

Zofia Walter, Joanna Mankiewicz

APOPTOZA I METODY JEJ BADANIA

Apoptoza to jeden z typów śmierci komórki. Praca omawia morfologiczne i biochemiczne zmiany pojawiające się podczas „samobójstwa komórki”. Zostały opisane czynniki aktywujące ten proces oraz specyficzne geny, białka i enzymy pojawiające się w kolejnych etapach. Ponadto zostały przedstawione zalety i wady wybranych metod badawczych stosowanych w analizie zmian apoptotycznych.

WSTĘP

Apoptoza to programowana, aktywna śmierć komórki, nazywana śmiercią: fizjologiczną lub samobójczą, zależna od indukcji specyficznych genów. Termin ten został zapożyczony z języka greckiego, w którym oznacza opadanie płatków kwiatów lub liści [4, 40, 41]. Dokładnie pierwsza część wyrazu – *apo* opisuje pozorne wyciekanie umierających komórek do miejsc wokół nich, a *ptosis* odnosi się do usunięcia, zniknięcia komórek z tkanki [4].

Aktywna śmierć komórki towarzyszy organizmowi od początku jego rozwoju w okresie embriogenezy, morfogenezy i jest podstawą dla prawidłowego funkcjonowania dojrzałego organizmu. Przykładem może być ciągła wymiana komórek w tkankach proliferujących takich jak skóra, nabłonki [4, 33, 40]. Programowana śmierć jest niezbędna dla utrzymania prawidłowej homeostazy tkankowej, zapobiega rozrostom hiperplastycznym i neoplastycznym. Apoptoza decyduje o selekcji komórek posiadających niewłaściwy zestaw receptorów w układzie odpornościowym. Około 90–95% komórek umiera podczas dojrzewania tymocytów w grasicy oraz komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym [30, 37]. Poza tym programowana śmierć komórki związana jest z eliminacją blisko 50% komórek nerwowych w rozwijającym się mózgu [33]. W stanach patologicznych związanych z neurodegradacją procesowi apoptozy ulegają komórki nerwowe, co występuje przy chorobach Alzheimera, Huntingtona, Parkinsona, oraz przy zaburzeniach neuroroz-

wojowych związanych z autyzmem czy schizofrenią [33, 37]. Podobnie limfocyty CD^{4+} u ludzi chorych na AIDS umierają poprzez programowaną śmierć komórki [37]. Komórki nowotworowe również umierają śmiercią samobójczą wywoływaną spontanicznie lub indukowaną przez promieniowanie jonizujące i cytotoksyny [1, 27, 28, 37]. Oprócz tego apoptozę wywołują kancerogeny np.: $K_2Cr_2O_7$ [6, 16]. Niektóre leki przeciwnowotworowe aktywują proces apoptozy w zaatakowanych komórkach, należą do nich pochodne związków platyny takie jak CDDP (ang. *cis* diammine dichloro platinum); JM149 (ang. *cis* ammine dichloro (cyclohexylamine) *trans* dihydroxo platinum (IV)), JM335 (ang. *trans* ammine dichloro (cyclohexylamine) dihydroxo platinum (IV)), [17, 23, 26], leki alkilujące, winkrystyna, metatreksat, etopozyd, niektóre antymetabolity, deksametazon, cykloheksamid.

ZMIANY MORFOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE ZACHODZĄCE W KOMÓRCE PODCZAS PROCESU APOPTOZY

Podczas apoptotycznej śmierci komórki w pierwszym etapie dochodzi do obkurczenia komórki co wiąże się z aktywacją enzymów proteolitycznych, błona komórkowa traci swą asymetryczną strukturę co związane jest z przemieszczeniem fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony. Głównym miejscem ataku jest jądro komórkowe gdzie zagęszczeniu i marginalizacji ulega chromatyna tworząc tzw. „półksiężycy” umiejscowione przy błonie jądrowej [4, 7, 21]. Ważną jednostką biorącą udział w apoptozie są również mitochondria – centra energetyczne komórki, w których dochodzi do utraty potencjału transmembranowego PT [9]. Spadek potencjału jest jednym z wcześniejszych sygnałów apoptotycznych powiązanych ze wzrostem produkcji białka Bcl-2 [10]. W końcowej części pierwszego etapu aktywnej śmierci komórki dochodzi do fragmentacji DNA. Chromatyna ulega wielostopniowym podziałom, zależnym od aktywności endonukleaz. Pierwszym sygnałem jest fragmentacja na długie odcinki 700, 300, kilo par zasad (kpz) [2, 8, 18, 34, 39, 43]. Odcinki o długości 300 kpz odpowiadają heksamerycznym pętłom, znanym jako struktura rozety [34]. Następnie dochodzi do powstania mniejszych fragmentów o długości 50 kpz odpowiadającym pojedynczym pętłom DNA [34]. W późniejszym okresie może dojść do fragmentacji na regularne odcinki o długości 200 par zasad (pz), widoczne podczas analizy metodami konwencjonalnej elektroforezy na żelu agarozowym w postaci charakterystycznej „drabinki apoptotycznej” [4, 7, 37].

Drugi etap wiąże się z powstawaniem „ciałek apoptotycznych” poprzez wypuklanie się błony cytoplazmatycznej (aktywacja transferaz). „Ciała

apoptotyczne” zawierają dobrze zachowane składniki komórki oraz jądra komórkowego i są szybko usuwane z przestrzeni międzykomórkowej dzięki procesowi fagocytozy, przy udziale komórek żernych – makrofagów [4, 7]. Proces ten zapobiega powstawaniu stanu zapalnego, co powoduje minimalne zakłócenia struktury tkanki.

Podczas pierwszego etapu apoptozy: kurczenie się komórki, marginalizacja chromatyny może dojść do naprawy uszkodzeń, czyli cofnięcia procesu programowanej śmierci komórki. Po fragmentacji DNA komórka traci możliwość naprawy.

AKTYWATORY APOPTOZY

Apoptoza jako proces zapewniający utrzymanie prawidłowej homeostazy organizmu związana jest z działaniem wielu czynników środowiska wewnątrzkomórkowego (szok biologiczny). Do takich czynników wewnętrznych pobudzających proces programowanej śmierci komórki, ważnej przy np.: regulacji dojrzewania tymocytów w grasicy, należą glukokortykoidy – hormony sterydowe [30, 37]. Czynniki martwicy nowotworów (TNF- α) – produkowane przez makrofagi, (TNF- β) produkowane przez limfocyty regulują występowanie procesu apoptozy w limfocytach. Komórki B i T zawierają na swojej powierzchni receptory (TNFR1) dla czynnika TNF, których aktywację może hamować inhibitor apoptozy MnSOD [4, 5, 25, 33]. Kolejnym czynnikiem wewnętrznym aktywującym proces apoptozy jest receptor Fas (znany także jako APO-1 czy CD95). Należy on do I grupy białek błonowych limfocytów T [37], jest receptorem dla przeciwciał Fas/APS [4, 25, 33]. Również niedobór czynników wzrostu, może prowadzić do spadku ekspresji genów rodziny Bcl-2 oraz uaktywnienia genów takich jak *c-myc*, *p53* czy *bax* [5, 37].

Po aktywacji apoptozy w dalszym etapie sygnał przekazywany jest przy udziale kolejnych przekaźników – białek cytoplazmatycznych: FADD, MORT-1 (wiążą Fas) i TRADD (wiążą TNFR1) oraz ceramidów, co prowadzi do aktywacji rodziny białek ICE, a inaktywacji rodziny białek Bcl-2. Zwiększenie poziomu jonów Ca^{2+} w komórce zapewnia działanie enzymów z klas: endonukleaz, proteaz, transglutaminaz. Dochodzi do zmian morfologicznych i biochemicznych w komórce apoptotycznej. Tworzą się nowe markery powierzchniowe np.: kompleksy FasL/Fas i TNF/TNFR-1, co pobudza makrofagi do procesu fagocytozy, zapobiega to stanom zapalnym komórki.

AKTYWACJA GENÓW ZWIĄZANYCH Z PROCESEM APOPTOZY

Apoptoza jest procesem aktywnym, zależnym od indukcji i represji specyficznych genów. Geny uczestniczące w zmianach apoptotycznych możemy podzielić na: 1) mające związek tylko ze śmiercią programowaną, 2) biorące udział w innych procesach zachodzących w komórce.

Do pierwszej grupy należą geny: *ced-3*, *ced-4* i *ced-9* zidentyfikowane u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Geny *ced-3* i *ced-4* ulegają ekspresji w komórkach umierających śmiercią naturalną podczas procesu morfogenezy, kiedy dokładnie 131 komórek, z ogólnej liczby 1090, jest eliminowanych [4, 7, 33]. Odpowiednikiem genu *ced-3* u ssaków jest gen kodujący informację dla białka ICE (ang. *interleukin-1 β -converting enzyme*) należącego do grupy proteaz cysteinowych, odgrywających decydującą rolę podczas apoptozy. Gen *ced-4* jest ważny dla wiązania wapnia, co umożliwia aktywację proteaz, endonukleaz i transglutaminaz. Geny *ced-3* i *ced-4* działają przeciwstawnie do antyapoptotycznego genu *ced-9*, którego aktywacja ma ograniczać proces śmierci komórki, podobnie jak gen *bcl-2* u ssaków [7, 13, 15, 25, 32, 33].

Do wspólnej rodziny białek obok Bcl-2 należą również: Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 (podobnie jak Bcl-2 hamujące proces apoptozy) oraz Bax, Bik, Bak, Bad, Bcl-xs (aktywujące proces apoptozy). Białka te występują w formie heterodimerów np. Bcl-2, Bcl-xs. Podczas aktywacji procesu apoptozy pojawia się forma homodimerów np.: Bax\Bax, a odwrotnie kiedy występuje nadwyżka białek: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 powstają homodimery np.: Bcl-2\Bcl-2, co hamuje, ogranicza programowaną śmierć komórki [4, 5, 7, 25, 33]. Oprócz tego zmianie może ulec struktura białka kodowanego przez gen *bcl-x*. Białko Bcl-x podczas zmian apoptotycznych przyjmuje postać łańcucha krótszego w stosunku do formy dłuższej charakterystycznej dla procesu hamowania apoptozy.

Do drugiej grupy genów aktywnych nie tylko w procesie apoptozy należą protoonkogeny: *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, pełniące funkcję czynników transkrypcyjnych [36]. Również podwyższona ekspresja genu *p53* jest częstym induktorem programowanej śmierci komórki, np. w tymocytach [20, 24, 33, 35, 37, 42].

AKTYWACJA ENZYMÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ
W PROCESIE PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

Inicjacja apoptozy związana jest z aktywacją trzech grup enzymów: endonukleaz, proteaz i transglutaminaz. Napływ do wnętrza komórki jonów Ca^{2+} rozpoczyna proces samobójczej śmierci komórki.

Znane są trzy endonukleazy mogące brać udział w procesie apoptozy: NUC-18 i DNA-za I (zależne od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , ich działanie jest hamowane przez jony cynku) oraz DNA-za II [7, 11, 31, 32, 37]. Enzymy endonukleolityczne biorą udział w degradacji DNA (fragmenty: 700–30 kbp, 200–180 pz), ich działanie powoduje zrywanie wiązań internukleosomalnych.

Kolejną grupę enzymów biorących udział w apoptozie tworzą proteazy, które uczestniczą w proteolizie, niszczeniu cytoszkieletu co powoduje kurczenie się komórki. Ogólnie grupę tych proteaz cysteinowych oznaczono jako ICE, co łączy się z aktywacją $1-\beta$ interleukiny pośredniczącej w reakcjach związanych ze stanem zapalnym komórek. Obecnie wyróżniono w rodzinie proteaz dziesięć odrębnych białek – kaspaz (aspaz), należących do trzech podrodzin: kaspazy-1 (ICE), kaspazy-2 (ICH-1/Nedd), kaspazy-3 (CPP32/Y-AMA). Poszczególne kaspazy różnią się rodzajem substratów, np. dla kaspazy-1 substratem jest pro-IL 1β (pro-interleukina $1-\beta$) oraz pro-kaspaza 3 i 4; dla kaspazy-3 substratem jest PARP (polimeraza poli(ADP-rybozy)), pro-kaspaza 6 i 9 oraz SREBP 1 i 2 (czynnik przyłączający białko regulatorowe steroli); dla kaspazy-6 substratem jest PARP i lamina (A, B1/B2, C). Proteazy ICE występują w cytoplazmie w postaci nieaktywnej jako proenzymy, ich aktywacja wiąże się z pojawieniem czynnika apoptotycznego oraz inaktywacją białek Bcl-2 i Bcl-xL [4, 7, 21, 25, 33]. Inhibitorem proteaz ICE/CPP32/YAMA jest białko CrmA [5].

Za powstawanie wiązań krzyżowych pomiędzy białkami cytoplazmatycznymi, ich polimeryzację oraz tworzenie „ciałek apoptotycznych” odpowiedzialna jest trzecia grupa enzymów – transglutaminazy [10]. Enzymy te również biorą udział w stabilizacji i integrowaniu struktur komórkowych w powstających „ciałkach apoptotycznych” [29].

METODY BADAŃ APOPTOZY

Zmiany zachodzące w komórce apoptotycznej możemy badać stosując różne metody analizy morfologicznej i biochemicznej, biorąc pod uwagę całą populację komórek lub też pojedyncze komórki.

Analiza morfologiczna pojedynczych komórek wiąże się z obserwacją mikroskopową. Stosując różne techniki barwienia komórek np.: barwnikiem Giemsa lub błękitem trypanu, możemy obserwować w mikroskopie świetlnym (maksymalne powiększenie) lub elektronowym kondensację i marginalizację chromatyny oraz tworzenie się „ciałek apoptotycznych” [22]. Po zastosowaniu barwników fluorescencyjnych, np. oranż akrydyny – AO, jodek propidyny PI, lub aneksyny możemy obserwować tworzenie się „ciałek apoptotycznych” przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego [10, 22].

Kolejną techniką opartą na analizie pojedynczych komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego jest metoda TUNEL [22]. Polega ona na włączaniu biotynylowanej trójfosforodeoksyurydyny łącznie z terminalną deoksynukleotydylotransferazą TdT w miejsca pęknięć DNA.

Wymienione techniki są powszechnie stosowane przy analizie apoptozy, ale umożliwiają one jedynie obserwację wybranych pojedynczych komórek.

Bywają przypadki braku zmian morfologicznych w apoptotycznych komórkach, dlatego też obok analizy morfologicznej należy stosować analizę biochemiczną opartą na badaniu całych populacji komórek.

Degradację DNA możemy śledzić przy użyciu różnych technik elektroforetycznych. Analizę dużych fragmentów DNA: 700 kpz, 500 kpz, 300 kpz, 50 kpz umożliwia stosowanie elektroforezy pulsacyjnej PACE lub elektroforezy w odwróconym polu FIGE [2, 8, 18, 34, 39, 43]. Dalszą degradację DNA 200 pz związaną z powstawaniem „drabinki apoptotycznej” możemy badać stosując klasyczną elektroforezę na żelu agarozowym [4, 7, 40]. Analizę fragmentów DNA o długości 200 pz umożliwia również technika kometkowa, ale opiera się ona na analizie pojedynczych komórek. Należy podkreślić, że podczas apoptozy nie zawsze dochodzi do tworzenia się „drabinki apoptotycznej”, wówczas degradacja DNA zatrzymuje się na etapie tworzenia dużych fragmentów DNA.

Ponadto wymienione techniki elektroforetyczne wymagają dużej ilości komórek użytych do eksperymentu. Kolejnym problemem mogą być różne stadia rozwoju komórek w badanych populacjach.

Inną techniką opierającą się na analizie biochemicznej populacji komórek jest cytometria przepływowa [10, 12, 14, 19, 22]. Oparta na wykorzystaniu techniki laserowej oraz użyciu barwników fluorescencyjnych: oranżu akrydyny, jodku propidyny, aneksyny, co umożliwia śledzenie zmian w DNA, analizę specyficznych białek np.: Bcl-2, p53, onkoprotein, badanie zmian w potencjale transmembranowym PT w mitochondriach oraz zmian w błonach komórkowych (przemieszczanie się fosfatydyloseryny PS do zewnętrznej części błony komórkowej). Często podczas jednej analizy cytometrycznej po zastosowaniu mieszaniny barwników fluorescencyjnych możemy badać jednocześnie zmiany apoptotyczne zachodzące w różnych miejscach w komórce. Przykładem może być jednoczesne zastosowanie jodku propidyny PI i aneksyny, co umożliwia śledzenie zmian zachodzących zarówno w jądrze komórkowym – PI i błonie komórkowej – aneksyna. Wadą tej metody jest możliwość błędnej interpretacji wyników związana z analizą komórek znajdujących się w późnym stadium apoptozy, wówczas komórki mogą być potraktowane jako nekrotyczne (drugi rodzaj śmierci komórki).

Najnowszą techniką opartą na śledzeniu zmian morfologicznych w apoptotycznych komórkach jest wideomikroskopia [22]. Metoda ta polega na ciągłej obserwacji komórek przy użyciu wideomikroskopu, gdzie klatka

filmowa zmienia się co 3–5 min w przypadku populacji komórek lub co 10–20 s. w przypadku pojedynczych komórek. Jest to bardzo dokładna metoda umożliwiająca uchwycenie wszystkich etapów apoptozy, co nie jest możliwe w przypadku stosowania innych metod. Wadą tej metody jest potrzeba zapewnienia sterylnych warunków w pomieszczeniu doświadczalnym, odpowiedniej temperatury, wilgotności.

Opisane metody badań apoptozy uświadamiają konieczność stosowania złożonej analizy polegającej na jednoczesnej obserwacji morfologicznej i biochemicznej komórek.

LITERATURA

- [1] Bergstrom P., Johnsson A., Cavallin-Stahl E., Bergenheim T., Henriksson R. (1997), *Eur. J. Can.*, **33**, 153–159.
- [2] Bicknell G. R., Cohen G. M. (1995), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **207**, 40–47.
- [3] Blankenship L. J., Manning F. C. R., Orenstein J. M., Patierno S. R. (1994), *Tox. App. Pharmacol.*, **126**, 75–83.
- [4] Boyce B. F. (1996), *Principles of Bone Biology*, Academic Press, **53**, 739–753.
- [5] Bredesen D. E. (1995), *Ann. Neurol.*, **38**, 839–851.
- [6] Bridgewater L. C., Manning F. C. R., Patierno S. R. (1994), *Carcinogenesis*, **15**, 2421–2427.
- [7] Bromme H. J., Holtz J. (1996), *Mol. Cell. Biochem.*, **163/164**, 261–275.
- [8] Brown D. G., Sun X.-M., Cohen G. M. (1992), *J. Biol. Chem.*, **269**, 3037–3039.
- [9] Cohen G. M., Raffray M. (1997), *Pharmacol. Thr.*, **75**, 3, 155–177.
- [10] Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. (1997), *Cytometry*, **27**, 1–20.
- [11] Gaido M. L., Cidlowski J. A. (1991), *J. Biol. Chem.*, **226**, 18580–18585.
- [12] Gaal A., Bocsi J., Falus A., Szende B., Csaba G. (1997), *Life Sci.*, **61**, **23**, 339–342.
- [13] Hengartner M. O., Horvitz H. R. (1994), *Nature*, **369**, 318–320.
- [14] Hertveldt K., Philippe J., Thierens H., Cornelissen M., Vral A. (1997), *Int. J. Radiat. Biol.*, **71**, **4**, 429–433.
- [15] Hockenbery D. M., Oltvai Z. N., Yin X.-M., Millman C. L., Korsmeyer S. J. (1993), *Cell*, **75**, 241–251.
- [16] Huvinen M., Uitti J., Zitting A., Roto P., Virkola K., Kuikka P., Laippala P., Aitio A. (1996), *Occupational and Environmental Medicine*, **53**, 741–747.
- [17] Kelland L. R., Mistry P., Abel G., Loh S. Y., O'Neill C. O., Murrer B. A., Harrap K. R. (1992), *Can. Res.*, **52**, 3857–3864.
- [18] Lagarkowa M. A., Iarovaia O. V., Razin S. V. (1995), *J. Biol. Chem.*, **270**, 20239–20241.
- [19] Lamm G. M., Steinlein P., Cotten M., Christofori G. (1997), *Nuc. Acid. Res.*, **25**, **23**, 4855–4857.
- [20] Malcomson R. D. G., Clarke A. R., Peter A., Coutts S. B., Hpwie S. E. M., Harrison D. J. (1997), *J. Pathol.*, **181**, 166–171.
- [21] Martins L. M., Earnshaw W. C. (1997), *Tren Cell Biol.*, **7**, 111–114.
- [22] Mc Carthy N. J., Evan G. I. (1998), *Cur. Top. Developmental Biol.* **36**, 259–278.

- [23] Mellish K. J., Barnard Ch. F. J., Murrer B. A., Kelland L. R. (1995), *Int. J. Cancer* **62**, 717-723.
- [24] Michalovitz D., Harvry O., Oren M. (1990), *Cell*, **69**, 671-680.
- [25] Nagata S. (1997), *Cell*, **88**, 355-365.
- [26] O'Neill C. F., Ormerod M. G., Robertson D., Titley J. C., Cumber-Walswee Y., Kelland L. R. (1996), *Br. J. Can.*, **74**, 1037-1045.
- [27] Ormerod M. G., O'Neill C., Robertson D., Kelland L. R., Harrap K. R. (1996), *Can. Chemother. Pharmacol.*, **37**, 463-471.
- [28] Otto A. M., Paddenberg R., Schubert S., Mannherz H. G. (1996), *Can. Res. Clin. Oncol.*, **122**, 603-612.
- [29] Paraskevas S., Duguid W. P. (1996), *Cellular Inter-relationship in the Prancreas - Implications for Islet Transplantation*, eds. L. Rosenberg, W. P. Duguit, RG Landes Company, **5**, 99-122.
- [30] Pallicciari C., Bottone M. G., Schaack V., Barni S., Mmanfredi A. A. (1996), *Exp. Cell Res.*, **229**, 370-377.
- [31] Peitsch M. C., Mannherz H. G., Tschopp J. (1994), *Trends. Cell. Biol.*, **4**, 37-41.
- [32] Radziszewska E. (1995), *Post. Biol. Kom.*, **22**, 248-263.
- [33] Rudin Ch. M., Thomson C. B. (1997), *Annu. Rev. Med.*, **48**, 267-281.
- [34] Sestili P., Cattabeni F., Cantoni O. (1996), *FEBS*, **396**, 337-342.
- [35] Shaw L., Bovey R., Trdy S., Sahli R., Sordat B., Costa J. (1992), *Proc. Acad. Sci. USA*, **89**, 4495-4499.
- [36] Sikora E. (1993), *Post. Bioch.*, **39**, 212-220.
- [37] Sikora E. (1994), *Post. Bioch.*, **40**, 150-160.
- [38] Smets L. A. (1994), *Anti-Cancer Drugs*, **5**, 3-9.
- [39] Walker P. R., Weaver V. M., Lach B., Le Blanc J., Sikorska M. (1994), *Exp. Cell Res.*, **213**, 100-106.
- [40] Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Curie A. R. (1980), *Int. Rev. Cyt.*, **68**, 251-306.
- [41] Wyllie A. H. (1992), *Can. Metast. Rev.* **11**, 95-103.
- [42] Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M. (1991), *Nature*, **353**, 345-347.
- [43] Zhivotovsky B., Cedervall B., Jiang S., Nicotera P., Orrenius S. (1994), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **202**, 120-127.

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Katedra Genetyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki

Zofia Walter, Joanna Mankiewicz

APOPTOSIS AND METHODS OF INVESTIGATIONS

Apoptosis is one of the kinds of cell death. This paper presents the morphological and biochemical changes which are connected with apoptotic cell death. The factors, which activate this process, are described in this article. Moreover the groups of genes, proteins and enzymes that participate in the „call suicide” are characterised. The advantages and disadvantages of the chosen methods of investigations are discussed.