

Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза*

Манских В.Н.

Morphological methods of verification and quantitative estimation of apoptosis

Manskikh V.N.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Манских В.Н.

В обзоре рассмотрены существующие методические подходы к верификации АСК (апоптотической смерти клеток), основанные на изучении морфологии гнущихся клеток: рутинная световая и электронная микроскопия, флуоресцентно-микроскопическое исследование, выявление фрагментации ДНК *in situ* и т.д., обсуждаются основные структурные отличия некроза от апоптоза в связи с патофизиологией этих процессов и значимость конкретных морфологических изменений в дифференциальной диагностике типа клеточной смерти. Показана относительность существующих критериев АСК, многие из которых являются классическими признаками состояний клеток, ранее обозначаемых как некробиоз и коагуляционный некроз, и проанализированы причины некоторых связанных с этим обстоятельством противоречий, имеющих в литературе, посвященной морфологии АСК.

Ключевые слова: апоптоз, некроз, морфология смерти клеток.

In the review the existent methodic approaches to the verification of ACD (apoptotic cell death) based on the dying cell morphology study (routine light and electron microscopy, luminescent microscopic examination, DNA fragmentation reveal *in situ* and so on) have been observed, the main structural differences between necrosis and apoptosis in connection with the pathophysiology of these processes and the significance of specific morphological changes in differential diagnostics of cell death type have been discussed. It has been demonstrated the relativity of the existing ACD criterions, many of them were classic characteristics of the cell states, the former necrobiosis and coagulation necrosis. The causes of some misunderstandings, connected with this circumstance, in literature devoted to the ACD morphology, have been analyzed.

Key words: apoptosis, necrosis, cell death morphology.

УДК 611-018.1-036.8

В современной литературе имеется множество обзорных и оригинальных работ, посвященных изучению механизма апоптотической смерти клеток (АСК), тогда как методические подходы к ее идентификации, несмотря на большое их разнообразие, освещены относительно скудно. Этот раздел обычно переключивается из одного обзора в другой и, как правило, содержит самые общие замечания. Между тем потребность в критической систематизации этих данных совершенно очевидна ввиду того огромного многообразия морфологических критериев и методов, обла-

дающих неодинаковой эффективностью и специфичностью, которое создает большие затруднения при сравнении результа-

тов, полученных разными исследователями. Это обстоятельство порождает большую терминологическую и фактологическую путаницу, которая имеется в современной литературе и причиной которой является некритичное отношение к дифференциальной диагностике некроза и апоптоза. Нередко в публикациях встречаются высказывания типа «некроз с образованием так называемых апоптотических телец» [9] или «апоптоз — вариант некроза» [29].

В настоящей работе сделана попытка критически рассмотреть и систематизировать существующие критерии и методические подходы к идентификации апоптотической смерти клеток.

Все методы морфологической идентификации АСК можно подразделить на следующие группы:

1) рутинное свето-микроскопическое исследование с использованием обычных методов фиксации и окрашивания или способов, селективно выявляющих пикнотизированный хроматин. Сюда относятся также методы с использованием витальных красителей;

2) флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуорохромов, включая и проточную цитофотометрию;

3) электронно-микроскопические методы;

4) выявление олигонуклеосомной деградации ДНК *in situ*;

5) иммуногистохимическое выявление белков-маркеров, участвующих в запуске АСК.

1. Рутинная световая микроскопия

Изучение АСК на окрашенных стандартными способами препаратах применяется очень широко ввиду относительной простоты и дешевизны этих методов.

С целью учета апоптоза в клеточной взвеси нередко используют подсчет апоптотических телец в камере Горяева—Тома с добавлением небольшого количества растворов витальных красителей — нейтрального красного или трипанового синего. Критериями отличия АСК от некроза выступают распад клеток на фрагменты, содержащие гранулярные отмишивания красителя и не имеющие диффузного прокрашивания цитоплазмы [1]. Метод основан на том, что, в отличие от некроза, при АСК мембранные структуры клеток

остаются неповрежденными (т.е. фактически апоптотические тельца являются «живыми» образованиями), что препятствует распространению красителя в цитозоле [1]. Низкая эффективность этого метода связана, с одной стороны, с незначительной длительностью специфичной для апоптоза стадии фрагментации клеток (всего 1—1,5 ч [23]), а с другой стороны, с трудностями изучения в данных условиях морфологии погибающих клеток и апоптотических телец даже при применении фазового контраста, вследствие чего их не всегда возможно отличить от постороннего детрита.

Оценку АСК проводят и на фиксированных препаратах-мазках и гистологических срезах. Методика фиксации особого значения не имеет, все же предпочтительнее смеси, сохраняющие тонкую структуру ядра клетки. Обычно для мазков применяют этанол или метанол, а для срезов — смеси Карнуа, Боуэна, растворы формалина. Для окраски нередко используют стандартные общие методы — азур-эозин по Романовскому—Гимзе, гематоксилин-эозин и т.д. Однако в связи с тем, что при апоптозе наиболее характерными считаются изменения морфологии ядра, некоторые авторы предпочитают использовать селективные методики окраски хроматина. Так, в работе Ю.Е. Квачевой [9] для выявления апоптотических изменений в миелокариоцитах костного мозга при лучевой болезни использовалась традиционная окраска на ДНК по Фельгену—Россенбеку. В. Moser [39] предложен специальный метод выявления апоптоза селективной импрегнацией конденсированного хроматина $AgNO_3$ с этенамином на эмпирически подобранных условиях. Этот метод использовался для выявления апоптоза в спленocyтах [27] и саркоматозных перевиваемых опухолях [26], причем возможно производить количественную оценку АСК с помощью автоматического компьютерного анализа изображения [27].

Полученные при подсчете апоптотически измененных клеток результаты выражают в виде так называемого апоптотического индекса (IA). Число подсчитанных клеток, необходимое для получения достоверных результатов, зависит от объекта исследования. Например, для переви-

ваемой саркомы М1 оно составляет 3 тыс. [26]. Для статистической обработки результатов употребляют разнообразные методы параметрической и непараметрической статистики – критерии Стьюдента [9, 19, 26, 28], Вилкоксона [24] и др., выбор которых зависит от конкретных задач исследования.

С этой целью используют и специальные стандартные пакеты программ, например, пакет LYSYS II («Becton Dickinson Immunocytometry system») [7].

Что касается критериев АСК, выявляемых на рутинно окрашенных препаратах, то нужно отметить не только большое их разнообразие, но и подчас пренебрежительное отношение некоторых авторов к этому моменту при изложении методики исследования, которое нередко ограничивается указаниями типа «апоптоз выявляли микроскопическими методами, а также по степени деградации хроматина» [28]. Ниже будут рассмотрены наиболее часто используемые критерии верификации АСК.

Прежде всего обращается внимание на следующие изменения морфологии ядра:

1. *Маргинация хроматина*. Признак, который упоминается большинством исследователей [1—3, 5—14, 20, 21, 23, 28, 30, 34, 37, 39—42] и считается абсолютно специфичным для АСК, но который не всегда удается бесспорно выявить на окрашенных обзорными методами препаратах. Сущность его заключается в концентрации хроматина по периферии ядра в виде полусфер или глыбок, иногда принимающих форму полумесяца [1, 23]. Ранее такое состояние ядра клетки обозначали как «гиперхроматоз ядерной оболочки» [2]. Некоторые авторы считают аналогом маргинации хроматина появление вакуолей в ядре [2], хотя известно, что подобная вакуолизация ядра встречается и при некрозе.

2. *Неровность контуров ядра*. Считается, что ядро на определенной стадии апоптоза приобретает лопастный вид, далее происходит его коллапс и распад на микроядра [1—3, 6, 8—14, 19—27, 29—31, 34—37, 40, 41, 43]. Этот процесс зачастую называют кариорексисом, хотя остается неясным, насколько процесс специфичен для апоптоза и в чем заключаются его отличия от аналогичного яв-

ления, представляющего классический признак коагуляционного некроза. Сама по себе неровность контуров ядра не является специфическим признаком апоптоза и может выявляться при повышенной метаболической активности клетки.

3. *Пикноз (конденсация) хроматина*. Несмотря на то, что этому признаку отводится ведущая роль при диагностике АСК, его специфичность для апоптоза (как и специфичность часто сопровождающего пикноз кариорексиса) признается далеко не всеми исследователями. Одни авторы относят кариопикноз, как и кариорексис, к процессам, характерным только для АСК [14, 23], другие указывают, что аналогичные явления имеют место и при некрозе [6, 9, 43]. Имеются указания, что отличительным признаком некроза служит «пятнистый» вид ядерного хроматина, т.е. наличие явлений кариолизиса [2, 10, 22, 23]. Пикноз ядра связывают со специфической межнуклеосомной деградацией хроматина, хотя такие же изменения могут наблюдаться при крупномолекулярной нарезке ДНК, имеющей место на ранних стадиях апоптоза, но не считающейся прерогативой АСК [9, 23, 42]. Объявить пикноз абсолютным верификационным признаком апоптоза не позволяет, по-видимому, то обстоятельство, что картины пикнотизации ядер наблюдаются при большом числе патологических процессов, сопровождающихся дистрофическими изменениями клеток. Такого рода явления классически принято квалифицировать как критерии коагуляционного некроза [2, 6, 9, 10, 11, 29, 43]. Именно в связи с этим на ранних этапах развития учения об АСК ее часто трактовали как «моноцеллюлярный коагуляционный некроз», особенно по отношению к апоптозу гепатоцитов — телец Каунсильмена [2, 22]. Поскольку в настоящее время эти образования представляют собой бесспорный пример АСК, указанное обстоятельство иногда служит причиной противоречий и высказываний некоторых авторов об общности природы коагуляционного некроза и апоптоза [2]. Признание пикноза специфическим признаком АСК обесмысливает выделение коагуляционного варианта некроза, а вместе с тем ставит под сомнение биологическую сущность апоптоза как программируемой смерти, поскольку в этом слу-

чае некротическая гибель клеток (по сути — колликативный некроз) окажется чрезвычайно редким явлением и программируемой окажется клеточная смерть едва ли не при всех дистрофических процессах. Именно такая ситуация имеет место в настоящее время: в литературе последних лет, посвященной процессам гибели клеточных элементов, почти исчезли упоминания о некрозе и практически любая клеточная смерть (особенно в культуре *in vitro*) трактуется как апоптоз. Следование формальным морфологическим признакам (пикноз ядра и фрагментация клеток) привело к тому, что к числу апоптотических телец некоторые авторы причисляют зрелые эритроциты и даже тромбоциты [19]. Очевидная ошибочность таких заключений хорошо иллюстрирует непригодность пикнотических изменений ядер как абсолютного верификационного признака апоптоза.

Цитоплазматические изменения менее характерны для АСК. Обычно таковыми считаются:

1. *Изменение окрашивания цитоплазмы*, появление базофилии на ранних стадиях АСК (гибнущие клетки) или эозинофилии (апоптотические тельца) [2, 10, 11, 23]. Такие изменения связывают, с одной стороны, с сохранением синтеза белка при апоптозе, а с другой — с увеличением активности трансглутаминазы, которое приводит к сгущению цитоплазмы [1, 2, 10, 23, 34, 37, 41]. Эти биохимические признаки отличают апоптоз от некроза, однако их морфологическое выражение — изменение окраски цитоплазмы — не является характерным для АСК, поскольку изменения их могут быть связаны с состоянием метаболизма клетки и обычно используются лишь как дополнительный критерий.

2. *Вакуолизация цитоплазмы*, причиной которой является дилатация гладкой эндоплазматической сети (ЭПС) [2, 7, 10, 23]. Это явление характерно для ранней стадии апоптоза, но, несмотря на его постоянство, малоприспособно для верификации АСК, так как данная фаза апоптоза весьма кратковременна [10], а формирующиеся вакуоли неотличимы от наблюдаемых при дистрофических состояниях. Именно в связи с этим некоторые авторы ранее рассматривали баллонную дистрофию как проявление АСК [2]. Физио-

логически вакуолизация цитоплазмы при апоптозе обусловлена выведением из цитоплазмы жидкости, что необходимо для ее компактизации при действии трансглутаминазы [1, 2, 10, 12].

3. *Изменение контуров и фрагментация клеток*. На ранних стадиях АСК наблюдается округление контуров и уменьшение размеров клеток, потеря ими межклеточных контактов. Далее на клеточной поверхности появляются вдавления и выпячивания, после чего клетка распадается на апоптотические тельца [1—3, 7—14, 19, 20, 23—27 и др.]. Эти тельца существуют от нескольких минут до 1 ч. *In vivo* их элиминация сопряжена с рецептор-зависимым фагоцитозом макрофагами или окружающими паренхиматозными клетками [1, 10, 22, 23, 34, 43]. Если фагоцитоз почему-либо не происходит (что имеет место *in vitro*), то апоптотические тельца подвергаются вторичным некротическим изменениям, обращаясь в детрит, что затрудняет их верификацию и количественный учет [1, 2, 23].

На гистологических препаратах, где сохранена топография тканевых структур, дополнительным критерием служит отсутствие воспалительной реакции, а также то обстоятельство, что апоптотические процессы всегда разворачиваются на уровне индивидуальных клеток [1, 2, 10, 23, 34, 37, 41, 43]. Однако эти критерии очень относительны, поскольку апоптоз имеет место и в очаге воспаления [14—18, 22] и может носить массовый характер, как в случае гибели лимфоцитов в тимусе при действии глюкокортикоидов [22]. Имеются указания на то, что в срезах АСК может проявляться в виде так называемых темных клеток [2]. Такого рода изменения встречаются среди нейронов после травматического воздействия, а также в опухолевых клетках. В отличие от типичных изменений при АСК, в темных клетках отсутствует резко выраженная маргинация хроматина и вакуолизация ядер. Эти клетки имеют вогнутые контуры. Другие признаки этих клеток соответствуют таковым при АСК. Причиной появления такой аберрации апоптоза считается сдавление гибнущих клеток окружающей тканью [2].

2. Флюоресцентная микроскопия

Этот метод часто используется для выявления АСК. Исследуют как витально окрашенные клетки во взвеси [24], так и фиксированные препараты. Для фиксации используют раствор параформальдегида в 70%-м этаноле или смесь Карнуа. Окрашивание производится с использованием флюорохромов, специфически связывающихся с ДНК: DAPI [13], Хехст 33258 [16, 20], акридинового оранжевого [24, 35, 38] и бромистого этидия [5, 24]. В случае витального окрашивания растворы указанных красителей добавляют к клеточной взвеси. Согласно указаниям И.И. Фридлянской и соавт. [24], используя смесь бромистого этидия и акридинового оранжевого в условиях витальной окраски, можно производить выявление и количественный учет живых, некротизированных и подвергающихся апоптозу клеток. Однако из этой работы остается неясным, какие критерии в данном случае могут быть использованы для оценки состояния клеточных элементов. Обычно признаком АСК при использовании флюоресцентной микроскопии служит выявление ярко светящегося конденсированного хроматина. В связи с этим по отношению к данному методу справедливо все, что было сказано выше о верификационном значении изменений ядра по типу рексиса и пикноза при АСК.

Совмещая обработку ДНК-специфическими флюорохромами с применением проточной цитофотометрии, производят количественный учет АПС в клеточной взвеси. Чаще всего для этой цели используют обработку йодидом пропидия. Диагностическим критерием в этом случае служит обнаружение на ДНК-гистограмме дополнительного пика, свидетельствующего о наличии гиподиплоидных клеток [14, 15, 17, 21]. Однако известно, что гиподиплоидия отнюдь не является специфическим признаком апоптоза, при обработке мутагенами число таких клеток может составлять более 30% популяции, что затрудняет оценку АСК указанным методом. Некоторое применение находят также методы, с помощью которых производится оценка состояния цитоплазматической мембраны клетки, а именно — ее проницаемости при окраске аннексином V, специфически связывающегося с остатками фосфатидилсерина мембраны апоп-

тозных клеток с последующей цитофотометрией [17, 18]. В то же время хорошо известно, что повреждение мембран фосфолипазами (прежде всего фосфолипазой A2) и увеличение их проницаемости является неспецифической реакцией клетки на действие повреждающих агентов, морфологически выражающееся в виде так называемого некробиоза [6, 22].

3. Электронная микроскопия

Большинство электронно-микроскопических признаков АСК составляют те же изменения, которые выявляются при световой микроскопии. Ведущее значение аналогично придается морфологии ядерных структур. Вместе с этим существует ряд более тонких ультраструктурных изменений, характеризующих АСК и отличающих ее от некроза. В первую очередь к ним относятся изменения цитолеммы и поверхностных структур клетки. Вначале происходит утрата микроворсинок и десмосом, затем появляются выпячивания и пузыри на мембране, получившие в англоязычной литературе название блеббингов [23]. При этом сама цитолемма и мембраны органоидов остаются неповрежденными вплоть до фагоцитоза или вторичного некроза апоптотических телец [1, 2, 8, 10, 23, 30, 34, 41]. Митохондрии не набухают (как это происходит при некрозе), рибосомы концентрируются в кристаллоидные структуры, под мембраной появляются параллельные пучки филаментов. В ядре обнаруживаются транскрипционные комплексы, поступающие из ядрышек и формирующие осмиофильные тельца. Поры сохраняются лишь в тех участках оболочки ядра, где отсутствует маргинация хроматина [10]. ЭПС после кратковременной дилатации образует контакты с плазмолеммой (считается, что они имеют значение для последующего фагоцитоза апоптотических тел), далее каналцы гранулярного ретикулула формируют кластеры и фрагментируются [2]. В целом электронная микроскопия считается более надежным способом выявления апоптоза по сравнению со световой [10, 23, 43].

4. Выявление олигонуклеосомной деградаци ДНК *in situ*

Этот метод считается самым надежным и специфическим способом выявления АСК, поскольку направлен на верификацию основного феномена — распада ДНК под действием Mg^{2+}/Ca^{2+} -зависимых эндонуклеаз с образованием фрагментов, размеры которых кратны размеру одной нуклеосомы (186 азотистых оснований). Для выявления этого процесса применяют так называемый TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotid Transferase — mediated dUTP — biotin Nick — End Labeling), или терминальное дезоксиуридиновое мечение концов [23]. Суть метода заключается в специфическом связывании с 3'-концом разорванной нити ДНК дУТФ, меченного биотином. Такое связывание осуществляется ферментом дезоксирибонуклеотидтрансферазой. Метод считается особенно ценным в тех случаях, когда нужно выявить АСК в тканях, содержащих небольшое число гибнущих клеток, например, в атеросклеротической бляшке [36] или иммунocyтaх tunica prorgia ротовой полости при пародонтозе [30]. Метод допускает параллельное проведение на одном и том же срезе иммуногистохимических и некоторых гистохимических реакций, например, окраску хромогранином А [33]. Согласно указаниям Н.Т. Райхлина и А.Н. Райхлина [23], этот способ мало пригоден для выявления ранних стадий апоптоза, когда наблюдается крупномолекулярная деградация ДНК. В этот момент наступают отчетливые ультраструктурные изменения, но количество свободных 3'-концов еще недостаточно для обнаружения их TUNEL-методом. Все же стоит отметить, что олигонуклеосомная деградация хроматина выявляется значительно раньше по сравнению с признаками АСК, выявляемыми при световой микроскопии [7]. Существуют и другие, весьма веские замечания относительно специфичности и надежности TUNEL-метода. С одной стороны, в части TUNEL-положительных ядер удается выявить протекание процессов транскрипции и сплайсинга, что невозможно при наступлении АСК [7]. С другой стороны, существует целый ряд ферментов, не имеющих отношения к системе апоптоза и в то же время способных вызывать олигонуклеосомную деградацию хроматина. К числу таких энзимов относится бактериальная ДНКаза, выделенная из

Micrococcus [4]. Этот факт нужно учитывать и при контроле морфологических данных параллельным электрофоретическим исследованием состояния ДНК. Относительно последнего следует заметить, что доказательством наличия АСК может служить лишь выявление дискретной «лесенки» с размером фрагментов, кратным 200 парам азотистых оснований (одной нуклеосоме), что подтверждается с помощью маркеров молекулярной массы [24, 32, 42]. Необходимость такого контроля обусловлена тем, что при разрушении ДНК с помощью дезоксирибонуклеаз, наблюдаемом при некрозе, также возможно выявление «лесенки», однако не олигонуклеосомной, а олигонуклеотидной, с массой фрагментов, кратной одному основанию [4]. В ряде работ подобные явления некорректно трактовались как АСК [7, 39]. Все эти обстоятельства вынуждают в конечном счете даже при верификации АСК TUNEL-методом и ДНК-электрофорезом контролировать полученные результаты изучением светооптической морфологии клеток с использованием вышеуказанных критериев [5, 23, 36].

5. Иммуногистохимическое исследование

С помощью этой группы методов определяют наличие протеинов, составляющих каскад биохимических процессов, приводящих к АСК. В некоторых случаях к ним относят и TUNEL-метод [23], что, по сути, неверно, так как последний не включает использование взаимодействий антиген — антитело. На основании иммуногистохимических данных делают выводы о возможности вступления тех или иных клеточных элементов в апоптоз, но не об уровне этого процесса в популяции клеток [15]. Известно, например, что такой важный фактор АСК, как каспаза 3, может быть выявлен в нейтрофилах, у которых экспериментально заблокирована возможность развития апоптотических процессов [17]. Обычно используют поли- и моноклональные антитела к протеинам p53 — ДО-7, РАВ-1801 (для выявления wt p53 и mt p53), РАВ-240 (для определения только mt p53) и др. В методическом плане считается более надежным выявление белка, мутантного mt p53, поскольку его период полураспада значительно больше

(24 ч) по сравнению с диким wt p53 (20 мин), из-за чего концентрация последнего может быть ниже чувствительности иммуногистохимических методов [23]. Кроме антител к протеину p53 используют иммуноглобулины к другим ключевым точкам генетической программы АСК — bcl-2, bax, MPM-2, RB, Fas (моноклональные антитела ICO-160, анти-Fas, анти-АРО-1), циклинам, каспазам и т.д.

Заключение

Произведенный обзор основных морфологических подходов к оценке АСК свидетельствует, что ни один из существующих методов выявления апоптоза, включая TUNEL-метод, не обладают абсолютной специфичностью и надежностью. Особенно это касается светооптических критериев, которые идентичны классическим признакам коагуляционного некроза. В связи с этим приходится констатировать, что нередко вывод о наличии АСК делается на основании каузальных соображений, когда гипотетически предполагается, что данное воздействие по некоторым причинам (физиологической концентрации и т.д.) не способно вызвать некротические изменения. Это обстоятельство указывает на необходимость ревизии и уточнения морфологических признаков АСК и, возможно, потребует пересмотра вопроса о биологической сущности и механизмах некроза и апоптоза. Если подойти к проблеме формально, то наиболее надежным критерием наличия апоптоза является обнаружение *каспазозависимой олигонуклеосомной дегградации хроматина при сохранении целостности мембранных структур клеток*. Практически же для повышения достоверности получаемых данных прибегают к использованию нескольких методических приемов, основанных на различных подходах.

Литература

1. *Белушкина И.И., Северин С.Е.* Молекулярные основы патологии апоптоза // *Арх. пат.* 2001. Т. 63. < 1. С. 51—60.
2. *Бережков Н.В.* Апоптоз — управляемая смерть клетки // *Арх. анат., гистол. и эмбриол.* 1990. Т. 99. < 12. С. 68—75.
3. *Владимирская Е.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г.* Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // *Гематол. и трансфузиол.* 1997. Т. 42. С. 4—9.
4. *Гилберт С.* Биология развития. М.: Мир, 1993. 235 с.
5. *Гинкул Л.Б., Александрова С.А., Арцабашева И.В., Швембергер И.Н.* Клональный анализ гетерогенности опухолевых гепатоцитов // *Вопр. онкол.* 1998. Т. 47. < 4. С. 456—460.
6. *Гистология* // Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, В.Ф. Котовский и др. / Под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юриной. М.: Медицина, 2001. 744 с.
7. *Дудич Е.И., Семенкова Л.Н., Дудич И.В. и др.* Изучение апоптоза раковых клеток, индуцированного α -фетопротееином // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2000. Т. 130. < 12. С. 604—612.
8. *Зарецкая А.И.* Электронно-микроскопический анализ апоптоза рака прямой кишки до и после облучения // *Арх. пат.* 1988. Т. 50. < 1. С. 46—52.
9. *Квачева Ю.Е.* Морфологические типы радиационно-индуцированной гибели клеток кроветворной ткани, ее биологическая суть и значимость на различных этапах развития острого радиационного поражения // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2002. Т. 42. < 10. С. 287—292.
10. *Коган Е.А.* Некроз. Лекции по общей патологической анатомии / Под ред. В.В. Серова, М.А. Пальцева. М.: Медицина, 1996. С. 78—90.
11. *Лонская И.А., Чернова О.А., Чернов В.М.* Два различных типа апоптоза в тимоцитах // *Цитология.* 2001. Т. 43. < 3. С. 244—249.
12. *Лукьянова К.Ю., Кулик Г.И., Чехун В.Ф.* Роль генов p53 и bcl-2 в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей // *Вопр. онкол.* 2000. Т. 46. < 2. С. 121—128.
13. *Лягузова М.С., Поспелов В.А., Кислякова Т.В.* Дифференцированные клетки тератокарциномы мыши линии F9 вступают в апоптоз при разрыве контакта с субстратом // *Цитология.* 2001. Т. 42. < 10. С. 955—962.
14. *Маянский Н.А., Заславская М.И., Маянский А.Н.* Апоптоз экссудативных нейтрофилов человека // *Иммунология.* 2000. Т. 22. < 2. С. 11—13.
15. *Маянский Н.А.* Субклеточное перераспределение bax и его слияние с митохондриями при спонтанном апоптозе нейтрофилов // *Иммунология.* 2001. Т. 22. < 6. С. 29—31.
16. *Маянский Н.А.* Действие липополисахаридов и УФ-облучения на регуляцию апоптоза нейтрофилов человека // *Иммунология.* 2001. Т. 22. < 2. С. 25—27.
17. *Маянский Н.А.* Состояние каспазы 3 при подавлении апоптоза нейтрофилов гранулоцитарно-макрофагальным КС // *Иммунология.* 2001. Т. 22. < 2. С. 22—25.
18. *Маянский Н.А.* Каспазозависимый механизм апоптоза нейтрофилов: апоптогенный эффект туморонекротического фактора α // *Иммунология.* 2002. Т. 23. < 1. С. 15—18.
19. *Михайлов В.М., Комаров С.А., Нилов В.К. и др.* Ультраструктурный и морфометрический анализ стадий апоптоза кардиомиоцитов мышечной MDX // *Цитология.* 2001. Т. 43. < 8. 729—735.
20. *Мошников А.Б., Мошников С.А., Афанасьев В.Н. и др.* Диметилсульберимат как специфический индуктор

- апоптоза трансформированных клеточных культур // Цитология. 2001. Т. 43. < 8. С. 747—753.
21. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеева М.И., Ярилина А.А. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. 1999. Т. 21. < 2. С. 20—23.
 22. Пальцев М.А. Морфология повреждения. Лекции по общей патологической анатомии / Под ред. В.В. Серова, М.А. Пальцева. М.: Медицина, 1996. С. 17—29.
 23. Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях // Вопр. онкол. 2002. Т. 48. < 2. С. 159—171.
 24. Фридлянская И.И., Демидов О.Н., Булатова М.М. Индукция апоптоза в клетках мышинной миеломы NS0/1, трансформированной геном основного белка теплового шока // Цитология. 2000. Т. 42. < 11. С. 1053—1509.
 25. Фильченков А.А. Стойка Р.С. Апоптоз: краткая история, молекулярные механизмы, методы выявления и возможное значение в онкологии // Эксперим. онкол. 1995. < 18. С. 435—448.
 26. Хавинсон В.Х., Южаков В.В., Кветной И.М., Малинин В.В. Влияние эпитагона на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М.1 // Вопр. онкол. 2001. Т. 47. < 4. С. 461—466.
 27. Хавинсон В.Х., Кветной И.М. Пептидные биорегуляторы ингибируют апоптоз // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2000. Т. 130. < 12. С. 657—659.
 28. Хансон К.П., Имянитов Е.Н., Посохов В.С., Розенберг О.А. Модификация чувствительности к апоптозу клеток асцитной карциномы Эрлиха путем трансфекции ДНК из тимоцитов // Вопр. онкол. 1998. Т. 44. < 6. С. 701—703.
 29. Цинзерлинг А.В., Цинзерлинг В.П. Патологическая анатомия. М.: Медицина, 1996. 370 с.
 30. Шаповалов В.Д., Михалева Л.М. Апоптоз и ультраструктурные изменения плазматических клеток собственной слизистой оболочки десны больных парадонтозом // Иммунология. 2002. Т. 23. < 2. С. 83—86.
 31. Afanasev V.N., Korol B.A., Mantsygin Yu.A. et al. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death // FEBS Lett. 1986. V. 194. P. 347—350.
 32. Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A. Apoptosis. The role of endonuclease // Amer. J. Path. 1990. V. 136. P. 593—608.
 33. Bonkhoff H., Fixemer T., Hansicker I., Remberger K. Simultaneous detection of DNA fragmentation (apoptosis), cell proliferation (MIB-1), and phenotype markers in routinely processed tissue sections // Virchows Archiv. 1999. V. 434. < 1. P. 71—73.
 34. Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo // J. Cell. Biochem. 1995. V. 58. P. 181—190.
 35. Horton J., Milner A., Horton T. et al. Apoptosis-specific protein (ASP) identified in apoptotic Xenopus thymus tumor cells // Dev. Immunol. 1998. V. 5. < 4. P. 333—348.
 36. Kochx M. Apoptosis in the atheroma // Arteriosclerosis, Tromb. and Vasc. Biol. 1998. < 18. P. 1519—1522.
 37. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis // Amer. J. Path. 1995. V. 146. P. 3—15.
 38. McMahan R., Jonson R.O., Ruben L.N., Clothier R.H. Apoptosis and the cell cycle in Xenopus laevis: PHA and PMA exposure of splenocytes // Immunol. Lett. 1999. V. 70. < 3. P. 179—183.
 39. Moser B. Silver stain for the detection of apoptosis at the light microscopy // Micr. Anat. 1995. V. 37. 27—29.
 40. Sarnaf C.E., Bowen I.D. Kinetic studies on a murine sarcoma and analysis of apoptosis // Brit. J. Cancer. 1986. V. 54. P. 989—998.
 41. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide // Science. 1995. V. 267. P. 1445—1449.
 42. Walker P.R., Sikorska M. Endonuclease activities and DNA — degradation in apoptosis // Biochim. Cell Biol. 1994. V. 72. P. 615—623.
 43. Weedon D., Searl J., Kerr J.F. Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology // Am. J. Dermatopathol. 1979. V. 1. < 2. P. 133—144.

Поступила в редакцию 17.10.2003 г.