин збільшення вторинного некрозу може бути те, що загибель клітини, яка почалася як апоптоз, завершується розривом плазматичної мембрани через виснаження енергетичних ресурсів. Це було показано при вивченні апоптозу лімфоцитів *in vitro* [14, 15]. При дослідженні клітин, виділених із тимуса, з'ясувалося, що зміни життєздатності та загибелі в умовах імунокомплексного патологічного процесу були подібні до змін, виявлених у лімфоцитах, ізольованих із лімфовузлів. Зменшувалася життєздатність клітин тимуса з $91,7 \pm 0,8$ % у контролі до $87,6 \pm 1,3$ % при імунізації БСА ($P < 0,05$). Встановлено посилення некрозу тимоцитів (який становив у контрольних тварин $2,7 \pm 0,4$ %, при введенні БСА – $4,4 \pm 0,7$ %, $P < 0,05$) та виявлено тенденцію до посилення їх апоптозу у контролі – $5,6 \pm 0,7$ %, при імунізації – $8,0 \pm 1,4$ %, $P = 0,13$).

Посилення апоптозу ІКК за умов імуноної відповіді, в тому числі і при імунокомплексних хворобах, є важливим механізмом обмеження надмірної активації імуноної системи. Однак збільшення кількості клітин зі втратою цілісності плазматичної мембрани (некроз і постапоптотичний некроз) призводить до виходу клітинного вмісту назовні, провокує або посилює запальні та аутоімуноні процеси. Це відноситься і до ІКК, які інфільтрують ушкоджені тканини, а посилення їх некротичної загибелі, яке було виявлене в наших дослідженнях, може бути одним з механізмів розвитку та хронізації імунокомплексних хвороб.

Таким чином, ми показали, що моделювання імунокомплексної патології за допомогою довготривалої імунізації мишей чужорідним білком БСА викликає генотоксичний стрес ІКК як первинного (тимус), так і периферичних органів (лімфовузли) імуноної системи. На тлі встановленого сильного ушкодження ДНК за умов введення БСА

погіршується життєздатність лімфоцитів із посиленням їх апоптозу та некрозу (в тому числі вторинного постапоптотичного). Сильний генотоксичний стрес ймовірно, є основною причиною збільшення загибелі ІКК за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом. Інтенсифікація запалення та імуних реакцій в результаті некрозу в свою чергу буде провокувати ушкодження ДНК. Таке замкнене коло неконтрольованого посилення запальних та імуних процесів може бути важливим механізмом імунокомплексного патологічного процесу.

Нині впроваджуються підходи до моніторингу патологічних станів людини на основі того, що периферичні лімфоцити, які можна отримати за допомогою малоінвазивної процедури та дослідити імуноцитохімічними, біохімічними та іншими методами, можуть бути тест-системами інтегральної оцінки того чи іншого стану клітин в організмі загалом [16]. Це, зокрема, стосується генотоксичного стресу та схильності клітин до того чи іншого типу загибелі, оскільки шляхи загибелі лімфоцитів значною мірою віддзеркалюють загальний баланс проапоптотичних і пронекротичних чинників в організмі. Така оцінка є інформативна з точки зору патогенетичних механізмів та вибору стратегії лікування, спрямованої на модуляцію шляхів клітинної загибелі, в тому числі і за умов імуноопосередкованих захворювань. У наших дослідженнях виявлено суттєвий генотоксичний стрес та посилення некрозу ІКК поряд із такими ознаками імунокомплексного ушкодження, як збільшення циркулюючих імуних комплексів і фіксації їх у тканинах, мультиорганна патологія (як судин, так і паренхіми), активація та посилена інфільтрація клітин неспецифічної резистентності в ушкоджені тканини [13]. Тому ми вважаємо, що визначення генотоксичного стресу та шляхів загибелі периферичних лімфоцитів може бути перспективною тест-системою для оцінки тяжкості аутоімуних та імунокомплексних хвороб та ефективності їх лікування.

ВИСНОВКИ

1. Відкладання імуних комплексів у різних органах мишей, імунізованих БСА, супроводжувалось дистрофічними змінами у печінці, селезінці, нирках та аорті, що свідчить про системне імунокомплексне ушкодження.

2. Встановлено наявність вираженого генотоксичного стресу клітин лімфовузлів і тимуса за умов інтенсивного впливу антигенного стимулу.

3. Імунізація БСА призводила до зменшення життєздатності ІКК, в тому числі внаслідок значного збільшення їх некрозу.

4. Генотоксичний стрес ІКК і посилення їх загибелі за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом можуть відігравати значну роль у розвитку імунокомплексного патологічного процесу.

**Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Брызгина,
В.С. Сухина, Н.В. Макогон, Р.И. Янчий**

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ПУТИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ТИМУСА И ЛИМФОУЗЛОВ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОЙ ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ПАТОЛОГИИ

Изучали генотоксический стресс и пути гибели иммунокомпетентных клеток (ИКК) (апоптоз и некроз) при моделировании системного иммунокомплексного повреждения с помощью иммунизации мышей линии СВА бычьим сывороточным альбумином (БСА). Иммунофлюоресцентными исследованиями иммунизированных мышей установили фиксацию иммунных комплексов в тканях печени, селезенки, почек и аорты. Гистологический анализ этих органов показал поражения сосудистой системы и в меньшей степени паренхимы. Установлено, что при иммунизации БСА индекс ДНК-комет увеличивался в 1,4 раза в клетках лимфоузлов и в 1,5 раза в клетках тимуса. Увеличивалось количество клеток с максимальным повреждением ДНК в препаратах тимуса (в 3,4 раза) и лимфоузлов (в 3,3 раза), что свидетельствует о сильном генотоксическом стрессе. Снижалось количество живых ИКК и увеличивалась их гибель, в том числе провоспалительным и иммуногенным некротическими путями. Показано, что генерализованный иммунокомплексный патологический процесс приводит к повреждению ДНК и гибели ИКК как центрального, так и периферического органов иммунной системы. Генотоксический стресс ИКК и усиление их гибели некротическим путем может играть значительную роль в развитии иммунокомплексных заболеваний. Эти показатели количества лимфоцитов периферической крови могут быть перспективной тест-системой

для оценки тяжести аутоиммунных и иммунокомплексных болезней и эффективности их лечения.

Ключевые слова: повреждения ДНК; апоптоз; некроз; лимфоциты; иммунокомплексная патология.

**N.G. Grushka, S.I. Pavlovych, T.M. Bryzgina,
V.S. Sukhina, N.V. Makogon, R.I Yanchiy**

GENOTOXIC STRESS AND THE PATHWAYS OF THYMUS CELL DEATH AND LYMPH NODES OF MICE IN CONDITIONS OF IMMUNOCOMPLEX PATHOLOGY

There were performed the studies of genotoxic stress and the ways of immunocompetent cells death (apoptosis and necrosis) in the modeling of immune system damage by immunization of CBA mice with the bovine serum albumin. Immunofluorescence studies of immunized mice were established the fixation of immune complexes in liver tissue, spleen, kidney and the aorta. Histological studies of these organs showed vascular system affection and, to a lesser extent, parenchyma. It has been shown that DNA comets index increases in 1,4 time in the lymph node cells and in 1,5 time in the thymus cells in the presence of BSA immunization. We also observed an increase in the number of cells with maximum damage DNA thymus preparations (3.4 fold) and lymph nodes (3.3-fold), respectively, indicating strong genotoxic stress. There were shown the reduce of live ICC number and their death increase, including the pro-inflammatory and immunogenic necrotic way. In that way, data which were obtained on the experimental model is evidenced that generalized immunecomplex pathologic process leads to DNA damage and ICC death both central and peripheral organs of the immune system. ICC genotoxic stress and their death amplification by the necrotic way may play a significant role in the immunecomplex diseases development. These factors of peripheral blood lymphocytes can serve as a prospective test system for assessing the severity of autoimmune and immune complex diseases and their treatment effectiveness.

Key words: DNA damage; apoptosis; necrosis; lymphocytes; immunocomplex pathology.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology NAS of Ukraine,
Kyiv*

REFERENCES

1. Vladimirskaya EB. Mechanisms apoptoticheskoy hybely cells. *Hematol. and transfuziologiya*. 2002; 42 (2): 35-40.
2. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1371-87.

3. Chopyak V, Valchuk IV, Hayduchok IG. Hiperimuno-kompleksnyy syndrome in experiment and clinic. *Bulletin. sciences. research*. 2007; 1. 5-8.
4. Jancar S, Sánchez Crespo M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol*. 2005 Jan;26(1):48-55.
5. Shmagel KV, Chereshnev VA. Molecular bases of immune complex pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2009 May;74(5):469-79.
6. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis*. 2010; 31: 512-19.
7. Heaton PR, Ransley R, Charlton CJ, Mann SJ, Stevenson J, Smith BH, Rawlings JM, Harper EJ. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J Nutr*. 2002 Jun;132(6 Suppl 2):1598-1603.
8. Kaminsky V O, Lutsik MD, Stoika RS. Comet assay of dna fragmentation: modification of silver staining for obtaining permanent preparations. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2005; 77(6): 105-7.
9. Sorochinska J, Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different inveroental agents. *Oncology*. 2008; 10 (3): 303-8.
10. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249-61.
11. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Akao Y, Kosaka H, Hasegawa J, Matsuda H, Tsujimoto Y. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am.J.Phisiol*. 1996; 271 (6). 949-58.
12. Bryzgina TM, Makogon NV, Alexyuk LI, Martynova TV, Pavlovych SI, Sukhina VS, Yanchiy RI, Alexeyeva IM. The pathways and mechanisms of immune cell death in the time course of experimental immune-mediated liver injury. *Pathologia*. 2011; 8(2): 108-10.
13. Pavlovych SI, Lytvynenko AP, Makogon NV, Martynova TV, Bryzgina TM, Yanchiy RI, Cukhina VS, Shepel OA, Voznesenska TYu, Blashkiv TV, Getmanets AV. Immunomorphological characterization of mouse model of a systemic immune complexes mediated pathology. *Reports of morphology*. 2014; 8 (2):496-500.
14. Eidus LKh. Extrapolation of dose-effect relationships for cytogenetic aberrations from high to low doses. *Radiats Biol Radioecol*. 1999 Jan-Feb;39(1):177-80.
15. Eidus LKh. On the mechanism of the nonspecific cell response to the action of damaging agents and the nature of hormesis. *Biofizika*. 2005 Jul-Aug;50(4):693-703.
16. Grecchi S, Mazzini G, Lisa A, Armentero MT, Bergamaschi R, Romani A, Blandini F, Di Perri C, Scovassi AI. Search for cellular stress biomarkers in lymphocytes from patients with multiple sclerosis: a pilot study. *PLoS One*. 2012; 7(11).

*Матеріал надійшов
до редакції 12.06.2014*