УДК 612.112.3:612.014:616-097:579

© А. И. Гордиенко, Н. В. Химич, 2009.

ДАЛЬНЕЙШЕЕ ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ХАОТРОПНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

А. И. Гордиенко, Н. В. Химич

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского

THE FURTHER STUDY OF PROPERTIES CHAOTROPICALLY MODIFIED IMMUNOGLOBULINS

A. I. Gordienko, N. V. Khimich

SUMMARY

Is established, that one of the biologically important effects chaotropically modified immunoglobulins (PRIG) is opsonization of antigenes, that promotes them phagocytosis. Besides PRIG can block linkage LPS with effectors by crates, that prevents their activation and synthesis various mediators of an inflammation. Thus, PRIG can bring in the additional contribution to protection organism from the infectious agents.

ПОДАЛЬШЕ ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХАОТРОПНО МОДИФІКОВАНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

А. І. Гордієнко, Н. В. Хіміч

РЕЗЮМЕ

Установлено, що одним з біологічно важливих ефектів хаотропно модифікованих імуноглобулінів (ПРІГ) є опсонізація чужорідних часток, що сприяє їхньому фагоцитозу. Крім того, ПРІГ можуть блокувати зв'язування ЛПС із ефекторними клітками, що запобігає їхню активацію і синтез різноманітних медіаторів запалення. Таким чином, ПРІГ можуть вносити додатковий вклад у захист організму від інфекційних агентів.

Ключевые слова: полиреактивные иммуноглобулины, липополисахарид, фагоцитоз.

По данным литературы, модификация структуры антител с помощью различных физико-химических факторов (экстремально низкие либо высокие значения pH; обработка липазами, хаотропными ионами, органическими растворителями; воздействие активных форм кислорода (АФК) и др.) приводит к полиреактивной трансформации иммуноглобулинов, что проявляется в многократном усилении их способности к взаимодействию с широким спектром самых разных антигенов [1, 17, 19]. Ранее нами было показано, что кратковременная обработка сывороточных иммуноглобулинов человека (ИГ) 3,5 М тиоцианатом калия существенно усиливает их связывание с гликолипидными (липопополисахариды энтеробактерий) и белковыми (овальбумин) антигенами [7, 14]. Считается, что перечисленные выше физико-химические факторы способствуют увеличению подвижности субдоменных структур центров связывания ИГ, что облегчает комплементарную перестройку их конформации под соответствующий антигенный эпитоп. При этом Fc-область остается неизменной и сохраняет присущие ей эффекторные свойства [2]. В связи с этим полиреактивно трансформированные иммуноглобулины (ПРИГ) обладают выраженной биологической активностью и могут оказывать существенное влияние на различные физиологические и патофизиологические процессы. Показано, что ПРИГ усиливают фагоцитоз микроорганизмов, потенцируют развитие специфического иммунного ответа на антигены с низкой иммуногенностью, являются одним из первичных защитных барьеров по отношению к инфекционным агентам, участвуют в катаболизме аутоантигенов и др. [2, 17, 19]. Поскольку повышение активности ПРИГ может быть целесообразным для организма, допускается возможность образования ПРИГ in vivo в очагах воспаления, где активированные нейтрофилы продуцируют значительное количество АФК [1]. Вполне вероятно, что ПРИГ, являясь дополнительным протективным фактором иммунной природы, играют важную роль в защите организма от инфекционных агентов.

В настоящей работе приведены результаты дальнейшего изучения свойств ПРИГ, полученных путем полиреактивной трансформации ИГ сыворотки крови практически здоровых лиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов использовали пулированную сыворотку 40 доноров Крымской республиканской станции переливания крови (г. Симферополь), которую получали общепринятым способом и хранили при +4-8^{0}С. Иммуно-

глобулиновую фракцию выделяли четырехкратным осаждением 40%-м раствором сульфата аммония. Полученные ИГ трансформировали в ПРИГ кратковременной обработкой 3,5 М раствором тиоционата калия [7]. Концентрацию белка в иммуноглобулиновой фракции и препаратах ПРИГ определяли биуретовым методом [23]. Во время всего периода проведения экспериментов ПРИГ хранили при +4-8?С.

Анализ взаимодействия нативных ИГ и ПРИГ с коньюгатом белка А, меченным пероксидазой хрена (белок А*HRP, Пептос, Россия) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа [6]. Особенности проведения этого эксперимента указаны в разделе “Результаты и обсуждение”.

Фагоцитарную активность гранулоцитов периферической крови (ПК) оценивали методом проточной лазерной цитофлуориметрии, используя в качестве тест-объекта суспензию бактерий *Escherichia coli* K30 и *Staphilococcus aureus*, конъюгированных с ФИТЦ [4, 8].

Фракцию лейкоцитов выделяли из образцов ПК 50 практически здоровых людей путем разрушения эритроцитов лизирующим раствором на основе хлорида аммония [5, 8, 16]. Коньюгирование коммерческого препарата липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli* K235 (Sigma Chem. Co., USA) с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (Isomer I, Sigma Chem. Co., USA) (ЛПС-ФИТЦ) выполняли по методу [4]. Изучение особенностей взаимодействия флуоресцентного коньюгата ЛПС-ФИТЦ с субпопуляциями лейкоцитов ПК человека проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии [5].

Продукцию АФК полиморфноядерными лейкоцитами ПК (ПЯЛ) определяли методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) [3, 11, 12]. В качестве стимула образования АФК использовали зимозан (Sigma Chem. Co., USA), опсонизированный нативными ИГ и ПРИГ. С этой целью к 1 мл суспензии зимозана (12,5 мг/мл) в растворе Хенкса вносили 250 мкл нативных ИГ или ПРИГ (2,9 мг/мл), перемешивали и инкубировали 30-40 мин при 37?С. Затем суспензию зимозана центрифугировали 30 сек при 1000 g; дважды промывали опсонизированный зимозан 2 мл раствора Хенкса, после чего ресуспендировали в 250 мкл раствора Хенкса. Для определения показателей продукции АФК в термостатированный (37°С) кюветодержатель люминометра, выполненного на базе фотоэлектронного фотоумножителя ФЭУ-85, стабилизированного источника высокого напряжения и преобразователя “ток-напряжение” на операционном усилителе КР544УД1А [9, 15], помещали пластиковую измерительную кювету, содержащую 500 мкл суспензии лейкоцитов, 400 мкл раствора Хенкса и 100 мкл 0,5 мМ люминола (Sigma Chem. Co., USA). Спонтанную ХЛ регистрировали в течение 15 мин при 37?С. Затем в кювету прибавляли 100 мкл суспензии зимозана, опсонизированного нативными ИГ или ПРИГ и в течение 30 мин регистрировали активированную ХЛ при 37?С. Интенсивность ХЛ выражали в мВ/10^6 клеток. Площадь пика расчитывали гравиметрическим методом.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 97 из пакета Microsoft Office 97.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что воздействие на иммуноглобулины класса G (IgG) хаотропными ионами ведет к значительному усилению их способности взаимодействовать с самыми разными биологическими молекулами, что связывают с увеличением подвижности субдоменных структур Fab-участков антител [1, 7, 14, 17, 19]. Ряд имеющихся экспериментальных данных свидетельствует о том, что Fc-область молекул IgG сохраняет свои свойства неизменными или, по крайней мере, они изменяются незначительно [2]. Для оценки степени сохранения нативной конформации Fc-области ПРИГ мы

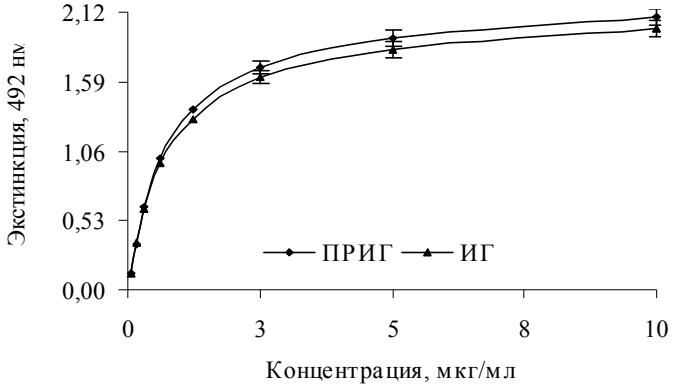

Рис. 1. Уровень связывания стафилококкового белка А с иммобилизованными на твердой фазе ПРИГ и ИГ.

воспользовались уникальным свойством белка А *Staphilococcus aureus* селективно взаимодействовать с Fc-фрагментом IgG человека [10]. При проведении данного эксперимента нативные ИГ и ПРИГ с начальной концентрацией 10 мкг/мл разводили с 2-кратным шагом 0,01М фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 1%-й NaCl (PBS), и иммобилизировали в течение 12 часов при 18-20С на поверхности полистироловых планшетов.

Для удаления неспецифически связавшихся компонентов и блокирования свободных центров связывания лунки промывали PBS, содержащим 0,05%-й Tween 20. Затем в лунки вносили коньюгат белка А с пероксидазой хрена (1:2000) и инкубировали при 37°С в течение 60 мин. Оценку ассоциированной с твердой фазой пероксидазной активности проводили, как описано в работе [6].

Проведенные опыты показали, что ПРИГ сохраняют способность связывать белок А Staphilococcus aureus практически на том же уровне, что и нативные ИГ (Рис. 1). Таким образом, кратковременная обработка антител 3,5 М тиоцианатом калия не приводит к существенным конформационным изменениям структуры Fc-фрагмента образующихся ПРИГ, в то время как конформация Fab-участка и соответственно его свойства (прежде всего, способность к взаимодействию с различными антигенными детерминантами) в результате такого воздействия претерпевают существенные изменения. В связи с этим следует ожидать, что ПРИГ должны обладать весьма выраженной биологической активностью и в качестве эффекторов способны оказывать существенное влияние на различные биологические процессы.

Известно, что опсонизация специфическими антителами объектов фагоцитоза оказывает существенное влияние на эффективность их поглощения фагоцитирующими клетками, которые имеют на своей поверхности рецепторы к Fc-фрагменту IgG. Вполне вероятно, что одной из важных функций ПРИГ может быть опсонизация антигенов, что обеспечивает дополнительный вклад в защиту организма от инфекционных агентов. В связи с этим нами были проведены эксперименты по изучению влияния ПРИГ на фагоцитарную активность гранулоцитов ПК. В качестве объекта фагоцитоза использовали суспензию бактерий *Escherichia coli* K30 и *Staphilococcus aureus*, конъюгированных с ФИТЦ (Табл. 1 и 2).

Таблица №1.

Влияние полиреактивных иммуноглобулинов на фагоцитарную активность гранулоцитов периферической крови. Объект фагоцитоза - *Escherichia coli* K30.

Группа	Фагоцитарная активность гранулоцитов			
	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число, усл. ед. флуор.		
		Среднее	Медиана	Мода
Фагоцитоз, индуцированный ПРИГ, n=50	7,94±0,24	94,28±0,32	96,52±0,52	90,34±2,59
Фагоцитоз, индуцированный ИГ, n=50	4,55±0,11 p<0,001	91,37±0,71 p<0,01	93,54±0,92 p<0,01	80,70±2,92 p<0,05
Спонтанный фагоцитоз, n=50	4,07±0,13 p<0,001 p_1<0,01	90,07±0,70 p<0,001	91,52±1,13 p<0,001	78,90±2,51 p<0,01

Примечание. Здесь и в таблице 2 символом “p” обозначен уровень достоверности различий показателей фагоцитарной активности гранулоцитов ПК, индуцированной ПРИГ по сравнению с аналогичными значениями фагоцитоза, индуцированного ИГ, и спонтанного фагоцитоза; p_1 - уровень достоверности различий показателей фагоцитарной активности гранулоцитов ПК, индуцированной ИГ, по сравнению с аналогичными значениями спонтанного фагоцитоза.

Установлено, что в присутствии ПРИГ фагоцитарная активность гранулоцитов ПК статистически достоверно возрастает. Так, фагоцитарный индекс в отношении использованных тест-объектов Escherichia coli K30 и Staphilococcus aureus был выше в среднем соответственно на 95,0% и 68,7% по сравнению с аналогичными значениями спонтанного фагоцитоза (p<0,001); и соответственно на 74,5% и 58,0% по отношению к величине данного показателя фагоцитоза, индуцированного ИГ (p<0,001). Наряду с этим было зарегистрировано и повышение фагоцитарного числа.

Так, фагоцитарное число в отношении использованных тест-объектов Escherichia coli K30 и Staphilococcus aureus было выше в среднем соответственно на 4,7% и 7,1% по сравнению с аналогичными значениями спонтанного фагоцитоза (p<0,001); и соответственно на 3,2% (p<0,01) и 4,9% (p<0,001) по отношению к величине данного показателя фагоцитоза, индуцированного ИГ.

Таблица №2.

Влияние полиреактивных иммуноглобулинов на фагоцитарную активность гранулоцитов периферической крови. Объект фагоцитоза - *Staphilococcus aureus*.

Группа	Фагоцитарная активность гранулоцитов			
	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число, усл. ед. флюорисценции		
		Среднее	Медиана	Мода
Фагоцитоз, индуцированный ПРИГ, n=50	14,49±0,23	95,77±0,68	99,47±0,69	91,08±2,92
Фагоцитоз, индуцированный ИГ, n=50	9,17±0,17 p<0,001	91,32±0,57 p<0,001	92,78±0,96 p<0,001	88,68±2,94
Спонтанный фагоцитоз, n=50	8,59±0,15 p<0,001 p_1<0,05	89,41±0,61 p<0,001 p_1<0,05	90,18±1,00 p<0,001	77,00±2,35 p<0,001 p_1<0,01

Фагоцитоз представляет собой сложный многоэтапный процесс, состоящий из ряда последовательно протекающих взаимозависимых стадий, и включает активацию фагоцитирующих клеток (моноцитов и полиморфноядерных гранулоцитов); положительный хемотаксис и хемокинез; адгезию микроорганизмов на клеточной мембране фагоцита; поглощение объекта фагоцитоза с образованием фагосомы; образование фаголизосомы путем слияния фагосомы с лизосомой.

Заключительной стадией фагоцитарного процесса, обеспечивающей килинг микроорганизмов, является генерация АФК [10, 12]. В связи с этим нами были проведены эксперименты по изучению возможного влияния ПРИГ на продукцию АФК ПЯЛ. В качестве стимула образования АФК использовали зимозан, опсонизированный нативными ИГ (ОЗ-ХЛ-ИГ) и ПРИГ (ОЗ-ХЛ-ПРИГ) (Табл. 3). Согласно полученным результатам, опсонизация зимозана ПРИГ сокращает время достижения максимального уровня продукции АФК по сравнению нативными ИГ в среднем в 1,9 раза (p<0,001). Кроме того, наблюдается тенденция к повышению показателей интенсивности ХЛ, индуцированной ПРИГ.

Таблица №3.

Показатели, характеризующие продукцию активных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами при их стимуляции зимозаном, опсонизированным нативными ИГ и ПРИГ.

Группа	Время, мин	Площадь пика, мг	Интенсивность ХЛ, мВ/10^6 клеток
ОЗ-ХЛ-ПРИГ n=15	51±2	675 ±50	19,3±1,3
ОЗ-ХЛ-ИГ n=15	95±2 p<0,001	660±46	17,9±1,1

Примечание. p - уровень достоверности различий между соответствующими показателями для ОЗ-ХЛ-ИГ и ОЗ-ХЛ-ПРИГ

Известно, что ключевым фактором патогенности грамотрицательных бактерий (ГОБ) является липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин, формирующий матриксный слой на внешней мембране клеточной стенки этих микроорганизмов. ЛПС считается одним из наиболее мощных иммунотропных агентов и обладает исключительно высокой биологической активностью, которая сочетается с широким и разнонаправленным спектром действия [13, 22]. Многообразие клинических проявлений патофизиологического воздействия ЛПС на организм человека опосредуется провоспалительными и вазоактивными медиаторами различной природы, которые синтезируются эффекторными клетками в ответ на их стимуляцию ЛПС. При этом биологически активной частью ЛПС является липид А, который способен взаимодействовать с специализированными мембранными рецепторами различных типов клеток. Это приводит к инициации соответствующих клеточных сигнальных путей и продукции активированными клетками провоспалительных цитокинов, АФК и других медиаторов воспаления, которым принадлежит важная роль в прогрессировании воспалительной реакции [13, 18, 20]. Наиболее важным считается взаимодействие ЛПС

с клетками миеломоноцитарного ряда (моноцитами и макрофагами) и эндотелиоцитами.

На сегодняшний день на плазматической мембране этих клеток идентифицировано несколько типов клеточных рецепторов, способных распознавать и связывать ЛПС, а также обеспечивать проведение внутриклеточного активационного сигнала.

В первую очередь к ним относятся мембранные белки CD14 и TLR-4, рецепторы комплемента ($в_2$-интегрины - CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) и "скэвинджер"-рецепторы (SR) [18, 20].

В нейтрализации биологической активности и клиренсе попадающего в кроваток ЛПС, помимо других антиэндотоксиновых систем крови, существенную роль играют специфические антиэндотоксиновые ИГ класса G, основная роль которых заключается в опсонизации ЛПС [21, 22]. По данным литературы, при определенных условиях полиреактивная трансформация антител может происходить *in vivo* [1].

В тоже время нами было показано, что ИГ, подвергшиеся воздействию хаотропных ионов, приобретают способность эффективно взаимодействовать с ЛПС ряда энтеробактерий (*Escherichia coli* K235, *Salmonella minnesota* и *Salmonella enteritidis*) [7].

Исходя из этого, можно предположить, что ПРИГ способны вносить определенный вклад в поддержание антиэндотоксинового гомеостаза организма. Одним из возможных механизмов защитного действия ПРИГ может быть блокирование связывания ЛПС с рецепторами эффекторных клеток. В связи с этим в следующей серии экспериментов нами было изучено влияние ПРИГ на взаимодействие флуоресцентно меченого ЛПС с ЛПС-связывающими рецепторами гранулоцитов и моноцитов ПК практически здоровых лиц.

Установлено (Табл. 4), что уровень связывания флуоресцентного конъюгата ЛПС-ФИТЦ с ЛПС-связывающими рецепторами гранулоцитов и моноцитов в присутствии ПРИГ статистически достоверно ($p<0,001$) снижался (в среднем соответственно на 37,5% и 50,0%) по сравнению с аналогичными значениями для контроля (инкубационная среда, не содержащая антител) и (в среднем соответственно на 15,7% и 24,4%) по отношению к величине данного показателя в присутствии ИГ.

Таблица № 4.

Влияние полиреактивных антител на взаимодействие флуоресцентного конъюгата ЛПС-ФИТЦ с ЛПС-связывающими рецепторами гранулоцитов и моноцитов периферической крови.

Группы	ЛПС-связывающие рецепторы			
	Условные единицы флюоресценции		% относительно контроля (PBS)	
	Гранулоциты	**Моноциты**	**Гранулоциты**	**Моноциты**
Полиреактивные иммуноглобулины, n=50	0,70±0,01	0,68±0,01	37,5	50,0
Иммуноглобулины, n=50	0,83±0,01 $p<0,001$	0,90±0,02 $p<0,001$	25,9	33,8
Контроль (PBS), n=50	1,12±0,02 $p<0,001$ $p_1<0,001$	1,36±0,04 $p<0,001$ $p_1<0,001$	100	100

Примечание. p - уровень достоверности различий показателей ПРИГ по сравнению с аналогичными значениями ИГ и контроля; p_1 - уровень достоверности различий показателей ИГ по сравнению с аналогичными значениями контроля.

Полученные результаты можно интерпретировать, на наш взгляд, следующим образом. ПРИГ, взаимодействуя с ЛПС, блокируют его связывание с ЛПС-связывающими рецепторами гранулоцитов и моноцитов. С одной стороны, это предотвращает активацию клеток и синтез разнообразных медиаторов воспаления, защищая организм от возможного развития пато-физиологических реакций, вызываемых ЛПС, с другой стороны - снижает функциональную нагрузку на SR гранулоцитов. Полученные данные свидетельствуют о том, что ПРИГ могут играть важную роль в нейтрализации биологической активности и клиренсе ЛПС и потенциально представляют собой один из важных компонентов ЛПС-связывающих систем крови.

ВЫВОДЫ

Таким образом, ПРИГ обладают способностью к низкоаффинному взаимодействию с самыми разнообразными серологически несходными антигенами [7, 14], в тоже время сохраняя многие, если не все, эффекторные свойства специфичных антител, что является предпосылкой их выраженной биологической активности. Одним из таких биологически важных эффектов может быть опсонизация ПРИГ разнообразных патогенов и их структур, что усиливает их фагоцитоз и дальнейшее представление антигенных пептидов Т-хелперам. Кроме того, возможным механизмом защитного действия ПРИГ может быть блокирование связывания

ЛПС с ЛПС-связывающими рецепторами эффекторных клеток, что в свою очередь, предотвращает их активацию и синтез разнообразных медиаторов воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобровник С.А. Трансформация специфических антител в полиреактивные иммуноглобулины и их связывание со стенками кровеносных сосудов //Укр. біохім. журн. – 2002. – 74, №3. – С. 133–141.

2. Бобровник С.А., Ефетов К.А., Петрова Ю.И. и др. Комплементсвязывающие и иммуномодулирующие свойства полиреактивных иммуноглобулинов //Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, №3. – С. 104–108.

3. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных /Итоги науки и техники. Биофизика.- Т. 24.- М.: ВИНИТИ, 1989.- 176 с.

4. Гордиенко А.И. Улучшенный метод получения флуоресцентного зонда для определения липополисахарид-связывающих рецепторов методом проточной лазерной цитофлюориметрии // Таврический медико-биологический вестник.- 2007.- 10, №4.- С. 156-160.

5. Гордиенко А.И. Влияние плазмы крови и сывороточного альбумина на специфичность взаимодействия конъюгата липополисахарида с флуоресцеинизотиоцианатом с лейкоцитами периферической крови человека //Імунологія та алергологія.- 2008.- №2.- С. 107-113.

6. Гордиенко А.И., Бакова А.А., Химич Н.В., Белоглазов В.А. Уровни естественных антител к липополисахаридам энтнробактерий у постоянных доноров республики Крым //Імунологія та алергологія.- 2003.- №4.- С. 31-36.

7. Гордиенко А.И., Химич Н.В. Хаотропно модифицированные иммуноглобулины по-разному взаимодействуют с белковыми и гликолипидными антигенами //Укр. біохім. журн. – 2006. – 78, №6. – С. 78–85.

8. Гордієнко А.І, Хіміч Н. В., Білоглазов В. О. Метод визначення поглинальної активності нейтрофілів і моноцитів периферичної крові. Інформаційний лист. – Київ, 2009.- №112.- С. 1-4.

9. Драгомирецкий В.В., Сухов П.П. Стабилизированный источник высокого напряжения для питания Э.О.П. //Приборы и техника эксперимента.- 1993.- №1.- С. 235-236.

10.Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Одесса.: АстроПринт, 1999. – С. 21–24.

11.Друх В.М.., Фархутдинов Р.Р., Загидуллин Ш.З. Метод изучения хемилюминесценции лейкоцитов цельной крови //Клиническая лабораторная диагностика.- 2004, №12.- С. 41-43.

12.Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике.- М.: Медицина, 1983.- 112 с.

13.Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. I. Общая характеристика липополисахаридов и структура липида А //Биохимия.- 1993.- 58, №2.- С. 166-181.

14.Химич Н.В., Гордиенко А.И. Индивидуальные особенности полиреактивной трансформации иммуноглобулинов в норме и при патологии // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета.- Симферополь: Изд. центр КГМУ, 2007.- т. 143, часть 6.- С. 148-153.

15.Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа.- М.: Мир, 1989.- С. 564-566.

16.Appendix A.2A.1 /Current Protocols in Cytometry.- New York: John Wiley & Sons Inc., 1997.

17.Bouvet J.P., Dighiero G. Polyreactivity is not an artefact //J. Immunol. Methods. – 2001. – 254, N1–2. – P. 199–201.

18.Fenton M.J., Golenbock D.T. LPS-binding proteins and receptors //J. Leukoc. Biol.- 1998.- 64, N1.- P. 25-32.

19.Jean-Pierre Bouvet, Guillaume Dighiero From Natural Polireactive Autoantibodies to A La Carte Monoreactive Antibodies to Infectious Agents: Is In a Small World after All? //Infection and Immunity. – 1998, Jan. – P. 1–4.

20.Kielian T.L., Blecha F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review // Immunopharmacology.- 1995.- 29, N3.- P. 187-205.

21.Manthous C.A., Hall J.B., Samsel R.W. Endotoxin in human disease. Part 1: Biochemistry, assay, and possible role in diverse disease states //Chest.- 1993.- 104, N5.- P. 1572-1581.

22.Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function //FASEB J.- 1994.- 8, N2.- P. 217-225.

23.Yatzidis H. An improved biuret reagent //Clin Chem. – 1977. – 23, N5. – P. 908.