

УДК 616-092.19

## РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕФЕНСИНОВ ИЗ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРЫС

Алешина Г.М., Янкевич И.А., Кокряков В.Н.

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»  
Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург,  
e-mail: galina\_aleshina@mail.ru*

Разработана и оптимизирована иммуноферментная тест-система для количественного определения дефенсина RNP-3 из нейтрофильных гранулоцитов крысы, одного из катионных антимикробных пептидов, являющихся ключевыми молекулами врожденного иммунитета. Дизайн разработанной тест-системы – «сэндвич» на основе поликлональных антител в качестве первичных антител и их конъюгатов с пероксидазой хрена, используемых в качестве детектирующих антител. Полученная система имеет чувствительность 0,1 нг/мл и диапазон измерений 0,1–8 нг/мл. Данная тест-система выявляет также дефенсин RNP-2 (с эффективностью 3% от значений для RNP-3) и не выявляет дефенсины RNP-1 и RNP-4. Установлено, что среднее значение концентрации дефенсина RNP-3 в плазме крови у интактных животных составляет  $36 \pm 6$  нг/мл (среднее  $\pm$  ошибка среднего), а относительное содержание –  $9,82 \pm 3,02$  нг /1 млн нейтрофилов.

**Ключевые слова:** дефенсины, врожденный иммунитет, иммуноферментный анализ

## A DEVELOPMENT OF AN ENZYME IMMUNOASSAY FOR RAT NEUTROPHIL DEFENSINS

Aleshina G.M., Yankelevich I.A., Kokryakov V.N.

*Institute of Experimental Medicine of the NorthWest Branch of the Russian Academy  
of Medical Sciences, Saint Petersburg, e-mail: galina\_aleshina@mail.ru*

We developed and optimized an enzyme immunoassay for rat neutrophil defensin RNP-3, one of cationic antimicrobial peptides that participate in host defense. The assay utilizes a sandwich design with a polyclonal capture antibody and a polyclonal detecting antibody conjugated with horseradish peroxidase. The assay has a sensitivity of 0,1 ng/ml and a working range of 0,1–8,0 ng/ml. This enzyme immunoassay also detects defensin RNP-2 (with an efficiency of 3% of the values for the RNP-3), and doesn't detect RNP-1 and RNP-4. It has been shown that concentration of RNP-3 in blood of intact animals is  $36 \pm 6$  ng/ml (mean  $\pm$  std. err. of mean) or  $9,8 \pm 3,0$  ng /1 million neutrophils.

**Keywords:** defensins, innate immunity, ELISA

Антимикробные пептиды животных (дефенсины, кателицидины), одним из основных источников которых являются нейтрофильные гранулоциты, представляют собой ключевые молекулярные факторы врожденного иммунитета. Механизмы врожденного иммунитета отвечают, прежде всего, за неотложное реагирование организма животных и человека на инфекцию, заключающееся в распознавании ее природы, дискриминации от «своего» и последующей элиминации патогенного начала. У позвоночных эта система иммунной защиты является также базовой, определяющей как резистентность к большинству инфекционных агентов, так и осуществляющей инструктивную роль в реализации иммунных реакций приобретенного типа, которые протекают с участием иммуноглобулинов и Т-лимфоцитов [2; 7].

$\alpha$ -Дефенсины и  $\beta$ -дефенсины человека хемотаксичны для моноцитов, Т-клеток и незрелых дендритных клеток [12; 13]. Индуцированная дефенсинами дегрануляция тучных клеток и повышение продукции ИЛ-8 при воспалительных процессах

способствует привлечению и накоплению нейтрофилов [14]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что антимикробные пептиды подавляют бактериально-индуцированную продукцию цитокинов, стимулируют заживление ран и ангиогенез [4; 5], обладают митогенной активностью [11].

В то же время исследование роли эндогенных дефенсинов, секретируемых нейтрофильными гранулоцитами при различных неблагоприятных воздействиях на организм, в развитии патофизиологических процессов на экспериментальных моделях с использованием животных затруднено отсутствием коммерческих наборов для количественного выявления альфа-дефенсинов крыс.

**Целью нашей работы** явилась разработка и оптимизация иммуноферментной тест-системы для количественного выявления в биологических жидкостях альфа-дефенсина крысы RNP-3.

### Материалы и методы исследования

*Выделение дефенсинов из лейкоцитов крысы*

Выделение дефенсинов крысы проводили по стандартной схеме, ранее применяемой нами для выделения дефенсинов других видов животных [3].

В качестве исходного материала использовали лейкоциты экссудата крыс, который инициировали внутрибрюшинным введением 0,5% крахмала в 0,85% NaCl. Через 16–18 часов после введения производился забор экссудатной жидкости путем промывания брюшной полости животных 0,85% раствором NaCl, с добавлением 0,07% ЭДТА. Около 90% клеток составляли нейтрофилы (контролировали микрокопированием). Клетки осаждали центрифугированием и осадок гомогенизировали в 10% уксусной кислоте. Кислоторастворимый экстракт, содержащий катионные пептиды, подвергали ультрафильтрации через фильтр «Миллипор» YM-10. Затем концентрировали на камере для ультрафильтрации «Amicon» через фильтр «Миллипор» YM-1. Сконцентрированный экстракт фракционировали с помощью высокоэффективной обратнофазовой жидкостной хроматографии на установке Gold System фирмы Beckman, США. Разделение проводили на колонке Vydac C-18 (25×0,46 см; диаметр частиц сорбента 5 мкм) с использованием линейного градиента: 0–60% (за 60 мин). Скорость потока: 1 мл/мин. Фазы: вода (с 0,1% трифторуксусной кислоты) – ацетонитрил. Гетерогенность полученных фракций оценивали с помощью электрофореза в кислой среде [8]. Были получены в чистом виде дефенсины RNP-3 и RNP-4. Для получения очищенных фракций RNP-1 и RNP-2 проводили рехроматографию в условиях более пологого градиента концентрации ацетонитрила – 20–40% за 40 минут.

Только RNP-3 был получен в количестве, достаточном для разработки иммуноферментной тест-системы.

#### *Связывание дефенсинов крысы с активированной агарозной матрицей*

Связывание антигена с цианоген бромид-активированной агарозой фирмы Sigma (C9210) проводили согласно протоколу, приложенному к матрице:

0,5 г активированной агарозы фирмы Sigma промывали охлажденной 1 мМ HCl, далее промывали дистиллированной водой, затем 0,2 М буфером бора-борная кислота с pH 8,0, содержащим 1 М NaCl. Добавили 1,2 мг смеси дефенсинов в 0,2 М буфере бора-борная кислота с pH 8,0, содержащем 1 М NaCl и инкубировали на качалке на 3 часа при комнатной температуре.

Полученную матрицу со связанными дефенсинами уравнивали раствором 0,2 М глицина и оставили на ночь при 4°C. Затем упаковали матрицу в колонку, промыли 4 раза поочередно 0,2 М буфером бора-борная кислота pH 8,0 и содержащего 1 М NaCl и 0,1 М натрий-ацетатным буфером pH 4,0 с 0,5 М NaCl. Уравнивали колонку 1 М NaCl и хранили при 4°C.

#### *Конъюгация дефенсина RNP-3 с овальбумином*

1 мг дефенсина RNP-3 разводили в 500 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера с pH 7,0. К полученному раствору добавили 5 мг овальбумина, предварительно разведенного в 500 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера с pH 7,0. К полученной смеси добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,02% раствора глутаральдегида в 0,1 М натрий-фосфатном буфере с pH 7,0. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и удаляли глутаральдегид с помощью колонки PD-10.

#### *Иммунизация кроликов конъюгатом дефенсина с овальбумином*

Иммунизация кроликов проводилась по следующей схеме:

– первая иммунизация в подушечки задних лап: 200 мкл конъюгата с концентрацией 1,2–1,5 мг/мл

смешивали и суспензировали с 250 мкл полного адьюванта Фрейнда;

– вторая иммунизация на 29–31 день после 1-й иммунизации, подкожно вдоль линии позвоночника: 200 мкл конъюгата с концентрацией 1,2–1,5 мг/мл смешивали и суспензировали с 250 мкл неполного адьюванта Фрейнда;

– третья иммунизация проводилась на 29–31 день после 2-й иммунизации по той же схеме.

Через 10 дней после третьей иммунизации производили забор крови из ушной вены, получали сыворотку, в которую добавляли мертиолат натрия до концентрации 0,01% и хранили при 4°C.

Полученную в результате иммунизации сыворотку проверяли на наличие специфических антител иммуноцитохимическим методом. Результат оценивали визуально по степени окрашенности гранул нейтрофилов на мазках крови интактных крыс. При использовании неиммунных кроличьих сывороток окрашивание не наблюдалось.

#### *Выделение антител к крысиным дефенсинам из фракции белков, обогащенной иммуноглобулинами*

К 10 мл иммунной сыворотки добавляли 5 мл насыщенного (4 М) раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Полученный осадок отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в 5 мл дистиллированной воды, к полученному раствору добавляли 4 мл 4 М раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Осадок вновь отделяли центрифугированием. Процедуру высаливания повторяли еще 2 раза. Полученный осадок, содержащий иммуноглобулины, растворяли в воде и диализовали при +4°C против 0,01 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, содержащего 0,15 М NaCl.

Афинную колонку со связанными дефенсинами промывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2, содержащим 0,15 М NaCl (исходный буфер), наносили раствор иммуноглобулинов. Промывали колонку исходным буфером, затем натрий-фосфатным буфером pH 7,2, содержащим 0,3 М NaCl. Связавшиеся иммуноглобулины элюировали 0,1 М глицин-HCl буфером pH 3,0, содержащим 0,1 М NaCl. Элюат диализовали против исходного буфера при температуре 4°C. В качестве консерванта к полученному раствору антител добавляли мертиолат натрия до 0,01%.

Антитела использовали в качестве первичных антител в иммуноферментной тест-системе, а также для получения конъюгата антител с пероксидазой хрена.

#### *Конъюгация антител с пероксидазой хрена*

Конъюгат получали периодатным методом [6]. 0,8 мг пероксидазы хрена растворяли в 100 мкл воды. К полученному раствору добавили 200 мкл свежеприготовленного 0,1 М раствора периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ). Смесь перемешивали в течение 20 мин в стеклянном флаконе. Затем произвели замену буфера на 1 мМ натрий-ацетатный буфер с pH 4,4 путем фильтрации на колонках Millipore Centrifugal Filtr Units 100 000 MWGO. Довели pH смеси до 9–9,5, добавлением 2 мкл 0,2 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и сразу добавили 100 мкл раствора иммуноглобулинов в концентрации 10 мг/мл в 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер pH 9,5. Смесь перемешивали 2 часа при комнатной температуре. Затем к смеси добавили 10 мкл свежеприготовленного раствора боргидрида натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), в концентрации 4 мг/мл. Перемешивали 2 часа при температуре 4°C. Полученный конъюгат перевели в 0,1 М боратный буфер с pH 7,4. К 50 мкл конъюгата добавили 20 мкл глицерина и хранили при температуре –20°C.

*Статистическая обработка результатов*

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна–Уитни, за достоверный принимали 95%-й уровень значимости ( $p < 0,05$ ).

**Результаты исследования и их обсуждение**

Для количественной оценки содержания дефенсина RNP-3 в плазме крови крыс использовали следующую процедуру.

Антитела к RNP-3 разводили до концентрации 10 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9,0. Вносили полученный раствор в количестве 100 мкл в лунку планшета, предназначенную для анализа. Инкубировали в течение ночи при 4 °С.

После инкубации проводили четырехкратную промывку лунок планшета 0,01% натрий-фосфатным буфером с pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,05% ТВИН-20 (промывочный раствор).

Плазму крови крыс разводили в 100 раз 0,01% натрий-фосфатном буфере с pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,05% ТВИН-20 и 1% БСА (раствор для проб). В этом же растворе разводили стандарты – RNP-3 в концентрациях 0, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 2000 и 4000 пг/мл. Перед нанесением проб планшет инкубировали с буфером для

в течение часа при комнатной температуре для блокировки сайтов возможного неспецифического связывания. Затем планшет полностью опорожняли и наносили пробы и стандарты по 100 мкл в каждую лунку планшета. Инкубировали в течение ночи при 4 °С. Затем лунки промывали по схеме, описанной ранее.

Конъюгат антител к RNP-3 с пероксидазой хрена разводили в 4000 раз раствором для проб и наносили по 100 мкл в лунку. Инкубировали в течение 6 часов при температуре 4 °С, затем лунки пятикратно промывали. Добавляли по 100 мкл субстратной смеси, содержащей 0,02% орто-фенилендиамина и 0,015% перекиси водорода в цитратном буфере pH 5,0. Инкубировали 15–20 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 5 н серной кислоты.

Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Labsystems Multiskan MS при длине волны 492 нм (A 492). Результаты оценивали по калибровочной кривой.

Полученная система имеет чувствительность 0,1 нг/мл и диапазон измерений 0,1–8 нг/мл. Данная тест-система выявляет также дефенсин RNP-2 (с эффективностью 3% от значений для RNP-3) и не выявляет RNP-1 и RNP-4 (табл. 1).

**Таблица 1**

Зависимость поглощения окрашенного продукта ферментативной реакции от концентрации дефенсина в пробе (среднее ± ошибка среднего)

Стандарт (нг/мл)	A 492 RNP-3	A 492 RNP-2	A 492 RNP-1	A 492 RNP-2
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,2	0,026 ± 0,004	0,000	0,000	0,000
0,3	0,035 ± 0,004	0,000	0,000	0,000
0,4	0,050 ± 0,004	0,000	0,000	0,000
0,5	0,058 ± 0,004	0,000	0,000	0,000
0,6	0,085 ± 0,005	0,000	0,000	0,000
0,7	0,093 ± 0,005	0,000	0,000	0,000
0,8	0,122 ± 0,006	0,000	0,000	0,000
2,0	0,250 ± 0,007	0,009 ± 0,003	0,000	0,000
4,0	0,365 ± 0,009	0,016 ± 0,003	0,000	0,000
8,0	0,510 ± 0,011	0,028 ± 0,004	0,000	0,000

В интервале концентраций от 0 до 2 нг/мл зависимость оптической плотности от концентрации имеет линейный характер.

Установлено что средняя концентрация дефенсина RNP-3 в плазме крови у интактных животных составляет 36 ± 6 нг/мл (среднее ± ошибка среднего), а относительное содержание – 9,8 ± 3,0 нг/1 млн нейтрофилов. Такая концентрация сравнима с концентрацией дефенсинов человека в плазме

крови – 42 ± 53 нг/мл (среднее ± стандартное отклонение) [9].

Была проведена проверка тест-системы на корректность определения дефенсина в плазме крысы. В разведенную в 100 раз плазму добавляли заранее известное количество дефенсина RNP-3. Наблюдаемые и ожидаемые значения концентраций дефенсина в сыворотке крови при добавлении известного количества дефенсина достоверно не отличаются (табл. 2).

Таблица 2

Наблюдаемые и ожидаемые концентрации дефенсина RNP-3 в пробах при добавлении известного количества дефенсина.

	Дефенсин добавлен до концентрации	A 492	Концентрация дефенсина наблюдаемая, нг/мл	Концентрация дефенсина ожидаемая, нг/мл
Проба 1		0,061	0,47	
Проба 2		0,056	0,44	
Проба 3		0,069	0,52	
Проба 1	0,2 нг/мл	0,093	0,72	0,67
Проба 2	0,2 нг/мл	0,088	0,68	0,64
Проба 3	0,2 нг/мл	0,101	0,78	0,72
Проба 1	0,8 нг/мл	0,164	1,28	1,27
Проба 2	0,8 нг/мл	0,156	1,22	1,24
Проба 3	0,8 нг/мл	0,170	1,33	1,32

Первая иммуноферментная тест-система для выявления дефенсинов в плазме крови была разработана А.В. Панютинем для дефенсинов из нейтрофилов человека на основе моноклональных антител к дефенсинам [10]. Система имела диапазон измерений 0,05–10 нг/мл. Особенности физико-химических свойств дефенсинов человека (прежде всего, высокая гидрофобность молекулы и сравнительно небольшой положительный заряд) заставили авторов отказаться от некоторых традиционных реагентов, используемых для иммуноферментного анализа. Так, например, ТВИН-20 был заменен на цетилтриметиламмоний бромид, для того чтобы избежать неспецифического связывания дефенсина с поверхностью планшета. Кроме того, для корректных измерений требовалось разбавлять плазму крови не менее чем в 1000 раз. Физико-химические свойства дефенсинов крысы позволили нам не изменять стандартную схему, которая ранее применялась нами для определения нейтрофильных белков нейтрофилов человека [1].

В настоящее время биотехнологические фирмы (в частности, «Nucult Biotech»), производящие коммерческие наборы для количественного определения дефенсинов из нейтрофильных гранулоцитов, предлагают такие наборы только для дефенсинов человека. Так же как и в тест-системе Панютинча, для корректного измерения концентрации дефенсинов плазму крови необходимо разбавлять в 2000 раз. Наборы работают в диапазоне измерений 0,156–10 нг/мл, минимальная концентрация, доступная для измерения, – 0,156 нг/мл.

Таким образом, разработанная нами тест-система для выявления дефенсинов крысы в плазме крови имеет схожие характеристики с коммерческими наборами для дефенсинов человека.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-01498а и № 12-04-01573а.

#### Список литературы

1. Ботерашвили Н.М., Алешина Г.М., Сорокина М.Н., Иванова В.В. Миелопероксидаза и лактоферрин в сыворотке крови и ликворе детей больных менингитом // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4. № 4–5. – С. 565–572.
2. Кокряков, В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. – СПб.: Наука, 2006. – 206 с.
3. Цветкова Е.В., Алешина Г.М., Шамова О.В., Леонова Л.Е., Лерер Р.И., Кокряков В.Н.  $\alpha$ -Дефенсин из лейкоцитов крови обезьяны *Papio hamadryas*. // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 8. – С. 1083–1090.
4. Ямщикова Е.В., Орлов Д.С., Пазина Т.Ю., Трулев А.С., Орлов С.Б., Григорьев А.В., Колодкин Н.И., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Влияние антимикробного пептида бактенецина 5 и его укороченных фрагментов на пролиферацию фибробластов кожи человека, и на процесс заживления ран у экспериментальных животных // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – Режим доступа: URL: www.science-education.ru/103-6127.
5. Bowdish D.M., Davidson D.J., Scott M.G., Hancock R.E. Immunomodulatory activities of small host defense peptides // Antimicrob Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – P. 1727–1732.
6. Catty D., Raykundalia C. ELISA and related enzyme immunoassays. In «Antibodies Volume II, A Practical Approach» (D. Catty, ed.) Oxford University Press, USA, 1989, pp. 97–154
7. Fearon, D.T., Locksley R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response / D.T. Fearon, R.M. Locksley // Science. – 1996. – Vol. 272. – P. 50–54.
8. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. // Arch Biochem Biophys. – 1969. – Vol. 130. – P. 337–346.
9. Panyutich A.V., Panyutich E.A., Krapivin V.A., Baturevich E.A., Ganz T. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. // J. Lab. Clin. Med. – 1993. – Vol. 122, № 2. – P. 202–207.
10. Panyutich A.V., Voitenok N.N., Lehrer R.I., Ganz T. An enzyme immunoassay for human defensins // J. Immunol. Methods. – 1991. – Vol. 141. – P. 149–155.
11. Pleskach V.A., Alezhina G.M., Artsybasheva I.V., Shamova O.V., Kozhukharova I.V., Goilo T.A., Kokriakov V.N. Cytotoxic and mitogenic effect of antimicrobial peptides from neutrophils on cultured cells // Цитология. – 2000. – Т. 42., № 3. – С. 228–234.
12. Territo M.C., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils // J Clin Invest. – 1989. – Vol. 84. – P. 2017–2020.



13. Yang D., Chen Q., Chertov O., Oppenheim J.J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells // *J Leukoc Biol.* – 2000. – Vol. 68. – P. 9–14.

14. Yang Y.H., Wu W.K., Tai E.K., Wong H.P., Lam E.K., So W.H., Shin V.Y., Cho C.H. The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 318. – P. 547–554.

**References**

1. Boterashvili N.M., Aleshina G.M., Sorokina M.N., Ivanova V.V. *Meditsinskaya Immunologiya*, 2002, Vol. 4, no 4–5, pp. 565–572.

2. Kokryakov V.N. *Ocherki o vrozhdennom immunitete* [Essays of innate immunity]. St. Petersburg, Nauka Publ., 2006, 206 p.

3. Tsvetkova E.V., Aleshina G.M., Shamova O.V., Leonova L.E., Lehrer R.I., Kokryakov V.N. *Biochemistry (Mosc)*. 2006 Vol. 71, no. 8, pp. 879–883.

4. Yamshchikova E.V., Orlov D.S., Pazina T.Yu., Trulev A.S., Orlov S.B., Grigoriev A.V., Kolodkin N.I., Kokryakov V.N., Shamova J.V. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2012, no. 3. URL: [www.science-education.ru/103-6127](http://www.science-education.ru/103-6127).

5. Bowdish D.M., Davidson D.J., Scott M.G., Hancock R.E. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. Vol. 49. pp. 1727–1732.

6. Catty D., Raykundalia C. In *«Antibodies Volume II, A Practical Approach»* (D. Catty, ed.) Oxford University Press, USA, 1989, pp. 97–154

7. Fearon, D.T., Locksley R.M. *Science*. 1996. Vol. 272. pp. 50–54.

8. Panyim S., Chalkley R. *Arch Biochem Biophys*. 1969. Vol. 130. pp. 337–46.

9. Panyutich A.V., Panyutich E.A., Krapivin V.A., Baturevich E.A., Ganz T. *J. Lab. Clin. Med.* 1993, Vol. 122, no. 2, pp. 202–207.

10. Panyutich A.V., Voitenok N.N., Lehrer R.I., Ganz T. *J. Immunol. Methods*. 1991, Vol. 141, pp. 149–155.

11. Pleskach V.A., Aleshina G.M., Artsybasheva I.V., Shamova O.V., Kozhukharova I.V., Goilo T.A., Kokriakov V.N. *Tsitologiya*. 2000. Vol. 42, no. 3. pp. 228–234.

12. Territo M.C., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R. *J Clin Invest*. 1989. Vol. 84. pp. 2017–2020.

13. Yang D., Chen Q., Chertov O., Oppenheim J.J. *J Leukoc Biol*. 2000. Vol. 68. pp. 9–14.

14. Yang Y.H., Wu W.K., Tai E.K., Wong H.P., Lam E.K., So W.H., Shin V.Y., Cho C.H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. Vol. 318. pp. 547–554.

**Рецензенты:**

Киселева Е.П., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;

Ермоленко Е.И., д.м.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и генетики микробов отдела молекулярной микробиологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 30.12.2013.