

УДК 612.017.1-612.018.-573.6.

Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета

А. Д. Черноусов^{1,2}, М. Ф. Никонова¹, Н. И. Шарова¹, А. Н. Митин¹, М. М. Литвина¹, П. Е. Садчиков¹, И. Л. Гольдман², А. А. Ярилин¹, Е. Р. Садчикова^{2*}

¹Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: e.r.sadchikova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.05.2013

РЕФЕРАТ Инновационный продукт Неолактоферрин представляет собой естественную комбинацию рекомбинантного лактоферрина человека (90%) и лактоферрина козы (10%), выделенных из молока коз-продуцентов, несущих в геноме полноразмерный ген лактоферрина человека. Изучено действие Неолактоферрина на клетки иммунной системы человека. Неолактоферрин усиливал выработку интерлейкина 1 β (IL-1 β), определял направление дифференцировки предшественников дендритных клеток, усиливал экспрессию факторов транскрипции, ответственных за дифференцировку Th- и Treg-клеток, стимулировал выработку как интерферона- γ , так и IL-4. Обогащенный ионами железа Неолактоферрин усиливал синтез провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей α . Полученные данные свидетельствуют о том, что Неолактоферрин обладает иммуностимулирующей активностью, сдерживает развитие иммунных процессов по воспалительному пути. Обогащение Неолактоферрина ионами железа усиливает его провоспалительную активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА воспаление, иммунитет, Неолактоферрин, рекомбинантный лактоферрин человека, факторы транскрипции, цитокины.

ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (Лф) – ключевой бактерицидный белок грудного молока, обеспечивающий защиту новорожденного ребенка от инфекций. Лф обладает противомикробным [1–3], противовирусным [4–6] и противогрибковым [7, 8] действием. Показано также, что Лф поражает антибиотикостойчивую микрофлору без формирования генетической адаптации к нему микроорганизмов [9, 10]. При совместном применении Лф и антибиотиков наблюдается усиление действия последних [11, 12]. Несмотря на выраженную антимикробную активность, Лф не подавляет жизнедеятельность нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта [13, 14]. Более того, он стимулирует рост бифидобактерий, поставляя необходимые для их жизнедеятельности ионы железа [15]. Среди других биологических активностей Лф основными являются: иммуномодулирующая [9, 16], антиоксидантная [17, 18] и противовоспалительная [19]. Обнаружено, что Лф и его производные (лактоферрицины) подавляют развитие опухолей и метастазов у экспериментальных животных [20–22].

Механизм биологических активностей Лф хорошо изучен [23–25]. Установлено, что бактерицидность

Лф обусловлена не только непосредственным воздействием на патогенные микроорганизмы, но и способностью активировать иммунную систему организма за счет стимуляции врожденного иммунитета, активации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток [26]. Было решено выделить лактоферрин человека (чЛф) в чистом виде и попытаться использовать его в качестве компонента продуктов функционального питания и в составе различных биологически безопасных лекарственных средств нового поколения. Возможность подобного использования чЛф подтверждена в работах сотрудников Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, создавших на основе чЛф, выделенного из грудного молока, высокоэффективные лекарственные средства широкого терапевтического действия [27–30], в том числе и инъекционные [31]. К сожалению, вследствие дефицита грудного молока потребность в чЛф не может быть полностью удовлетворена.

В последнее десятилетие широкое распространение получил лактоферрин, выделенный из коровье-го молока (Bovine lactoferrin, бЛф), биологические активности которого во многом оказались сходными

с чЛф [32, 33]. Несмотря на успехи в использовании бЛф [34], «чужеродный» бЛф решили заменить рекомбинантным лактоферрином человека (рчЛф), как это сделано в случае некоторых других биологически активных белков животных.

Известно, что по аминокислотной последовательности чЛф и бЛф совпадают лишь на 67% [35]. Различия в первичной структуре приводят к различиям во вторичной и третичной структуре этих белков, что может определять их функциональные особенности. Уже выявлены определенные различия в строении рецепторов чЛф и бЛф в различных органах и тканях человека [36]. Установлено, например, что рецептор клеток тонкого кишечника более специфичен к чЛф, чем к бЛф, и это отличие в значительной степени определяется структурой чЛф [37]. Предполагается, что рецептор чЛф участвует во всасывании железа в тонком кишечнике человека [38]. Обычно железо транспортируется через апикальную мембрану тонкого кишечника при помощи транспортера двухвалентных катионов (Divalent metal transporter-1, DMT-1). Железо, связанное с чЛф, не может проникнуть в клетку посредством DMT-1, для этого служит рецептор чЛф. Попав в клетку, чЛф связывается с ядром, где, по видимому, действует в качестве фактора транскрипции и активирует биосинтез таких сигнальных белков, как каспаза-1 и интерлейкин-18, которые затем поступают в циркуляцию как системный сигнал. Этот путь считается минорным, по нему транспортируется ~10% чЛф. Основной путь, по которому чЛф проникает в эпителиальные клетки, приводит к деградации ~90% белка и высвобождению железа.

Рецепторы чЛф, аналогичные рецептору тонкого кишечника, удалось найти в слюнных железах, сердце, скелетных мышцах, надпочечниках и поджелудочной железе [39]. Два других типа рецепторов обнаружены в печени: рецепторный белок липопротеинов низкой плотности (LRP) и асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR).

При расщеплении бЛф и чЛф образуются так называемые лактоферрицины, обозначаемые соответственно символами В [40] и Н [41], которые различаются как по аминокислотной последовательности, так и по биологической активности.

Иммунологи полагают, что полную биологическую безопасность бЛф для человека может гарантировать только применение этого белка в составе пищевых продуктов, тогда как чЛф можно использовать и в составе инъекционных лекарственных средств.

К настоящему времени рчЛф получен в разных странах при помощи современных биотехнологических методов, а также растений [42, 43], микроскопических грибов [44] и животных [45, 46] в качестве продуцентов.

В Российской Федерации в рамках Программы союзного государства (Россия–Белоруссия) рчЛф получен в составе козьего молока [47]. По физико-химическим параметрам и биологической активности рчЛф соответствует природному чЛф [48, 49]. На основе этого белка создан инновационный продукт Неолактоферрин (Неолакт), представляющий собой комбинацию рчЛф и лактоферрина козы (кЛф), присутствующих в молоке трансгенных коз в соотношении рчЛф : кЛф = 90 : 10.

Ранее мы экспериментально установили, что лактоферрин козы усиливает экспрессию гена *NF-κB* и синтез важнейшего для активации врожденного иммунитета фактора некроза опухолей α (TNFα, tumor necrosis factor), но не влияет на активацию синтеза интерлейкина-1 (IL-1, interleukin-1).

В представленной работе изучено совместное действие рчЛф и кЛф на показатели врожденного иммунитета человека. Исследована способность Неолакта с различным насыщением железа – 4% (Fe⁻) и 16% (Fe⁺) активировать врожденный иммунитет, усиливать презентирующую способность дендритных клеток, определять направление дифференцировки предшественников Т-клеток и усиливать синтез основных цитокинов адаптивного иммунного ответа – интерферона-γ (IFNγ, interferon-γ) и IL-4.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Активность образцов Неолакта оценивали в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 мкг/мл при инкубации с исследуемыми клетками в течение 18 ч при 37°C.

Мононуклеары (преимущественно лимфоциты) выделяли из цельной крови человека центрифугированием с использованием одноступенчатого градиента плотности фиколл–верографин (плотность 1.077 г/мл). Прилипающую фракцию получали инкубацией мононуклеаров крови в 24-луночных плашках (Costar, США) в течение 1 ч при 37°C.

Линия дендритных клеток человека HTSC.IL-10 получена и поддерживается в лаборатории дифференцировки лимфоцитов Института иммунологии [50].

Экспрессию мембранных молекул на поверхности клеток оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии BD FACSCanto II с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентной изотиоцианатом (анти-CD80, анти-CD123) или фикоэритрином (анти-HLA-DR, анти-CD86) (Caltag, США).

Концентрацию цитокинов в культуральных средах определяли иммуноферментным методом с использованием соответствующих тест-наборов (ОАО «Цитокин», Санкт-Петербург).

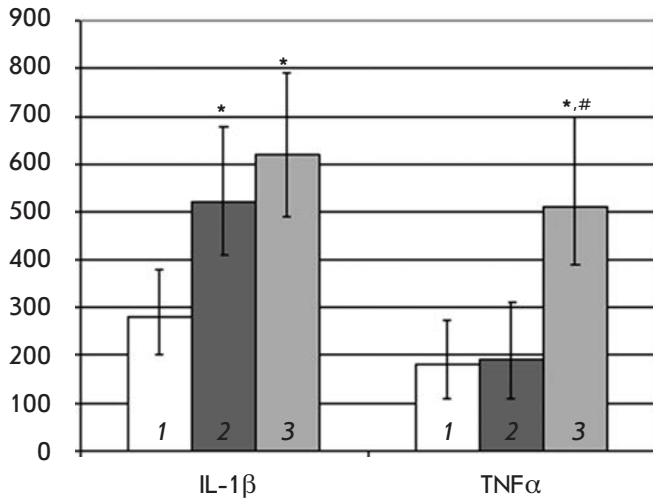


Рис. 1. Влияние Неолакта (2) и Неолакта, обогащенного железом (3), на секрецию моноцитами цитокинов IL-1β и TNFα. 1 – уровень секреции цитокинов в контроле. По оси ординат: концентрация цитокинов (пг/мл) в культуральной среде моноцитов. Представлены медианы **p* < 0.05 относительно контроля; # – то же относительно Неолакта. Содержание Неолакта и Неолакта, обогащенного железом, в среде составило 10 мкг/мл

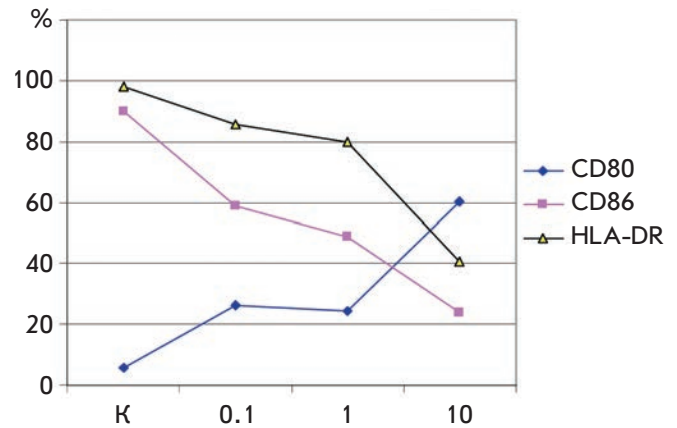


Рис. 2. Влияние Неолакта на экспрессию костимулирующих молекул HLA-DR, CD80 и CD86 дендритными клетками линии HTSC.IL-10. Представлены средние значения трех определений. По оси абсцисс – концентрация Неолакта, мкг/мл, по оси ординат – процент клеток, несущих маркер. К – исходная экспрессия костимулирующих молекул, без добавления Неолакта

Внутриклеточные цитокины определяли в мононуклеарах, активированных смесью 4-форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) и иономицина (ионо), в присутствии BD GolgiStop (Becton Dickinson, США) и пермеабилizированных BD-набором (BD Cytotfix/Cetoperm Fixation/Permeabilization Kit) на проточном цитометре с использованием меченых моноклональных антител к цитокинам [51].

Уровень экспрессии генов факторов транскрипции (NF-κB, GATA-3, Tbet, FOXP3 и RORc) определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с предварительной обратной транскрипцией. Использовали наборы реагентов TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit и TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) [52]. Уровень экспрессии мРНК определяли относительно экспрессии мРНК гена «домашнего хозяйства» β2-микроглобулина (B2M) по формуле:

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-((Ct_{BK}^{B2M} - Ct_{B2M}) - (Ct_{генX}^{BK} - Ct_{генX}))}$$

где Ct – пороговый цикл, определяемый на экспоненциальном участке кривой накопления ДНК, BK – внутренний контроль.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрического анализа. Показатели представляли в виде Ме (L–H),

где Ме – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами обнаружено, что Неолакт активирует врожденный иммунитет. В концентрации 10 и 100 мкг/мл он значительно усиливал секрецию IL-1β моноцитами крови человека, не влияя на выработку TNFα.

Обогащение Неолакта ионами железа индуцировало появление у него способности усиливать выработку TNFα (рис. 1). Таким образом, провоспалительная активность Неолакта ограничивалась повышением выработки IL-1β моноцитами крови, тогда как его обогащение ионами железа существенно активировало врожденный иммунитет и усиливало проявления провоспалительных эффектов.

Влияние Неолакта на экспрессию мембранных молекул, играющих ключевую роль в презентации антигена, определенное на дендритных клетках линии HTSC.IL-10, представлено на рис. 2. Неолакт в трех испытанных дозах значительно снижал число клеток, экспрессирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR) и костимулирующую молекулу CD86, которые исходно были представлены почти на всех клетках линии, и повышал численность клеток, несущих дру-

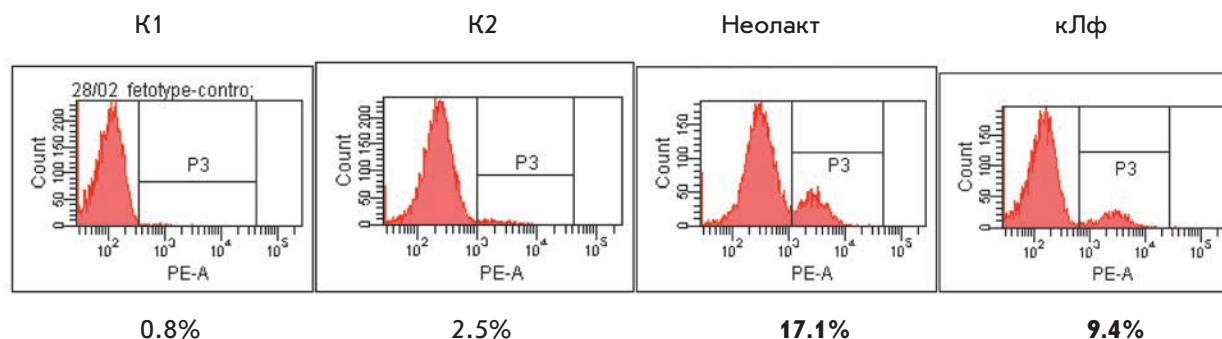


Рис. 3. Влияние Неолакта и козьего лактоферрина на экспрессию молекул CD123 на дендритных клетках линии HTSC.IL-10 в суточных культурах. Гистограммы двцветного окрашивания моноклональными антителами. К1 – без окрашивания анти-CD123-PE; К2 – без инкубации с Неолактом. Жирным выделены значения, отличающиеся от контроля в 2 и более раз. Концентрации Неолакта и козьего лактоферрина составили 10 мкг / мл

гую костимулирующую молекулу – CD80, исходно представленную на малом числе клеток этой линии. Под влиянием Неолакта фактически происходила смена костимулирующих молекул на поверхности дендритных клеток. При этом под влиянием Неолакта возрастала плотность молекул HLA-DR на каждой индивидуальной клетке. Введение в препарат ионов железа приводило к утрате этих эффектов. Снижение доли дендритных клеток, несущих молекулы HLA-DR, можно рассматривать как свидетельство ограничения под влиянием Неолакта антигенпрезентирующей способности популяции дендритных клеток. Активация Т-клеток, зависящая от экспрессии костимулирующих молекул, в присутствии Неолакта количественно не меняется, поскольку ослабление экспрессии одной костимулирующей молекулы сопровождается усилением экспрессии другой, выполняющей аналогичную функцию. При этом Неолакт обладает активностью фактора дифференцировки дендритных клеток, что регистрируется по экспрессии маркера плазмацитоидных дендритных клеток – CD123, являющегося рецептором IL-3 (рис. 3). Индукция экспрессии CD123, которую можно трактовать как признак конверсии фенотипа дендритных клеток из миелоидных в плазмацитоидные [53], определяет иммунный ответа Th2-типа и ослабляет более агрессивный ответ Т-клеток (Th1 и Th17), приводящий к развитию иммунного воспаления. Необходимо отметить, что у кЛф дифференцирующая активность выражена в меньшей степени (рис. 3).

Выбор направления дифференцировки Т-хелперных клеток в конечном счете определяет направление иммунного ответа, а также его про- или противовоспалительный характер, способность благоприятствовать развитию различных форм иммунопатологии

и т.д. Условно к провоспалительным можно отнести Th1- и Th17-клетки, а к противовоспалительным – Th2 и Treg, причем Th2-клетки принято рассматривать как проаллергические. Направление дифференцировки и стабилизация клеточного фенотипа определяются экспрессией факторов транскрипции GATA-3 (для Th2-клеток), Tbet (для Th1), RORc (для Th17) и FOXP3 (для Treg), кодируемых соответственно генами *GATA3*, *TBX21*, *RORC* и *FOXP3*. В связи с этим спектр экспрессии указанных генов Т-клетками крови в значительной степени определяет наследственную или индуцированную склонность организма к развитию иммунного ответа в том или ином направлении, а также различных форм иммунопатологии.

Влияние Неолакта на развитие Т-хелперных клеток различного типа оценивали по их воздействию на экспрессию генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку CD4⁺ Т-клеток (таблица). Неолакт и его производное, обогащенное железом, уже в концентрации 1 мкг/мл усиливали экспрессию гена *GATA3*, ответственного за развитие Th2-клеток, антипаразитарную защиту и проаллергическую ориентацию иммунных процессов. Эффект проявлялся при действии Неолакта как на покоящиеся, так и на активированные Т-клетки. Скольконибудь существенного влияния на экспрессию «провоспалительных» генов *TBX21* (кодирует фактор Tbet Th1-клеток) и *RORC* (кодирует фактор Th17-клеток RORc) не обнаружено. Неолакт усиливает экспрессию гена *FOXP3*, ответственного за развитие регуляторных Т-клеток, которые ограничивают интенсивность и длительность иммунного ответа. Неолакт не индуцирует экспрессию в дендритных клетках гена β-цепи IL-12, ответственного за дифференцировку Th1-клеток.

Влияние Неолакта на экспрессию генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов

Неолакт, мкг/мл	Гены факторов транскрипции			
	<i>GATA3</i>	<i>TBX21</i>	<i>RORC</i>	<i>FOXP3</i>
Неактивированные лимфоциты				
0 (контроль)	0.718 (0.527–0.974)	0.010 (0.005–0.018)	0.260 (0.199–0.292)	0.569 (0.306–0.818)
1.0	1.173* (0.815–1.690)	0.014 (0.002–0.016)	0.266 (0.159–0.272)	0.834* (0.811–1.120)
10.0	0.727 (0.481–2.587)	0.018 (0.001–0.028)	0.172 (0.043–0.409)	0.767 (0.246–0.774)
Активированные фитогемагглютинином лимфоциты				
0 (контроль)	0.613 (0.483–0.894)	0.010 (0.005–0.017)	0.649 (0.433–1.013)	0.805 (0.047–1.101)
1.0	1.228* (0.705–1.815)	0.014 (0.007–0.018)	0.487 (0.399–0.802)	1.018 (0.759–2.446)
10.0	0.675 (0.399–0.807)	0.011 (0.008–0.013)	0.743 (0.483–1.576)	0.678 (0.361–1.069)

**p* < 0.05.

Примечание. Представлены медианы (в скобках – нижний и верхний квартили).

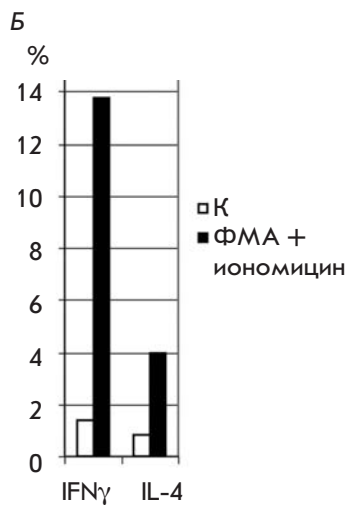
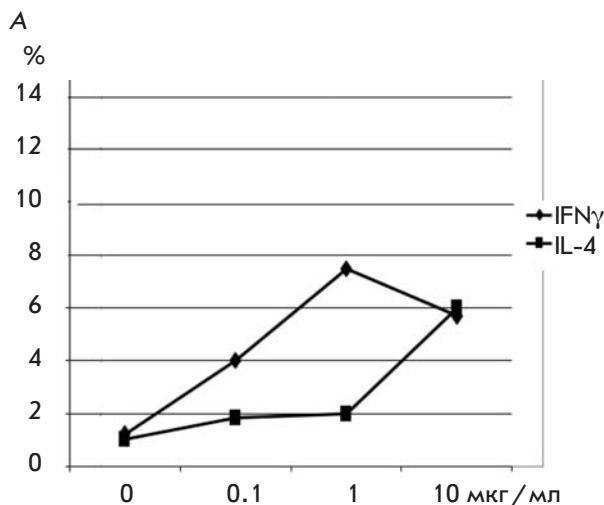


Рис. 4. Влияние Неолакта на индукцию Т-клеток, образующих IFN γ и IL-4 (*n* = 3) (А), и положительный контроль синтеза указанных цитокинов Т-клетками при оптимальной стимуляции смесью ФМА/иономицин (100 нМ/2 мкМ соответственно) (Б). По оси абсцисс – концентрация рчЛф (А), по оси ординат – процент клеток, продуцирующих IFN γ и IL-4 (А, Б)

Таким образом, в этой группе тестов Неолакт не только не проявил сколько-нибудь выраженной способности усиливать экспрессию факторов, вовлеченных в развитие иммунного воспаления, но оказывал скорее противоположное действие, стимулируя экспрессию генов, ответственных за развитие Th2- и Treg-клеток.

Оценка влияния Неолакта на дифференцировку Th1- и Th2-клеток (Th1- и Th2-клетки определяли по числу клеток, продуцирующих их ключевые

цитокины – IFN γ и IL-4 соответственно) показала, что Неолакт усиливает выработку обоих цитокинов. При концентрации 1 мкг/мл продукция IFN γ усиливается в большей степени, чем выработка IL-4, при концентрации 10 мкг/мл эффекты обоих цитокинов выравниваются (рис. 4). Но даже при концентрации 1 мкг/мл число клеток-продуцентов IFN γ остается существенно меньше, чем при активации клеток смесью ФМА и иономицина, тогда как число IL-4-продуцентов превышает этот уровень. Иными

словами, стимуляция Th2-клеток под действием Неолакта соответствует физиологическому уровню их вовлечения в иммунный ответ, тогда как стимуляция Th1-клеток не достигает этого уровня, что не противоречит результатам оценки влияния рчЛф на экспрессию генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку подклассов Т-хелперных клеток.

ВЫВОДЫ

Суммируя результаты оценки влияния Неолакта на некоторые проявления активности иммунной системы, можно заключить, что препарат обладает иммуностимулирующей активностью, его действие в определенной степени направлено на сдерживание иммун-

ных процессов или их развитие по Th2-зависимому пути. В то же время, судя по влиянию на формирование IFN γ - и IL-4-продуцирующих клеток, препарат не вызывает резко выраженной поляризации иммунного ответа, что могло бы послужить основой для развития аллергических или аутоиммунных процессов. Обогащение препарата ионами железа вызывает усиление его провоспалительной активности и утрату ряда эффектов, свойственных исходному Неолакту. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственный контракт № 01.916.12.0001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Farnaud S., Evans R.W. // *Mol. Immunol.* 2003. V. 40. P. 395–405.
- Brock J.H. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 245–251.
- Sallmann F.R., Baveye-Descamps S., Pattus F., Stivense K.J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 16107–16114.
- van Hooijdonk A.C., Kusstndrager K.D., Steijns J.M. // *Br. J. Nutr.* 2000. V. 84. P. 127–134.
- Ikeda M., Nozaki A., Sugiyama K., Shiita J., Sato T. // *Virus Res.* 2000. V. 66. P. 51–63.
- Pietrantonio A., Ammendolia M.G., Superti F. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 442–448.
- Andersson Y., Lindquist S., Lagerqvist C., Hernell O. // *Early Hum. Dev.* 2000. V. 59. P. 95–105.
- Giels S., Czuprynski C. // *Microb. Pathog.* 2002. V. 32. P. 87–97.
- Kruzel M.L., Zimecki M. // *Arch. Immunol. Ther.* 2002. V. 50. P. 339–410.
- Leitch E.C., Willcox M.D. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2001. V. 18. P. 399–402.
- Naidu A.S., Arnold R.R. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1994. V. 20. P. 69–75.
- Fowler C.E., Soothill J.S., Oakes L. // *J. Antimicrob. Chemother.* 1997. V. 40. P. 877–879.
- Reiter B. // *Ann. Rech. Vet.* 1978. V. 9. P. 205–224.
- Petschow B.M., Talbott R.D., Batema R.P. // *J. Med. Microbiol.* 1999. V. 48. P. 541–546.
- Kim W.S., Ohashi M., Tanaka T., Nozaki A., Sugiyama K. // *Biometals.* 2004. V. 17. P. 279–283.
- Yamauchi K., Wakabayashi H., Shin K., Takase M. // *Biochem. Cell Biol.* 2006. V. 84. P. 291–296.
- Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Kuwata H., Yip T.T., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H. // *Biochimie.* 2009. V. 91. P. 52–57.
- Mulder A.M., Connellan P.A., Oliver C.J., Morris C.A., Stevenson L.M. // *Nutr. Res.* 2008. V. 28. P. 583–589.
- Kulics J., Kijstra A. // *Immunol. Lett.* 1986/1987. V. 14. P. 349.
- Furlong S.J., Mader J.S., Hoskin D.W. // *Exp. Mol. Pathol.* 2010. V. 88. P. 371–375.
- Mader J.S., Salsman J., Conrad D.M., Hoskin D.W. // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. P. 612–624.
- Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 2310–2312.
- Murphy M.E., Kariwa H., Mizutani T., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I. // *Arch. Virol.* 2000. V. 145. P. 1571–1582.
- Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. // *Успехи совр. биол.* 2011. Т. 131. С. 135–144.
- Lonnerdal B., Iyer S. // *Annu. Rev. Nutr.* 1995. V. 15. P. 93–110.
- Spadaro M., Caorsi C., Ceruti P., Varadhachary A., Forni G., Pericle F., Giovarelli M. // *FASEB J.* 2008. V. 22. P. 2747–2757.
- Немцова Е.Р., Иванова Л.М., Якубовская Р.И. // *Вопр. мед. химии.* 1995. Т. 3. С. 58–61.
- Эделева Н.В., Сергеева Т.В., Немцова Е.Р., Щербицкая И.Я., Якубовская Р.И., Осипова Н.А. // *Анестезиология и реаниматология.* 2001. Т. 5. С. 61–64.
- Немцова Е.Р., Эделева Н.В., Осипова Н.А., Якубовская Р.И., Бойко А.В., Демидова Л.В., Чиссов В.И. // *Рос. онкол. журн.* 2006. № 4. С. 29–32.
- Эделева Н.В., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Иванова Л.М., Осипова Н.А. // *Рос. онкол. журн.* 2005. № 6. С. 34–39.
- Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Бойко А.В., Немцова Е.Р., Сергеева Т.В., Осипова Н.А. Пат. RU № 2165769. 2001.
- Spik G., Burnet B., Mazurier-Dehaine C., Fontaine G., Montreuil J. // *Acta Paediatr. Scand.* 1982. V. 71. P. 979–985.
- Cirioni O., Giacometti A., Barchiesi F., Scalise G. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2000. V. 46. P. 577–582.
- Valenti P., Berlutti F., Conte M.P., Longhi C., Seganti L. // *J. Clin. Gastroenterol.* 2004. V. 38. P. 127–129.
- Magnuson J.S., Henry J.F., Yip T.T., Hutchens T.W. // *Pediatr. Res.* 1990. V. 28. P. 176–181.
- Kawakami H., Lonnerdal B. // *Am. J. Physiol.* 1991. V. 261. P. 841–846.
- Suzuki Y.A., Shin K., Lonnerdal B. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 15771–15779.
- Baker E.N., Baker H.M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 2531–2539.
- Suzuki Y.A., Lopez V., Lonnerdal B. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 2560–2575.
- Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. // *J. Appl. Bacteriol.* 1992. V. 73. P. 472–479.
- Odell E.W., Sarra R., Foxworthy M., Chapple D.S., Evans R.W. // *FEBS Lett.* 1996. V. 382. P. 175–178.

42. Conesa C., Calvo M., Sánchez L. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. P. 831–838.
43. Lönnnerdal B. // *J. Am. Coll. Nutr.* 2002. V. 21. P. 218S–221S.
44. Andersen J.H. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2004. V. 6. P. 344–349.
45. van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 484–487.
46. Zhang J., Li L., Cai Y., Xu X., Chen J., Wu Y., Yu H., Yu G., Liu S., Zhang A., et al. // *Protein. Expr. Purif.* 2008. V. 57. P. 127–135.
47. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 512–519.
48. Соколов А.В., Пулина М.О., Кристиан А.В., Захарова Е.Т., Рунова О.Л., Васильев В.Б., Гурский Я.Г., Минашкин М.М., Краснов А.Н., Кадулин С.Г. и др. // *ДАН.* 2006. Т. 411. № 2. С. 267–270.
49. Goldman I., Chernousov A., Sadchikova E. // *Recent Adv. Clin. Med.* 2010. P. 315–321.
50. Шарова Н.И., Литвина М.М., Ярилин А.А. // *Иммунология.* 2010. Т. 31. С. 181–185.
51. Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. // *J. Immunol. Meth.* 1993. V. 159. P. 197–207.
52. Донецкова А.Д., Никонова М.Ф., Ярилин А.А. // *Иммунология.* 2011. Т. 32. С. 184–188.
53. Schmitt N., Cumont M.C., Nugeyre M.T., Hurtrel B., Barré-Sinoussi F., Scott-Algara D., Israël N. // *Immunobiology.* 2007. V. 212. P. 167–177.