

# Вивчення змін кількісного рівня молекулярного шаперону Hsp60 у тканині серця при дилатаційній кардіоміопатії

Л. М. Капустян, О. Т. Рожко, В. І. Бобик, І. В. Крупська, Д. В. Рябенко<sup>1</sup>,  
Ю. С. Хожасько<sup>2</sup>, В. А. Гуртовий<sup>2</sup>, В. С. Усенко<sup>2</sup>, Л. Л. Сидорик

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

<sup>1</sup> Національний кардіологічний центр «Інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска» АМН України  
Вул. Народного ополчення, 5, Київ, 03151, Україна

<sup>2</sup> Морфологічна лабораторія «БІОНТЕК»  
Вул. Комсомольська, 52А/88, Дніпропетровськ, 49000, Україна

l.m.kapustian@imbg.org.ua

*Досліджено зміни кількісного рівня молекулярного шаперону Hsp60 у тканині серця при дилатаційній кардіоміопатії (ДКМП). Виявлено зростання сумарного вмісту Hsp60 як у лізатах тканини сердець людей, хворих на ДКМП, так і в лізатах тканин сердець мишей із експериментальним захворюванням, подібним до ДКМП людини. Вперше встановлено збільшення кількості Hsp60 у мітохондріальній фракції та зниження у цитоплазматичній, що може бути одним із чинників апоптозу кардіоміоцитів при серцевій недостатності, викликаній дією хронічного стресу. За результатами імуногістохімічного аналізу сердець мишей із експериментальною патологією, подібною до ДКМП людини, показано, що підвищення кількісного рівня Hsp60 у тканині серця носить неоднорідний характер: значне зростання відбувається лише в окремих кардіоміоцитах, ймовірно, в тих, де активовані антистресові механізми захисту клітини від дії хронічного стресу.*

*Ключові слова: молекулярні шаперони, Hsp60, дилатаційна кардіоміопатія, кардіоміоцит, апоптоз.*

**Вступ.** На сьогодні кардіоваскулярні захворювання є основною причиною смертності у світі. Втрату функції або загибель кардіоміоцитів вважають головним фактором у розвитку подібних хвороб. Апоптоз кардіоміоцитів характерний як для гострих серцевих захворювань, так і для низки хронічних, зокрема, дилатаційної кардіоміопатії. Відомо, що молекулярні шаперони як кардіопротекторні білки є одним із ключових регуляторів апоптозу кардіоміоцитів [1].

Особливий інтерес представляє молекулярний шаперон Hsp60, основним компартментом функціонування якого є мітохондрії. Проте, за результатами останніх досліджень, у кардіоміоцитах до 30 % вмісту цього білка зосереджено в цитоплазмі [2]. Деякими експериментами продемонстровано потенційну антиапоптичну роль цитоплазматичного Hsp60 кардіоміоцитів. Зокрема, надекспресія Hsp60 захищає кардіоміоцити від апоптозу після ішемії [3]. Показано, що цитоплазматичний Hsp60 утворює макромолекулярний комплекс з проапоптичними білками Вах та Вак, блокуючи їхню здатність викликати апоптоз. Зниження рівня Hsp60 у кардіоміоцитах внаслідок

Л. М. КАПУСТЯН, О. Т. РОЖКО, В. І. БОБИК, І. В. КРУПЬСЬКА,  
Д. В. РЯБЕНКО, Ю. С. ХОЖАСЬКО, В. А. ГУРТОВИЙ, В. С. УСЕНКО,  
Л. Л. СИДОРИК, 2008

антисенс-РНК обробки чи гіпоксії призводить до транслокації білка Вах до мітохондрій і запуску апоптозу [4, 5]. Надекспресія Hsp60 у кардіоміоцитах зменшує рівень доксорубіцин-індукованого апоптозу завдяки інгібуванню убіквітинування антиапоптичного білка Bcl-X<sub>L</sub> [6]. Отже, цитоплазматичний Hsp60 може модулювати рівень білків родини Bcl-2 за рахунок посттрансляційних модифікацій і тим самим супресувати активацію апоптичних сигнальних каскадів у кардіоміоцитах. Усі ці дані дозволили нам припустити, що зміни кількості та/або клітинної локалізації Hsp60 можуть впливати на розвиток такої важкої серцевої патології, як ДКМП. Тому вивчення особливостей експресії шаперону Hsp60 необхідне не лише для розуміння молекулярних механізмів розвитку ДКМП, але й для можливого створення нових терапевтичних засобів.

Мета нашого дослідження полягала у визначенні вмісту Hsp60 у тотальному лізаті, в цитоплазматичній та мітохондріальній фракціях, отриманих з міокарда людей, хворих на ДКМП, та мишей з експериментальним індукованим захворюванням, подібним до ДКМП людини.

**Матеріали і методи.** Використано зразки секційного патоморфологічного матеріалу з лівих шлуночків п'яти сердець хворих, що померли від ДКМП, та п'яти нормальних сердець практично здорових людей, які загинули в результаті нещасного випадку.

Для вивчення рівня експресії Hsp60 у динаміці захворювання застосовано створену раніше в нашій лабораторії експериментальну модель міозин-індукованого автоімунного пошкодження міокарда мишей лінії BALB/c, подібного до ДКМП людини. Дані про розроблену модель міозин-індукованого пошкодження міокарда опубліковано раніше в роботах [7, 8]. Досліджували такі групи тварин: контрольна (здорові миші лінії BALB/c) та експериментальні – через 1, 2, 4 та 6 місяців після індукції захворювання. До кожної групи входило по п'ять тварин.

Всю роботу з тваринами проведено згідно з правилами Етичного комітету України. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Серце зу-

пиняли перфузією охолодженим до температури 4 °С розчином фосфатного буфера PBS.

*Отримання сумарного лізату із тканини серця.* Наважку міокарда гомогенізували у 20 мМ трис-НСl-буфері, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 1 %-й NP-40, 1 %-й дезоксихолат натрію, 0,1 %-й додецилсульфат натрію, 0,1 %-й розчин суміші інгібіторів протеаз («Sigma», США). Гомогенат центрифугували (10000 g, 20 хв), надосад використовували як сумарний лізат.

*Отримання цитоплазматичної та мітохондріальної субфракцій.* Наважку міокарда гомогенізували у буфері, який містить 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мМ сахарозу, 1 мМ ДТТ, 0,1 %-й розчин суміші інгібіторів протеаз («Sigma»). Ядра відділяли центрифугуванням (1500 g, 20 хв). Мітохондрії осаджували центрифугуванням надосаду (10000 g, 20 хв). Одержаний супернатант центрифугували при 18500 g протягом 20 хв. Надосад містив цитоплазматичну фракцію. Мітохондрії промивали буфером для гомогенізації, осаджували центрифугуванням та дезінтегрували за допомогою ультразвуку. Чистоту отриманих фракцій перевіряли методом імуноблотингу за допомогою антитіл проти білкових маркерів цитоплазми (-тубулін) та мітохондрій (VDAC – voltage-dependent anion channel). Нами використано анти-VDAC антитіла (SC-8828, Santa Cruz) та анти-тубулін (SC-9104, Santa Cruz).

*Імуноблотинг.* Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [9]. Білки розділяли електрофорезом за денатурувальних умов у 12 %-му ПААГ за Леммлі [10]. Електроперенесення білків здійснювали на полівінілідифторидну (PVDF) мембрану («Millipore», США). Сайти неспецифічної сорбції блокували 5 %-м розчином сухого знежиреного молока в буфері PBS-T (80 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 мМ NaCl, рН 7,5, 0,1 %-й твін-20) протягом 1 год за кімнатної температури. Як первинні використовували отримані нами кролячі поліклональні анти-GroEL антитіла [11]. Мембрани інкубували з первинними антитілами упродовж 1 год за кімнатної температури, тричі відмивали буфером PBS-T та інкубували з кон'югованими з пероксидазою хрому вторинними антитілами («Sigma») протягом 1 год за кімнатної

температури, промивали 3 рази і детектували за допомогою набору ECL («Amersham Pharmacia Biotech», Швеція). За цією ж схемою здійснювали імуноблотинг з використанням мишачих поліклональних антитіл проти контрольного білка GAPDH (гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа), отриманих в нашій лабораторії.

Кількісний рівень білка оцінювали за інтенсивністю сигналу на плівці за допомогою комп'ютерної програми TotalLab 1.10 і представляли в умовних одиницях. Кількість білка Hsp60 нормалізували відносно вмісту контрольного білка GAPDH. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакету статистичних програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Для порівняння показників досліджуваних груп використовували *U*-критерій Мана-Вітні (Mann-Whitney *U*-test). Значення  $p < 0,05$  розглядали як критерій значущості різниці. На рис. 1 результати представлено у вигляді Me [25; 75] (Me – медіана; 25 и 75 – 1-й та 3-й квантили).

*Імуногістохімічні дослідження.* Серця тварин після перфузії фізіологічним розчином, фіксовані у розчині Буена протягом 24 год за кімнатної температури, до заливки в парафін зберігали в 70 %-му етанолі. З середньої частини органа перпендикулярно до анатомічної осі вирізали блок завтовшки 4–5 мм. Зрізи товщиною 4–5 мкм отримували за допомогою мікротому (REICHERT-JUNG Mod.1140/Autocut).

Імуногістохімічне дослідження вмісту антигенів виконували згідно із стандартними протоколами [12, 13]. Для блокування сайтів неспецифічної сорбції використовували біотин-блокувальну систему («DAKO», США). Робоче розведення анти-Hsp60 антитіл – 1:1000. Мічені біотином антикролячі антитіла («Sigma») розводили 1:400, Vectastatin ABC Kit («Vector Lab», США) з пероксидазною міткою використано як третій шар. Для негативного контролю 1 %-й бичачий сироватковий альбумін («Sigma»), розчинений у 0,02 М фосфатному буфері (рН 7,2), наносили замість специфічних антитіл. Активність пероксидази виявляли інкубацією зрізів у 0,05 %-му розчині 3',3'-діамінобензидинтетрагідрохлориду (Sigma), який містив 0,01 % пероксиду водню.

Інтенсивність імуногістохімічного забарвлення вимірювали за допомогою світлового мікроскопа «Axioplan» («Zeiss», Німеччина) з імерсією та об'єктивом 100, оснащеного системою відеовведення зображень. Система введення зображень складається з відеокамери Sony DXC-151AP з композитним відеовходом, плати відеовходу EZ Capture, комп'ютера та програми аналізу зображень «ImagePro» («Media Cybernetic», США). У кожному зразку досліджували по 10 полів зору, обраних випадково, і зображення зберігали у вигляді файлів формату Tiff. Просторове калібрування та калібрування інтенсивності забарвлення проводили згідно з рекомендаціями виробника. Для визначення оптичної щільності позитивного забарвлення використовували стандартну шкалу оптичної щільності, надану в пакеті програмного забезпечення. За допомогою інструмента програми ImagePro Count/Size визначали середню оптичну щільність позитивного забарвлення та відсоток площі зрізу, яку займає позитивне забарвлення. Вміст антигену в тканині розраховували як множинну середньої оптичної щільності позитивного забарвлення та відсотка площі зрізу позитивного забарвлення. Для оцінки різниці показників використовували *t*-критерій Ст'юдента. Значення  $p < 0,05$  розглядали як критерій значущості різниці.

**Результати і обговорення.** Дослідження ролі антистресових білків у розвитку серцево-судинних патологій має велике наукове та практичне значення. Гіперекспресія молекулярних шаперонів є потужним засобом цитопротекції, у тому числі і серцево-судинної системи. Кардіопротекторні властивості шаперонів показано у низці досліджень, проведених на культурах кардіоміоцитів, трансгенних тваринах та інтактних серцях. Але більшість подібних досліджень здійснені за умов гострого стресу, і практично дуже мало даних про особливості експресії шаперонів та їхньої клітинної локалізації при хронічних захворюваннях серцево-судинної системи, зокрема, при ДКМП. ДКМП – це ушкодження серцевого м'яза нез'ясованої етіології, яке супроводжується розширенням камер серця, порушенням його систолічної функції та розвитком симптомів серцевої недостатності [14]. Незважаючи на всі зусилля сучасної медицини,

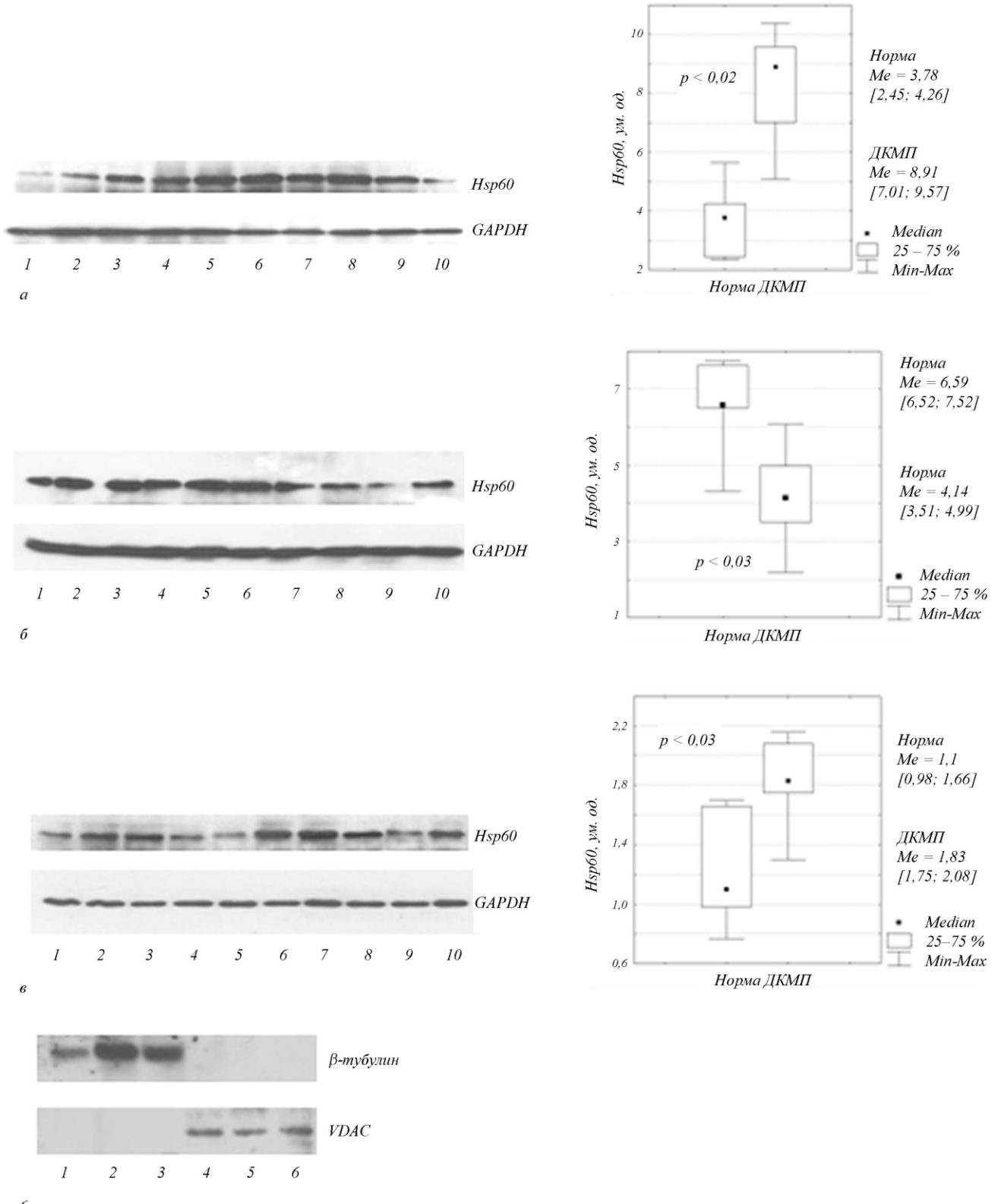


Рис. 1. Визначення кількісного рівня Hsp60 у шлуночках сердець людини, уражених ДКМП: а – тотальний лізат; б – цитоплазматична фракція; в – мітохондріальна фракція (1–5 – нормальні серця; 6–10 – серця, уражені ДКМП); г – контроль чистоти отриманих субклітинних фракцій (1–3 – цитоплазматичні фракції; 4–6 – мітохондріальні фракції)

*Морфометричний аналіз рівня Hsp60 у лівих шлуночках  
сердця модельних мишей*

Група	1 місяць	2 місяці	4 місяці
Контроль (n = 50)	0,04 0,027	0,03 0,03	0,04 0,014
ДКМП (n = 50)	0,04 0,001	0,08 0,006*	0,09 0,005*

$M \pm m$ , ум. од., \*значаща різниця у порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

ДКМП залишається одним із захворювань, яке найчастіше призводить до необхідності трансплантації серця.

Ми вивчали зміни кількісного вмісту Hsp60 методом імуноблотингу як у тотальному лізаті, так і в цитоплазматичній та мітохондріальній фракціях. Виявлено, що експресія білка Hsp60 у серцях, уражених ДКМП, на останній стадії захворювання зростає приблизно в 2 рази у порівнянні з контролем (рис. 1, а). Подібні результати отримано й іншими дослідниками. Так, авторами [15, 16] показано, що експресія Hsp60 у серцях хворих на ДКМП вища у 2,5 разу порівняно з нормою. Вивчаючи зміни експресії Hsp60 у динаміці на експериментальній моделі захворювання, подібного до ДКМП людини, нами встановлено зростання кількісного рівня Hsp60 у серцях мишей, починаючи з другого місяця після індукції хвороби (рис. 2, а). Результати, одержані методом імуноблотингу, також підтверджено даними імуногістохімічного та морфометричного аналізу (рис. 3, таблиця). Забарвлення кардіоміоцитів на Hsp60 на зрізах лівих шлуночків міокарда контрольних мишей виглядає значно менш інтенсивним, ніж у імунізованих тварин (рис. 3, а). При дослідженні змін експресії та клітинної локалізації Hsp60 на зрізах міокарда модельних ДКМП-мишей спостерігається значне підвищення вмісту Hsp60 в окремих кардіоміоцитах з першого місяця після індукції захворювання (рис. 3, б). Забарвлення таких клітин носить гранулярний характер помірної, а в деяких випадках – високої інтенсивності. Через 2 місяці картина експресії Hsp60 (рис. 3, в) порівняно з першим місяцем не змінилася: серед основної маси помірно забарвлених клітин зустрічалися сильніше забар-

влені кардіоміоцити. Через 4 місяці інтенсивність забарвлення на Hsp60 в окремих кардіоміоцитах зростає (рис. 3, г). У порівнянні з контролем забарвлення на Hsp60 в імунізованих тварин було інтенсивнішим приблизно у 2 рази (таблиця). Крім того, результати імуногістохімічного аналізу показали, що зростання вмісту Hsp60 при патології в тканині серця має неоднорідний характер: значне підвищення відбувається лише в окремих кардіоміоцитах. Останнє може свідчити про те, що на певному етапі патології шкідливого впливу зазнають окремі клітини. Дія хронічного стресу зумовлює активацію антистресових механізмів захисту клітини, що й виявляється у підвищенні експресії шаперону.

Оскільки Hsp60 у клітині локалізується головним чином у мітохондріях та цитоплазмі, нами проведено визначення вмісту зазначеного шаперону в обох цих субклітинних фракціях. Чистоту мітохондріальної та цитоплазматичної фракцій перевіряли на наявність/відсутність відповідних специфічних маркерів (рис. 1, г).

Результати дослідження показали зростання кількості Hsp60 в мітохондріях та зниження – в цитоплазмі кардіоміоцитів під час прогресування патології. Це продемонстровано на серцях як хворих на ДКМП (рис. 1, б, в), так і піддослідних тварин (рис. 2, б, в). Ми виявили зростання приблизно на 30 % рівня мітохондріального Hsp60 та таке ж зниження рівня цитоплазматичного Hsp60 на останній стадії ДКМП людини.

При експериментальному захворюванні мишей, подібному до ДКМП людини, ці зміни мають ще драматичніший характер – на шостий місяць хвороби рівень мітохондріального Hsp60 зростає, а цитоплазматичного – знижується у 2 рази. Ці дані є свідченням того, що на 6-й місяць після індукції захворювання патологічні зміни відбуваються у значно більшій кількості кардіоміоцитів, що вказує на прогресування та поширення патологічного процесу в міокарді тварин. Зростання кількості мітохондріального Hsp60 може бути адаптивною відповіддю на прогресування індукованої патології. У той же час відомо, що при серцевій недостатності кількість мітохондрій зростає, але вони менші за розміром [17]. Тому не можна виключити

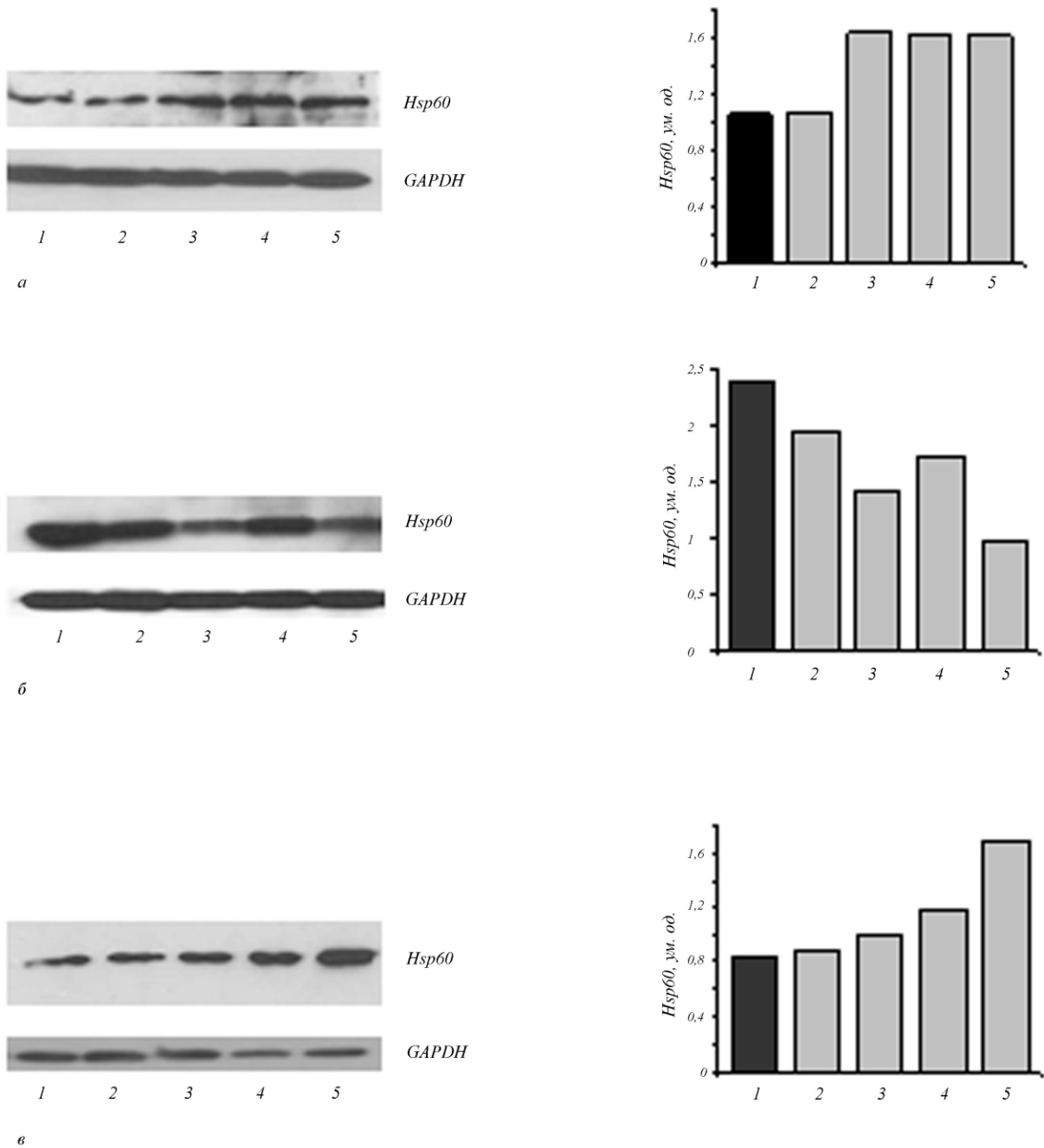


Рис. 2. Визначення кількісного рівня Hsp60 у шлуночках сердець мишей під час розвитку експериментального захворювання, подібного до ДКМП людини: *a* – тотальний лізат; *б* – цитоплазматична фракція; *в* – мітохондріальна фракція (1 – контроль; 2 – 1 місяць; 3 – 2 місяці; 4 – 4 місяці; 5 – 6 місяців після індукції захворювання)

ймовірності ще однієї причини збільшення кількості Hsp60 в мітохондріях, яка може полягати в дисфункції останніх.

Цікавим є факт зменшення вмісту цитоплазматичного Hsp60 при ДКМП. Раніше показано, що

падіння рівня Hsp60 в цитоплазмі неонатальних кардіоміоцитів може призводити до запуску апоптозу [5]. Зниження рівня цитоплазматичного Hsp60 у кардіоміоцитах відбувається при діабетичній кардіоміопатії, при цьому зменшується кількість

IGF-1-рецепторів, що призводить до падіння інтенсивності IGF-1-сигналіngu [18, 19]. Останнє негативно впливає на виживання кардіоміоцитів. Встановлено, що Hsp60 супресує убіквітинування IGF-1-рецептора, модулюючи тим самим IGF-1-сигналінг у кардіоміоцитах. Зроблено припущення, що при діабетичній кардіоміопатії зниження вмісту Hsp60 та подальше зменшення кількісного рівня IGF-1-рецептора внаслідок його посиленої деградації є основними механізмами розвитку діабетичної кардіоміопатії.

Останніми дослідженнями показано, що Hsp60 може транспортуватися із кардіоміоцита назовні екзосомним шляхом і, таким чином, потрапляти у міжклітинний простір [20]. Крім того, визначено, що під час деяких стресів, зокрема гіпоксії, Hsp60 з цитоплазми кардіоміоцитів експортується на плазматичну мембрану. Через це його рівень в цитоплазмі знижується, що в свою чергу спричиняє запуск апоптозу [3, 4]. За рахунок яких саме процесів відбувається зменшення кількісного вмісту цитоплазматичного Hsp60 при ДКМП, на сьогодні невідомо. З'ясування цього питання є метою наших подальших досліджень.

**Висновки.** Отримані нами результати свідчать про зростання кількісного рівня молекулярного шаперону Hsp60 у тканині серця в разі ДКМП, при цьому відмічено збільшення кількості Hsp60 у мітохондріях та зниження у цитоплазмі кардіоміоцитів. Результати імуногістохімічного аналізу сердець мишей з експериментальною патологією, подібною до ДКМП людини, показали, що підвищення кількісного рівня Hsp60 у тканині серця має неоднорідний характер: значне зростання відбувається лише в окремих кардіоміоцитах, ймовірно, в тих, де антистресові механізми захисту клітини від дії хронічного стресу є активованими.

*L. M. Kapustian, O. T. Rozhko, V. I. Bobyk, I. V. Kroupka, D. V. Riabenko, Yu. S. Khozhaenko, V. A. Gurtovyy, V. S. Usenko, L. L. Sidorik*

Changes in the content of molecular chaperone Hsp60 in heart tissue at dilated cardiomyopathy

Summary

*The changes of Hsp60 content in heart tissue at dilated cardiomyopathy (DCM) were investigated. An increase in Hsp60 level was observed in human hearts affected by DCM as well as in*

*the hearts of mice with disease model similar to human DCM. We observed the increase in Hsp60 level in mitochondria and decrease in cytoplasmic fraction, which could be one of the reasons for apoptotic response in cardiomyocytes at heart failure associated with chronic stress. The results of immunohistochemical analysis of mice hearts with the model human-like pathology demonstrate heterogeneity in chaperone levels. A considerable increase in Hsp60 staining was observed only in some cardiomyocytes, possibly in those with activated antistress mechanisms of cell defense against chronic stress.*

*Keywords: molecular chaperone, Hsp60, dilated cardiomyopathy, cardiomyocytes, apoptosis.*

*Л. М. Капустян, О. Т. Рожко, В. І. Бобык, І. В. Крупская, Д. В. Рябенко, Ю. С. Хожжаенко, В. А. Гуртовий, В. С. Усенко, Л. Л. Сидорик*

Изучение изменений количественного уровня молекулярного шаперона Hsp60 в ткани сердца при дилатационной кардиомиопатии

Резюме

*Исследованы изменения количественного уровня молекулярного шаперона Hsp60 в ткани сердца при дилатационной кардиомиопатии (ДКМП). Выявлено увеличение общего количественного уровня Hsp60 как в лизатах ткани сердец человека, пораженных ДКМП, так и в лизатах ткани сердец мышей с экспериментальным заболеванием, подобным ДКМП человека. Впервые установлено увеличение содержания Hsp60 в митохондриальной и уменьшение в цитоплазматической фракции, что может являться одним из факторов апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности, вызванной хроническим стрессом. Результаты иммуногистохимического анализа сердец мышей с экспериментальной патологией, подобной ДКМП человека, показали, что увеличение количественного уровня Hsp60 в ткани сердца имеет неоднородный характер: значительное возрастание происходит только в отдельных кардиомиоцитах, по всей видимости, тех, в которых активированы антистрессовые механизмы защиты клетки от действия хронического стресса.*

*Ключевые слова: молекулярные шапероны, Hsp60, дилатационная кардиомиопатия, кардиомиоциты, апоптоз.*

#### PERELIK LITERATURY

1. Reeve J. L. V., Duffy A. M., O'Brien T., Samali A. Don't loose heart – therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease // *J. Cell. Mol. Med.*–2005.–9, N 3.–P. 609–622.
2. Gupta S., Knowlton A. A. Hsp60, Bax, apoptosis and the heart // *J. Cell. Mol. Med.*–2005.–9, N 1.–P. 51–58.
3. Lin K. M., Lin B., Lian I. Y., Mestrlil R., Scheffler I. E., Dillmann W. H. Combined and individual mitochondrial Hsp60 and Hsp10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation // *Circulation.*–2001.–103.–P. 1787–1792.
4. Gupta S., Knowlton A. A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis // *Circulation.*–2002.–106.–P. 2727–2733.

5. Kirchhoff S. R., Gupta S., Knowlton A. A. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury // *Circulation*.–2002.–**105**.–P. 2899–2904.
6. Shan Y. X., Liu T. J., Su H. F., Samsamshariat A., Mestrl R., Wang P. H. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells // *J. Mol. Cell. Cardiol.*–2003.–**35**.–P. 1135–1143.
7. Бобик В. І., Рябенко Д. В., Сергієнко О. В., Труніна І. В., Федоркова О. М., Морозова Л. М., Сидорик Л. Л. Розробка експериментальної моделі автоімунного міозин-індукованого пошкодження міокарда // *Біополімери і клітина*.–2007.–**23**, № 2.–С. 115–122.
8. Рябенко Д. В., Сидорик Л. Л., Бобик В. И., Сергиенко О. В., Федоркова О. М., Труніна И. В., Мацука Г. Х. Морфологические особенности аутоиммунного повреждения миокарда, обусловленного различными миокардиальными антигенами человека: сравнительное экспериментальное исследование // *Укр. ревматол. журн.*–2000.–№ 2.–С. 55–60.
9. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*–1976.–**46**.–P. 193–200.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 // *Nature*.–1970.–**227**.–P. 680–685.
11. Капустян Л. Н., Киямова Р. Г., Гришкова В. С., Терентьев А. Г., Филоненко В. В., Сидорик Л. Л. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // *Біополімери і клітина*.–2006.–**22**, № 2.–С. 117–121.
12. *Immunocytochemical methods and protocols* / Ed. C. L. Javois.–New York: HumanapPress, 1999.–233 p.
13. Mize R. R. Quantitative image analysis for immunocytochemistry and *in situ* hybridization // *Neurosci. Meth. J.*–1994.–**54**.–P. 219–237.
14. Maron B. J., Towbin J. A., Thiene G., Antzelevitch C., Corrado D., Arnett D., Moss A. J., Seidman C. E., Young J. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. an american heart association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee; quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups; and council on epidemiology and prevention // *Circulation*.–2006.–**113**.–P. 1807–1816.
15. Knowlton A. A., Kapadia S., Torre-Amione G., Durand J. B., Bies R., Young J., Mann D. L. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts // *J. Mol. Cell. Cardiol.*–1998.–**30**.–P. 811–818.
16. Latif N., Taylor P. M., Khan M. A., Yakoub M. H., Dunn M. J. The expression of heat shock protein 60 in patients with dilated cardiomyopathy // *Basic Res. Cardiol.*–1999.–**94**.–P. 112–119.
17. Sabbah H. N., Sharov V., Riddle J. M., Kono T., Lesch M., Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure // *J. Mol. Cell. Cardiol.*–1992.–**24**.–P. 1333–1347.
18. Shan Y., Yang T. L., Mestrl R., Wang P. H. Hsp10 and Hsp60 suppress ubiquitination of insulin-like growth factor-1 receptor and augment insulin-like growth factor-1 receptor signaling in cardiac muscle // *J. Biochem. Chem.*–2003.–**278**, N 14.–P. 45492–45498.
19. Lai H. C., Liu T. J., Ting C. T., Yang J. Y., Huang L., Wallas D., Kaiser P., Wang P. H. Regulation of IGF-1 receptor signaling in diabetic cardiac muscle: dysregulation of cytosolic and mitochondria Hsp60 // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*–2007.–**292**.–P. E292–E297.
20. Gupta S., Knowlton A. A. Hsp60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway // *Amer. J. Heart Circ. Physiol.*–2007.–**292**.–P. H3052–H3056.

УДК 616.127-007.64:612.07  
Надійшла до редакції 14.01.08