

Динаміка зміни вмісту білків теплового шоку в лізаті клітин слизової оболонки шлунка щурів під час розвитку експериментального хронічного атрофічного гастриту

С. Я. Мандрик^{1,2}, Л. М. Гайда¹, Л. М. Капустян², І. О. Тихонкова²,
О. В. Дробінська¹, Л. Л. Сидорик², Л. І. Остапченко¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 03143, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

Sergman83@mail.ru

Методом імуноблотингу досліджено вміст білків теплового шоку Hsp60, Hsp70 і Hsp90 в лізаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку експериментального хронічного атрофічного гастриту (ХАГ). Вміст білків Hsp60 і Hsp70 статистично достовірно підвищувався на ранніх (1-й, 2-й тижні) і пізніх (5-й, 6-й тижні) етапах розвитку моделі захворювання. Рівень білка Hsp90 зростає на 1-й тиждень ХАГ. Показано, що збільшення вмісту шаперонів спостерігається під час активації процесів апоптозу, генерації активованих форм кисню і розвитку атрофії шлунка.

Ключові слова: хронічний атрофічний гастрит, атрофія, білки теплового шоку.

Вступ. Порушення просторової структури окремих білків клітини все частіше розглядається як одна з можливих причин виникнення і перебігу низки захворювань людини (зокрема, окремих нейродегенерацій).

Відомо, що деякі білки клітини (найчастіше, це білки з відносно низькою молекулярною масою) після синтезу на рибосомах можуть самостійно набувати нативної просторової конформації, яка енергетично є найстабільнішою [1]. Це яскраво продемонстровано в класичних експериментах Асфінсена з рибонуклеазою [2]. Проте велика кількість білків для забезпечення правильної про-

сторової конформації потребує участі спеціального класу факторів – молекулярних шаперонів. До останніх належить більшість білків теплового шоку. Участь і молекулярні механізми експресії шаперонів при розвитку таких захворювань шлунково-кишкового тракту, як стресова виразка, хронічний гастрит, поліпи шлунка і дванадцятипалої кишки, рак різних відділів стравоходу та ін., потребують значно глибшого вивчення [3–5]. Більше того, однією з основних проблем функціонування шаперонів у клітинах слизової оболонки шлунково-кишкового тракту є дослідження їхньої участі в регуляції молекулярних механізмів апоптозу і проліферації [5–7].

Тому метою роботи було дослідити вміст білків Hsp60, 70, 90, а також Вах і Ki-67 у лізаті клітин

слизової оболонки шлунка щурів на різних етапах розвитку хронічного атрофічного гастриту (ХАГ).

Матеріали і методи. При роботі зі щурами дотримувалися міжнародних рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з Європейською конвенцією. Використовували самців білих лабораторних нелінійних щурів з початковою масою 180–220 г. Тваринам протягом 6 тижнів щоденно вводили 2 %-й розчин саліцилату натрію (2 мл інтрагастралью), а питну воду замінювали 20 мМ розчином діоксихолату натрію.

Рівні експресії білків, активності антиоксидантних ферментів і концентрацію ТБК-активних продуктів (ТБК-АП, продукти окиснення ліпідів, які утворюють комплекси з тіобарбітуровою кислотою) в гомогенаті слизової шлунка визначали на 1-, 2-, 3-, 4-, 5- і 6-й тижні моделі [8].

Лізис отриманих клітин слизової оболонки шлунка проводили в лізуючому буфері (20 мМ трис-НCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мкМ ЕДТА, 1 %-й тритон X-100, інгібітори протеаз).

Концентрацію білка визначали методом Бредфорда [9]. Електрофорез лізатів клітин проводили за денатурувальних умов по Леммли [10]. Імуноблотинг отриманих проб здійснювали згідно з [11].

Кількісну обробку результатів імуноблотингу виконували з використанням програми TotalLab.

Поліклональні антитіла проти білків Hsp90 і Hsp60 одержано за методом, описаним в [12]. Препарат Hsp90, очищений з мозку бика, люб'язно надано проф. Я. Кузницьким (Інтернаціональний інститут молекулярної і клітинної біології, Польща). Поліклональні антитіла проти DnaK (прокаріотний аналог еукаріотного Hsp70) одержано від проф. Н. Пфаннера (Університет м. Фрайбурга, Німеччина).

Вміст ТБК-АП оцінювали згідно з методом Стальної і співав. [13]. Метод ґрунтується на здатності маленового діальдегіду утворювати комплекси з тіобарбітуровою кислотою. Концентрацію ТБК-АП визначали спектрофотометрично при довжині хвилі $\lambda = 532$ нм.

Активність супероксиддисмутази (СОД) у клітинах визначали за Чеварі та співавт. [14]; активність каталази – за Королюк та співавт. [15].

Для статистичної обробки результатів дослідження використовували пакет статистичних програм «STATISTICA for Windows 5.1». Статистичну обробку результатів здійснювали на основі 3–4 дослідів. Значення $p < 0,05$ розглядали як критерій достовірності різниці.

Результати і обговорення. Дослідження ролі окремих білків теплового шоку у захисті слизової оболонки шлунка за умов розвитку і переходу ХАГ у рак шлунка є досить проблематичними як з медичної, так і з біологічної точки зору. Однією з причин є поліетіологічність хронічного гастриту (ХГ). Так, більше 70 % усіх випадків ХГ припадає на гастрити, асоційовані з інфекцією *Helicobacter pylori*; 15–18 % – на аутоімунні гастрити, викликані антитілами до окремих білків парієтальних клітин; близько 10 % – на гастрити, пов'язані з вживанням нестероїдних протизапальних засобів; менше 5 % становлять рефлюкс-гастрити, спричинені рефлюксами жовчі з дванадцятипалої кишки, і до 1 % – так звані рідкісні форми ХГ, до яких відносять еозинофільний, лімфоцитарний ХГ та ін. [16]. Часова динаміка атрофії є складною і може тривати до 17–30 років.

Відповідно до класичних досліджень Корреа, ХГ може переходити в рак шлунка через низку дискретних взаємопов'язаних стадій [17, 18]. Тому пошук адекватної експериментальної моделі цього захворювання є одним із основних завдань при дослідженні молекулярних механізмів цитопротекції шлунка. Нами використано експериментальну модель ХАГ, розроблену в працях Ванг та співавт. [8]. Розвиток ХАГ у щурів викликали щоденним пероральним введенням 2 %-го розчину саліцилату натрію і заміною питної води на 20 мМ розчин діоксихолату натрію. Саліцилат натрію безпосередньо пошкоджує слизовий бар'єр шлунка [6–8]. Окрім цього, саліцилат натрію є інгібітором ферменту синтезу простагландинів класу Е – простагландин-циклооксигенази. Простагландини класу Е, зокрема PGE₂, належать до гуморальних факторів, причетних до захисту ентероцитів шлунка [8]. Пошкодження слизової оболонки, викликані впливом діоксихолату натрію, схожі на такі, спричинені впливом солей жовчних кислот. Останні потрапляють у шлунок з дванадцятипалої кишки під

Концентрація ТБК-активних продуктів і активності антиоксидантних ферментів у лізаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку хронічного атрофічного гастриту (ХАГ)

Тижні розвитку ХАГ	Активність СОД, ум. од.хв ⁻¹ ·мг білка ⁻¹	Активність каталази, нмоль Н ₂ О ₂ ·хв ⁻¹ ·мг білка ⁻¹	Концентрація ТБК-АП, нмоль·мг білка ⁻¹
Контроль	0,192±0,016	7,22±0,64	94,92±8,26
1	0,138±0,013*	9,21±0,87*	179,98±15,85*
2	0,086±0,008*	5,27±0,51*	104,7±9,61
3	0,067±0,006*	4,92±0,36*	142,83±13,75*
4	0,058±0,005*	7,56±0,69	124,83±12,08*
5	0,125±0,011*	6,39±0,58	150,44±14,27*
6	0,118±0,009*	6,39±0,62	150,7±13,83*

П р и м і т к а. Статистичну обробку результатів здійснювали на основі 3–4 дослідів; *значення статистично достовірно відрізняється від контрольних показників з $p < 0,05$.

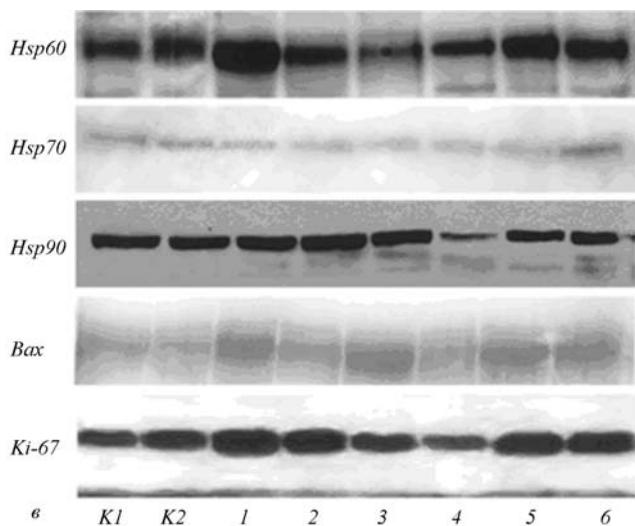
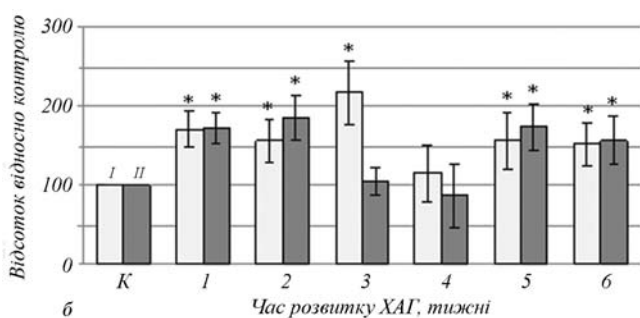
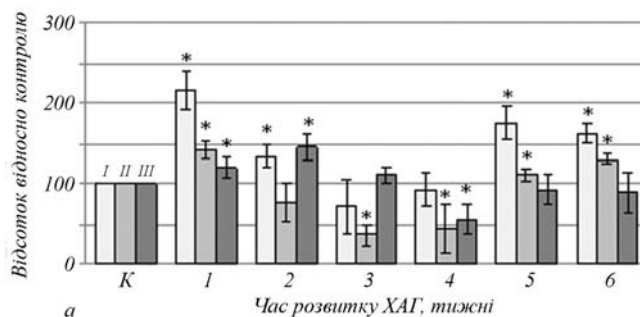
час рефлюксів жовчі і можуть порушувати нативну структуру ліпопротеїдів оболонки шлунка [8, 16]. У роботі Ванг та співавт. продемонстровано, що на 6-й тиждень моделі захворювання спостерігалася масова інфільтрація нейтрофілами слизової оболонки, зниження кількості травних залоз в антральному відділі і зменшення товщини муцинового шару [8]. Окрім того, за даними цих авторів, у слизовій шлунка на 6-й тиждень розвитку ХАГ виявлялись аномальні сферичні клітини великого розміру, що може вказувати на розвиток інтестинальної метаплазії [8]. Таким чином, використана модель ХАГ відповідає морфологічній картині рефлюкс-гастриту з переходом в інтестинальну дисплазію шлунка.

Концентрація ТБК-АП у лізаті слизової, починаючи з 1-го тижня моделі ХАГ у порівнянні з контролем статистично достовірно підвищувалася (таблиця). ТБК-АП утворюються в результаті взаємодії продукту перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою [13, 19]. Активація процесів ПОЛ незалежно від фактора індукції може призводити до деструктивних змін у клітині, пов'язаних з накопиченням продуктів окиснення. Продукти ПОЛ (малоновий діальдегід, вільні радикали жирних кислот і гідропероксиди залишків вищих жирних кислот) можуть інактивувати мембранні ферменти, порушувати білково-ліпідні взаємодії в мембранах,

утворювати міжмолекулярні зшивки, змінювати в'язкість ліпідної фракції та ін. [13, 19–21]. Рівень продукування ПОЛ за норми контролюється низкою антиоксидантних речовин (вітамін Е і С, убіхінон та ін.) і ферментів (СОД, каталаза, глутатіонпероксидаза тощо) [13–15, 19–21].

Аналіз даних, представлених у таблиці, вказує на те, що активність СОД у лізаті слизової шлунка статистично достовірно знижувалася, починаючи з 1-го тижня розвитку моделі захворювання. Активність каталази на 2-й і 3-й тижні ХАГ також достовірно знижувалася (таблиця). Падіння активностей СОД і каталази на окремих етапах моделі поряд із зростанням концентрації ТБК-АП може свідчити про зниження антиоксидантного потенціалу слизової і відповідно підвищення рівня таких активованих форм кисню, як супероксид-аніон, і розвиток оксидативного стресу. Збільшення рівнів активованих форм кисню (АФК) і активація процесу ПОЛ у тканинах продемонстровано при багатьох захворюваннях печінки, артритях, атеросклерозі, деяких інфекційних захворюваннях і т. п. Більше того, з активацією процесів ПОЛ пов'язане окиснення білків і утворення клітинних агрегатів [13, 19, 20].

Однією з можливих причин підвищення рівня ТБК-АП за умов розвитку даної моделі ХАГ може виступати активація запального процесу у слизовій оболонці шлунка [19]. Так, на різних етапах розвит-



Вміст білків: а – Hsp60 (I); Hsp70 (II), Hsp90 (III); б – Вах (I) і Ki-67 (II) в лізаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку хронічного атрофічного гастриту (ХАГ). Визначення вмісту білків проводили методом імуноблотингу на 1-, 2-, 3-, 4-, 5- і 6-й тижні розвитку ХАГ (в). Вміст білків подано у відсотках відносно контролю. Кількісну обробку результатів імуноблотингу здійснювали з використанням програми TotalLab. Статистично результати обробляли на основі 3–4 дослідів; *значення достовірно відрізняється від контрольних показників з $p < 0,05$

ку моделі ХГ нами проведено гістологічні дослідження слизової шлунка. На гістологічних препаратах показано, що рівень інфільтрації слизової оболонки нейтрофілами зростає у кінці 3-го тижня моделі захворювання. При цьому слизова оболонка шлунка потовщувалася, що може вказувати на посилення процесів регенерації тканини і проліферації у відповідь на введення саліцилату і діоксихолату натрію. На гістологічних зрізах тканин шлунка на 5-й і 6-й тижні спостерігається потоншення слизової оболонки, вона частково заміщується сполучною тканиною, що може слугувати одним із свідчень атрофії (даних не наведено).

У лізаті клітин слизової шлунка визначали також вміст проапоптичного білка Вах і білка – маркера проліферації Ki-67. З рисунка, б, видно, що вміст білка Вах у слизовій зростає вже на 1-й тиждень розвитку ХАГ. Максимальних значень показники вмісту білка Вах сягали на 3-й тиждень розвитку моделі захворювання (рисунком, б). Як уже зазначалося, на кінцевих стадіях розвитку моделі (5-й і 6-й тижні) відмічено зниження товщини слизової оболонки і її часткове заміщення сполучною тканиною, що може виступати одним із показників зменшення кількості травних залоз шлунка (атрофії). Відомо, що однією з причин атрофії є відмирання клітин травних залоз, зокрема, парієтальних клітин, які продукують соляну кислоту [16, 18]. Можливим поясненням активації процесів апоптозу і розвитку атрофії шлунка може слугувати посилення процесів генерації АФК, на що вказує підвищення концентрації ТБК-АП, починаючи з 1-го тижня розвитку ХАГ (таблиця).

Білок Ki-67 з'являється в ядрі клітин наприкінці G1 фази клітинного циклу. Можлива роль Ki-67 в клітині – це зв'язування з хроматином, що може відігравати певну роль у процесі поділу клітин. Показники рівня експресії Ki-67 можна використовувати для встановлення мітотичного індексу трансформованих клітин [22]. Максимальні, достовірно вищі за контроль значення вмісту білка Ki-67 спостерігали на 1-, 2-, 5- і 6-й тижні прогресування ХАГ (рисунком, б).

Отримані нами результати вказують на те, що в слизовій оболонці шлунка щурів відбувається по-

силення процесів вільнорадикального пошкодження ліпідів, розвиток запального процесу, а також активація процесів апоптозу і проліферації на окремих етапах перебігу моделі захворювання.

На експериментальній моделі ХАГ нами досліджено часову динаміку вмісту основних груп шаперонів у клітинах слизової оболонки шлунка. Вміст білків Hsp60 і Hsp70 у лізаті клітин слизової статистично достовірно зростає у кінці першого, а також на 5-й і 6-й тижні розвитку ХГ. На 3-й і 4-й тижні моделі спостерігали достовірне зниження вмісту Hsp70. Рівень білка Hsp90 порівняно з контрольними значеннями був достовірно вищим на 1-й і 2-й тижні і знижувався наприкінці 4-го тижня захворювання (рисунок, а).

У 1998 році було остаточно сформульовано визначення хронічного атрофічного гастриту. Згідно з цим ним, основними ознаками ХАГ є програмована втрата шлункових залоз і/або їхня заміна кишковими залозами і епітелієм кишкового типу (гастроінтестинальна метаплазія). Часто перебіг ХАГ тісно пов'язаний з розвитком раку шлунка, тому ХАГ відносять до передракових станів. Відповідно до класичних робіт Корреа, розвиток раку шлунка включає поступовий перехід ХАГ в інтестинальну метаплазію, дисплазію і аденокарциному інтестинального типу [17].

Загалом порушення балансу між процесами проліферації і апоптозу епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка є характерним для розвитку і перебігу ХАГ. Як зазначалося вище, білки теплового шоку, зокрема, Hsp70 і Hsp60 належать до молекулярних шаперонів клітини. Вони відіграють першорядну роль у процесах формування правильної нативної просторової конформації багатьох білків клітини.

Окрім цього, очевидно є роль згаданих білків у подальшому підтриманні просторового укладання поліпептидів і їхнього рефолдингу або ж протекції за умов дії на клітину різноманітних стресових факторів (денатурувальних речовин, підвищеної температури, порушення внутрішньоклітинного гомеостазу тощо) [16–18].

За умов стресу рівень експресії шаперонів різко зростає, що, очевидно, вказує на цитопротекторні властивості цих білків. Однак за умов фізіологічної

норми дані білки також експресуються на достатньо високому рівні, необхідному для забезпечення дозрівання новосинтезованих білків клітини. В активно проліферуючих клітинах рівні експресії окремих шаперонів (зокрема, Hsp73, Hsp60, Hsp27) є високими. Це зумовлено в першу чергу підвищенням швидкості білкового синтезу і відповідно потребою у фолдингу, рефолдингу, а також деградації незворотно денатурованих поліпептидів [1, 5].

Ключовим у захисті слизової оболонки за участі Hsp є контроль просторового укладання клітинних білків. Вже зазначалося, що, починаючи з перших тижнів розвитку ХАГ, відбувається інфільтрація слизової оболонки нейтрофілами і лімфоцитами. Це беззаперечно вказує на перебіг запального процесу в тканинах шлунка. Одним із наслідків інфільтрації слизової оболонки активованими нейтрофілами є посилення генерації АФК [16]. Підтвердженням зростання рівня генерації АФК може бути підвищення вмісту ТБК-АП у клітинах (таблиця). На збільшення в клітинах шлунка за умов розвитку хронічного гастриту рівня таких АФК, як супероксид-аніон, гідроксильний радикал і пероксид водню, може вказувати і зниження активностей ферментів СОД і каталази, причетних до їхнього знешкодження.

Так, відомо, що СОД каталізує реакцію дисмутації супероксид-аніона з утворенням пероксиду водню, який відновлюється до води за участі каталази [19, 20]. Швидкість генерації АФК у клітині залежно від стану метаболізму може змінюватися і, зокрема, підвищується при порушенні гомеостазу клітини. Такі АФК, як пероксид водню і гідроксильний радикал, здатні модифікувати білки і порушувати їхню просторову конформацію [19, 21]. Отже, роль молекулярних шаперонів за умов прогресування ХАГ, очевидно, визначається контролем якості клітинних білків шлунка.

Висновки. Таким чином, показано, що на окремих етапах розвитку моделі хронічного гастриту вміст шаперонів Hsp60, Hsp70 і Hsp90 у слизовій оболонці шлунка щурів зростає. Вочевидь, це вказує на участь даних білків у цитопротекції за умов розвитку оксидативного стресу і активації процесів апоптозу і проліферації в слизовій шлунка.

S. Ya. Mandryk, L. N. Gaida, L. N. Kapustian, I. O. Tykhonkova, O. V. Drobinska, L. L. Sidorik, L. I. Ostapchenko

Dynamics of heat shock proteins quantity in rats' gastric mucosa lysates upon chronic atrophic gastritis development

Summary

The levels of Hsp60, Hsp70 and Hsp90 in rats' gastric mucosa cells lysates upon the development of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) were investigated by the immunoblot-analysis. The quantities of Hsp60 and Hsp70 at the early (the first two weeks) and late (the 5–6th weeks) stages of disease progression were reliably higher in comparison with normal mucosa. It was also observed an increase in Hsp90 expression at the end of the first week of CAG. The increase in Hsp expression in gastric mucosa was shown upon activation of apoptosis, generation of reactive oxygen species, and gastric atrophy development.

Keywords: chronic atrophic gastritis, atrophy, heat shock proteins.

С. Я. Мандрюк, Л. Н. Гайда, Л. Н. Капустян, И. А. Тихонкова, О. В. Дробинская, Л. Л. Сидорик, Л. И. Остапченко

Динамика изменения количества белков теплового шока в лизате слизистой оболочки желудка крыс в условиях развития экспериментального хронического атрофического гастрита

Резюме

Методом иммуноблотинга исследовано количество белков теплового шока Hsp60, Hsp70 и Hsp90 в лизате клеток слизистой оболочки желудка крыс в условиях развития экспериментального хронического атрофического гастрита (ХАГ). Количество белков Hsp60 и Hsp70 статистически достоверно повышалось на ранних (1-я, 2-я недели) и поздних (5-я, 6-я недели) этапах развития заболевания. Уровень белка Hsp90 возрастал в первую неделю ХАГ. Показано, что увеличению количества шаперонов сопутствует активация процессов апоптоза, генерации активированных форм кислорода и развития атрофии желудка.

Ключевые слова: хронический атрофический гастрит, атрофия, белки теплового шока.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fink A. L. Chaperone-mediated protein folding // *Phys. Rev.*—1999.—**79**.—P. 425–449.
2. Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // *Science*.—1973.—**181**.—P. 223–230.
3. Ciocca D. R., Calderwood S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications // *Cell Stress Chaperones*.—2005.—**10**.—P. 816–103.
4. Malago J. J., Koninkx J. F. G., Dijk J. E. The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium // *Cell Stress Chaper.*—2002.—**7**.—P. 191–199.
5. Oksala N. K. J., Oksala A., Paavonen T., Alhava E., Paimela H. Heat shock preconditioning modulates proliferation and apoptosis after superficial injury in isolated guinea pig gastric mucosa via an eicosanoid and protein synthesis-dependent mechanism // *APMIS*.—2003.—**111**.—P. 497–506.

6. Rokutan K. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection // *J. Gastroenterol. Hepatol.*—2000.—**15**.—P. 12–19.
7. Tsukimi Y., Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing // *Biol. Pharm. Bull.*—2001.—**24**.—P. 1–9.
8. Wang L.-J., Chen S.-J., Chen Z., Cai J.-T., Si J.-M. Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and regulating mechanism of protein expression in rats // *J. Zhejiang Univ. SCIENCE B*.—2006.—**7**.—P. 634–640.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**.—P. 248–254.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—**227**.—P. 680–685.
11. Bollag D. M., Rozycki D. M., Edelstein S. J. Protein methods.—New York, 1996.—415 p.
12. 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.—**2**, № 22.—С. 117–120.
13. Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация.—Київ: Наук. думка, 1991.—178 с.
14. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лаб. дело*.—1985.—№ 11.—С. 578–681.
15. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело*.—1988.—№ 1.—С. 16–19.
16. Григор'єв П. Я., Стародуб С. М., Яковенко Е. П., Гаврилюк М. Є., Шостак С. Є. Хвороби органів травлення (Діагностика і лікування).—Тернопіль: Укрмедкнига, 2000.—102 с.
17. Correa P. The epidemiology and pathogenesis of chronic gastritis: three etiologic entities // *Front. Gastrointest. Res.*—1980.—**6**.—P. 98–108.
18. Fox J. G., Wang T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer // *J. Clin. Inv.*—2007.—**117**.—P. 60–69.
19. Владимиров М. В., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.—78 с.
20. McCord J. M., Edas M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision // *Biomed. Pharmacol.*—2005.—**59**.—P. 139–142.
21. Lushchak V. I., Gospodaryov D. V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Biol. Int.*—2005.—**29**.—P. 187–192.
22. Тихонкова І. О., Лізогузов В. В., Хожасенко Ю. В., Довгопола О. О., Коровін С. І., Овчаренко Г. В., Усенко В. С., Роднін М. В., Філоненко В. В. Дослідження структурно-функціональних властивостей імуногенного фрагмента Ki-67 антигену та отримання до нього полі- і моноклональних антитіл // *Біополімери і клітина*.—2005.—**21**, № 2.—С. 180–183.