

Розробка експериментальної моделі аутоімунного міозин-індукованого пошкодження міокарда

В. І. Бобик, Д. В. Рябенко¹, О. В. Сергієнко¹, І. В. Труніна¹,
О. М. Федоркова, Л. М. Морозова, Л. Л. Сидорик

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут кардіології ім. акад. Н. Д. Стражеско АМН України
Вул. Народного ополчення, 5, Київ, 03151, Україна

sidorik@imbg.org.ua

Розроблено експериментальну модель міозин-індукованого аутоімунного пошкодження міокарда мишей лінії BALB/c, подібного до дилатаційної кардіоміопатії (ДКМП) людини. Показано, що лише міозин, отриманий з ураженого ДКМП міокарда, викликає у піддослідних тварин пошкодження міокарда, характерні для ДКМП, а саме: потоншення лівого шлуночка серця, міоцитоліз та кардіосклероз, зниження АТФ-ної активності, достовірне зростання рівня специфічних аутоантитіл до власного кардіоміозину.

Ключові слова: дилатаційна кардіоміопатія людини, аутоантитіла, міозин, пошкодження міокарда.

Вступ. Молекулярна медицина — це наука, яка, використовуючи методи та підходи своєї складової молекулярної біології, вивчає порушення в роботі організму людини на молекулярному рівні і розробляє підходи щодо їхнього усунення. Наукову основу молекулярної медицини становлять ідентифікація структурних і регуляторних генів людини та вивчення молекулярних механізмів їхньої регуляції і експресії, а також порушень, що призводять до розвитку спадкових і мультифакторних хвороб [1]. Останнє десятиліття характеризується бурхливим розвитком досліджень молекулярно-генетичних основ серцево-судинних захворювань, які є головною причиною смертності. Особливу увагу науковців і медиків не лише в нашій країні, але й у світі привертають різні види кардіоміопатій, серед яких найрозповсюдженішою та найважчою є

дилатаційна кардіоміопатія (ДКМП). Причини виникнення та розвитку цього захворювання вивчено недостатньо, тому пріоритетом у його дослідженні є виявлення молекулярних порушень функціонування міокарда.

За визначенням ВООЗ, дилатаційна кардіоміопатія — це аутоімунна кардіоспецифічна патологія міокарда з мітохондріальною дисфункцією, яка характеризується розширенням порожнини лівого (рідше — обох) шлуночка серця, зі зниженням скоротливості міокарда та прогресуванням серцевої недостатності, загибеллю кардіоміоцитів переважно апоптичним шляхом з подальшим розвитком колагенозу серцевого м'яза. ДКМП є одним із основних показників для трансплантації серця.

Пусковим моментом у розвитку хвороби можуть бути різні види стресу, такі як інфекційне ураження міокарда вірусами, бактеріями, найпростішими, метаболічні порушення в окисненні жирних кислот, порушення мітохондріального окисню-

вального фосфорилування у дихальному ланцюгу, токсична дія алкоголю, важких металів тощо [1—4]. Механізми ж розвитку захворювання потребують подальшого вивчення.

На сьогодні наявність аутоімунних процесів при розвитку серцевих захворювань не викликає сумніву [5, 6]. У сироватках крові хворих виявлено підвищений рівень аутоантитіл до низки антигенів, зокрема, до білків скоротливого апарату, основних структурних білків, таких як актин, міозин, С-білок, і регуляторних білків — тропоміозин, тропоніни [7—9]. Виявлено також, що при розвитку ДКМП відбуваються зміни у функціонуванні анти-стресових білків — молекулярних шаперонів. Наслідком цього є неправильний фолдинг білків різних субклітинних компартментів кардіоміоцита, який сприяє накопиченню дефектних білків. Останні є стресовим сигналом для кардіоміоцита, що може активувати індуковані стресом апоптичні сигнальні шляхи, відповідальні за існування або загибель кардіоміоцита [10—13]. Вивчення молекулярних і клітинних механізмів ДКМП ускладнюється відсутністю адекватних тваринних моделей розвитку цієї патології. Відомо лише декілька трансгенних моделей, які, однак, не дають повної картини розвитку хвороби у людей [14]. Створення моделі індукованого міозином розвитку ДКМП-подібної патології на тваринах є дуже важливим для розуміння процесів, що відбуваються в організмі на різних стадіях розвитку хвороби. Наявність такої моделі дозволить вивчити молекулярні та клітинні особливості зазначених процесів, їхню послідовність, надасть можливість дослідити молекулярно-структурні зміни в кардіоміоцитах і їхніх компонентах, дозволить змодельовати і відслідкувати дію різних ліків і біологічно активних речовин.

Матеріали і методи. Препарати міозину отримували з біопсійного матеріалу лівого шлуночка людини, померлої внаслідок ДКМП (міозин шлуночка, ураженого ДКМП — МДШ), та здорової людини, яка загинула трагічно (міозин нормально-го шлуночка — МНШ), а також використано акто-міозин із серця мишей за методом [15]. Чистоту одержаних препаратів перевіряли за допомогою гель-електрофорезу в денатурувальних умовах за методом Лемблі [16]. Аутоантитіла проти отриманих білків виявляли методом ELISA [17]. Концентрацію білка визначали за Бредфордом [18]. АТФ-ну реакцію проводили при температурі 37 °С протягом 5 хв у середовищі, що містило 60 мМ КСІ,

5 мМ MgCl₂, 10 мМ імідазол, рН 7,0, 0,25 мМ АТФ, а також 100 мкМ CaCl₂ (Ca²⁺-сердовище) або 1 мМ етиленгліколь-біс(2-аміноетилловий ефір) N,N-тетраацтової кислоти (ЕГТА-середовище). Реакцію зупиняли додаванням HClO₄ до кінцевої концентрації 0,3 М. АТФ-ну активність оцінювали за кількістю відщепленого неорганічного фосфату, який визначали методом [19]. Самців мишей лінії BALB/c віком 12—16 тижнів імунізували емульсією повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) і різних препаратів міозинів або фізіологічного розчину. Тваринам вводили підшкірно 0,2 мл емульсії з білком у концентрації 2 мг/мл. Через 2 тижні тварин повторно імунізували 1/2 дози. У визначені строки тварин декапітували під легким ефірним наркозом, забирали кров і отримували сироватку, серця використовували для гістологічних досліджень. Матеріал фіксували упродовж 24 год в 10 %-му розчині формаліну у фосфатному буфері, рН 7,4. Обезводжували в спиртах за стандартною схемою і заливали в парафін. Зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксином і еозином за методом ван-Гізона (гематоксилін — основний фуксин пікринової кислоти, ГОФП). Для вивчення скоротливого апарату кардіоміоцитів використано метод поляризаційної мікроскопії. Види пошкоджень і ступінь контрактурних змін кардіоміоцитів оцінювали за критеріями, запропонованими Целларіусом [20].

Мікроскопічні дослідження виконували за допомогою світлового мікроскопа «Біолам ЛОМО» (РФ) при 200-кратному збільшенні та мікроскопа AxioPlan (США). Морфометричну оцінку здійснювали не менш як на 30 довільно вибраних ділянках міокарда [21].

Для визначення товщини лівого шлуночка серця тварин фіксували у розчині Буена протягом 24 год при кімнатній температурі, до заливки в парафін зберігали у 70 %-му розчині етанолу. З середньої частини органа перпендикулярно до анатомічної вісі вирізали блок завтовшки 4—5 мм. При виготовленні парафінових зрізів блоки орієнтували найширшою частиною до поверхні зрізання. Послідовні зрізи товщиною 4—5 мкм забарвлювали гематоксином та еозином. Система введення зображень складалася з відеокамери з композитивним відеовходом, плати відеовходу, комп'ютера та програми аналізу зображень ImagePro. Проводили зйомку зрізів, забарвлених гематоксином та еозином. У кожному зразку досліджували по 10 полів зору, обраних випадково. Для просторового калі-

Таблиця 1

Рівень аутоантитілу проти власного кардіального міозину у сироватках мишей, імунізованих препаратами міозинів людини, на різних етапах експерименту (розведення 1:540)

Антиген	День від початку імунізації			
	14-й	21-й	52-й	120-й
Міозин нормально-го шлуночка	0,344	0,149	0,330	0,292
Міозин шлуночка, ураженого ДКМП	0,328	0,455	0,398	0,585
Повний ад'ювант Фрейнда	0,097	0,027	0,032	0,028

брування, яке проводили згідно з рекомендаціями виробника, використовували зображення стандартної шкали ОМОУ42 (ГОСТ 7513-75). На зображенні вручну окреслювали зовнішню та внутрішню межі міокарда лівого шлуночка. За допомогою програми Measurements вимірювали величину параметра і розраховували середнє значення за 10 вимірами.

Результати і обговорення. Однією з перших ознак розвитку аутоімунних процесів в організмі є зростання рівня аутоантитілу до власних антигенів. Незначний рівень аутоантитілу в організмі існує для утилізації відмерлих клітин та їхніх компонентів, але цей рівень контролюється і не виходить за певні межі. У разі збільшення рівня аутоантитілу внаслідок гострого інфекційного захворювання, коли має місце масове руйнування клітин організму, компенсаторні механізми імунної системи за короткий час повертають все до норми. Якщо ж цього не відбувається, то розвивається аутоімунне захворювання.

На сьогодні існує думка, що є три основних критерії, за якими хвороба людини розглядається як аутоімунна, це — прямі докази (впливають з перенесення патологічних антитілів чи патологічних Т-лімфоцитів від хворої людини піддослідним тваринам), непрямі докази (базуються на індуванні аутоімунної хвороби в експериментальних тварин), побічні докази (як наслідок клінічних характеристик хвороби) [22].

Прямі докази є найточнішими для встановлення аутоімунної етіології хвороби. Але випадки перенесення аутоімунної хвороби до лабораторних тварин чи людей через патологічні антитіла є досить рідкісними.

Щоб виявити аутоімунну природу хвороби

найчастіше використовують непрямі докази. Для цього спочатку потрібно ідентифікувати аутоантиген-мішень, проти якого відбувається постійна підвищена імунна відповідь у хворої людини. Цей антиген потім виділяють з тканин тваринного походження або з патологоанатомічного матеріалу (якщо така можливість існує). Очищеним антигеном проводять експериментальну імунізацію. Слід врахувати, що аутоімунна хвороба людини найчастіше зачіпає декілька антигенів. Це антиген, який, так би мовити, запускає хворобу, і ті, що надходять у кровотік після первинного ушкодження тканини. ДКМП розглядають сьогодні як аутоімунне органоспецифічне ураження міокарда. Аутоімунні реакції проти кардіальної ізоформи міозину продемонстровано як у клінічних, так і в експериментальних дослідженнях [23, 24]. Показано, що імунізація кардіальним міозином генетично схильних мишей призводила до розвитку в них аутоімунного міокардиту та появи кардіоспецифічних антиміозинових антитілів [25, 26]. У нашій лабораторії встановлено, що миші лінії BALB/c були чутливішими до введення кардіального міозину, ніж інші лінії.

У табл. 1 наведено дані імуноферментного визначення рівнів аутоантитілу до кардіального міозину миші, отримані при імунізації мишей препаратами міозинів людини на різних строках після імунізації. Як видно, усі сироватки містять значний рівень аутоантитілу проти кардіального міозину миші на всіх етапах експерименту. При цьому імунна відповідь проти МНШ та МДШ має різну динаміку розвитку (табл. 1), що є ознакою прогресуючого аутоімунного процесу, індукованого імунізацією досліджуваним білком.

Білок, виділений з ураженого органу, вважається аутоантигеном, якщо імунізація ним дослідних тварин викликає аналогічне захворювання або спричинює подібні патоморфологічні зміни [22].

Імунізація МДШ викликала в міокарді експериментальних тварин певні мікроциркуляторні зміни: стази, повнокрів'я, агрегацію еритроцитів, набряк стінок артеріальних судин, нерізно виражений периваскулярний фіброз. Видно сегментарні контрактури I—III ступеня, частина яких з некрозом, резорбцією, утворенням рубців. Збільшується кількість фібробластів, волокнистого компонента, оперізувальних клітин з дегрануляцією. Міоцитоліз кардіоміоцитів внаслідок прямої дії антигену зуст-

Таблиця 2

Відносний об'єм (%) кардіоміоцитів з різними типами пошкоджень у міокарді мишей на 21-й день після їхньої імунізації кардіальними міозинами людини (за результатами світлової мікроскопії) ($M \pm m$)

Антиген	Тип пошкодження кардіоміоцита			
	К	РК	ЛК	М
Повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ)	1,32±0,39	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,09
Міозин нормального шлуночка	3,36±0,44 ¹	0,44±0,17 ^{1,2}	0,24±0,12 ^{1,2}	0,63±0,21 ^{1,2}
Міозин шлуночка, ураженого ДКМП (МДШ)	2,32±0,39	1,36±0,34 ¹	0,92±0,28 ¹	6,76±0,64 ¹

П р и м і т к а. ¹ Достовірна різниця з аналогічними показниками в групі ПАФ ($p < 0,001$); ² достовірна різниця з аналогічними показниками в групі МДШ ($p < 0,05$); К — сегментарні контрактурні пошкодження кардіоміоцита; РК — резорбція контрактур; ЛК — локальний кардіосклероз; М — міоцитоліз кардіоміоцита.

Таблиця 3

Відносний об'єм (%) кардіоміоцитів з різними типами пошкоджень у міокарді мишей після їхньої імунізації міозином шлуночка людини, хворої на ДКМП, на різних етапах експерименту (за даними світлової мікроскопії) ($M \pm m$)

Антиген	День	Тип пошкодження кардіоміоцита			
		К	РК	ЛК	М
Міозин шлуночка, ураженого ДКМП	14-й	1,12±0,29	0,24±0,12 ²	0,00±0,00	1,24±0,31 ²
	21-й	2,32±0,39 ¹	1,36±0,34 ^{1,2}	0,92±0,28 ^{1,2}	6,76±0,64 ^{1,2}
	52-й	2,48±0,41 ^{1,2}	1,68±0,34 ^{1,2}	2,64±0,53 ^{1,2}	14,00±1,09 ^{1,2}
	120-й	5,16±0,69 ^{1,2}	1,12±0,36 ^{1,2}	1,12±0,32 ^{1,2}	8,56±0,69 ^{1,2}
Повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ)	14-й	1,40±0,39	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	21-й	1,32±0,39	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,09
	52-й	0,80±0,25	0,08±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00
	120-й	0,68±0,22	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,04

П р и м і т к а. ¹ Достовірна різниця з аналогічними показниками на першому етапі експерименту (14 днів), $p < 0,01$; ² достовірна різниця з аналогічними показниками в групі ПАФ, $p < 0,01$; К — сегментарні контрактурні пошкодження кардіоміоцита; РК — резорбція контрактур; ЛК — локальний кардіосклероз; М — міоцитоліз кардіоміоцита.

річається значно частіше, ніж сегментарні контрактурні. Має місце гіпертрофія окремих груп кардіоміоцитів, деякі клітини мають кілька ядер і збільшений об'єм саркоплазми. Картина в цілому дуже подібна до тієї, що спостерігають при гістологічних дослідженнях міокардів людини, уражених ДКМП.

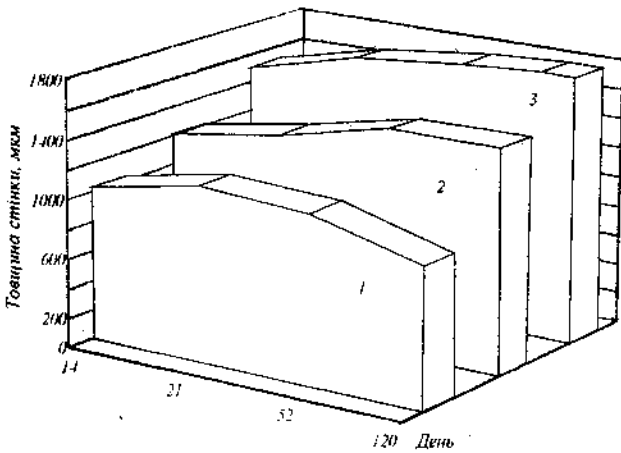
Імунізація МНШ викликає такі ж мікроциркуляторні зміни. Крім того, виявлено, що набряк і пошкодження стінок артерій і артеріол відсутній, периваскулярний набряк вкрай слабкий. Стромальна реакція також відсутня. Оперізуювальні клітини поодинокі, без дегрануляції. Знайдено контрактурні пошкодження кардіоміоцитів I—III ступеня.

У табл. 2 представлено результати обрахунку відносного об'єму, який займають кардіоміоцити з різними типами пошкоджень.

З наведених даних випливає, що на 21-й день

експерименту кількість пошкоджень досить значна при імунізації всіма типами міозинів, але найбільше пошкоджень кардіоміоцитів спостерігається при імунізації МДШ. Кількість деяких видів пошкоджень достовірно відрізняється від такої при імунізації МНШ та ПАФ. При імунізації тварин МДШ протягом довгого терміну отримано низку досить цікавих результатів. У табл. 3 представлено результати обрахунку пошкоджень кардіоміоцитів при імунізації МДШ протягом тривалого часу. Кількість деяких пошкоджень кардіоміоцитів зростає з часом і досягає максимуму на 52-й день, після чого їхня кількість зменшується на 120-й день, а число деяких з них зростає і досягає максимуму на 120-й день.

Так, відносна кількість кардіоміоцитів з міоцитолізом різко зростає на 52-й день від початку



Товщина міокарда лівого шлуночка мишей лінії BALB/c після імунізації міозином, виділеним зі шлуночка серця, ураженого ДКМП (1), та шлуночка нормального серця людини (2); 3 — контроль

імунізації і дещо падає на 120-й день, при цьому внесок ПАФ незначний.

Однією з характерних ознак ДКМП у людини є зменшення товщини стінки лівого шлуночка серця. При імунізації мишей лінії BALB/c різними препаратами міозинів людини визначено потоншення лівого шлуночка серця порівняно з контролем в усіх експериментальних групах вже на 14-ту добу після імунізації. Ця тенденція з часом не змінюється. Повного відновлення товщини лівого шлуночка не відбулося ні в одній експериментальній групі.

Найбільше зменшення параметра у порівнянні з контролем виявлено у тварин, імунізованих міозином, виділеним зі шлуночка серця, ураженого ДКМП, що наглядно демонструє рисунок.

Паралельно з вивченням морфологічних і гістологічних пошкоджень, які виникають у кардіоміоцитах при імунізації мишей різними препаратами міозинів людини, виявлено зміни АТФ-ної активності актоміозину мишей у динаміці розвитку експериментальної хвороби, оскільки прямим показником роботи м'язів, сили їхнього скорочення є АТФ-на активність.

Як видно з даних табл. 4, АТФ-на активність кардіального актоміозину міокардів піддослідних тварин у динаміці розвитку патології після імунізації міозинами людини змінюється не так драматично, але і тут визначається достовірна різниця між окремими групами. Так, на 21-й день після імунізації в усіх групах АТФ-на активність достовірно відрізняється від контролю (група ПАФ).

Крім того, групи МНШ проявляють достовірно нижчу АТФ-ну активність, ніж МДШ. Чутливість до іонів кальцію при цьому достовірно не змінювалася. АТФ-на активність міозину миші варіювала лише на ранніх стадіях експерименту і поверталась до вихідних значень на пізніх етапах розвитку ДКМП.

Вивчення кардіоваскулярних хвороб людини, зокрема, молекулярних механізмів їхнього виникнення та розвитку є вкрай важливим і складним. Зміни, які виникають у серці на клітинному і молекулярному рівнях, можна визначити лише в результаті біопсії, що пов'язано з великими труднощами і ризиком, або після смерті пацієнта. Тому створення адекватної моделі захворювання на лабораторних тваринах є дуже важливим.

Експериментальна модель хвороби повинна бути максимально наближена до тієї, що спостерігається у людини. У табл. 5 показано кореляцію параметрів, які визначено у хворих на ДКМП, і отриманих нами в експерименті на мишах лінії BALB/c при імунізації їх МДШ.

Виходячи з результатів, наведених у табл. 5, при імунізації мишей лінії BALB/c міозином, виділеним із серця людини, ураженого ДКМП, у тварин з часом розвивається захворювання, подібне до ДКМП. При цьому міозин, виділений з нормального серця, не викликає у мишей вищезазначеної хвороби (даних у таблиці не наведено).

Враховуючи те, що процедуру виділення та очищення препаратів міозинів проводили за однакових умов і згадані препарати не відрізнялися ні за ізоелектричною точкою, ні за рухливістю в поліакриламідному гелі, ми припустили, що вони різняться за посттрансляційними модифікаціями, серед яких фосфорилювання, моно- і поліглікозилювання, ацетилювання тощо або ж має місце часткова денатурація міозину, яка призводить до оголення нових епітопів та до іншого характеру імунної відповіді. Наслідком таких модифікацій є неправильний фолдинг молекули міозину, поява нових антигенних детермінант, через що вона перестає розпізнаватися імунною системою організму як «своє» і стає аутоантигеном.

Висновки. 1. Міозин, виділений із ушкодженого ДКМП міокарда, має інші імуногенні властивості, ніж міозин з нормального міокарда.

2. Антитіла проти міозину, виділеного із ушкодженого ДКМП міокарда, викликають у тварин глибокі зміни в морфології кардіоміоцитів та АТФ-

Таблиця 4

АТФ-на активність кардіального актоміозину миші у різні строки після імунізації препаратами міозинів людини ($M \pm m$)

Антиген	День	Активність		
		Ca ²⁺ -середовище, нмоль P ₁ ·мг ⁻¹ ·хв ⁻¹	ВГТА-середовище, нмоль P ₁ ·мг ⁻¹ ·хв ⁻¹	Чутливість до Ca ²⁺ , %
Міозин шлуночка, ураженого ДКМП (МДШ)	21-й	190,75±2,15 ¹	140,05±1,65	26,56±1,69
	52-й	164,65±2,45 ¹	112,65±3,15 ¹	31,53±2,93
Міозин нормального шлуночка	21-й	184,20±0,90 ^{1,2}	142,20±1,44	23,14±0,69
	52-й	162,97±1,28	111,35±0,63 ¹	31,66±0,33
Повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ)	21-й	181,20±0,92	136,87±1,67	24,45±1,11
	52-й	154,20±1,34	106,07±0,44	31,19±0,89

Примітка. ¹Достовірна різниця з аналогічними показниками в групі МДШ ($p < 0,05$); ²достовірна різниця з аналогічними показниками в групі ПАФ ($p < 0,05$).

Таблиця 5

Ознаки, що спостерігаються при ДКМП та у підослідних тварин

Ознаки	Зміни	
	При ДКМП	У підослідних тварин
Морфологічні		
Порожнини серця	Зростають	Не визначали
Товщина стінки лівого шлуночка	Зменшується	Зменшується
Гістологічні		
Міоцитоліз	Зростає	Зростає
Локальний кардіосклероз	Зростає	Зростає
Біохімічні		
АТФ-на активність кардіоміозину	Зменшується	Зменшується
Імунологічні		
Кількість аутоантитіл до власного кардіоміозину	Зростає	Зростає

ній активності актоміозину, ніж антитіла проти нормального міозину.

3. Імунізація МДШ, але не МНШ, спричинює морфологічні, гістологічні та біохімічні зміни в міокарді, характерні для ДКМП людини.

4. Отримані дані дозволяють запропонувати імунізацію шлуночковим міозином, виділеним із ушкодженого ДКМП міокарда, як модель індукованого ДКМП-подібного захворювання у мишей BALB/c.

V. I. Bobyk, D. V. Ryabenko, O. V. Sergienko, I. V. Trunina,
O. M. Fedorkova, L. M. Morozova, L. L. Sidork

Experimental model of autoimmune myosin-induced myocardium injury

Summary

Experimental model of autoimmune myosin-induced injury of

BALB/c mouse myocardium, similar to human dilated cardiomyopathy (DCM), has been developed. The immunization by myosin, obtained from DCM-affected human heart initiated the following DCM-like myocardial damage: myocytolysis, cardiosclerosis, thinning of left ventricular wall, decrease in cardiac actomyosin ATP-ase activity and increase in anti-myosin autoantibodies level.

Keywords: dilated cardiomyopathy, autoantibodies, myosin, myocardial damage.

В. И. Бобык, Д. В. Рябенко, О. В. Сергиенко, И. В. Трунина,
О. М. Федоркова, Л. М. Морозова, Л. Л. Сидорик

Разработка экспериментальной модели аутоиммунного миозин-индуцированного повреждения миокарда

Резюме

Разработана экспериментальная модель миозин-индуцированного повреждения миокарда мышей линии BALB/c, подобного дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) человека. Показано, что лишь миозин, полученный из поврежденного ДКМП миокарда, вызывает у подопытных животных повреждение миокарда.

карда, характерные для ДКМП, а именно: уменьшение толщины левого желудочка сердца, миоцитоллизис и кардиосклероз, снижение АТФ-ной активности, достоверное повышение уровня специфических аутоантител к собственному кардиомиозину.

Ключевые слова: дилатационная кардиомиопатия человека, аутоантитела, миозин, повреждения миокарда.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Keeling P. J., Tracy S. Link between enteroviruses and dilated cardiomyopathy: serological and molecular data // *Br. Heart J.*—1994.—72 (suppl. S).— S. 25—29.
- Dale J. B., Beachey E. H. Sequence of myosin-cross-reactive epitopes of streptococcal M protein // *J. Exp. Med.*—1986.—164.—P. 1785—1790.
- Cunha-Neto E., Duranti M., Gruber A., Zingales B., Messias J., Stolf N., Bellotti J., Pattaroyo M. E., Pilleggi F., Kalil J. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope cross-reactive to an immunodominant trypanosoma cruzi antigen // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 3541—3545.
- McCall D. Alcohol and the heart // *Curr. Problems. Cardiol.*—1987.—27.—P. 351—408.
- Staudt A., Schaper F., Stangl Y., Plogemann A., Bohm M. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution // *Circulation.*—2001.—103.—P. 268—286.
- Rose N. R., Hill S. L. Autoimmune myocarditis // *Int. J. Cardiol.*—1996.—54.—P. 171—175.
- Бобык В. И., Веберов А. В., Рябенко Д. В., Дубровская Г. В., Роднин Н. В., Сидорик Л. Л. Выделение основных тканеспецифических антигенов из миокардов здоровых лиц и больных дилатационной кардиомиопатией // *Биополимеры и клетка.*—1993.—9, № 1.—С. 63—65.
- Бобык В. И., Федоркова О. М., Сидорик Л. Л., Рябенко Д. В., Ковеня Т. В., Мацука Г. Х. Желудочковый и предсердный кардиальный миозин при ДКМП; сравнительное исследование иммунореактивности // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 3.—С. 200—207.
- Сидорик Л. Л., Федоркова О. М., Рябенко Д. В., Бобык В. И., Данилова В. М., Трегубов В. С., Мацука Г. Х. Сравнительное исследование иммунореактивности тропонинового комплекса при дилатационной и ишемической кардиомиопатиях // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 1.—С. 40—45.
- Li Z., Menoret A., Srivastava P. Roles of heat shock proteins in antigen presentation and cross-presentation // *Curr. Opin. Immunol.*—2002.—14.—P. 45—51.
- Portig I., Pankuwelt S., Maisch B. Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy // *J. Mol. Cell Cardiol.*—1997.—29.—P. 2245—2251.
- Fink A. I. Chaperon-mediated protein folding // *Physiol. Revs.*—1999.—79.—P. 185—192.
- Apoptosis, and myocardial injury // *Circulation.*—2002.—105.—P. 2899—2904.
- Arber S., Hunter J. J., Ross J., Hongo M., Sansig G., Borg J., Perriard J. C., Chlen K. R., Caroni H. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure // *Cell.*—1997.—88.—P. 393—403.
- Margossian S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 13747—13754.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680—685.
- Matsiota P., Druet P., Dosquet P. Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.*—1987.—69.—P. 79—88.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72.—P. 193—200.
- Kodama T., Fukui K., Kometani K. The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate // *J. Biochem.*—1986.—99.—P. 1465—1472.
- Целларуус Ю. Г., Семенова Л. А., Непомнящих Л. М. Очаговые повреждения и инфаркт миокарда: Световая, поляризационная и электронная микроскопия: Метод. разработка по патолог. анатомии.—Новосибирск, 1980.—72 с.
- Mize R. R. Quantitative image analysis for immunocytochemistry and *in situ* hybridization // *Neurosci. Meth. J.*—1994.—54.—P. 219—237.
- Rose N., Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited) // *Immunol. Today.*—1993.—14.—P.
- Caforio A. L. P., Bonifacio E., Stewart J. T., Neglia D., Parodi O., Bottazzo J. F., McKenna W. J. Novel organ-specific circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy // *J. Amer. Chem. Soc.*—1990.—15.—P. 1527—1534.
- Hein S., Schaper J. The pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure: insights from cell morphology and biology // *Curr. Opin. Cardiol.*—1996.—11.—P. 293—301.
- Caforio A. L. P., Bonifacio E., Stewart J. T., Neglia D., Parodi O., Bottazzo J. F., McKenna W. J. Identification of a- and b-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy // *Circulation.*—1992.—85.—P. 1734—1742.
- Caforio A. L. P., Goldman J. H., Baig M. K., Haven A. J., Libera L. D., Keeling P. J., McKenna W. J. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression // *Heart.*—1997.—77.—P. 62—67.

УДК 577.152

Надійшла до редакції 26.12.06