

Вплив інгібітора полі (АДФ-рибозо) полімерази 4-гідроксиквіназоліну на загибель імунокомпетентних клітин за умов імунокомплексної патології у мишей

Н.Г. Грушка

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: grunay@i.ua

Досліджували вплив інгібітора полі (АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) на ступінь ушкодження ДНК та шляхи загибелі клітин лімфовузлів і тимуса мишей при моделюванні імунокомплексної патології для визначення його можливої цитопротективної дії. Встановлено, що за умов гіперімунокомплексної, викликаній довготривалою імунізацією мишей лінії СВА бичачим сироватковим альбуміном (БСА), індекс ДНК-комет імунокомпетентних клітин збільшувався в 4 рази. Вірогідно збільшилася кількість клітин з сильним пошкодженням ДНК у препаратах тимуса з 1,5 до 77% і лімфовузлів з 0 до 80%. Введення 4-ГК на тлі імунізації БСА послаблювало генотоксичний стрес, зменшуючи кількість лімфоцитів з сильним ушкодженням ДНК, що сприяло зростанню відсотка клітин з інтактною ДНК. Застосування інгібітора ПАРП мало виражений цитопротективний ефект: призводило до збільшення життєздатності імуноцитів переважно за рахунок зменшення їх некротичної загибелі, спричиненої імунізацією БСА. Отже, наші результати свідчать, що ПАРП може брати участь у розвитку ушкодження клітин тимуса та лімфовузлів за умов гіперімунокомплексної, а також вказують на перспективність розробки препаратів на основі інгібіторів цього ферменту з профілактичною та лікувальною метою при імунокомплексній патології. Ключові слова: полі(АДФ-рибозо) полімераза; імунокомплексна патологія; лімфоцити; ушкодження ДНК; клітинна загибель.

ВСТУП

Полі(АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) – родина із 18 ферментів. ПАРП-1, найбільш розповсюджена ізоформа, відіграє значну фізіологічну роль, здійснюючи посттрансляційну модифікацію білків. Фермент активується при розривах ДНК, синтезує ланцюги полімера АДФ-рибози та приєднує їх до гістонів, білків репарації ДНК, транскрипційних факторів тощо. Така модифікація білків залучена в широкий спектр клітинних процесів: репарацію ДНК, ремоделювання структури хроматину, транскрипцію генів, проліферацію, диференціацію і загибель клітин. Встановлена участь ПАРП-1 у підтримці стабільності геному та епігенетичних механізмах регуляції генної експресії [1-3]. Однак за умов надмірної активації він задіяний у

патогенезі багатьох захворювань. Це може бути опосередковано тим, що ПАРП-1 діє як коактиватор прозапальних транскрипційних факторів (зокрема, NF- κ B та AP-1, що сприяє посиленому утворенню медіаторів запалення), а також впливом на життєздатність та шляхи загибелі клітин. Сильна активація ферменту при значному ушкодженні ДНК спричиняє виснаження клітинних ресурсів НАД⁺ та АТФ, що може призводити до некрозу або переключати шлях загибелі з апоптотичного (який потребує значного енергетичного забезпечення) на некротичний. Встановлено, що ПАРП залучена в пошкодження тканин при низці хвороб, в тому числі аутоімунних, і є ключовим медіатором клітинної загибелі за умов оксидативного та нітрозативного стресу, у разі ішемії та ушкодження ДНК.

© Н.Г. Грушка

Підвищення активності ПАРП-1 було виявлено при таких захворюваннях людини з імунним компонентом у патогенезі, як множинний склероз, хронічне обструктивне ушкодження дихальних шляхів, аутоімунний нефрит, септичний шок тощо, причому рівень активації ферменту корелював із ступенем ураження [1, 3-5]. Інгібування ПАРП запобігало та послаблювало запальний процес в експериментальних моделях аутоімунних і запальних захворювань (при хворобі Паркінсона, аутоімунному нефриті, хронічному запаленні кишечника, експериментальному алергічному енцефаломієліті, аутоімунному гепатиті, експериментальному ураженні легень, за умов контактної гіперчутливості, на моделях септичного і геморагічного шоку та ін. [5-10]. Хоча розвиток різних імунопатологічних процесів супроводжується й опосередковується формуванням і відкладанням імунних комплексів (ІК) у тканинах, однак роль ПАРП у патогенезі імунокомплексних хвороб вивчено недостатньо.

Метою нашої роботи було на моделі системного імунокомплексного пошкодження, відтвореного довготривалою імунізацією мишей чужорідним білком БСА, з'ясувати участь ПАРП в ушкодженні клітин тимуса та лімфовузлів, а також вивчити можливу захисну дію інгібітора цього ферменту 4-гідроксиквіназоліну (ГК).

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА. Всі тварини на початку експерименту (2–2,5 міс) мали масу 16–18 г. При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи (Страсбург, 1986). Модель системного хронічного патологічного процесу імунокомплексного генезу відтворювали за допомогою введення мишам БСА, розчиненого в фізіологічному розчині («Sigma», США), 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. Блокатор ПАРП, 4-ГК («Sigma», США; 100 мг/кг) вводили двічі на тиждень, у разі збігання з імунізацією – за 1 год до застосування БСА. Контрольними були миші, яким робили ін'єкції фізіологічного розчину замість БСА та 4-ГК у відповідному об'ємі за цією самою схемою. На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу, забирали кров, тимус й лімфовузлі для подальших досліджень.

Клітини тимуса та лімфовузлів виділяли за загальноприйнятою методикою м'якого механічного диспергування органів з наступним відмиванням, центрифугуванням у забуференому фосфатами фізіологічному розчині (ЗФР). Відсоток живих та ушкоджених клітин в отриманих суспензіях встановлювали рутинним методом виключення барвника – трипанового синього. Шляхи клітинної загибелі вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (йодидом пропідіуму і Хехст 33342), як описано раніше [11]. Використовували відеосистему передачі зображення з люмінесцентного мікроскопа «Люам І-1» (водно-імерсійний об'єктив х 85) на комп'ютер. Визначали відсоток живих, некротичних та апоптотичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин.

Ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса та лімфовузлів визначали методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет) [12] з деякими модифікаціями. 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 струму 100 мА протягом 30 хв. Аналізували ДНК-комети на електрофореграмах, забарвлених флуоресцентним барвником DAPI (4',6-діамідін-2-фенілндол), візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп «Люам І-1» та відеосистему передачі зображення на

комп'ютер за допомогою 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 загально визнаною класифікацією на 5 класів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від співвідношення ДНК у "голові" та "хвості" комети [13]. Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс ДНК-комет ($I_{\text{ДНК}}$), який обчислювали за формулою: $I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$, де $n_0 - n_4$ – число ДНК-комет кожного типу, Σ – сума підрахованих ДНК-комет [14].

Активацію ПАРП у клітинах тимуса та лімфовузлів оцінювали за імуноцитохімічним виявленням полі-АДФ рибози (ПАР), що утворюється ферментом ПАРП [4]. Мазки клітин, виділених з вилючкової залози і лімфатичних вузлів, фіксували 2 хв у суміші метанол-ацетон (1:1) при кімнатній температурі з наступним промиванням у ЗФР. Далі проводили демаскування антигенних детермінант у 0,1 ммоль/л цитратному буфері (рН 6) 30 хв при 92-95 ° С на киплячій водяній бані. Після відмивання мазків блокували ендогенну пероксидазу впродовж 30 хв (0,3%-й H_2O_2 , 60% метанолу), а потім промивали в ЗФР. Неспецифічне зв'язування блокували 1 год в 1,5%-му розчині БСА на ЗФР, що містить 0,3% Тритон X-100, а потім інкубували з поліклональними кролячими антитілами, специфічними до ПАР («BD Pharmingen» США) впродовж 12 год (1:100, 4° С). Після відмивання в ЗФР (3рази по 10 хв) зразки інкубували з антитілами до імуноглобулінів кроля, кон'югованими з пероксидазою («Sigma», США) 1 год (1: 100, при кімнатній температурі) з подальшим відмиванням (2 рази по 10 хв). Візуалізацію реакції проводили при інкубації препаратів з діамінобензидином за загальноприйнятою методикою. Негативним контролем слугували зразки, які не інкубували з первинними антитілами. Підраховували не менш як 200 клітин у кож-

ному препараті. Результати реакції оцінювали напівкількісно з розрахунком середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) за принципом Астальді за формулою: $\text{СЦК} = (0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot v + 3 \cdot g + 4 \cdot d) / 100$, де а – д – відсоток однотипних клітин з певним ступенем забарвлення (а – відсутність, б – слабо позитивна реакція, в – помірно позитивна, г – виражено позитивна, д - різко позитивна реакція).

Перевірку отриманих результатів на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова – Смирнова. За нормального розподілу статистичну обробку при порівнянні трьох груп результатів здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень між групами тестом Ньюмена-Кейлса із використанням програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows ("GraphPad Software", США). Результати виражали як $M \pm SD$ (середнє \pm стандартне відхилення). $P < 0,05$ вважалося статистично вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами показано, що імунізація призводила до активації клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету. Це спричиняло зростання вмісту ІК в крові та їх відкладання в тканинах організму. Гістологічні дослідження тканин печінки, селезінки, нирок та аорти імунізованих мишей дали морфологічне підтвердження наявності системних патологічних змін судинної системи і паренхіми органів [11]. В цьому і попередніх дослідженнях на різних моделях імуноопосередкованих патологічних процесів ми показали також, що відбувається активація ПАРП як в імунокомпетентних клітинах (ІКК), так і в клітинах різних органів [8, 11]. Методом імуноцитохімії було встановлено, що введення інгібіторів ПАРП призводило до зменшення активації ферменту. Зокрема, при моделюванні гіперімунокомплексемії СЦК активності ПАРП у клітинах тимуса і лімфовузлів підвищувався в 2,5 та в 3 рази ($P < 0,001$ порівнянно з контролем),

що узгоджується з даними, отриманими на інших експериментальних моделях аутоімунних хвороб [5, 15, 16]. 4-ГК за умов гіперімунокомплексемії вірогідно зменшував СЦК в 2,3 і 2 рази в клітинах тимуса і лімфовузлів відповідно. Це свідчить, що він у застосованій схемі і дозі введення ефективно інгібував ПАРП.

Відомо, що при імунозапальних процесах посилюється проліферація, диференціація та загибель ІКК. Апоптоз цих клітин є гомеостатичним процесом, націленим на обмеження імунних і запальних реакцій, тоді як їх некротична загибель може бути провідним патогенетичним механізмом. Введення чужорідного білка в нашому експерименті призводило до посилення клітинної загибелі. Кількість живих клітин, виділених з лімфовузлів, зменшувалася з $93,0 \pm 0,7$ у контролі до $85,6 \pm 2,2$ ($P < 0,01$) у імунізованих тварин. За умов імунокомплексної патології було встановлено збільшення некрозу клітин лімфовузлів в 4,5 рази в порівняно з контролем ($P < 0,001$). Кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу також підвищувалася, однак статистично вірогідних змін ми не виявили. При моделюванні системного імунокомплексного пошкодження подібно до клітин лімфовузлів, знижується відсоток живих тимоцитів за рахунок некрозу. Кількість некротичних клітин у контролі становила $1,00 \pm 0,20$ %, за умов імунізації - $3,55 \pm 0,99$ % ($P < 0,05$). Фармакологічне інгібування ПАРП за допомогою 4-ГК призводило до покращення життєздатності ІКК внаслідок зменшення їх некротичної загибелі. У клітинах лімфовузлів відсоток некрозу був $1,29 \pm 0,34$ у контролі, $5,83 \pm 0,46$ за умов імунізації, $2,5 \pm 0,52$ при введенні 4-ГК імунізованим мишам ($P < 0,001$ порівняно з імунізацією). Застосування інгібітора ПАРП на тлі гіперімунокомплексемії призводило до зменшення кількості некротичних клітин тимуса з $3,55 \pm 0,99$ % за умов імунізації до $1,57 \pm 0,30$ % ($P < 0,05$ порівняно з імунізацією, контроль становив $1,00 \pm 0,2$ %). Введення 4-ГК не спричиняло статистично значущих

змін апоптозу. Представлені результати свідчать, що застосування 4-ГК мало подібну за направленістю і вираженістю протективну дію на клітини первинного і вторинного органів імунної системи. Інгібування ПАРП призводило до послаблення прозапальної та імуногенної некротичної загибелі і не зменшувало апоптоз лімфоцитів. Це важливо з точки зору терапевтичного застосування інгібіторів ПАРП, оскільки достатній рівень апоптозу сприяє вилученню активованих лімфоцитів, в тому числі аутореактивних, що є необхідним для обмеження й термінації імунного запалення.

Останнім часом пошкодження ДНК розглядається як один з багатьох чинників апоптозу та клітинного старіння. За умов деяких імуноопосередкованих захворювань відбувається ушкодження ДНК [3], однак при імунокомплексних процесах такі дані відсутні. Тому досліджуючи пошкодження генетичного апарату ІКК при моделюванні імунокомплексного запалення визначали і роль ПАРП-1 у розвитку генотоксичного стресу клітин за цієї патології за допомогою фармакологічного інгібування ферменту. Для цього був застосований метод ДНК-комет, згідно з яким розміри та інтенсивність світіння хвоста комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [14, 17, 18]. Нами показано, що $I_{\text{дк}}$ (загальноприйнятий інтегральний показник, який враховує зміни кількості всіх типів комет із різним ступенем ушкодження ДНК) збільшувався за умов імунізації як у клітинах лімфовузлів, так і в клітинах тимуса в 4 рази ($P < 0,001$ відносно контролю), що свідчить про генотоксичний стрес клітин центрального і периферичного органів імунної системи (рис.1). При застосуванні 4-ГК на тлі імунізації значення $I_{\text{дк}}$ клітин тимуса та лімфовузлів знижувалося порівняно з імунізованими БСА тваринами ($P < 0,01$). У наших дослідженнях було встановлено, що через 6 тиж після початку імунізації БСА збільшувався відсоток комет, котрі належить до 3-4-го класу, який характеризує

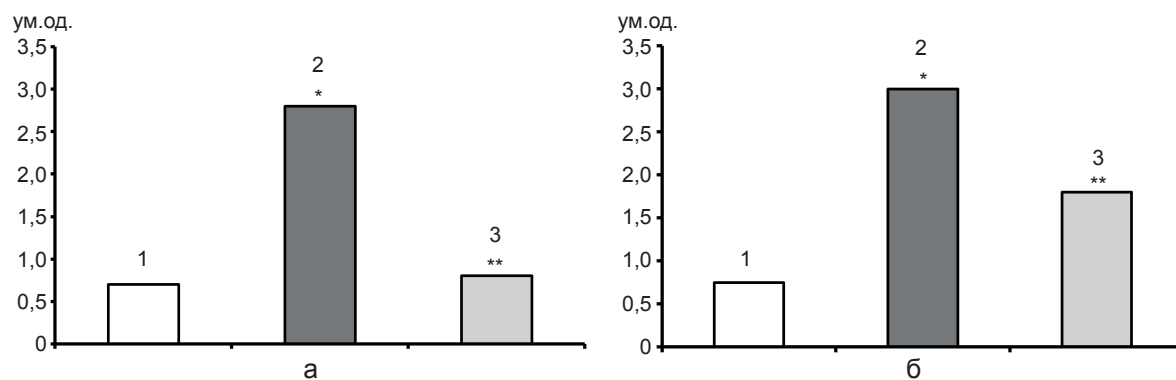
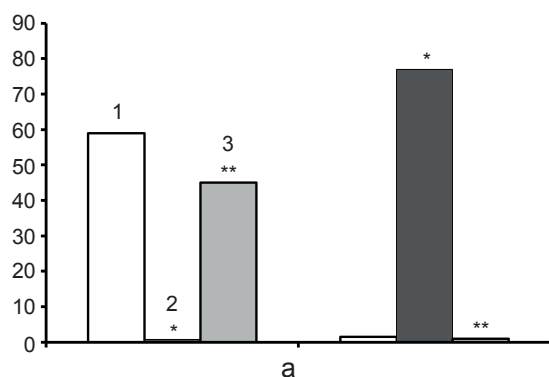


Рис. 1. Індекс ДНК - комет клітин тимуса (а) лімфовузлів (б) за умов імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та введення блокатора ПАРП 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК): 1 - контроль, 2 – імунізація, 3- імунізація і введення 4-ГК. * $P < 0,001$ - відносно контролю; ** $P < 0,01$ - відносно імунізованих БСА тварин

сильне пошкодження ДНК (рис. 2,3). Введення імунізованим мишам інгібітора ПАРП-1 4-ГК призводило до зменшення кількості клітин з сильним пошкодження ДНК (рис. 3,4). Таким чином, генералізований імунокомплексний патологічний процес призводить до пошкодження ДНК і загибелі ІКК як центрального (тимуса), так і периферичних органів імунної системи (лімфовузлів), а інгібування ПАРП мало виражену цитопротективну дію. Можна стверджувати, що за умов імунокомплексної патології одним із провідних механізмів ушкодження ДНК і некротичної загибелі є активація клітин вродженого імунітету з посиленою продукцією прозапальних чинників (цитокінів, активних форм кисню тощо), що було показано як у наших попе-



редніх дослідженнях, так і на інших моделях гіперімунокомплексемії [19, 20]. Запалення, індукване ІКК, призводить також до експресії індукційної NO-синтази та до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [21]. Ці сполуки за умов недостатнього антиоксидантного захисту можуть спричинити генотоксичний стрес, що було встановлено в нашому теперішньому дослідженні.

Таким чином, з'ясовано, що довготривала імунізація мишей чужорідним білком БСА, яка спричиняє імунокомплексну патологію, призводить до активації ПАРП і генотоксичного стресу ІКК. При цьому знижується життєздатність клітин за рахунок підвищення їх некротичної загибелі. Нині запропоновано один із провідних механізмів

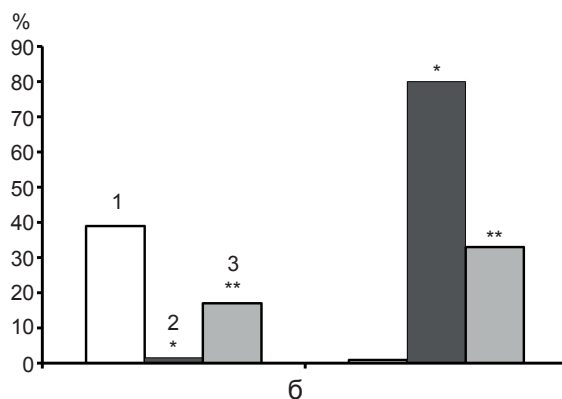


Рис. 2. Зміни кількості ДНК-комет клітин тимуса (а) з інтактною (I) та з сильно ушкодженою ДНК (II) та клітин лімфовузлів (б) за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та при дії 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК). 1-контроль, 2- імунізація, 3 – 4-ГК.

* $P < 0,01$ - відносно контролю; ** $P < 0,01$ - відносно імунізованих БСА тварин

мів ПАРП-опосередкованого ушкодження із встановленням позитивних зворотних зв'язків самопідсилення [1, 6, 9]: значний генотоксичний стрес спричиняє надмірну активацію ПАРП, призводить до виснаження енергетичних ресурсів і некрозу клітин. Вихід клітинного вмісту назовні, в свою чергу, сильно активує клітини-ефектори запалення зі збільшенням синтезу прозапальних цитокінів, реактивних форм кисню та азоту, що посилює генотоксичний стрес та активацію ПАРП. Відповідно, інгібування ПАРП перериває цей патологічний процес посилення запалення й виявляє протективну дію, в тому числі й при деяких імуноопосередкованих хворобах [5-10]. Блокатор ПАРП 4-ГК мав виражений цитопротективний ефект за умов імунокомплексної патології: покращувався морфофункціональний стан ІКК, збільшувалась їх життєздатність внаслідок послаблення некрозу, суттєво зменшувалось ушкодження ДНК. Отримані результати свідчать про патогенетичну роль ПАРП у розвитку імунокомплексного ушкодження, а також про перспективність терапевтичного застосування інгібіторів ПАРП при хворобах, пов'язаних із ІК. Розробка препаратів, які диференційовано впливали б на клітинну загибель за різними шляхами є важливою для лікування аутоімунних уражень: вони повинні зменшувати прозапальну та імуногенну некротичну загибель, водночас не пригнічуючи апоптоз. За наведеними вище результатами, такими модуляторами шляхів клітинної загибелі є інгібітори ПАРП, зокрема, застосований нами 4-ГК.

Існує думка, що, з огляду на фізіологічну роль ПАРП-1, досягнення часткового інгібування ферменту буде більш безпечним лікувальним підходом [22, 23]. У зв'язку з цим слід зазначити, що ПАРП-інгібувальні властивості мають численні ендogenous та екзогенні природні фактори, включаючи флавоноїди, активні форми вітаміну Д, похідні кофеїну, поліфеноли червоного вина, тиреоїдні гормони, поліаміни, пурини тощо [2, 22]. Застосування таких натуральних модуляторів

активності ПАРП могло б бути ефективним довготривалим безпечним засобом попередження та послаблення хронічних запальних хвороб через дієтотерапію [24]. Цей підхід до лікування та реабілітації хворих потребує подальших детальних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Відтворення імунокомплексної патології за допомогою довготривалої імунізації чужорідним білком призводило до зменшення життєздатності клітин тимуса та лімфоузлів, переважно внаслідок значного збільшення їх некрозу, а також до ушкодження ДНК.

2. Застосування інгібітора ПАРП-1 4-ГК на тлі імунізації суттєво послаблювало генотоксичний стрес досліджуваних клітин.

3. Інгібування ПАРП за умов імунокомплексної патології мало виражену цитопротективну дію, посилюючи життєздатність клітин за рахунок зменшення некротичної загибелі без суттєвих змін апоптозу, що важливо для послаблення та обмеження аутоімунних та запальних процесів.

Н.Г. Грушка

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ПОЛИ (АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ 4-ГИДРОКСИКВИНАЗОЛИНА НА ГИБЕЛЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ПАТОЛОГИИ У МЫШЕЙ

Исследовали влияние ингибитора поли (АДФ-рибоза) полимеразы (ПАРП) 4-гидроксиквиназолина (4-ГК) на степень повреждения ДНК и пути гибели клеток лимфоузлов и тимуса мышей при моделировании иммунокомплексной патологии с целью определения его возможного цитопротективного действия. Методом ДНК-комет установлено, что в условиях гипериммунокомплексемии, вызванной длительной иммунизацией мышей линии СВА бычьим альбумином (БСА), индекс ДНК-комет иммунокомпетентных клеток увеличился в 4 раза. Наблюдалось увеличение количества клеток с сильным повреждением ДНК в препаратах тимуса с 1,5 до 77% и лимфоузлов с 0 до 80%. Введение 4-ГК на фоне иммунизации БСА ослабляло генотоксический стресс, уменьшая количество лимфоцитов с сильным повреждением ДНК, что способствовало росту процента клеток с интактной

ДНК. Применение ингибитора ПАРП мало выраженный цитопротективный эффект: приводило к увеличению жизнеспособности иммуноцитов преимущественно за счет уменьшения их некротической гибели, вызванной иммунизацией БСА. Итак, наши данные свидетельствуют, что ПАРП может участвовать в развитии повреждения клеток тимуса и лимфоузлов в условиях гипериммунокомплексемии, а также указывают на перспективность разработки препаратов на основе ингибиторов данного фермента с профилактической и лечебной целью при иммунокомплексных патологии.

Ключевые слова: поли(АДФ-рибоза)полимераза; иммунокомплексная патология; лимфоциты; повреждения ДНК; клеточная гибель.

N.G. Grushka

THE EFFECT OF OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE INHIBITOR 4-HYDROXYQUINAZOLINE ON DEATH OF IMMUNE CELLS UNDER IMMUNE COMPLEX-MEDIATED INJURY IN MICE

The influence of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 4-hydroxyquinazoline (4-HQ) on the level of DNA damage and on the death of thymic and lymph node cells in mouse model of immune complex injury was investigated to reveal its possible cytoprotective effect. As shown by comet assay, DNA damage index of immune cells was increased 4,0 times in mice with immune complex-mediated pathology induced by a long-term immunization of CBA mice with bovine serum albumin (BSA), $P < 0,001$. The percentage of thymic cells with strong DNA damage was increased to 77 % under immunization (compared to 1,5 % in control mice) and the percentage of such cells from lymph nodes was increased to 80 % (compared to 0 % in control), in both cases $P < 0,001$. Genotoxic stress was reduced by treatment of immunized mice with 4-HQ: the percentage of lymphocytes with strong DNA damage was significantly decreased that promoted increase in the amount of cells having intact DNA. PARP inhibition exerted a strong cytoprotective effect: viability of thymus and lymph node cells was increased mainly due to reduced level of necrosis. So, our results suggest that PARP may be involved in thymic and lymph node cell damage in immune complex mediated pathology and give evidence that inhibition of this enzyme may constitute a perspective target in immune complex diseases prevention and therapy.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Makogon NV, Alexeyeva IM. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP): physiological and pathological roles. *Fiziol Zh.* 2012; 58 (3): 95-112.[Ukrainian].
2. Drel VR, Sybirna NO. Nephroprotective effect of grape wine in the rat with experimental diabetes mellitus. *Stud Biol.* 2009; 3 (3): 59–68.
3. Bao Z, Xiong J, Li W, Chen Z, Shen H, Ying S. Genomic instability in chronic airway inflammatory diseases. *Biomed J.* 2015; 38(2):117-24.
4. Toth-Zsomboki E, Horvath E, Vargova K et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med.* 2006;12(9-10):221-8.
5. Jog NR, Dinnall JA, Gallucci S, Madaio MP, Caricchio R. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the progression of autoimmune nephritis in males by inducing necrotic cell death and modulating inflammation. *J Immunol.* 2009; 182(11):7297-306.
6. Bai P. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Lett.* 2012; 586 (21): 3771–7.
7. Gonzalez-Rey E, Martínez-Romero R, O'Valle F, Aguilar-Quesada R, Conde C, Delgado M, Oliver FJ. Therapeutic effect of a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response. *PLoS ONE.* 2007; 2 (10): e1071.
8. Grushka N, Makogon N, Pavlovych S, Bryzгина T, Martynova T, Sukhina V, Yanchiy R. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline exerts a protective effect against concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Health Sci.* 2014;3(11): 463-8.
9. Wang Y, Dawson VL, Dawson TH. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol.* 2009; 218 (2);193–202.
10. Fuerst M. More than a handful of PARP inhibitors in development to treat hereditary breast cancer. *Oncol Tim.* 2014; 36 (2): 50-1.
11. Lytvynenko AP, Pavlovych SI, Makogon NV, Yanchiy RI Effects of inhibitor of poly (ADP-ribose)polymerase on the deposition of immune complexes and uterine contractility under systemic immune complex disorders in mice. *Med Hydrol Rehabil.* 2014; 12 (1/4): 15-21.
12. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments . *Electrophoresis.* 2010; 31: 512-19.
13. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-61.
14. Sorochinska J, Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Oncology.* 2008; 10 (3): 303-8.
15. Kamboj A, Lu P, Cossoy MB. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 contributes to neuroinflammation and neurological dysfunction in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflam.* 2013; 10: 49–58.
16. Ahmad SF, Zoheir KM, Bakheet SA, Ashour AE, Attia SM. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor modulates T regulatory and IL-17 cells in the prevention of adjuvant induced arthritis in mice model. *Cytokine.* 2014; 68(2): 76–85.

17. 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;132(6 Suppl 2):1598-603.
18. Kaminsky VO, Lutsik MD, Stoika RS. Comet assay of dna fragmentation: modification of silver staining for obtaining permanent preparations. *Ukr Biochem.* 2005; 77(6): 105-7.
19. Chopyak V, Valchuk IV, Hayduchok IG. Hiperimuno-kompleksnyy syndrome in experiment and clinic. *Bull Sci Res.* 2007; 1: 5-8.
20. 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. *Rep Morphol.* 2014; 8 (2):496-500.
21. Jancar S, Sánchez Crespo M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol.* 2005;26(1):48-55.
22. Kirkland J. Poly ADP-ribose polymerase-1 and health. *Exp Biol Med.* 2010; 235 (5):561 –68.
23. Besson V.C. Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose) polymerase pathway modulation. *Br J Pharmacol.* 2009; 157: 696-704.
24. Banasik M, Stedeford T, Strosznajder RP. Natural inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mol Neurobiol.* 2012; 46 (1): 55-63.

*Матеріал надійшов
до редакції 04.07.2016*