

Изменение транскрипции генов цитокинов в перевиваемых клетках человека под влиянием иммуномодулятора Гепон

Атауллаханов Р.И., Холмс Р.Д., Наровлянский А.Н., Катлинский А.В., Мезенцева М.В., Щербенко В.Э., Фарфаровский В.С., Ершов Ф.И.
ООО Иммафарма, ГНЦ-Институт иммунологии МЗ РФ, Immutic Group, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН, Московская медицинская академия им. Сеченова.

В работе исследовано влияние иммуномодулятора Гепон на устойчивость клеток человека *in vitro* к цитотоксическому действию вируса энцефаломиокардита (ВЭМК). Изучена связь противовирусного действия Гепона с изменением транскрипции генов регуляторных цитокинов в клетках хозяина.

В культуре перевиваемых клеток человека (J-96) *in vitro* установлено, что Гепон защищает клетки от гибели вследствие инфекции ВЭМК (100 ТЦД₅₀ в 1 мл). Инкубация клеток в течение 24 часов в присутствии Гепона полностью предотвращала гибель клеток J-96 при 100% гибели клеток в контрольных культурах без Гепона. Минимальная эффективная концентрация Гепона составила 3±2 мкг в 1 мл в сравнении с 6±2 мкг/мл ридостина, контрольного противовирусного препарата.

В клетках J-96, инкубированных в присутствии Гепона или без него, методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции исследовали активность мРНК 11 цитокинов (ИФН-альфа, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО-альфа, ИФН-гамма, ИЛ-18, ИЛ-12). Показано, что Гепон изменяет спектр цитокинов, вырабатываемых в клетке. В контрольных культурах без каких-либо специальных воздействий клетки J-96 синтезировали мРНК ИФН-гамма, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-18 и ФНО-альфа. В клетках J-96, инкубированных в течение 24 часов в присутствии Гепона, дополнительно включался синтез мРНК ИФН-альфа, ИЛ-1бета и ИЛ-6, а продукция мРНК ИФН-гамма и ИЛ-4 прекращалась.

Под влиянием Гепона изменился цитокиновый ответ клеток на вирусную инфекцию. В ответ на инфекцию ВЭМК в клетках J-96 начиналась транскрипция мРНК ИФН-альфа и ИЛ-1бета. Напротив, синтез мРНК ИФН-гамма, ИЛ-4, ИЛ-10 и ФНО-альфа останавливался. Транскрипция мРНК ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и ИЛ-18 оставалась без изменения (как в клетках J-96 без вирусной инфекции). Если клетки J-96 инкубировали в течение 24 часов в присутствии Гепона, а затем заражали ВЭМК, то спектр транскрибируемых мРНК цитокинов отличался от того, что было обнаружено в клетках, инфицированных вирусом без предварительной инкубации с препаратом. В случае последовательной обработки клеток Гепоном, а затем вирусом была выявлена активность 1084 мРНК ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО-альфа. То есть после обработки Гепоном клетки не ответили на вирусную инфекцию ни началом синтеза мРНК ИФН-альфа и ИЛ-1бета, ни прекращением синтеза мРНК ИФН-гамма, ИЛ-10 и ФНО-альфа.

Предполагается, что противовирусное действие Гепона может быть связано с изменением программы синтеза цитокинов как в клетках, в которые вторгается вирус, так и в клетках иммунной системы, которые осуществляют защиту от вирусной инфекции.

Иммуномодулятор Гепон (рег. Р№000015/04-2001) успешно применяется при лечении острых и хронических инфекционно-воспалительных процессов различной этиологии и локализации. В частности, имеются сообщения о высокой эффективности Гепона в лечении рецидивирующего кандидоза слизистых и кожи (7), хронического фарингита (5), рецидивирующих респираторных инфекций (3), рецидивирующей герпес-вирусной инфекции (1,2).

При лечении Гепоном острого ларинготрахеобронхита у детей показано эффективное противовоспалительное действие препарата, которое проявлялось в снятии отека гортани у больных с синдромом Крупа (4). Быстрое и отчетливое противовоспалительное действие препарата описано также при его местном применении для лечения воспаленных слизистых урогенитального тракта (7).

Для понимания механизмов противоинфекционного и противовоспалительного действия Гепона необходимы специальные исследования. В данной работе исследовано влияние Гепона на устойчивость клеток человека *in vitro* к цитотоксическому действию вируса энцефаломиокардита. Изучена связь противовирусного действия Гепона с изменением транскрипции генов регуляторных цитокинов в клетках хозяина.

Материалы и методы

Клетки

Перепиваемая культура клеток J-96, получена из клеток крови мужчины, больного подострой моноцитарной лейкемией [13]. Клетки культивировали в среде 199, дополненной 2 mM глутамина, 10% инактивированной сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 100 Ед/мл пенициллина и анти-PPLO.

Вирус

Использовали вирус энцефаломиокардита (ВЭМК) мышей, штамм "Колумбия SKCoI-SK", в исходной концентрации 105 ТЦД₅₀ (тканевая цитотоксическая доза, приводящая к гибели 50% клеток) в 1 мл.

Титрование ВЭМК

Предварительно за 24 часа до проведения эксперимента культуру клеток J-96, выращенную в 96-луночных пластиковых панелях до монослоя, заражали ВЭМК в 10-кратных разведениях от 10⁻¹ до 10⁻⁸. Культуры клеток инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂, через 24 часа учитывали цитопатогенное действие (ЦПД) вируса с использованием инвертированного микроскопа (Leitz). При исследовании Гепона, а также при изучении спектра синтезируемых мРНК цитокинов в культурах, инфицированных вирусом, применяли дозу вируса 100 ТЦД₅₀ в 1 мл.

Препараты

Использовали Гепон производства ООО Иммафарма (Москва) в виде лиофилизированного стерильного препарата по 2 мг во флаконах. В качестве препарата сравнения применяли "Ридостин" (НПО Вектор, Новосибирск), известный индуктор интерферонов, повышающий защиту от вирусной инфекции.

Исследование противовирусного действия Гепона

Клетки линии J-96 в концентрации 200000 клеток в 1мл высевались в 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты в среде 199 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 300 мкг/мл глутамина и 100 Ед/мл пенициллина. Гепон вносили в культуральные планшеты с клетками J-96 в концентрации 1 мг/мл и раститровывали с шагом 1:2 в 24 лунках, по 3 лунки на каждую концентрацию. Эксперименты повторяли 3 раза. Противовирусный эффект оценивался по минимально эффективной концентрации (максимально эффективное разведение) препарата, защищающей 50% клеток от цитопатогенного действия 100 TCID₅₀ ВЭМК в 1 мл.

Исследование слияния времени экспозиции клеток в присутствии Гепона на ЦПД ВЭМК

Гепон вносили в 3-х концентрациях: 10 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 0,1 мкг/мл (по 9 лунок на каждую концентрацию) в культуральные планшеты с монослоем клеток J-96. Затем в каждые 3 лунки с препаратом каждой концентрации через 24 часа вводили ВЭМК. Использовали следующие схемы обработки Гепоном:

1. препарат вносили за 24 часа до заражения клеток вирусом (без отмывания препарата);
2. препарат вносили за 24 часа до заражения вирусом, перед заражением клетки отмывали от препарата;
3. препарат вносили в культуры клеток на 10 минут, затем клетки отмывали от препарата, инкубировали 24 часа, а затем заражали вирусом.

Противовирусный эффект Гепона оценивался по влиянию на ЦПД ВЭМК. Для определения ЦПД вируса использовали инвертированный микроскоп при увеличении 100х. Интенсивность ЦПД выражали как процент гибели клеток в инфицированной культуре. Гибель 100% клеток в результате ЦПД вируса обозначали +++++, 75% ++++, 50% ++, 25% +. Отсутствие гибели клеток в инфицированной вирусом культуре обозначали как ЦПД -.

Определение мРНК цитокинов

Культуру клеток J-96 высевали в 250 мл культуральные флаконы и на 3-й день культивирования ростовую среду заменяли на поддерживающую (среда 199, дополненная 2% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота без добавления антибиотиков). В опытные культуры клеток на 24 часа вносили препарат Гепон в концентрации 1 мкг/мл. Культуры клеток, обработанные и не обработанные препаратом, заражали ВЭМК за 4 часа до выделения РНК. Таким образом, РНК выделяли из 4 вариантов культуры клеток J-96:

1. контрольные клетки, не подвергавшиеся воздействию ни препаратом, ни вирусом;
2. клетки, инкубированные в присутствии Гепона в течение 24 часов;
3. клетки, инкубированные без препарата в течение 20 часов, затем зараженные вирусом за 4 часа до выделения РНК;
4. клетки, инкубированные в присутствии препарата в течение 20 часов, затем зараженные вирусом за 4 часа до выделения РНК.

Активность мРНК 11 цитокинов определяли методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Выделение РНК проводили по методу [8]. Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой [10]. В работе были использованы пары праймеров для следующих цитокинов: ИФН-альфа [10], ИЛ-6, ИЛ-8 [11], ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО-альфа, ИФН-гамма [16], ИЛ-18 [9], ИЛ-12 [14]. В качестве положительного контроля использовали праймеры для бета-актина [11]. Пробы без кДНК использовались в качестве отрицательного контроля. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически и 2,5% агарозном геле. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758).

Результаты и обсуждение

Гепон защищает клетки J-96 от цитопатогенного действия вируса *in vitro*

В первой серии экспериментов изучали противовирусное действие Гепона. В контрольных культурах клеток J-96, инфицированных ВЭМК, имело место ЦПД вируса, приводящее к гибели 100% клеток. Предварительное инкубирование клеток J-96 в присутствии Гепона приводило к значительному повышению их устойчивости к инфекции ВЭМК. Во всех экспериментах Гепон подавлял развитие вирусной инфекции, снижая ЦПД ВЭМК со 100% до 0. В таблице 1 представлены данные, показывающие

минимально-эффективные концентрации и максимально-эффективные разведения, при которых Гепон проявлял противовирусную активность. Минимальная эффективная концентрация препарата, обеспечивающая противовирусный эффект, составила $3,0 \pm 2,4$ мкг/мл. Эффекты Гепона были сравнимы с противовирусным действием ридостина, известного индуктора интерферонов. Следует отметить, что между отдельными экспериментами наблюдались существенные различия в минимально эффективных концентрациях Гепона. Эти различия, по-видимому, были связаны с естественным изменением культуры клеток в зависимости от времени постановки эксперимента, с различиями серий культуральных сред, сывороток и других добавок, необходимых для поддержания культуры клеток.

Препараты		Противовирусный эффект (разведение*; мкг/мл**)			
Наименование; исходная концентрация	Начальное разведение	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	$M \pm m$
Гепон (1 мг/мл)	1/2	1/128*	1/1024	1/4096	3±2,4
	500	7,8**	0,98	0,24	
Ридостин (1 мг/мл)	1/2	1/512	1/128	1/128	6±2
	500	2	8	8	

Примечания:

* максимальное разведение, до которого наблюдается противовирусный эффект (ЦПД₅₀/мл);

** минимальная концентрация, начиная с которой наблюдается противовирусный эффект .
(ЦПД₉₉/мл).

Таблица 1. Противовирусный эффект гепона в культуре клеток человека J-96

Время экспозиции клеток в присутствии Гепона, достаточное для проявления противовирусного эффекта препарата.

В таблице 2 представлены данные по оценке антивирусной активности Гепона и концентрациях 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл при разных временах экспозиции клеток в присутствии препарата. Полученные результаты доказывают, что инкубация клеток в присутствии Гепона в течение 24 часов индуцировала высокий уровень устойчивости клеток к цитопатогенному действию вируса. Сокращение времени экспозиции клеток в присутствии Гепона до 10 минут приводило к значительному ослаблению противовирусного действия препарата. Следовательно, за 10 минут контакта Гепона с клетками не успевали произойти какие-то важные изменения в клетках, необходимые для их защиты от вируса. Последующая инкубация клеток в течение 24 часов (после 10 минутной экспозиции в присутствии Гепона) не повышала противовирусного действия препарата. Полученные данные свидетельствуют о необходимости продолжительного контакта Гепона с клетками для формирования сигналов, обеспечивающих переход клеток в состояние повышенной устойчивости к вирусной инфекции.

мРНК цитоклинов	Клетки J-96 инкубировали в течение 24 часов			
	без гепона		в присутствии гепона	
	без заражения ВЭМК	заражение ВЭМК (после инкубации без препарата)	без заражения ВЭМК	заражение ВЭМК (после инкубации с препаратом)
ИФН- α	-	+	+	-
ИФН- γ	+	-	-	-
ИЛ-1 β	-	+	+	-
ИЛ-2	+	+	+	+
ИЛ-4	+	-	-	-
ИЛ-6	-	-	+	+
ИЛ-8	-	-	-	-
ИЛ-10	+	-	+	+
ИЛ-12	-	-	-	+
ИЛ-18	+	+	+	+
ФНО- α	+	-	+	+

Примечания:

1. вариант - инкубация клеток в течение 24 часов в присутствии гепона, затем заражение ВЭМК без отмывки препарата;
2. вариант - инкубация клеток в течение 24 часов в присутствии гепона, отмывка препарата, затем заражение ВЭМК;
3. вариант - инкубация клеток в течение 10 минут в присутствии гепона, отмывка препарата, затем культивирование клеток без препарата в течение 24 часов, затем заражение ВЭМК. Градации интенсивности цитопатогенного действия ВЭМК на клетки J-96: гибель 100% клеток +++, гибель 75% клеток +, гибель 50% клеток ++, гибель 25% клеток +, отсутствие ЦПД -.

Таблица 2. Цитопатогенное действие ВЭМК на клетки J-96 в зависимости от времени инкубации клеток в присутствии гепона.

Гепон изменяет спектр мРНК цитокинов, вырабатываемых в клетке

Повышение устойчивости клеток к вирусной инфекции часто связано с синтезом интерферонов и некоторых других цитокинов. В данной работе исследована продукция мРНК 11 различных цитокинов в клетках J-96 до и после воздействия Гепоном (таблица 3). В контрольных культурах без каких-либо специальных воздействий клетки J-96 синтезировали мРНК ИФН-гамма, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-18 и ФНО-альфа. В клетках J-96, инкубированных в течение 24 часов в присутствии Гепона, дополнительно включался синтез мРНК ИФН-альфа, ИЛ-1бета и ИЛ-6, а продукция мРНК ИФН-гамма и ИЛ-4 прекращалась. Следовательно, Гепон оказывал регуляторное влияние на экспрессию генов цитокинов в клетках J-96. Спектры мРНК цитокинов, синтезирующихся в контрольных клетках и клетках, инкубированных в присутствии Гепона, существенно различались. Под влиянием Гепона происходило изменение клеточной программы, что совпадало с переходом клеток в состояние повышенной устойчивости к инфекции ВЭМК.

мРНК цитокинов	Клетки J-96 инкубировали в течение 24 часов			
	без гепона		в присутствии гепона	
	без заражения ВЭМК	заражение ВЭМК (после инкубации без препарата)	без заражения ВЭМК	заражение ВЭМК (после инкубации с препаратом)
ИФН- α	-	+	+	-
ИФН- γ	+	-	-	-
ИЛ-1 β	-	+	+	-
ИЛ-2	+	+	+	+
ИЛ-4	+	-	-	-
ИЛ-6	-	-	+	+
ИЛ-8	-	-	-	-
ИЛ-10	+	-	+	+
ИЛ-12	-	-	-	+
ИЛ-18	+	+	+	+
ФНО- α	+	-	+	+

Примечание:

(+) наличие активности мРНК; (-) отсутствие активности мРНК.

Таблица 3. Влияние гепона и ВЭМК на активность мРНК цитокинов в клетках J-96

Влияние Гепона на синтез мРНК цитокинов в клетках, инфицированных вирусом

В ответ на инфекцию ВЭМК в клетках J-96 начиналась транскрипция мРНК ИФН-альфа и ИЛ-1бета. Напротив, синтез мРНК ИФН-гамма, ИЛ-4, ИЛ-10 и ФНО-альфа останавливался. Транскрипция мРНК ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и ИЛ-18 оставалась без изменения. То есть в инфицированных ВЭМК клетках происходило значительное изменение программы синтеза мРНК цитокинов. Это изменение совпадало с неспособностью клеток противостоять вирусной инфекции.

Если клетки J-96 инкубировали в течение 24 часов в присутствии Гепона, а затем заражали ВЭМК, то спектр транскрибируемых мРНК цитокинов отличался от того, что было обнаружено в клетках, инфицированных вирусом без предварительной инкубации с препаратом. В случае последовательной обработки клеток Гепоном, а затем вирусом была выявлена активность мРНК ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО-альфа. Следовательно, под влиянием Гепона изменился ответ клеток на вирусную инфекцию. После обработки Гепоном клетки не ответили на вирусную инфекцию ни началом синтеза мРНК ИФН-альфа и ИЛ-1бета, ни прекращением синтеза мРНК ИФН-гамма, ИЛ-10 и ФНО-альфа.

Реакция клеток J-96 на Гепон существенно отличалась от реакции этих клеток на ВЭМК. Принципиальные различия действия Гепона от влияния вируса касались транскрипции мРНК ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО-альфа. Напротив, влияние Гепона и вируса на синтез мРНК ИФН-альфа и ИЛ-1бета было подобным. Следовательно, в основе повышения устойчивости клеток к вирусной инфекции лежит модификация синтеза мРНК ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО-альфа, но не ИФН-альфа и ИЛ-1бета.

Цитокины являются мощными регуляторами состояния различных клеток и тканей. В одних случаях цитокины регулируют состояние клеток, которые их производит (аутокринный механизм). В других - с помощью цитокинов клетка воздействует на своих ближайших соседей по ткани (паракринный механизм) или на клетки, находящиеся в других органах и тканях (эндокринный механизм). В случае изменения программы синтеза цитокинов под влиянием Гепона можно предполагать, что защита клеток J-96 от ВЭМК происходит в результате аутокринного или паракринного влияния цитокинов. В первом случае, изменив под влиянием Гепона спектр синтезируемых цитокинов, клетка сама изменяется так, что становится более защищенной от цитопатогенного действия вируса. Во втором случае при посредстве измененного "коктейля" синтезируемых цитокинов клетка влияет на соседние клетки, переводя их в состояние повышенной устойчивости к вирусной инфекции.

Взаимные влияния клеток, опосредованные цитокинами, могут быть достаточно сложными. В настоящее время принято говорить о цитокиновых сетях, имея в виду, что каждый цитокин серьезным образом может влиять на синтез многих других цитокинов и самого себя. Например, в ранней фазе вирусной инфекции начинается синтез ИФН-альфа, который, в свою очередь, индуцирует усиленный синтез ИЛ-12 [12]. Вместе ИФН-альфа и ИЛ-12 синергично включают синтезы ИЛ-2 и ИФН-гамма [6]. В рамках иммунной системы ИЛ-2 активирует реакции Т-клеток, а ИФН-гамма - реакции моноцитов/макрофагов, в обоих случаях усиливаются механизмы защиты от внутриклеточных инфекций [15]. В данной работе показано, что Гепон регулирует синтез ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-альфа, ИФН-альфа и ИЛ-1бета. Вполне вероятно, что такое регуляторное влияние на клетки иммунной системы повышает эффективность иммунной защиты от инфекций. В целом, результаты данной работы раскрывают некоторые механизмы противоинфекционного действия Гепона. Индуцированное Гепоном изменение спектра синтезируемых цитокинов может защищать клетку, на которую подействовал Гепон, или повысить устойчивость к инфекции других клеток, на которые подействовал измененный коктейль цитокинов. Оба события могли иметь место в условиях воздействия Гепоном на клетки J-96 *in vitro*.

В условиях клинического применения Гепона, при введении препарата в организм человека, в дополнение к прямому повышению устойчивости клеток к инфекции, через изменение спектра продуцирующихся цитокинов может происходить активация иммунной защиты от инфекций. Измененный под влиянием Гепона спектр синтезируемых цитокинов может активировать макрофаги, НК-клетки, цитолитические Т-клетки или какие-то другие механизмы иммунитета, защищающие организм от инфекций.

Литература

1. Бибичева Т.В., Силина Л.В. Иммуномодулятор Гепон для местной терапии герпес- вирусной инфекции. - В кн.: Тезисы докладов IX Российского национального конгресса "Человек и лекарство", Москва, 2002, с. 55. 2.
2. Бибичева Т.В., Силина Л.В. Лечение рецидивирующего генитального герпеса иммуномодулятором Гепон - В кн.: Тезисы докладов IX Российского национального конгресса "Человек и лекарство", Москва, 2002, с. 56. 3.
3. Кладова О.В., Ф.С.Харламова, А.А.Щербакова, Т.П.Легкова, Л.И.Фильдфикс, А.А.Знаменская, Г.С. Овчинникова, В. Ф. Учайкин. Первый опыт интраназального применения гепона у детей с респираторными заболеваниями. - Педиатрия, 2002, №2, 86-88. 4.
4. Кладова О.В., Ф.С.Харламова, А.А.Щербакова, Т.П. Легкова, Л.И. Фильдфикс, В.Ф. Учайкин. Эффективное лечение синдрома крупа с помощью иммуномодулятора Гепон. - Русский медицинский журнал, 2002, том 10, №3,138-141. 5.
5. Полякова Т.С., М.М.Магомедов, М.Е.Артемьев, Е.В.Суриков, В.Т.Пальчук. Новый подход к лечению хронических заболеваний глотки. - Лечащий врач,2002, №4, 64-65. 6.
6. Ронт А., Дж. Бростофф, Д. Мейл. Иммунология. М., Мир, 2000, 582 с. 7.
7. Тищенко А.Л. Новый подход к лечению рецидивирующего урогенитального кандидоза. - Гинекология, 2001, том 3, №6, 210-212. 8.
8. Chomczynski P., -N.Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thycyoanate-phenol-chloroform extraction. - Anal. Biochem., 1987,162, 156-159. 9.
9. Gaede K.-J., U.Mamat, M.Schiaak et al. Analysts of differentially regulated mRNAs in monocytis cells induced by in vitro stimulation. J Mol. Med., 1999; 77(12),847-852 10.
10. Geldcr CM, P.S .Thomas, D.H. Yales, I. M. Adcock, J.F.J. Morrison ct a! Cytokine expression m normal, atopic, and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction Thorax, 1995, 50, 1033-1037 11.
11. Lin Y.f M.Zhang, P.F. Barnes. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. - Infection and Immunity, 1998, 66(3), 1121-1126. 12.
12. Nicolaeva L.I., L.V.Olenina, E.F.Kolrsanova. Immunity in different types of hepatitis C - Rus. J. Immunol., 1999, v.4, No. 2, 91-112. 13.
13. Osgood E.E., J.H. Brooke. Continuous tissue culture of leucocytes from humanleukemic bloods by application of "gradient" principles. - Blood 1955, 10(10),1010-1022. 14.
14. Thomas S. Harrison, S.M.Levitz. Role of IL-12 in PBMC responses to fungi in persons with and without HIV infection. - J. Immunol., 1996, No. 3, 4492-4497. 15.
15. Trinchieri G., D. Peritt, F. Gerosa. Acute induction and priming for cytokine production in lymphocytes. - Cytokine and growth factor reviews, 1996, v.7, No.2, 123-132. 16. 16.
16. Yamamura M., K. Uyemura, R. J. Deans, K.Weinberg, T.H. Rea et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in Leprosy lesions. - Science, 1991, 254 (11), 277-279