

Протективна дія цитрату германію на функціональний стан імунокомпетентних клітин та активність нейтрофілів при запаленні, індукованому ліпополісахаридом

Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, О.А. Кондрацька, Н.О. Пількевич, Р.І. Янчій

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

Досліджено вплив нанопрепарату цитрату германію (Ge), який має антиоксидантні властивості, на функціонально-метаболічну активність нейтрофілів, ступінь ушкодження ДНК, шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишею при моделюванні системою ендотоксемії. Встановлено, що введення мишам ліпополісахариду E. coli (3 мг/кг) індукувало системний запальний процес із значним ушкодженням клітин і органів. Спостерігалась активація клітин неспецифічної резистентності (за результатами тесту з нітросинім тетразолієм та лізосомально-катіонного тесту), що є важливим механізмом цитотоксичної дії ліпополісахариду. Виявлено сильне ушкодження ДНК клітин тимуса та лімфовузлів. Показано зниження життєздатності та збільшення кількості клітин із характерними ознаками апоптозу та некрозу. Введення цитрату Ge зменшувало генерування в нейтрофілах активних форм кисню, про що свідчило зниження відсотка формазанпозитивних клітин та цитохімічного показника. Вміст катіонних білків, медіаторів запалення, за середнім цитохімічним коефіцієнтом також знижувався. Крім того, введення цитрату Ge за умов впливу ліпополісахариду призводило до зменшення ступеня ушкодження ДНК клітин тимуса та лімфовузлів, а також до послаблення клітинної загибелі як за апоптотичним, так і некротичним шляхами. Отже, застосування цитрату Ge чинило протективний вплив на клітини тимуса та лімфовузлів, зменшуючи ушкодження їх ДНК та загибель, що може бути опосередковано виявленою нами певною нормалізацією функцій нейтрофілів. Отримані результати вказують на перспективність застосування нанопрепаратів із антиоксидантними властивостями в комплексній профілактиці та терапії ендотоксиніндукованих захворювань людини і тварин.

Ключові слова: цитрат германію; ліпополісахарид; імунокомпетентні клітини; ушкодження ДНК; апоптоз; некроз.

ВСТУП

Ендотоксемія є патофізіологічним станом, викликаним порушенням реакції хазяїна на бактеріальний ендотоксин, також відомий як ліпополісахарид. Останній є основним компонентом зовнішньої клітинної стінки грамнегативних бактерій, надзвичайно токсичний. Він взаємодіє з клітинами вродженого імунітету, активуючи їх, при цьому призводить до пригнічення адаптивного імунітету. Потрапляючи в кровеносну систему, ліпополісахарид розпізнається Toll-подібними рецепторами 4 (TLR-4) [1],

які найбільш широко представлені саме на клітинах вродженого імунітету, включаючи моноцити й макрофаги. Під час активації ці клітини продукують прозапальні медіатори – цитокіни (фактор некрозу пухлин α – ФНП- α), інтерлейкіни 1, 6, 8, 12, оксид азоту – NO, простагландини, а також активні форми кисню (АФК) і азоту, що призводить до розвитку системної запальної відповіді [2]. Надмірне утворення АФК клітинами вродженого імунітету може викликати розвиток сильного оксидативного стресу, який у свою чергу спричиняє ушкодження клітин, і сприяє ак-

© Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, О.А. Кондрацька, Н.О. Пількевич, Р.І. Янчій

тивації механізму посилення імунозапальних процесів. Це являє собою серйозну проблему і потребує визначення патогенетичних механізмів дії ендотоксину для розробки ефективних протективних та лікувальних засобів. Участь оксидативного стресу у пошкодженні, пов'язаному з ендотоксемією, дає змогу припустити, що використання препаратів із антиоксидантними властивостями може підвищити ефективність протоколів лікування, спрямованих на ендогенне та терапевтичне видалення ліпополісахариду або молекул, які опосередковують його біологічну активність (тобто дезактивують, детоксикують та видаляють) [1, 3].

Розвиток нанотехнологій призвів до створення органічних сполук мікроелементів, ефекти яких останнім часом широко досліджуються у медицині та тваринництві. Серед таких нанопрепаратів особливий статус належить цитрату германію (Ge), що має імуностимулюючі, протизапальні та антиоксидантні властивості, забезпечує зниження гіпоксії на тканинному рівні. Показано його стимулюючий вплив на імунобіологічну реактивність та репродуктивну функцію щурів [4–6]. Також вживання цитратом Ge сприяло покращенню імунобіологічних показників щурів, в тому числі їх фертильності і молочності самиць [4, 7, 8]. Відзначено його виражену антиоксидантну дію, що супроводжувалась зниженням вмісту ТБК-активних продуктів і гідроперекисів ліпідів у крові тварин всіх дослідних груп [8]. Однак досліджень ефектів цієї речовини при імунозапальних процесах немає.

Метою нашої роботи було дослідити вплив цитрату Ge на ступінь ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин, їхню життєздатність, а також функціональну активність нейтрофілів при моделюванні системної ендотоксемії у мишей.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії Альбіно (масою 18–22 г). При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи (Страсбург, 1986). Тварини були поділені на 3 групи: контрольну і 2 дослідні, яким моделювали ендотоксемію за допомогою внутрішньоочеревиного введення ліпополісахариду (*E. coli* 0111:B4, «Sigma», США). До контрольної групи відносили тварин, яким вводили фізіологічний розчин (ФР) у відповідному об'ємі. До першої дослідної ввійшли тварини, які отримали ліпополісахарид у дозі 3 мг/кг. До другої дослідної – тварини, які отримали внутрішньоочеревино ін'єкції водного розчину цитрату Ge в дозі 100 мг/кг, двічі за 24 год та за 1 год до введення ліпополісахариду. В кожній групі було не менше ніж 8–10 тварин. Ми використовували вітчизняний препарат – цитрат Ge (ТОВ «Нанотехнології і наноматеріали», Україна), отриманий методом електроімпульсної нанотехнології [9], який характеризується екологічною безпекою, високою чистотою (99,99% Ge) та біодоступністю. Через 24 год тварин піддавали ефірному наркозу і вилучали матеріал для досліджень.

Для отримання імунокомпетентних клітин тимус та пахові лімфовузли подрібнювали в середовищі виділення (забуференому фосфатами ФР) за допомогою пінцетів і піпетування. Клітини виділяли за загальноприйнятою методикою механічної дисоціації м'яким диспергуванням з наступним відмиванням клітин [10]. Більшість клітин (близько 90%) в отриманих суспензіях становили лімфоцити, як було визначено при їх забарвленні за Папенгеймом. Загальну кількість виділених клітин підраховували в камері Горяєва, відсоток живих та некротичних клітин в отриманих суспензіях визначали за допомогою трипанового синього.

Ступінь ушкодження ДНК оцінювали методом лужного гель-електрофорезу ізо-

льованих клітин (метод ДНК-комет) за [11], з модифікаціями, як описано раніше нами [12, 13]. Аналіз не менше ніж 100 ДНК-комет на кожній електрофореграмі здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп «Люам І-1» (збільшення у 30 разів). Їх поділяли за загально визнаною класифікацією (залежно від співвідношення ДНК у “голові” та “хвості” комети) на 5 класів зі значенням від 0 (відсутнє ушкодження ДНК – комети без хвостів) до 4 (максимальне ушкодження – майже вся ДНК у хвості) [11]. Ступінь ушкодження ДНК визначали як індекс ДНК комет ($I_{\text{ДНК}}$): $I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \sum$, де $n_0 - n_4$ – число ДНК-комет кожного типу, \sum – сума підрахованих комет.

Життєздатність та шляхи загибелі клітин оцінювали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 і пропідіум йодиду («Sigma-Aldrich», США). Останній проникає лише у некротичні клітини із пошкодженими плазматичними мембранами та забарвлює їхні ядра у червоний колір, а Hoechst 33342 – через неушкоджені мембрани та забарвлює ядра живих клітин у синій колір. Зв’язуючись із хроматином, ці барвники дають змогу ідентифікувати апоптотичні зміни в ядерному матеріалі, тобто периферичну локалізацію хроматину, його конденсацію і фрагментацію ядер. Забарвлення проводили у забуференому ФР, використовуючи барвники у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л. Клітини витримували у темноті протягом 20 хв, потім промивали за допомогою центрифугування у забуференому ФР, фіксували 5%-м формаліном упродовж 2 хв і знов промивали. Мазки готували і досліджували під люмінесцентним мікроскопом «Люам І-1» (збільшення у 90 разів). Використовували відеосистему передачі зображення з мікроскопа на комп’ютер. У кожному препараті оцінювали не менш ніж 200 клітин та вираховували відсоток живих, апоптотичних і некротичних клітин.

Киснезалежний метаболізм нейтрофільних гранулоцитів вивчали у тесті з нітроси-

нім тетразолієм (НСТ), основанийому на здатності НСТ відновлюватися до нерозчинного формазану під впливом АФК, продукованих активованими клітинами. Оцінювали 100 нейтрофілів у препаратах крові мишей із розрахунком відсотка формазанопозитивних клітин та цитохімічного показника (ЦХП) за формулою:

$$\text{ЦХП} = (A \cdot 0 + B \cdot 1 + C \cdot 2 + D \cdot 3) / 100,$$

де А, В, С і Д – кількість нейтрофілів: А – без формазану або його дуже мало; В – площа відкладень формазану не перевищує 1/3 від такої ядра клітини; С – відкладення займають від 1/3 до усієї площі ядра клітини; Д – площа включень формазану більша за площу ядра [14]. Функціональний стан нейтрофілів оцінювали також за результатом напівкількісного лізосомально-катіонного тесту (ЛКТ) із розрахунком середнього цитохімічного коефіцієнту (СЦК) [15].

Результати обробляли в програмі GraphPad Prism version 5.00 для Windows (GraphPad Software, США). Перед статистичним аналізом перевіряли на нормальність розподілу кількісних значень за критерієм Колмогорова–Смірнова. При нормальному їх розподілі здійснювали однофакторний дисперсійний аналіз one-way ANOVA з подальшим множинним порівнянням за тестом Ньюмана–Коулса. Результати досліджень, які не мали нормального розподілу, аналізували з використанням непараметричного аналога ANOVA – Kruskal–Wallis-тесту з наступним порівнянням між групами за критерієм Данна. Відмінності вважали статистично значущими при $P < 0,05$. Результати виражали як $M \pm m$ (середнє \pm стандартна похибка).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що введення самицям мишей ліпополісахариду *E.coli* (серотип 0111:В4) у дозі 3 мг/кг через 24 год викликало зменшення маси тіла тварин та підвищення температури тіла, виміряної ректально (37,9–38,3°C), порівняно з контролем (36,4–37,1°C).

Спостерігалось значне ушкодження клітин та імунокомпетентних органів. У тимусі відзначалося зменшення вмісту тимоцитів, зростання їх бластних форм у кірковій зоні, її звуження внаслідок виходу Т-лімфоцитів, що могло зумовлювати зниження функціональної здатності тимуса. В лімфатичних вузлах порушувалася мікроциркуляція з наявністю нейтрофілів у просвіті розширених центральних синусів з низькою щільністю лімфоцитів, що могло викликати пригнічення імунної системи. За лейкограмою крові збільшувався відсоток паличкоядерних нейтрофілів з $4,6 \pm 1,2$ у контролі до $18,2 \pm 1,9\%$ при дії ліпополісахариду ($n = 10$; $P < 0,001$), а також відсоток сегментоядерних нейтрофілів з $12,7 \pm 1,7$ до $35,4 \pm 3,9\%$ ($P < 0,001$). Тобто ми виявили значну нейтрофілію зі зсувом лейкограми вліво, що є ознакою системного запального процесу. Зазначені зміни можуть бути пов'язані з тим, що ліпополісахарид є лігандом рецепторів TLR-4, які експресуються переважно на клітинах імунної системи і є важливим компонентом захисту організму від бактеріальних інфекцій. Результатом взаємодії TLR-4 з ліпополісахаридом є, зокрема, активація клітин неспецифічної резистентності, що призводить до посилення їх бактерицидності та видаленню бактерій [16].

Слід відмітити, що введення ліпополісахариду посилювало функціонально-метаболічну активність імуноцитів, розвиток оксидативного стресу. За результатом НСТ-тесту (який визначає генерацію АФК) клітини неспецифічної резистентності активуються, що є важливим механізмом цитотоксичної дії ліпополісахариду. У нейтрофілах периферичної крові мишей збільшувався відсоток формазанпозитивних клітин з $23,8 \pm 6,0$ у контролі до $63,0 \pm 7,3\%$ при введенні ліпополісахариду ($P < 0,001$), а також зростав ЦХП (який відображає активність процесів в окремих клітині) з $0,34 \pm 0,06$ до $0,96 \pm 0,04$ ($P < 0,001$). Паралельно активувався метаболізм клітин, про що свідчило збільшення СЦК реакції на вміст катіонних білків з $0,04 \pm 0,01$ у

контролі до $0,31 \pm 0,04$ при введенні ліпополісахариду ($P < 0,001$). Отже, результати наших досліджень вказують на те, що ендотоксин викликає розвиток оксидативного стресу та пошкодження ДНК, що говорить про високий рівень його генотоксичності. Надмірне вивільнення цитотоксичних факторів надалі може спричинювати посилення запального процесу зі збільшенням проникності судин, хемотаксису та активації лейкоцитів. Застосування цитрату Ge значною мірою покращувало морфологічний стан внутрішніх органів мишей з відновленням мікроциркуляції імунокомпетентних органів, зростанням об'єму часточок тимуса з активним заселенням кіркової речовини тимоцитами і лімфоцитами, збільшенням у лімфатичних вузлах кількості фолікул із світлими центрами і широкою мантієюною зоною утвореною малими лімфоцитами, а також сприяло нормалізації лейкограми крові, яка вірогідно не відрізнялася від показників контрольних тварин. При цьому зменшувалося генерування в нейтрофілах АФК, на що вказувало зниження відсотка формазанпозитивних клітин до $45,5 \pm 3,9\%$ та ЦХП до $0,53 \pm 0,04$. Вміст катіонних білків – медіаторів запалення за СЦК знижувався до $0,11 \pm 0,02$. Таким чином, застосування цитрату Ge значно зменшувало функціонально-метаболічну активність нейтрофілів периферичної крові, що говорить про його цитопротективну дію як антиоксиданта за умов системної ендотоксемії.

За допомогою методу комет-електрофорезу поодиноких клітин після введення ліпополісахариду було виявлено сильне ушкодження ДНК в імуноцитах. Це свідчить про високий рівень його генотоксичності. Вірогідно підвищувався Іднк (інтегральний показник, що характеризує як ступінь ушкодження ДНК, так і кількість клітин із ушкодженою ДНК) клітин тимуса до $2,35 \pm 0,11$ (при $0,66 \pm 0,25$ у контролі) та лімфовузлів до $1,98 \pm 0,32$ (у контролі $0,55 \pm 0,19$). Також збільшувався відсоток клітин з високим рівнем пошкодження ДНК у тимусі ($46,41 \pm 12,09\%$ порівняно

із $8,92 \pm 7,29\%$ у контролі; $P < 0,05$; рис. 1) та лімфовузлах ($27,61 \pm 6,81\%$ щодо $2,23 \pm 1,27\%$ у контролі; $P < 0,001$). Це вказує на розвиток сильного генотоксичного стресу імуніцитів досліджуваних органів імунної системи мишей (рис. 2). У разі введення розчину цитрату Ge зменшувався Іднк тимоцитів та клітин лімфовузлів до $0,13 \pm 0,02$ та $0,3 \pm 0,05$ відповідно ($P < 0,001$). Крім того, суттєво знижувалася кількість імуніцитів із сильним ушкодженням ДНК у тимусі до $1,2 \pm 0,49\%$

($P < 0,05$; див. рис. 1), в лімфовузлах – до $4,25 \pm 0,90\%$ ($P < 0,05$; див. рис. 2). Отримані результати підтверджують цитопротективну та антиоксидантну дію досліджуваного нанопрепарату на імунікомпетентні клітини за умов ендотоксемії.

На тлі такого значного ушкодження ДНК зменшувалася життєздатність клітин досліджуваних органів. Як відомо, активація імуніцитів призводить до активаційного апоптозу, що слугує гомеостатичним механізмом обмеження імунізапальних проце-

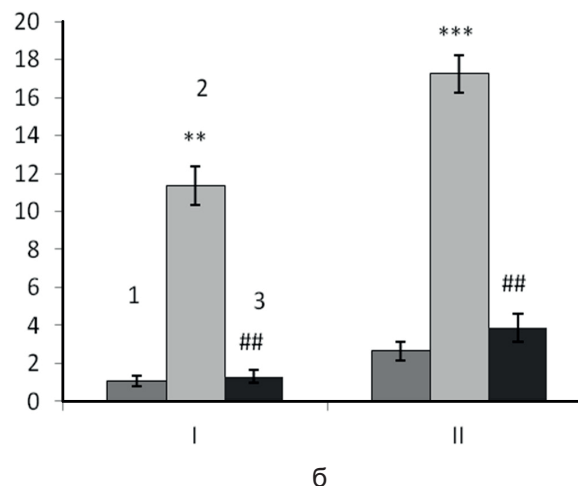
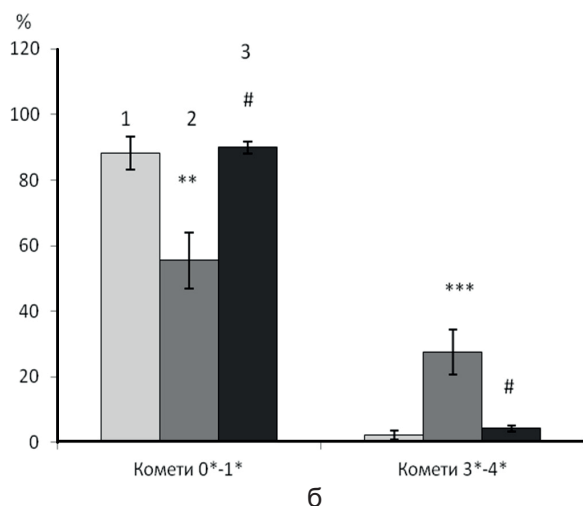
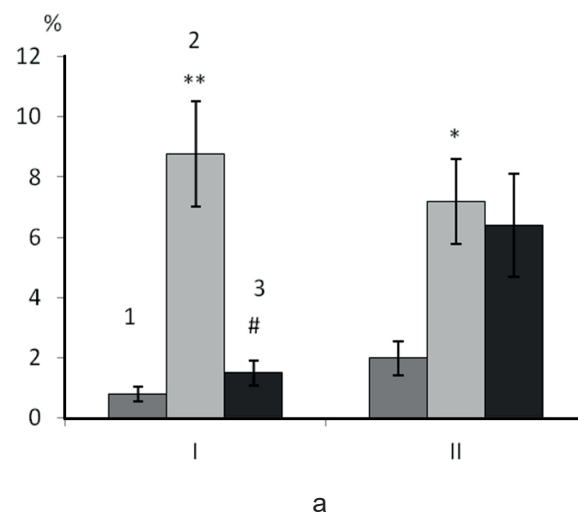
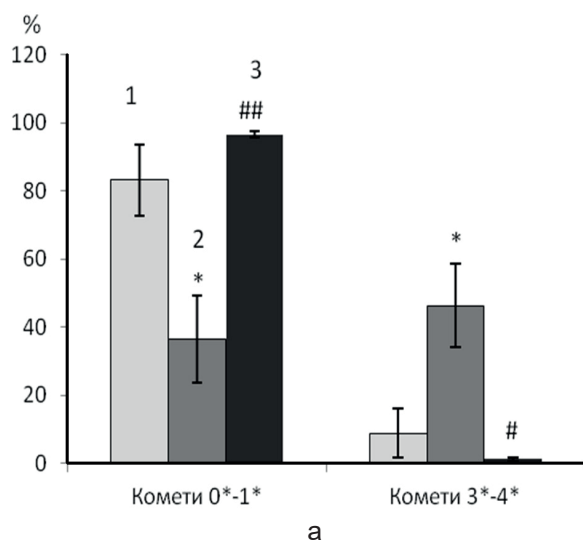


Рис. 1. Вплив цитрату Ge на ушкодження ДНК у клітинах тимуса (а) і лімфовузлів (б) за умов ендотоксемії: 1 – контроль, 2 – дія ліпополісахариду, 3 – дія цитрату Ge і ліпополісахариду. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ щодо контролю; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ щодо дії ліпополісахариду

Рис. 2. Вплив цитрату Ge на загибель клітин тимуса (а) і лімфовузлів (б) за умов ендотоксемії: I – некроз, II – апоптоз; 1 – контроль, 2 – дія ліпополісахариду, 3 – дія цитрату Ge і ліпополісахариду. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ щодо до контролю; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ щодо дії ліпополісахариду

сів. У нашій роботі методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (пропідіум йодиду і Хехст 33342) після застосування ліпополісахариду показано посилення апоптозу клітин тимуса і лімфовузлів в 4,6 і в 3,0 рази відповідно ($P < 0,001$) порівняно з контрольними значеннями (див. рис. 2). Однак сильний генотоксичний стрес та відповідне порушення функціонального стану клітин унеможлиблює завершення їх життєвого циклу досить енергозатратним шляхом апоптозу, що відповідно призводить до посилення некрозу. Нами встановлено, що відсоток некротичних клітин тимуса і лімфовузлів при введенні ліпополісахариду зростав в 13,8 і в 6,1 рази відповідно ($P < 0,01$). Таке значне посилення некрозу може бути патогенетичним механізмом посилення й хронізації імунозапального процесу. При некрозі порушується цілісність плазматичної мембрани, назовні виходить вміст клітин, що має сильні прозапальні властивості (в тому числі прозапальні сигнальні молекули – аларміни), а також вивільняються внутрішньоклітинні антигени, до яких імунна система не толерантна. Тож значне пошкодження ДНК і посилення клітинної загибелі за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом може бути одним з важливих механізмів розвитку патологічних наслідків ендотоксемії. Застосування цитрату Ge значно покращувало життєздатність імунцитів, зменшуючи клітинну загибель (як апоптоз, так і некроз), проте антинекротичний ефект був більш виражений (див. рис. 2), що вказує на протизапальні властивості досліджуваного нанопрепарату.

Таким чином, при моделюванні ендотоксемії ми виявили патогенетичні механізми, пов'язані із генерацією продукції АФК внаслідок активації клітин вродженого імунітету, що призводить до розвитку оксидативного стресу з наступним ушкодженням ДНК імункомпетентних клітин та індукцією їхньої загибелі переважно за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом. За-

стосування цитрату Ge чинило протективний вплив на клітини тимуса та лімфовузлів, зменшуючи ушкодження їх ДНК та загибель, що може бути опосередковано виявленою нами певною нормалізацією функцій нейтрофілів. Отримані результати вказують на перспективність застосування препаратів із антиоксидантними властивостями в комплексній профілактиці та терапії ендотоксиніндукованих хвороб людини і тварин.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Н.Г. Грушка, С.И. Павлович, Е.А. Кондрацкая, Н.А. Пилькевич, Р.И. Янчий

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИТРАТА ГЕРМАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК И АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ, ИНДУЦИРОВАННОМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

Исследовано влияние нанопрепарата цитрата германия (Ge), который обладает антиоксидантными свойствами, на функционально-метаболическую активность нейтрофилов, степень повреждения ДНК, пути гибели клеток тимуса и лимфоузлов мышей при моделировании системной эндотоксемии. Установлено, что введение мышам липополисахарида *E.coli* (3 мг/кг) индуцировало системный воспалительный процесс со значительным повреждением клеток и органов. Наблюдалась активация клеток неспецифической резистентности (согласно результатам теста с нитросиним тетразолием и лизосомально-катионного теста), что является важным механизмом цитотоксического действия ЛПС. Выявлено сильное повреждение ДНК клеток тимуса и лимфоузлов, снижение их жизнеспособности и увеличение количества клеток с характерными признаками апоптоза или некроза. Введение цитрата Ge уменьшало генерирование в нейтрофилах активных форм кислорода, о чем свидетельствовало снижение процента формазанположительных клеток и цитохимического показателя. Содержание катионных белков, медиаторов воспаления, по данным среднего цитохимического коэффициента также снижалось. Кроме того, введение цитрата Ge в условиях воздействия липополисахарида приводило к

уменьшению степени повреждения ДНК в клетках тимуса и лимфоузлов, а также к ослаблению клеточной гибели как путем апоптоза, так и некроза. Таким образом, применение цитрата Ge оказывало протективное влияние на клетки тимуса и лимфоузлов, уменьшая повреждение их ДНК и гибель, что может быть опосредовано выявленной нами определенной нормализацией функций нейтрофилов. Полученные результаты указывают на перспективность применения нанопрепаратов с антиоксидантными свойствами в комплексной профилактике и терапии эндотоксининдуцированных заболеваний человека и животных. Ключевые слова: цитрат германия; липополисахарид; иммунокомпетентные клетки; повреждение ДНК; апоптоз; некроз.

N.G. Grushka, S.I. Pavlovych, O.A. Kondratska, N.O. Pilkevich, R.I. Yanchii

THE PROTECTIVE EFFECT OF GERMANIUM CITRATE ON FUNCTIONAL STATE OF IMMUNE CELLS AND NEUTROPHIL ACTIVITY UNDER THE CONDITION OF LIPOLYSACCHARIDE INDUCED INFLAMMATION

In the present work we investigated the effect of germanium (Ge) citrate, which has antioxidant properties, on functional and metabolic activity of neutrophils, degree of DNA damage and pathways of thymus and lymph node cell death under the conditions of systemic endotoxemia in mice. It was found that the administration of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) (3 mg/kg) induced a systemic inflammatory process with significant damage to cells and organs. Introduction of LPS caused the activation of the nonspecific resistance cells (according to the nitroblue tetrazolium test and the lysosomal-cationic test), which is an important mechanism of the cytotoxic effect of LPS. There was severe damage to DNA of thymus and lymph node cells, reducing their viability and an increase in the number of cells with signs of apoptosis or necrosis. The use of Ge citrate under the conditions of LPS treatment reduced generation of reactive oxygen species in neutrophils, as evidenced by a decrease in the percentage of formazan-positive cells and the cytochemical index. The content of cationic proteins and inflammatory mediators, according to the average cytochemical coefficient, was also decreased. In addition, administration of Ge citrate resulted in a reduce of the degree of DNA damage in thymus and lymph node cells, as well as in weakening necrotic and apoptotic cell death. Thus, the use of Ge citrate had a protective effect on thymus and lymph node cells reducing their DNA damage and death, which can be mediated by the normalization of neutrophil functions revealed in our experiments. The data obtained indicate the promise of the use of Ge citrate in the complex prevention and treatment of endotoxin induced diseases in humans and animals.

Key words: germanium citrate; lipopolysaccharide; immune cells; DNA damage; apoptosis; necrosis.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: grunay@i.ua

REFERENCES

1. Shen S, Han F, Yuan A, Wu L, Cao J, Qian J, Qi X, Yan Y, Ge Y. Engineered nanoparticles disguised as macrophages for trapping lipopolysaccharide and preventing endotoxemia. *Biomaterials*. 2019;189:60-8.
2. Ajuwon OR, Oguntibeju OO, Marnewick JL. Amelioration of lipopolysaccharide-induced liver injury by aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract via inhibition of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14:392.
3. Buttenschoen K, Radermacher P, Bracht H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395(6):597-605.
4. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Khrabko MI, Tsap MM, Dolaychuk OP, Kropyvka SI. Haematological and biochemical parameters of the F2 rats' organism in a period of prolonged watering of nano-Ge citrate. *Animal Biol*. 2017;19(3):115-21. [Ukrainian].
5. Li L, Ruan T, Lyu Y, Wu B. Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals – A review. *Biosci and Med*. 2017;5(7):56-73.
6. Nakamura T, Takeda T, Tokuji Y. The oral intake of organic germanium, Ge-132, elevates α -Tocopherol levels in the plasma and modulates hepatic gene expression profiles to promote immune activation in mice. *Int J Vitam Nutr Res*. 2014;84(3-4):183-95.
7. Fedoruk RS, Khrabko MI, Tsap MM, Martsynko OE. Growth, development and reproductive function of female rats and their offspring viability at the conditions of the watering of different doses of citrate germanium. *Animal Biol*. 2016;18(3):97-106. [Ukrainian].
8. Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kropyvka SJ. Physiological reactivity and antioxidant defense system of the animal organism induced by germanium, chromium, and selenium "Nanoaquacitrates". *Agricult Sci Pract*. 2015;2(2):50-5.
9. Kosinov MV, Kaplunenkov VG. Pat. of Ukraine No. 38391. 2009. Method for metal carboxylates obtaining "Nanotechnology of obtaining metal carboxylates". N a 200810939; appl. 08.09.2008; publ. 12.01.2009; Bull. N 1:5 p.
10. *Lymphocytes: Methods*: Edited by J. Claus. – Publishing house "Mir", Moscow, 1990. [Russian].
11. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004;26(3):249-61.
12. Shepel E, Grushka N, Makogon N, Sribna V, Pavlovych S, Yanchii R. Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. *Pharmacol Rep*. 2018;70(6):1146-9.

13. Grushka N.G. The effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline on death of immune cells under immune complex-mediated injury in mice. *Fiziol Zh.* 2017;63(1):43-50. [Ukrainian].
14. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. *Laboratory manual of neutrophil function.* NY; Raven Press; 1986.
15. Nagalievskaya M, Sabadashka M, Hachkova H, Sybirna N. Galega officinalis extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):4.
16. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines (Basel).* 2017;5(4). pii: E34.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.09.2019*