

Індукція апоптозу та некрозу лейкоцитних клітин очищеними препаратами IgG сироватки крові мишей, яким тривалий час згодовували мозок великої рогатої худоби

М. Р. Козак, В. В. Влізло, Ю. Я. Кіт¹, Р. С. Стойка¹

Інститут біології тварин УААН
Вул. Василя Стуса, 38, Львів, 79034, Україна

¹Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

inenbiol@mail.lviv.ua

Досліджували властивості очищених препаратів IgG мишей. Встановлено, що усі препарати IgG мишей індукують загибель клітин лінії L1210 лейкоцитної миші. Найвищий рівень цитотоксичної активності виявлено за впливу IgG мишей, яким додатково до основного раціону згодовували мозок великої рогатої худоби. Загибель тест-клітин відбувалася як через апоптоз (характерні ознаки – руйнування ДНК, виявлене методом ДНК-комет, та конденсація і фрагментація хроматину, визначені флуоресцентною мікроскопією після фарбування клітин барвником Hoechst 33342), так і внаслідок некрозу. Останній оцінювали за рівнем активності лактатдегідрогенази, яка вивільнялася із зруйнованих клітин лінії L1210 у культуральне середовище, та світловою мікроскопією після забарвлення клітин за Романовським-Гімза.

Ключові слова: раціон, імуноглобуліни, цитотоксична активність, апоптоз, некроз.

Вступ. Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (ТСЕ) належать до групи смертельно небезпечних нейродегенеративних захворювань, які зустрічаються серед різних видів тварин, а також у людини (хвороба Крейцфельдта-Якоба). Характерною ознакою цих захворювань є наявність губчастоподібних утворень у мозку хворого організму. Для пояснення причин виникнення ТСЕ запропоновано дві концепції – пріонну та автоімунну [1–3]. В основі першої лежить участь пріонів у розвитку губчастоподібних утворень. Вважають, що дане захворювання спричинене накопиченням у мозку пріонного білка PrP^{sc} зі зміненою конформацією його молекули [4–7]. На сьогодні ця концепція вва-

жається найобґрунтованішою, проте вона не може пояснити усі відомі випадки виникнення ТСЕ.

Автоімунна концепція базується на тому, що губчастоподібні утворення у мозку хворих тварин є наслідком автоімунної реакції [8, 9]. На її користь свідчить наявність автоантитіл до антигенів мозку в крові та спинномозковій рідині тварин, хворих на ТСЕ, та людей з хворобою Крейцфельдта-Якоба [10]. Механізми індукції автоімунних процесів при ТСЕ залишаються мало вивченими. Вважають, що поява автоантитіл до білків мозку є наслідком молекулярної мімікрії певних чужорідних антигенів, які потрапляють в організм через споживання твариною інфікованих кормів [11]. Не виключено, що довготривале вживання деяких харчових антигенів також може призводити до автоімунних порушень,

які за певних умов стають причиною виникнення ТСЕ у тварин. Одним із показників автоімунних процесів в організмі ссавців може слугувати рівень цитотоксичної активності імуноглобулінів плазми крові [12, 13].

Метою даної роботи було дослідити цитотоксичну активність імуноглобулінів класу G сироватки крові мишей, які перебували на раціоні, збагаченому мозком великої рогатої худоби (ВРХ), у порівнянні з тими, яким згодовували м'ясо-кісткове борошно або борошно сої.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на п'ятох групах білих нелінійних мишей. Кожна група складалася з восьми тварин. Денний раціон однієї тварини контрольної групи (К) включав 8 г фруктів, 2 г хліба, 3 г пшеничної крупи, 2 г сіна, 1 г коренеплодів (морква і буряк), 0,5 г насіння соняшника, воду без обмежень. Першій піддослідній групі (М), крім основного раціону, щоденно згодовували мозок ВРХ (50 мг тканини мозку на одну тварину), другій (М + Б) – 25 мг мозку та 25 мг м'ясо-кісткового борошна (Куп'янський ветсанзагод, Україна), третій (Б) – 50 мг м'ясо-кісткового борошна, четвертій (С) – 50 мг борошна сої. Дослід тривав 1 рік.

Препарати IgG виділяли із загальної фракції імуноглобулінів, отриманої триразовим переосадженням білків сироватки крові сульфатом амонію та афінною хроматографією на колонці, наповненій білок G-агарозою («Sigma», США) [13]. Концентрацію білка в отриманих препаратах визначали при довжині хвилі 280 нм за допомогою спектрофотометра фірми «NanoDrop Technologies» (США). Чистоту препаратів перевіряли електрофорезом у 12 %-му поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності 0,1 % додецилсульфату натрію [15].

Для дослідження цитотоксичної активності препаратів IgG використовували клітини лінії L1210 лейкемії миші (Колекція клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України). Клітини культивували у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко («Sigma Chem. Co.», США), у присутності 10 % ембріональної сироватки ВРХ («Sigma Chem. Co.») і 50 мкг/мл гентаміцину («Sigma Chem. Co.»).

Клітини L1210 (500 тис/мл) інкубували з препаратами IgG (кінцева концентрація 2 мкг/мл) протягом 24 та 48 год. Кількість живих і загиблих клітин підраховували після їхнього фарбування 0,1 %-м водним розчином трипанового синього. За цих умов живі клітини залишалися не забарвленими [16]. Індекс життєздатності клітин (ІЖ) вираховували за формулою: $ІЖ = O/C \cdot 100 \%$, де O – кількість живих клітин після дії IgG; C – кількість живих клітин у культурі. Індекс цитотоксичності (ІЦ) – за формулою: $ІЦ = O/C \cdot 100 \%$, де O – кількість мертвих клітин після дії IgG; C – кількість мертвих клітин у культурі.

Стан хроматину в ядрах клітин визначали після їхнього фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342 («Sigma») [17]. Морфологію клітин аналізували після забарвлення за Романовським-Гімза [18].

Фрагментацію ДНК досліджували методом мікроелектрофорезу в гелі агарози [19]. Для візуалізації комет ДНК електрофореграми зафарбовували бромистим етидієм і фотографували під мікроскопом МикМед-12 (ЛОМО, РФ) в ультрафіолетовому світлі.

ELISA. ДНК тимусу теляти («Sigma») у концентрації 10 мкг/мл сорбували на 96-лунковий планшет («SARSTEDT», США) упродовж 18 год при температурі 4 °С. Промивали 1 %-м БСА у PBS, додавали IgG (0,02 мкг/мл) та інкубували (2 год, 37 °С). Далі інкубували з вторинними антимишачими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Amersham Life Sciences», Велика Британія) протягом 1 год за температури 37 °С. Промивали PBS, який містить твін-20. Як хромоген використали 3,3'-діамінобензидин («Sigma»). Поглинання вимірювали при 492 нм на спектрофотометрі фірми «NanoDrop Technologies».

Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі визначали за методом [20].

Для всіх дослідів, які повторювали тричі, розраховували середнє значення «M» та середню похибку «m». Рівень достовірності отриманих результатів визначали за допомогою функцій програми Microsoft Excel 5.0, вираховуючи коефіцієнт Ст'юдента. Вірогідними вважали зміни показників, коли $p < 0,05$.

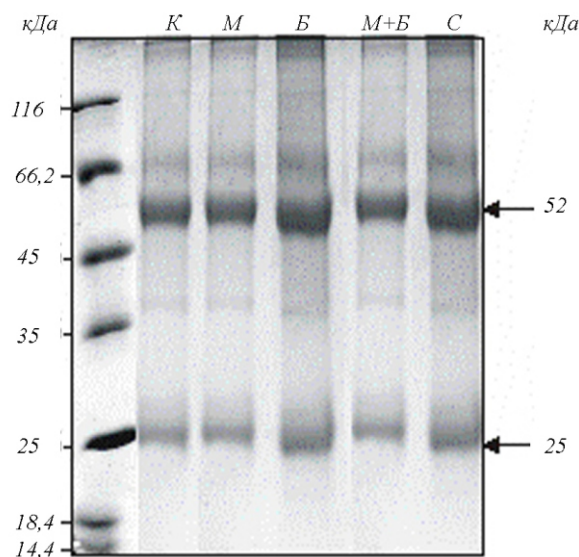


Рис. 1. Електрофорез у 12 %-му ПААГ за присутності 0,1 % додецилсульфату натрію препаратів IgG, очищених із сироватки крові мишей афінною хроматографією на білок G-агарози: *К* – IgG сироватки крові мишей контрольної групи; *М* – IgG сироватки крові мишей, яким додатково до основного раціону згодували мозок ВРХ; *М + Б* – IgG сироватки крові мишей, яким додатково згодували мозок ВРХ і м'ясо-кісткове борошно (1:1); *Б* – IgG сироватки крові мишей, яким додатково згодували м'ясо-кісткове борошно; *С* – IgG сироватки крові мишей, яким додатково згодували борошно сої

Результати і обговорення. Використано 40 зразків сироватки крові мишей, які протягом року перебували на різних раціонах (див. «Матеріали і методи»). Електрофоретичним аналізом препаратів IgG, очищених афінною хроматографією на білок G-агарози, виявлено, що білки виділених фракцій головним чином складаються з поліпептидів з молекулярною масою 52 та 27 кДа, які за цією ознакою відповідають важким і легким ланцюгам IgG миші (рис. 1). Отримані препарати IgG надалі використовували для вивчення їхньої цитотоксичної активності. Як клітинну тест-систему обрано лінію L1210 лейкемічних В-лімфоцитів миші.

На початковому етапі дослідження аналізували вплив препаратів IgG сформованих груп тварин на ріст клітин лінії L1210 *in vitro*. Цитостатичний ефект IgG визначали за динамікою кількості клітин через 24 та 48 год їхньої інкубації у культурі. Встановлено, що на 24-ту год дії препарати IgG пригнічують проліферацію клітин L1210 у такому порядку зростання їхньої активності: $B > K > M > M +$

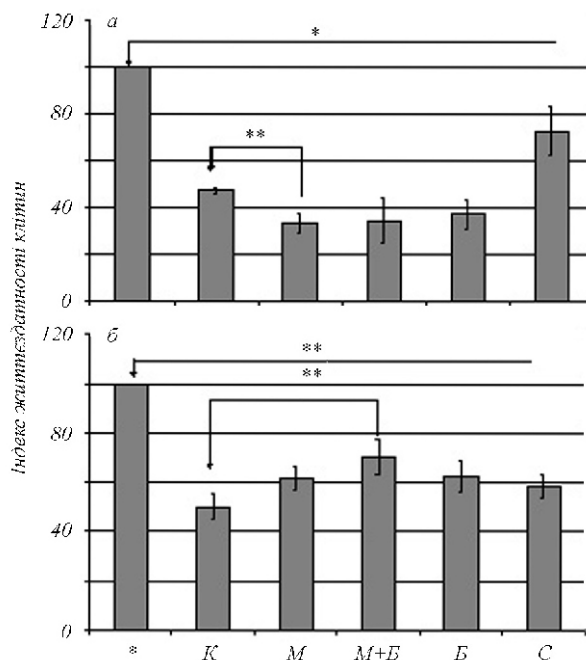


Рис. 2. Вплив препаратів IgG сироватки крові мишей на індекс життєздатності (ІЖ) клітин лінії L1210: ІЖ = $O/C \cdot 100\%$, де *O* – кількість живих клітин після дії IgG; *C* – кількість живих клітин у культурі; *a* – 24 год інкубації клітин з IgG; *б* – 48 год інкубації клітин з IgG; *К, М, М + Б, Б, С* – див. рис. 1; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

+ *Б* > *С* (рис. 2). На 48-му год інкубації клітин найбільшою цитостатичною активністю володіли IgG контрольної групи тварин, які майже вдвічі пригнічували ріст клітин L1210 *in vitro*.

На наступному етапі вивчали цитотоксичні властивості отриманих препаратів IgG. Цитотоксичний ефект цих препаратів визначали на 24-й та 48-й год інкубації клітин за співвідношенням кількості живих і загинувших клітин. Встановлено, що IgG піддослідних груп тварин відрізняються між собою за здатністю індукувати загибель клітин лінії L1210 *in vitro*. З рис. 3 видно, що цитотоксична активність препаратів IgG різних досліджуваних груп тварин суттєво залежить від тривалості дії цих препаратів на клітини-мішені. ІЖ при 24-год дії IgG тварин, яким додатково згодували мозок ВРХ, становив 200 %, а при 48-год – 370 %. У той самий час для контрольних тварин, які перебували на стандартному раціоні, приріст ІЖ був значно меншим (24 год – 152 %, 48 год – 222 %). У разі вживання м'ясо-кісткового борошна чи борошна сої, на-

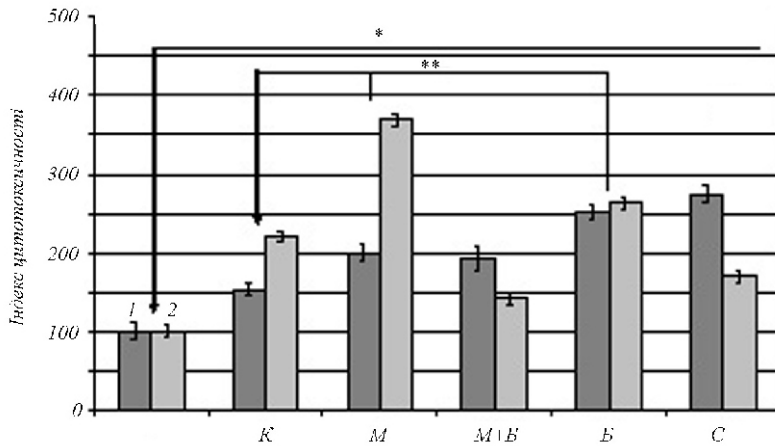


Рис. 3. Цитотоксична активність препаратів IgG, отриманих з сироватки крові мишей у тест-системі із клітинами лінії L1210 (1– 24 год; 2 – 48 год). Індекс цитотоксичності – кількість загинувлих клітин досліджуваної групи/кількість загинувлих клітин у контролі (без IgG) 100 %; K, M, B, M + B, C – див. рис. 1; *р 0,05; **р 0,01

впаки, з часом відбувалося зниження ІЦ, а додавання до згодовуваного мозку ще й м'ясо-кісткового борошна усувало таку залежність.

На основі отриманих результатів можна зробити висновок про те, що IgG сироватки крові мишей з різним раціоном індуюють загибель клітин лінії L1210 лейкемії мишей. Цитотоксичний ефект найкраще виражений при 48-год дії на ці клітини IgG мишей, раціон яких збагачений мозком ВРХ.

Відомо, що відмирання клітин в організмі відбувається за рахунок двох головних процесів – апоптозу або некрозу [20]. Апоптичні і некротичні клітини відрізняються за своїми морфологічними та біохімічними параметрами. Для перших характерною ознакою є конденсація і фрагментація ядерного хроматину, порушення функцій мітохондрій, експресія специфічних апоптичних білків, зокрема, протеолітичних ферментів каспаз, зморщення плазматичної мембрани й утворення апоптичних тілець. Для некротичних клітин відмінними ознаками є набряк як цих клітин, так і окремих органел, розрив плазматичної мембрани, що веде до витікання цитоплазматичних ферментів у позаклітинний простір [21, 22].

Ми використали дві характерні властивості апоптозу – конденсацію і фрагментацію ядерного хроматину, які виявляли після фарбування клітин флуоресцентним барвником Hoechst 33342 та за допомогою методу ДНК-комет, що дозволяє електрофоретично детектувати фрагментовану ядерну ДНК (рис. 4.). Встановлено, що інкубація клітин з дослідними препаратами IgG призводить до суттєвого зростання кількості клітин із фрагменто-

ваним хроматином (рис. 4). Виняток становив препарат IgG від тварин, яким додатково згодовували соєве борошно. У цьому разі знайдено навіть певне зменшення кількості клітин з ушкодженою ДНК.

Отже, препарати IgG, очищені із сироватки крові мишей, які перебували на різному раціоні, мали також різну здатність індукувати фрагментацію ядерного хроматину у клітин лінії L1210 *in vitro*. Характер цієї фрагментації вказує на те, що найімовірнішою є загибель клітин через апоптоз. Важливим показником автоімунних процесів в організмі ссавців є рівень у сироватці крові антитіл до дволанцюгової ДНК (анти-ДНК антитіл) [12]. Щоб встановити рівень анти-ДНК антитіл у препаратах IgG, очищених із сироватки крові тварин, ми використали метод ELISA. Визначено, що отримані препарати імуноглобулінів класу G піддослідних тварин містять у 2–2,5 рази більшу кількість антитіл до ДНК тимусу порівняно з IgG контрольної групи. Найвищий рівень антитіл до ДНК спостерігали у препаратах IgG від мишей, яким згодовували м'ясо-кісткове борошно у поєднанні з мозком ВРХ (рис. 5). Таким чином, значне підвищення рівня анти-ДНК антитіл у препаратах IgG, виділених із сироватки крові тварин, у харчовому раціоні яких присутній мозок ВРХ, вказує на можливі автоімунні порушення у організмі таких мишей.

Для перевірки того, чи здатні досліджувані IgG також індукувати некроз у частини клітин, додатково визначали активність ЛДГ у культуральному середовищі. Така ознака характерна для некротичних клітин внаслідок порушення у них цілісності плазматичної мембрани і витікання цитоплазматичних

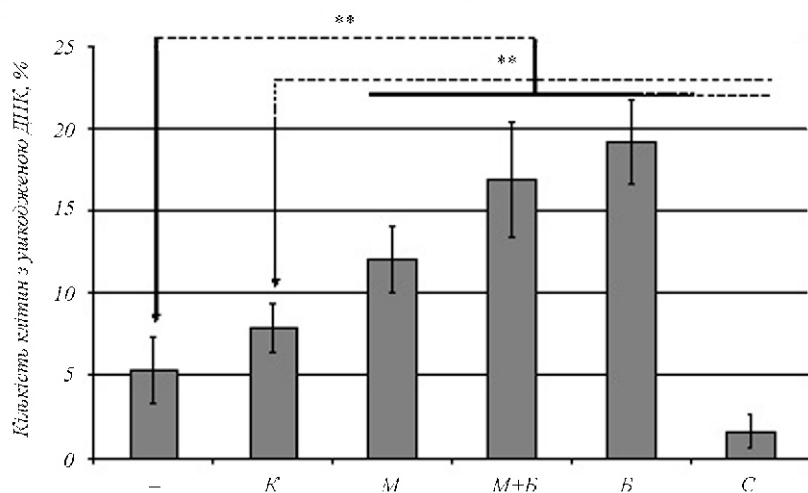
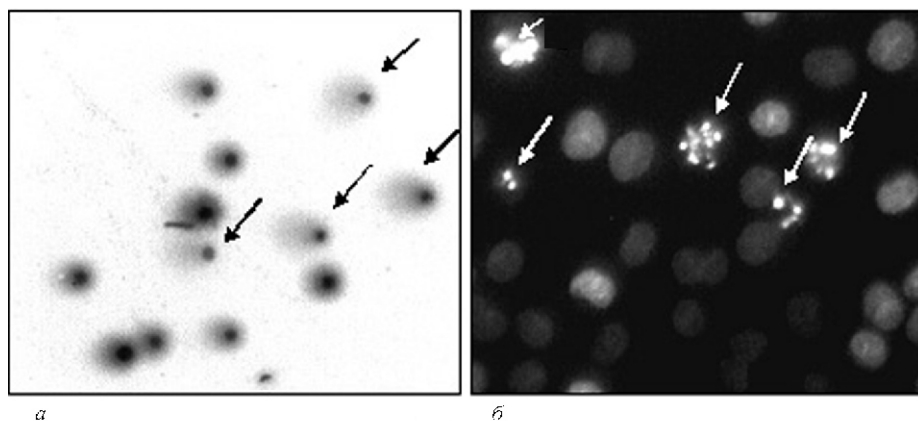


Рис. 4. Апоптоз клітин лінії L1210 під впливом препаратів IgG мишей: *a* – електрофореграма клітин лінії L1210 за впливу IgG мишей, яким згодовували мясо-кісткове борошно (стрілками вказано утворення комет ДНК внаслідок появи низькомолекулярної ДНК); *б* – фарбування клітин лінії L1210 барвником Hoechst 33342 (стрілками позначено клітини із ушкодженням (конденсація та фрагментація) хроматином на 48-му год інкубації); *в* – результати кількісної обробки результатів ДНК-комет аналізу; *K, M, M + B, B, C* – див. рис. 1. ***p* 0,01; ****p* 0,001

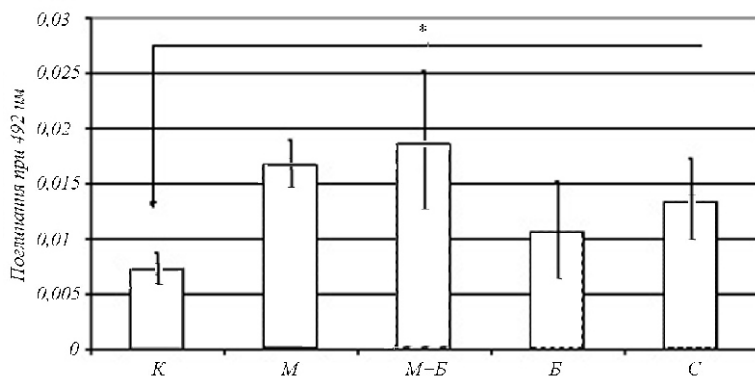


Рис. 5. Взаємодія IgG, отриманих від різних дослідних груп тварин, з ДНК тимусу теляти; *K, M, M + B, B, C* – див. рис. 1; **p* 0,05

ферментів у позаклітинний простір. З даних, наведених на рис. 6, випливає, що найвищою здатністю викликати некроз із виходом ЛДГ з клітин володіють препарати IgG, отримані із сироватки крові тварин, яким додатково згодовували мозок ВРХ. У більшості варіантів дослідження прояв такої активності зростає із тривалістю дії IgG на клітини-мішені. Наявність значної кількості некротичних клітин, що з'явилися під дією препаратів IgG, отриманих від

тварин, яким згодовували мозок ВРХ, підтверджено після фарбування тест-клітин за Романовським-Гімза. На рис. 7 видно клітини з пошкодженою плазматичною мембраною, через що відбувся витік з клітин цитоплазматичної ЛДГ.

Отже, тривале згодовування мишам продуктів, які містять тканини тварин (у даному випадку мозок), або продукти їхньої переробки (м'ясо-кісткове борошно), призводить до продукування антитіл

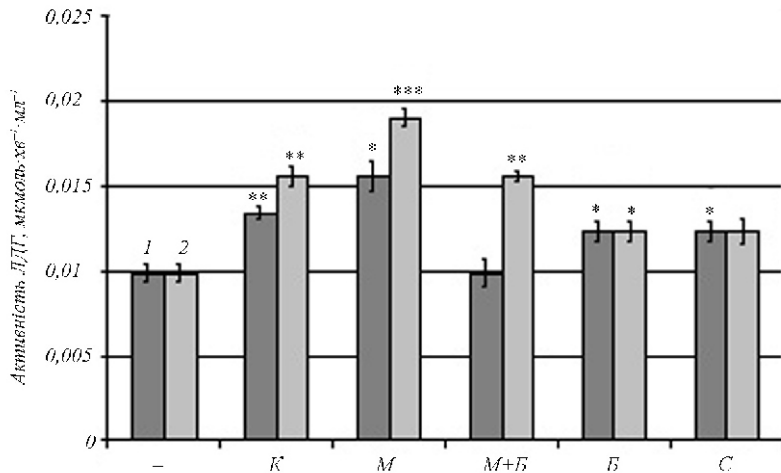


Рис. 6. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі L1210 за впливу препаратів IgG мишей, що перебували на різних раціонах; K, M, M + B, B, C – див. рис. 1. Дані порівнювали з контролем (без дії IgG) на 24-ту (1) та 48-му (2) год відповідно; *р 0,05; **р 0,01; ***р 0,001

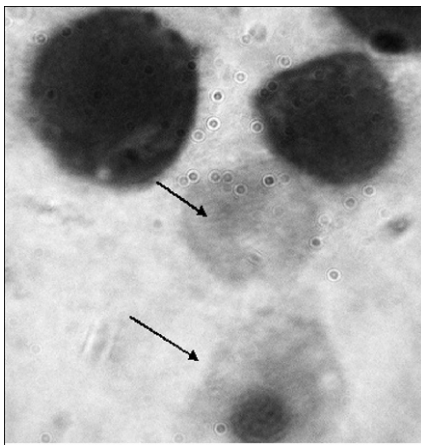


Рис. 7. Клітини лінії L1210 за впливу IgG миші, якій згодували мозок ВРХ. Фарбування за Романовським-Гімза. Стрілками показано некротичні клітини. Підраховано 250 клітин у різних полях зору під мікроскопом. При дії IgG протягом 24 год кількість клітин із ознаками некрозу цієї дослідної групи складала $24 \pm 5\%$

класу IgG, здатних індукувати загибель клітин внаслідок некрозу. Присутність анти-ДНК антитіл у препаратах IgG, очищених із сироватки крові піддослідних тварин, вказує на наявність автоімунних процесів у їхньому організмі. Встановлено, що анти-ДНК антитіла можуть індукувати апоптоз клітин ссавців *in vitro* [12]. Це дозволяє нам припустити, що приріст клітин із фрагментованою ДНК під дією препаратів IgG піддослідних тварин може бути пов'язаний з проапоптичною активністю зазначених антитіл. Хоча природа антитіл, здатних індукувати некроз клітин *in vitro*, та механізм їхньої дії на ці клітини залишаються нез'ясованими, можна спрогнозувати, що їхня присутність в організмі

піддослідних тварин відіграє суттєву роль у розвитку автоімунних процесів. На відміну від апоптозу при некрозі відбувається вивільнення у позаклітинний простір (кровотік, лімфа, цереброспінальна рідина) значної кількості внутрішньоклітинних білків, які є потенційними автоантигенами [23, 24]. У разі синергічної дії чужорідних антигенів, структурно спорідненими з цими автоантигенами, може порушуватися автоімунна толерантність організму, що призведе до розвитку автоімунних захворювань. Водночас незрозуміло, чому найвищий рівень таких антитіл виявлено у тварин, яким згодували мозок ВРХ. Ймовірно, що це пов'язано з присутністю у тканинах мозку великої кількості ліпідів, які при довготривалому згодуванні піддослідним тваринам можуть проявляти себе як ад'юванти.

M. R. Kozak, V. V. Vlizlo, Y. Y. Kit, R. S. Stoika

Induction of apoptosis and necrosis in leukemic cells by purified IgG of blood serum of mice which were fed with cattle brain for a long time

Summary

IgG preparations of mice under study were tested for their ability to induce death of cells of L1210 line of murine leukemia. The highest level of cytotoxic activity was found at affecting cells with IgG of mice that were additionally fed with cattle brain. It was shown that the test cells were dying by both apoptosis (typical signs are destruction of DNA, revealed by the method of DNA-comets, condensation and fragmentation of chromatin, discovered by fluorescent microscopy of cells, stained with Hoechst 33342) and necrosis. The latter was estimated taking into account the level of lactate dehydrogenase activity, which appeared in cultural medium of L1210 cells, and by light microscopy after cell staining according to Romanovsky-Gimza.

Keywords: ration, immunoglobulins, cytotoxic activity, apoptosis, necrosis.

М. П. Козак, В. В. Влизло, Ю. Я. Кут, Р. С. Стойка

Индукция апоптоза и некроза лейкомиических клеток очищенными препаратами IgG сыворотки крови мышей, которым длительное время скармливали мозг крупного рогатого скота

Резюме

Исследовали свойства очищенных препаратов IgG мышей. Установлено, что все препараты IgG мышей индуцируют гибель клеток линии L1210 лейкомии мыши. Наивысший уровень цитотоксической активности обнаружен при влиянии IgG мышей, которым дополнительно к основному рациону скармливали мозг крупного рогатого скота. Гибель тест-клеток происходила как вследствие апоптоза (характерные признаки – разрушение ДНК, обнаруженное методом комет ДНК, конденсация и фрагментация хроматина, выявленные флуоресцентной микроскопией после окрашивания клеток красителем Hoechst 33342), так и из-за некроза. Последний оценивали по уровню активности лактатдегидрогеназы, высвобождаемой из разрушенных клеток линии L1210 в культуральную среду, и световой микроскопией после окрашивания клеток по Романовскому-Гимза.

Ключевые слова: рацион, иммуноглобулины, цитотоксическая активность, апоптоз, некроз.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Axelrad J.* An autoimmune response causes transmissible spongiform encephalopathies // *Med. Hypotheses.*–1998.–**50**.–P. 259–264.
2. *Engelstein R., Grigoriadis N., Greig N., Ovadia H., Gabizon R.* Inhibition of P53-related apoptosis had no effect on PrP(Sc) accumulation and prion disease incubation time // *Neurobiol. Dis.*–2005.–**18**, N 2.–P. 282–285.
3. *Giese A., Kretzschmar H. A.* Prion-induced neuronal damage – the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*–2001.–**253**.–P. 203–217.
4. *Castilla J., Hetz C., Soto C.* Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein // *Curr. Mol. Med.*–2004.–**4**, N 4.–P. 397–403.
5. *Kuwata K., Matumoto T., Cheng H., Nagayama K., James T. L., Roder H.* NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106–126 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–2003.–**100**, N 25.–P. 14790–14795.
6. *Liberski P. P., Gajdusek D. C., Brown P.* How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): neuronal autophagy revisited // *Acta Neurobiol. Exp.*–2002.–**62**.–P. 141–147.
7. *Marella M., Chabry J.* Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment // *J. Neurosci.*–2004.–**24**, N 3.–P. 620–627.
8. *Andrievskaia O., McRae H., Elmgren C., Huang H., Balachandran A., Nielsen K.* Generation of antibodies against

- bovine recombinant prion protein in various strains of mice // *Clin. Vaccine Immunol.*–2006.–**1**.–P. 98–105.
9. *Zhu B. T.* Human and animal spongiform encephalopathies are the result of chronic autoimmune attack in the CNS: a novel medical theory supported by overwhelming experimental evidence // *Histol. Histopathol.*–2005.–**20**.–P. 575–592.
10. *Ebringer A., Rashid T., Jawad N., Wilson C., Thompson E. J., Ettelaie C.* From rabies to transmissible spongiform encephalopathies: an immune-mediated microbial trigger involving molecular mimicry could be the answer // *Med. Hypoth.*–2007.–**68**, N 1.–P. 113–124.
11. *Paraf A.* An immunological approach to prion diseases // *Med. Hypoth.*–1998.–**50**.–P. 85–90.
12. *Lim P.-L., Zouali M.* Pathogenic autoantibodies: Emerging insights into tissue injury // *Immunol. Lett.*–2006.–**103**.–P. 17–26.
13. *Gabibov A. G., Ponomarenko N. A., Tretyak E. B., Paltsev A., Suchkov S. V.* Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine // *Autoimmun. Rev.*–2006.–**5**.–P. 324–330.
14. *Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля.*–М.: Медицина, 1987.–390 с.
15. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*–1970.–**227**.–P. 680–685.
16. *Микроскопическая техника / Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Петрова.*–М.: Медицина, 1996.–544 с.
17. *Chen Q., Liu W., Guo X., Li Y., Guo Z.* Biphasic effect of aspirin on apoptosis of bovine vascular endothelial cells and its molecular mechanism // *Acta Pharmacol. Sin.*–2007.–**28**, N 3.–P. 353–358.
18. *Руководство по лабораторным методам исследования / Под ред. Л. Г. Смирновой, Е. А. Кост.*–М.: Медгиз, 1950.–23 с.
19. *Камінський В. О., Луцик М. Д., Стойка Р. С.* Аналіз фрагментації ДНК індивідуальних клітин методом гелю-мікроелектрофорезу: модифікація фарбування солями срібла для одержання постійних препаратів // *Укр. біохім. журн.*–2005.–**77**, № 6.–С. 105–108.
20. *Mori S., Watanabe W.* A colorimetric LDH assay for the titration of infectivity and the evaluation of anti-viral activity against ortho- and paramyxoviruses // *J. Exp. Med.*–1995.–**177**.–P. 315–325.
21. *Фільченков О. О., Стойка Р. С.* Апоптоз і рак.–Тернопіль: Укрмедкнига, 2006.–523 с.
22. *Wiegele G., Brandis M., Zimmerhackl L. B.* Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK) // *Nephrol. Dial. Transplant.*–1998.–**13**.–P. 1158–1167.
23. *Поletaев А. Б.* Иммунологический гомункулус (иммукулус) в норме и при патологии // *Биохимия.*– 2002.–**67**, № 5.–С. 721–731.
24. *Поletaев А. Б., Алферова В. В., Абросимова А. А., Комиссарова И. А., Соколов М. А., Гусев Е. И.* Естественные нейротропные аутоантитела и патология нервной системы // *Нейроиммунология.*–2003.–**1**.–С. 11–17.

УДК 577.083.37:084.1:085.23
Надійшла до редакції 20.04.07