

УДК 615:28

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ ОСНОВ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

¹Шамова О.В., ¹Орлов Д.С., ¹Пазина Т.Ю., ¹Ямщикова Е.В., ²Орлов С.Б.,
¹Жаркова М.С., ³Гринчук Т.М., ³Арцыбашева И.В., ¹Юхнев В.А., ¹Кокряков В.Н.

¹ФГБУ НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

²ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И.Разумовского Минздрава России», Саратов;

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, e-mail: oshamova@yandex.ru

Катионные антимикробные пептиды (АМП), содержащиеся в фагоцитах, являются одними из важнейших факторов системы врожденного иммунитета, участвующими в элиминации патогенных микроорганизмов. АМП имеют различные структуры и отличаются по механизмам антимикробного действия. В концентрациях, превышающих необходимые для инактивации бактерий, многие АМП проявляют токсическое действие и в отношении эукариотических клеток, в том числе опухолевых. Целью данной работы явилось сравнительное изучение особенностей цитотоксического действия структурно отличных антимикробных пептидов – мембраноактивного пептида протегрина 1 (PG1), обладающего конформацией β-шпильки и обогащенного пролином линейного бактенецина ChBac3.4 – в отношении опухолевых клеток человека *in vitro*. Изучение динамики токсического действия пептидов на клетки эритромиелоидной лейкемии человека K-562 и гистиоцитарной лимфомы человека U-937 показало, что гибель клеток, обработанных PG1, происходит в течение короткого промежутка времени (около 15 мин); эффекты ChBac3.4 на клетки-мишени значительно более отсрочены. Установлено, что токсическое действие пептида ChBac3.4 сопровождается инициацией процесса апоптоза в клетках K-562 и U-937, обработанных этим пептидом; в то время как клетки обеих линий погибают преимущественно по пути некроза после воздействия на них протегрина. Полученные данные предоставляют информацию, важную для понимания молекулярных механизмов функционирования эффекторных молекул врожденного иммунитета. Кроме того, результаты работы дают основание рассматривать АМП и как возможные прототипы для создания противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, протегрин, бактенецин

STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF THE CYTOTOXIC ACTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES TOWARDS TUMOR CELLS

¹Shamova O.V., ¹Orlov D.S., ¹Pazina T.Y., ¹Yamschikova E.V., ²Orlov S.B., ¹Zharkova M.S.,

³Grinchuk T.M., ³Artzibasheva I.V., ¹Yuhnev V.A., ¹Kokryakov V.N.

¹Institute of Experimental medicine RAMS, St-Petersburg, Russia;

²Saratov State Medical University, Saratov;

³Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, e-mail: oshamova@yandex.ru

Cationic antimicrobial peptides (AMPs) of phagocytes are important factors of the innate immune system, participating in an elimination of pathogenic microorganisms. AMPs have varied structures and different mode of antimicrobial action. Upon concentration, exceeding those required for an inactivation of bacteria, most of AMPs exert a toxic action towards eukaryotic cells including tumor cells. The aim of our work was a comparative study of a mode of the cytotoxic action of structurally different antimicrobial peptides – membranoactive β-hairpin peptide protegrin 1 (PG1) and linear proline-rich bactenecin ChBac3.4 – towards human tumor cells *in vitro*. Investigation of a dynamic of the toxic action of the peptides on human K-562 erythroleukemia cells and U-937 hystiocytic lymphoma cells showed that the cytotoxic action of PG1 occurred within a short period of time (about 15 min) while ChBac3.4 demonstrated significantly more delayed effects on the target cells viability. We revealed that the toxic action of ChBac3.4 is accompanied by the initiation of apoptosis in U-937, as well as in K-562 cells. Only features of a necrotic cell death have been observed in both cell lines after the treatment of the cells with PG1. The obtained data provide valuable information for understanding the molecular mechanisms of functioning of effector molecules of the innate immune system. In addition, the achieved results give a ground for considering AMPs as promising templates for a design of novel anticancer drugs.

Keywords: antimicrobial peptides, protegrin, bactenecin

Катионные антимикробные пептиды (АМП), содержащиеся в фагоцитах, являются одними из важнейших факторов системы врожденного иммунитета, участвующими в элиминации патогенных микроорганизмов. К АМП относят пептиды, принадлежащие к различным структурным классам: молекулы некоторых пептидов имеют конформацию α-спирали, другие – содержат β-тяжи;

есть пептиды, представляющие собой полипролиновые спирали 2-го типа [1, 2]. Механизмы антимикробного действия структурно различных АМП отличаются. В целом, действие большинства АМП на бактерии сопровождается быстрым и необратимым повреждением мембран микроорганизмов, приводящим к их гибели. Таким действием обладает, например, пептид из

нейтрофилов свиньи – протегрин 1 (PG1), имеющий выраженное мембранолитическое действие и проявляющий токсические эффекты, как в отношении бактерий, так и клеток млекопитающих [6]. Однако некоторые АМП инактивируют бактерии, нарушая в основном внутриклеточные процессы. К таким пептидам принадлежат обогащенные пролином линейные АМП семейства бактенецинов [5]. Большинство бактенецинов повреждают бактериальные мембраны, только когда используются в высоких концентрациях; эти АМП обычно не токсичны для клеток млекопитающих [9]. Однако нами был обнаружен обогащенный пролином пептид – бактенецин ChVac3.4 из лейкоцитов козы, имеющий относительно более выраженную активность в отношении бактериальных мембран (хотя и значительно уступающую активности протегрина 1), а также проявляющий существенную токсичность в отношении опухолевых клеток [13]. Целью данной работы явилось сравнительное изучение особенностей токсического действия структурно отличных антимикробных пептидов – мембраноактивного пептида протегрина 1, обладающего конформацией β -шпильки, и менее мембраноактивного обогащенного пролином линейного бактенецина ChVac3.4 – в отношении опухолевых клеток человека *in vitro*.

Материалы и методики исследования

В работе использовали химически синтезированные пептиды. Исследовали их цитотоксическое действие в отношении клеток эритромиелоидной лейкемии человека K-562 и клеток гистиоцитарной лимфомы человека U-937. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, дополненной глутамином, гентамицином и 10% эмбриональной телячьей сывороткой. Для оценки жизнеспособности клеток после их обработки пептидами в качестве маркера клеточной гибели использовали краситель трипановый синий. К суспензии клеток добавляли 0,4%-й раствор трипанового синего и подсчитывали в камере Горяева под микроскопом количество клеток, включивших краситель (количество погибших клеток) и не включивших краситель (количество живых клеток).

Активность каспазы 3 определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата Ac-DEVD-pNAc помощью набора «Caspase 3 AssayKit, Colorimetric» («Sigma», США). Клетки (1 млн/мл) инкубировали с разными концентрациями пептидов в течение 3 часов при 37°C; объем проб составлял 150 мкл, использовали по три параллели. Контролями служили пробы, в которых клетки инкубировали в тех же условиях, но без добавления пептидов. По окончании инкубации клетки центрифугировали 10 мин при 300 g, к полученным осадкам добавляли лизирующий раствор и оставляли их на ледяной бане на 30 мин. Далее пробы центрифугировали 20 мин при 10000 g при 4°C. Супернатанты отбирали и использовали для приготовления проб

в соответствии с рекомендациями изготовителей набора «Caspase 3 AssayKit, Colorimetric». Полученные пробы в 96-луночных планшетах инкубировали при 37°C в течение 3 часов, затем оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Spectra Max 250 при 405 нм. Активность каспазы представляли в процентах от контроля (клетки без пептида).

Для оценки доли клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, использовали набор «Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection kit» (Sigma, США), включающий Аннексин V, конъюгированный с флюорохромом Cy3.18 и 6-карбоксихлорофлуоресцеин диацетат (6-CFDA). Клетки (1 млн/мл) в инкубировали с разными концентрациями пептида в течение 2 часов при 37°C, объем проб составлял 150 мкл. Контролями служили пробы, в которых клетки инкубировали в тех же условиях, но без добавления пептидов. По окончании инкубации клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), затем ресуспендировали их в рабочем растворе буфера для окрашивания до концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Далее клетки окрашивали смесью реактивов Аннексин V-Cy3 и карбоксихлорофлуоресцеина диацетата, приготовленной в соответствии с рекомендациями производителей набора в течение 10 мин. Затем клетки отмывали ФСБ, осаждали и подсчитывали под люминисцентным микроскопом количество клеток, включивших тот или иной флюоресцентный краситель. Клетки, в которых наблюдалась только зеленая флюоресценция, рассматривались, как живые; клетки, в которых наблюдалась только красная – как погибшие по пути некроза, а клетки, в которых наблюдалась, как красная, так и зеленая флюоресценция – как находящиеся на ранней стадии апоптоза. Анализировали несколько полей зрения, подсчитывая не менее 500 клеток. Результаты выражали в процентах от общего количества клеток и представляли, как средние арифметические по данным трех экспериментов \pm среднеквадратичное отклонение.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6. Графики строили в программе SigmaPlot 11.

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее было показано, что антимикробные пептиды бактенецин ChVac3.4 и протегрин 1 (PG1) оказывают токсическое действие на опухолевые клетки [13]. Целью данной работы явилось изучение механизмов этого действия. Чтобы оценить, насколько быстро реализуются токсические эффекты PG1 и ChVac3.4 на клетки-мишени, изучали динамику их цитотоксического действия в отношении клеток U-937 (клетки гистиоцитарной лимфомы человека) и K-562 (клетки эритромиелоидной лейкемии человека), инкубируя клетки с пептидом в течение 15, 30, 60, 120 и 180 мин и оценивая количество живых и мертвых клеток с использованием витального красителя трипанового синего.

На рис. 1 (А, Б) представлены данные, полученные после инкубации клеток с PG1.

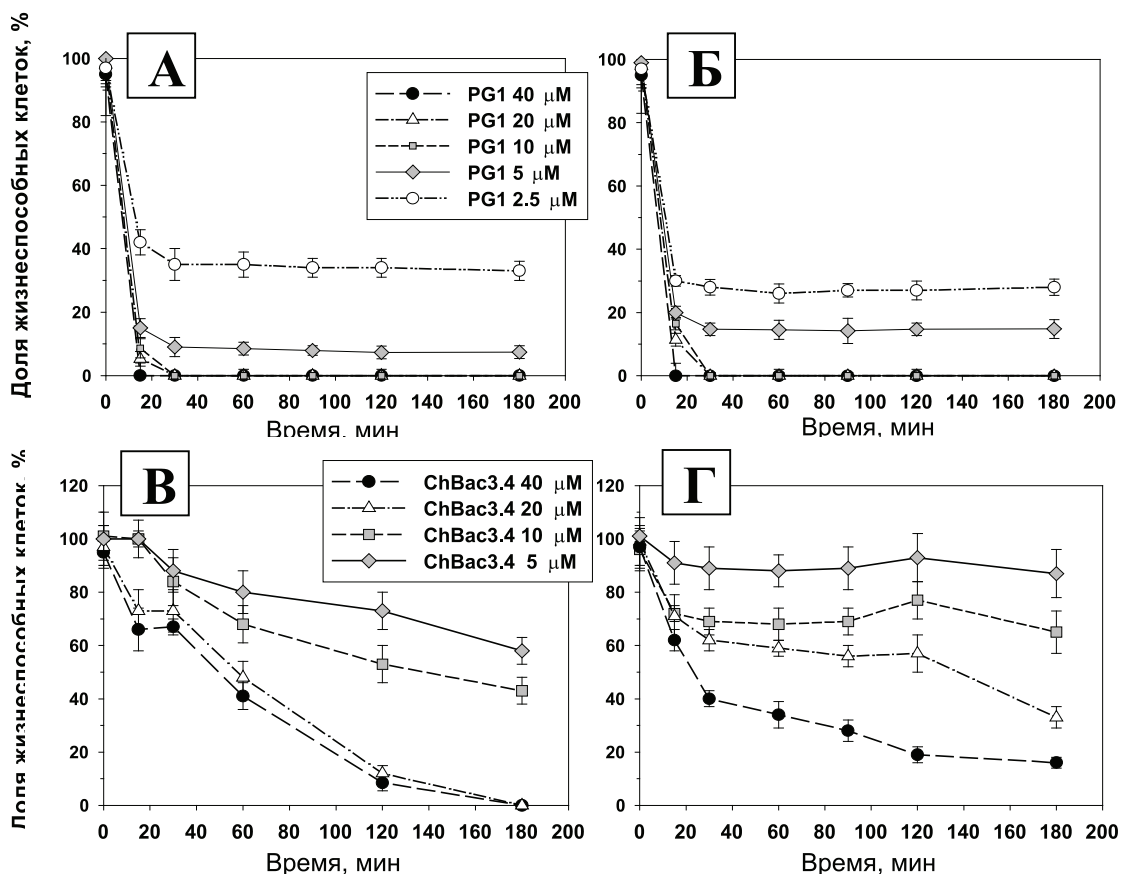


Рис. 1. Динамика токсического действия пептидов PG1 (А, Б) и ChVac3.4 (В, Г), применяемых в разных концентрациях, в отношении клеток К-562 (А, В) и U-937 (Б, Г) в культуре (окраска клеток витальным красителем трипановым синим). По оси Y – доля жизнеспособных клеток, в процентах (за 100% принимали значения для контрольных проб, не содержащих пептидов и инкубировавшихся в тех же условиях, что и опытные пробы, и в течение того же промежутка времени); по оси X – время инкубации клеток при 37 °С, в минутах (представлены средние арифметические ± среднеквадратичное отклонение; n = 4-6)

Как видно из рис.1, действие пептида осуществляется за короткий промежуток времени – уже через 15 минут наблюдается 90–100% гибель клеток К-562 (рис. 1 А) и U-937 (рис. 1 Б) при обработке их протегрином в концентрациях 10–40 мкМ. При добавлении к клеткам U-937 бактенецина ChVac3.4 в концентрации 40 мкМ через 30 мин наблюдается снижение количества жизнеспособных клеток на 60%, однако далее доля живых клеток изменяется менее заметно и через 3 часа полного подавления их жизнеспособности не показано (рис. 1 Г). В концентрациях 20 и 10 мкМ токсическое действие пептида более отсрочено, и выраженный эффект наблюдается лишь через 3 часа. В отношении клеток К-562 характер токсического действия пептида, в целом, сходный, хотя в концентрациях 40 и 20 мкМ его действие на клетки этой линии более эффективно, чем в отношении клеток U-937: он вызывает резкое снижение коли-

чества жизнеспособных клеток К-562 и через 2 часа остается лишь около 10% живых клеток, через 3 часа они практически полностью погибают (рис. 1. В). В более низких концентрациях действие пептида менее выражено.

Чтобы выяснить, вызывают ли пептиды клеточную гибель по пути некроза, или в некоторых случаях действие пептидов на клетки-мишени сопровождается инициацией апоптоза, использовали два подхода: оценивали активность каспазы 3 – ключевой эффекторной каспазы, участвующей в реализации процесса апоптоза; а также выявляли клетки, находящиеся на ранней стадии апоптоза с использованием набора реактивов, содержащего Аннексин V. После инкубации клеток U-937 в течение 3 часов в присутствии ChVac3.4 в концентрациях 40, 20, 10 и 5 мкМ активность каспазы 3 возрастает по сравнению с контрольными пробами ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента), причем

наиболее значительный подъем уровня активности наблюдается при использовании пептида в концентрации 20 мкМ (рис. 2 А).

В аналогичных экспериментах с клетками К-562 также наблюдается увеличение активности каспазы 3, хотя и в несколько меньшем диапазоне концентраций 10–40 мкМ (рис. 2 Б).

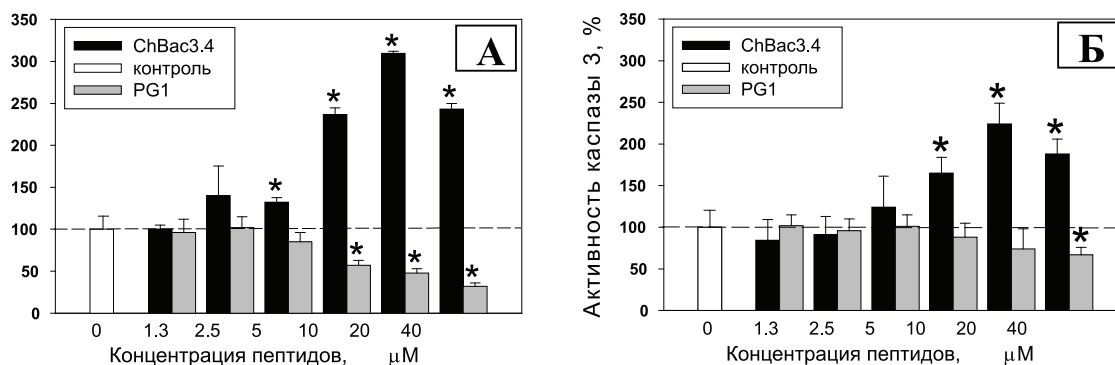


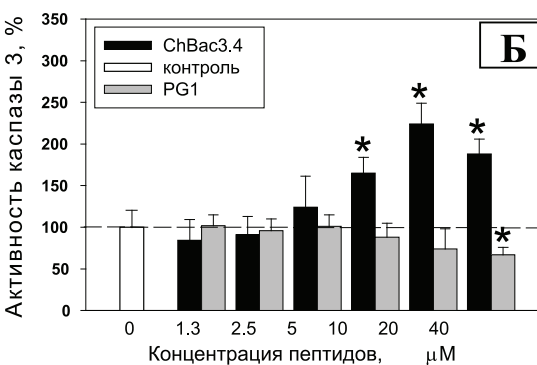
Рис. 2. Активность каспазы 3 клетках U-937 (А) и К-562 (Б) при обработке клеток протегрином 1 (PG1) или бактенецином ChBac3.4 в течение 3 часов при 37°C. За 100% принимали величину активности каспазы 3 в контроле – клетках, инкубированных в тех же условиях, но в отсутствие пептидов. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (t -критерий Стьюдента, $n = 6$)

Таким образом, действие бактенецина ChBac3.4 на клетки гистиоцитарной лимфомы человека U-937 и клетки эритромиелоидной лейкемии человека К-562 сопровождается увеличением активности эффекторного звена процесса апоптоза каспазы 3, в то время как активность этого фермента не повышается при действии мембраноактивного пептида PG1.

Для выявления клеток, вступивших на путь апоптоза и количественной оценки их доли применяли также другой метод, предполагающий использование аннексина 5, несущего метку Су3, флуоресцирующую в красной области спектра. Аннексин 5 избирательно связывается с компонентом клеточной мембраны – фосфатидилсерин, который в нормальной клетке локализован с внутренней стороны бислоя мембраны, но при индукции апоптоза перемещается на наружную сторону, что и является одним из ранних признаков апоптоза и может быть детектировано с помощью аннексина 5. В состав набора входит также карбоксифлуоресцеин диацетат – нефлуоресцирующий реагент, который при попадании в живые клетки расщепляется с образованием флуоресцентного продукта – карбоксифлуоресцеина, флуоресцирующего в зеленой области спектра, что позволяет выявлять жизнеспособные клетки. Применение данного набора реактивов позволяет с помощью люминесцентной микроскопии оценить долю клеток, находящихся на ран-

ней стадии апоптоза и клетки, погибшие по пути некроза.

Клетки U-937 и К-562 инкубировали с разными концентрациями бактенецина ChBac3.4 или PG1 и проводили выявление клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, и некротических клеток (рис. 3). Контролями служили клетки, инкубированные в тех же условиях, но без добавления пептидов. Установлено, что при инкубации клеток U-937 с бактенецином в концентрации 20 мкМ около 42% клеток находятся на ранней стадии апоптоза (рис. 3 А); около 18% клеток погибают путем некроза. Остальные клетки оказались неповрежденными. При обработке клеток К-562 этим пептидом в концентрации 20 и 10 мкМ, тоже выявлялось значительное количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза (рис. 3 Б). При инкубации клеток U-937 и К-562 с протегрином 1 в концентрации 10, 5 и 2,5 мкМ обнаруживались лишь клетки, погибающие по пути некроза (рис. 3 А и Б).



ней стадии апоптоза и клетки, погибшие по пути некроза.

Таким образом, для мембраноактивного протегрина в случае обеих клеточных линий наблюдается немедленная клеточная гибель по пути некроза как при использовании пептида в высокой концентрации (10 мкМ), так и в относительно низкой концентрации (2,5 мкМ). Цитотоксическое действие немембраноактивного бактенецина ChBac3.4 сопровождается инициацией апоптоза в исследуемых клетках линий U-937 и К-562.

Таким образом, для мембраноактивного протегрина в случае обеих клеточных линий наблюдается немедленная клеточная гибель по пути некроза как при использовании пептида в высокой концентрации (10 мкМ), так и в относительно низкой концентрации (2,5 мкМ). Цитотоксическое действие немембраноактивного бактенецина ChBac3.4 сопровождается инициацией апоптоза в исследуемых клетках линий U-937 и К-562.

К настоящему времени в литературе имеются лишь единичные работы, в которых описана способность антимикробных пептидов из нейтрофилов млекопитающих вызывать или модулировать процесс апоптоза клеток *in vitro*. Так, итальянскими учеными было показано, что линейный пептид из лейкоцитов быка ВМАР28 инициирует апоптоз опухолевых (K-562, U-937) и нормальных (активированных лимфоцитов человека) клеток, вызывая деполяризацию внутренней мембраны митохондрий вследствие открытия митохондриальных транзитных пор в ответ на действие пептида [11]. Есть данные о способности АМП человека LL-37 инициировать апоптоз в клетках эпителия дыхательных путей [3], в то время как

дефенсины человека вызывают клеточную гибель в основном не по пути апоптоза, а по пути некроза [4, 7]. С другой стороны, есть работы, в которых сообщается о способности пептида LL-37 человека, а также пептида PR-39 свиньи ингибировать процесс апоптоза нейтрофильных гранулоцитов *in vitro* [8, 10], хотя механизм наблюдаемых явлений пока ясен не до конца. Таким образом, к настоящему времени в литературе имеются противоречивые данные об апоптогенном действии АМП, по-видимому, противоречивость данных, в некоторой степени объясняется тем, что в различных работах пептиды применяли в разных диапазонах концентраций, а также с существенными различиями природы клеток-мишеней.

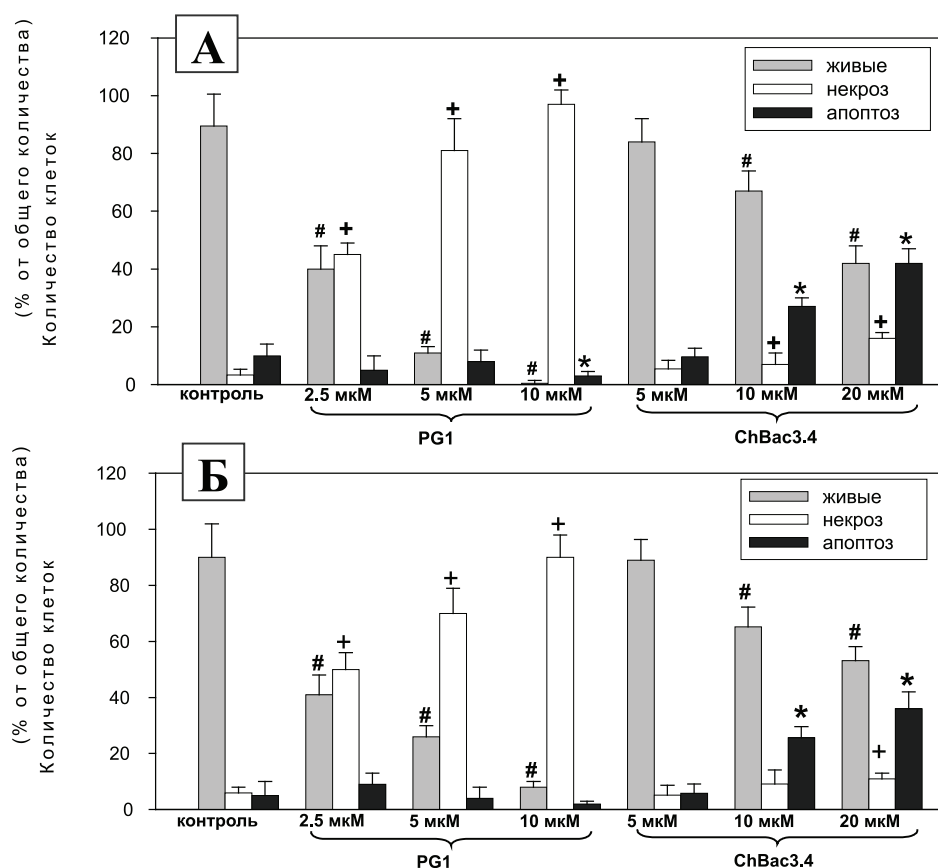


Рис. 3. Пути клеточной гибели после обработки культивируемых клеток U-937 (А) и K-562 (Б) протегрином I (PG1) или бактенецином ChBac3.4. По оси Y – количество живых клеток или клеток, гибнущих по пути некроза, или апоптоза, в процентах от общего количества клеток. Различия достоверны – по сравнению с числом живых клеток (#), клеток с признаками некроза (+) и апоптоза (*) в контрольных пробах, где клетки инкубировали в тех же условиях, но без добавления пептидов ($p < 0,05$, t -критерий Стьюдента, $n = 4$)

Заключение

Нами впервые показано, что токсическое действие пептида из семейства бактенецинов – ChBac3.4 – сопровождается инициацией процесса апоптоза в опухолевых клетках, обработанных этим пептидом. Полученные данные предоставляют инфор-

мацию, важную для понимания молекулярных механизмов функционирования эффекторных молекул врожденного иммунитета. Кроме того, результаты работы дают основание рассматривать АМП и как возможные прототипы для создания противоопухолевых препаратов.

Список литературы

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. – 2006. – СПб.: Наука. – 261 с.
2. Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies // Edited by Guangshun Wang: *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*. – 2010. – Series 18. – CABI: Oxfordshire. – UK. – 249 pp.
3. Barlow P.G., Li Y., Wilkinson T.S., Bowdish D.M., Lau Y.E., Cosseau C., Haslett C., Simpson A.J., Hancock R.E., Davidson D.J. // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 80, № 3. – P. 509–520.
4. di Carlo E., Iezzi M., Pannellini T., Zaccardi F., Modesti A., Forni G., Musiani P. // *J. Hematother. Stem Cell Res.* – 2001. – Vol. 10, № 6. – P. 739–748.
5. Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M., Podda E., Miani M. // *Curr. Pharm. Des.* – 2002. – № 8 – P. 763–778.
6. Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G. M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. // 1993. – *FEBS Lett.* – Vol. 327: 231–236.
7. Lichtenstein A.K. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins // *J. Clin. Invest.* – 1991. – Vol. 88. – P. 93–100.
8. Nagaoka I., Tamura H., Hirata M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7 // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 5. – P. 3044–3052.
9. Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1760, № 11 – P. 1732–40.
10. Ramanathan B., Wu H., Ross C.R., Blecha F. PR-39, a porcine antimicrobial peptide, inhibits apoptosis: involvement of caspase-3 // *Dev. Comp. Immunol.* – 2004. – Vol. 28, № 2. – P. 163–169.
11. Risso A., Braidot E., Sordano M.C., Vianello A., Macri F., Skerlavaj B., Zanetti M., Gennaro R., Bernardi P. // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 22, № 6. – P. 1926–1935.
12. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68, № 13. – P. 2317–30.
13. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H., Kokryakov V., Lehrer R. // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2009. – № 15. – P. 31–42.

References

1. Kokryakov V.N. *Ocherki o vrozhdennom immunitete* [Essay on the innate immunity], 2006, St-Petersburg, Nauka, 261 pp.
2. Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies [Edited by Guangshun Wang] *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*, 2010, Series 18, CABI, Oxfordshire, UK, 249 pp.
3. Barlow P.G., Li Y., Wilkinson T.S., Bowdish D.M., Lau Y.E., Cosseau C., Haslett C., Simpson A.J., Hancock R.E., Davidson D.J., *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 80, no. 3, pp. 509–520.
4. di Carlo E., Iezzi M., Pannellini T., Zaccardi F., Modesti A., Forni G., Musiani P., *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 2001, Vol. 10, no. 6. – pp. 739–748.
5. Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M., Podda E., Miani M., *Curr. Pharm. Des.*, 2002, no. 8, pp. 763–778.
6. Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G. M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I., *FEBS Lett.*, 1993, Vol. 327, pp. 231–236.
7. Lichtenstein A.K., *J. Clin. Invest.*, 1991, Vol. 88, pp. 93–100.
8. Nagaoka I., Tamura H., Hirata M. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 5, pp. 3044–3052.
9. Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, Vol. 1760, no. 11, pp. 1732–40.
10. Ramanathan B., Wu H., Ross C.R., Blecha F., *Dev. Comp. Immunol.*, 2004, Vol. 28, no. 2, pp. 163–169.
11. Risso A., Braidot E., Sordano M.C., Vianello A., Macri F., Skerlavaj B., Zanetti M., Gennaro R., Bernardi P., *Mol. Cell Biol.*, 2002, Vol. 22, no. 6, pp. 1926–1935.
12. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R., *Cell Mol Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 13, pp. 2317–30.
13. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H., Kokryakov V., Lehrer R., *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2009, no. 15, pp. 31–42.

Рецензенты:

Янковский О.Ю., д.б.н., зав. отделом Медицинской биотехнологии ООО «Аллерготест», г. Санкт-Петербург;

Рыбакина Е.Г., д.б.н., зав. лабораторией нейроиммуномодуляции, ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 06.04.2012.