

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН



2015 * № 1

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2015

УДК: 547.964:571.27

В.А. Зурочка¹, М.А. Добрынина¹, А.В. Зурочка¹, В.А. Гриценко^{2,3}

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ НА РОСТ ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОККОВ *IN VITRO*

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

³ Оренбургский научный центр УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Установить характер влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) ZP-2 на рост в жидкой питательной среде грамположительных кокков разной таксономической принадлежности.

Материалы и методы. Объектами исследования послужили музейные культуры *Micrococcus luteus var. lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. В экспериментах использовали опытный образец синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 (химическая формула - THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), полученный твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A». Влияние данного пептида на рост грамположительных кокков определялось *in vitro* при его внесении в жидкую питательную среду с градиентом концентраций (10, 30 и 100 мкг/мл) путем динамического замера оптической плотности (OD) бактериальных культур – 0, 2, 4, 6 и 24 часа.

Результаты. Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 при добавлении в жидкую питательную среду дозо-зависимо ингибировал рост грамположительных кокков. При этом выраженность ингибирующего эффекта ZP2 зависела от рода/вида бактерий и фазы роста бактериальной культуры.

Заключение. Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2) оказывает на рост грамположительных кокков в жидкой питательной среде ингибирующее действие, особенности которого зависят от концентрации вещества, таксономической принадлежности бактерий и фазы развития бактериальной культуры.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), активный центр, синтетический пептид, грамположительные кокки, *Micrococcus luteus var. lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, рост, ингибирование.

V.A. Zurochka¹, M.A. Dobrynina¹, A.V. Zurochka¹, V.A. Gritsenko^{2,3}

FEATURES OF SYNTHETIC PEPTIDES ACTIVE CENTER GM-CSF' INFLUENCE ON GROWHT OF GRAM-POSITIVE COCCI *IN VITRO*

¹ Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia

² Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

³ Orenburg Scientific Centre UrB RAS, Orenburg, Russia

Objective. To establish the nature of the influence of synthetic peptide of the active site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) - ZP2 on the growth of gram-positive cocci with different taxonomic affiliation in liquid medium.

Materials and methods. The objects of study were the museum cultures *Micrococcus luteus var. lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In experiments prototype of synthetic peptide of the active site of GM-CSF – ZP2 (chemical formula - THR

NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), obtained by solid-phase method on a synthesizer «Applied Biosystems 430A» was used. Effect of peptide on the growth grampositive cocci determined in vitro by its introduction into the liquid medium with a gradient of concentrations (10, 30 and 100 ug / ml) by measuring the dynamic optical density (OD) of bacterial cultures - 0, 2, 4, 6 and 24 hours

Results. A synthetic peptide of the active site of the GM-CSF – ZP2 when added to liquid culture medium dose-dependently inhibited the growth of gram-positive cocci. The expression of the inhibitory effect ZP2 depended on the genus/species of bacteria and the growth phase of the bacterial culture.

Conclusion. A synthetic peptide of the active site of the GM-CSF – ZP2 has on the growth of Gram-positive cocci in a liquid nutrient medium inhibitory effect, whose characteristics depend on the substance concentration, taxonomic origin of bacteria and development phases of a bacterial culture.

Key words: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), the active center, synthetic peptide, Gram-positive cocci, *Micrococcus luteus var. lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, growth, inhibition.

Введение

Любые повреждения тканей макроорганизма сопровождаются воспалительной реакцией с выработкой клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию [1].

Одним из таких цитокинов является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), состоящий из 127 аминокислот и стимулирующий костномозговое кроветворение, в частности рост и дифференцировку гемопоэтических клеток таких линий, как гранулоциты, макрофаги и эозинофилы [2]. В то же время результаты последующих исследований биологических эффектов активного центра ГМ-КСФ и его синтетических аналогов показали, что эти соединения обладают плеiotропным действием, проявляя помимо основной функции иммуномодулирующую, репарационную и антибактериальную активность [3-6], что определяет перспективность их использования в качестве основы при создании новых лекарственных препаратов для клинической практики [7].

Особый интерес привлекают синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ и, в частности, ZP2 (химическая формула – THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), который обладает относительно высокой активностью во всем спектре указанных биологических эффектов [4, 5]. Вместе с тем пока отсутствуют данные об особенностях влияния этого синтетического пептида на рост в жидкой питательной среде грамположительных кокков, принадлежащих к разным таксонам (род/вид) и отличающихся друг от друга степенью патогенности.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 на рост в жидкой питательной среде грамположительных кокков разной таксономической принадлежности.

Материалы и методы

Объектами исследования служили музейные культуры *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P) и *Staphylococcus epidermidis* №711 (из коллекции ИКВС УрО РАН).

В работе использован опытный образец синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 (химическая формула – THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), полученный твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A». Влияние данного пептида на рост грамположительных кокков определялось *in vitro* при его внесении в жидкую питательную среду с градиентом концентраций: 10, 30 и 100 мкг/мл.

Исследование влияния ZP-2 на рост грамположительных кокков производилось путем инкубации бактериальной культуры в течение 24 часов в микроячейках пластиковой планшеты в присутствии ZP-2. Для этого 25 мкл бактериальной взвеси, содержащей 5×10^8 КОЕ/мл, приготовленной из суточной агаровой культуры бактерий, и 25 мкл раствора ZP-2 вносились в микроячейки, содержащие 200 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ), с последующей инкубацией в термостате при 37°C. Развитие бактерий в жидкой среде определялось путем измерения оптической плотности культуры (ОД) в каждой из микроячеек при длине волны (λ) 492 нм на Multiscan Accent (Thermo Labsystems, Финляндия). В настоящем исследовании ОД культур замерялась на 0 (исходный уровень), 2, 4, 6 и 24 часах инкубации.

Для определения выраженности влияния ZP-2 на рост бактериальных культур рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ) по формуле [8]:

$$\text{ИИ} = \frac{\text{ОДк} - \text{ОДо}}{\text{ОДк}} * 100\%,$$

где ИИ - Индекс ингибирования (%); ОДк и ОДо – оптическая плотность контрольной и опытной культур соответственно. Индекс ингибирования бактериальных популяций оценивался на 2, 4, 6 и 24 часах.

Полученные данные обработаны с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., 2011) методами вариационной статистики с вычислением из 5 измерений средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). О достоверности отличий между контролем и опытом судили по критерию Стьюдента - t [9].

Результаты и их обсуждение

Как видно из рисунка 1, внесение в питательную среду синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 оказывало заметное тормозящее влияние на рост *M. luteus var. lysodeikticus*.

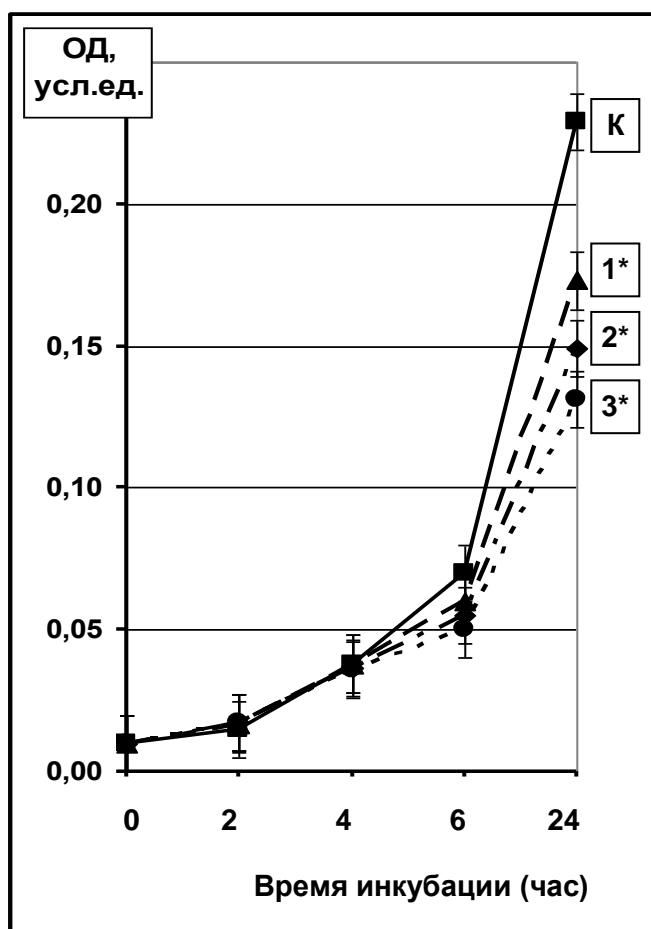


Рис. 1. Влияние на рост популяции *M. luteus var. lysodeikticus* (ОД, усл. ед.) ZP2 при разной концентрации (мкг/мл): 1 – 10; 2 – 30; 3 – 100; К – контроль; * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

При этом ингибирующий эффект ZP2 в отношении микрококка зависел как от концентрации фактора в среде культивирования, так и от фазы развития бактериальной популяции (табл. 1).

Следует отметить, что в диапазоне изученных концентраций ZP2 (10-100 мкг/мл) Индекс ингибирования роста популяции *M. luteus var. lysodeikticus* градиентно увеличивался на 4, 6 и 24 часах культивирования, свидетельствуя о дозо-зависимом эффекте влияния данного соединения на размножение микрококка в жидкой питательной среде (МПБ). Максимально выраженное ингибирование размножения *M. luteus var. lysodeikticus* наблюдалось на 24 часах, и при концентрациях ZP2 10, 30 и 100 мкг/мл оно соответственно

составило $24,5 \pm 0,6$, $34,9 \pm 2,1$ и $42,8 \pm 2,0\%$ относительно контроля.

Таблица 1. Зависимость Индекса ингибирования (ИИ, %) роста в жидкой питательной среде *M. luteus var. lysodeikticus* от концентрации ZP2 и фазы культивирования

Время культивирования	Индекс ингибирования (ИИ, %) роста бактерий при разной концентрации ZP2 в питательной среде		
	10 мкг/мл	30 мкг/мл	100 мкг/мл
2 час	$-13,3 \pm 0,8^*$	$-15,3 \pm 1,1^*$	$-14,7 \pm 1,2^*$
4 час	$1,2 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,8$	$5,3 \pm 0,4$
6 час	$14,3 \pm 0,5^*$	$21,4 \pm 1,4^*$	$28,6 \pm 1,2^*$
24 час	$24,5 \pm 0,6^*$	$34,9 \pm 2,1^*$	$42,8 \pm 2,0^*$

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$); то же – для таблиц 2 и 3.

Вместе с тем обращает на себя внимание тот факт, что на ранней фазе культивирования (2 часа инкубирования) наблюдался парадоксальный эффект – ZP2 «стимулировал» рост микрококка, о чем свидетельствовали более высокая оптическая плотность (ОД) опытных культур ($0,017$ против $0,015$ усл.ед. в контроле) и отрицательные значения Индекса ингибирования ($-13,3 \pm 0,8 \dots -15,3 \pm 1,1\%$).

Возможно, это явление связано с особенностями действия ZP2 на взвесь *M. luteus var. lysodeikticus*, приготовленную из суточной агаровой культуры микрококка, в которой бактериальные клетки находились в стационарной фазе развития и, очевидно, проявляют меньшую чувствительность к ингибирующей активности данного пептида. Указанное предположение подтверждается увеличением Индексов ингибирования (с $1,2-5,3$ до $14,3-28,6\%$) на более поздних сроках инкубирования – на 4 и 6 часах соответственно, когда культуры вступают в фазу с интенсивного роста. Следует подчеркнуть, что аналогичный характер влияния антибактериальных веществ на рост микроорганизмов ранее описан применительно к катионному пептиду лейкоцитов «Интерциду» в отношении *Escherichia coli* K12, когда эшерихии в присутствии данного соединения демонстрировали более высокий темп роста на ранних стадиях развития культуры в сравнении с контролем [8].

Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 существенно и дозо-зависимо влиял на рост *S. aureus* 209P в жидкой питательной среде, снижая биомассу бактерий, оцениваемую по величине оптической плотности контрольных и опытных культур в динамике их развития (рис. 2).

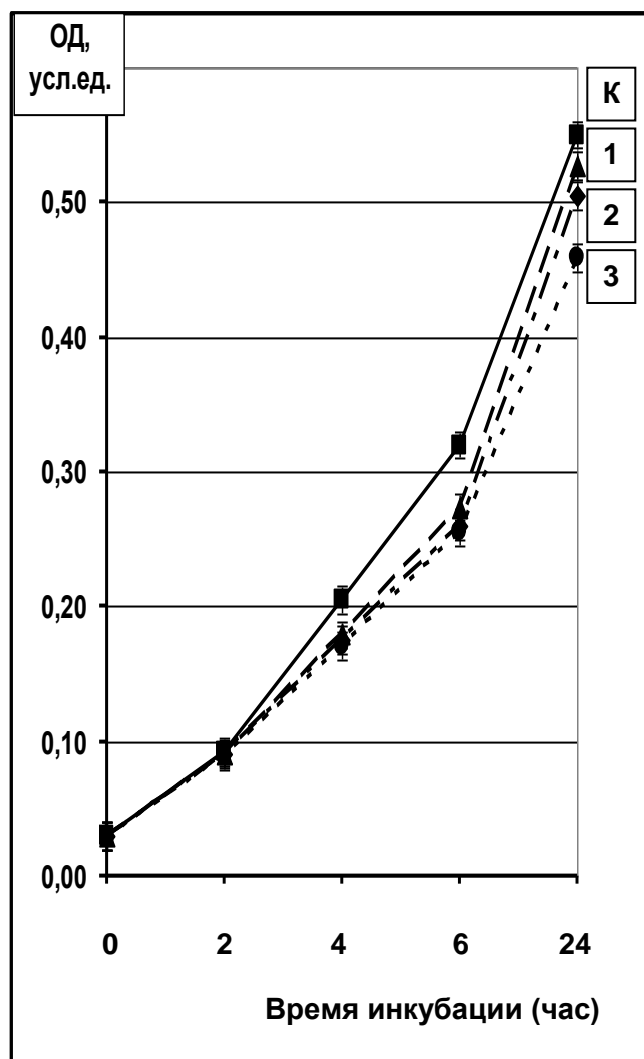


Рис. 2. Влияние на рост популяции *S. aureus* 209P (ОД, усл. ед.) ZP2 при разной концентрации (мкг/мл): 1 – 10; 2 – 30; 3 – 100; К – контроль.

При этом наиболее выраженный ингибирующий эффект ZP2 наблюдался на 6 часах инкубации *S. aureus* 209P и составил $14,7 \pm 0,6$, $18,8 \pm 0,6$ и $20,3 \pm 0,7\%$ для концентраций – 10, 30 и 100 мкг/мл соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Зависимость Индекса ингибирования (ИИ, %) роста в жидкой питательной среде *S. aureus* 209P от концентрации ZP2 и фазы культивирования

Время культивирования	Индекс ингибирования (ИИ, %) роста бактерий при разной концентрации ZP2 в питательной среде		
	10 мкг/мл	30 мкг/мл	100 мкг/мл
2 час	$-1,1 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,3$
4 час	$11,2 \pm 0,4^*$	$14,6 \pm 0,5^*$	$16,6 \pm 0,5^*$
6 час	$14,7 \pm 0,6^*$	$18,8 \pm 0,6^*$	$20,3 \pm 0,7^*$
24 час	$4,2 \pm 0,5$	$8,2 \pm 0,8^*$	$16,5 \pm 0,7^*$

Сравнивая особенности влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 на рост музейных штаммов золотистого стафилококка и микрококка, следует подчеркнуть обнаруженное сходство и имеющиеся межродовые отличия реакции этих бактерий на данный пептид. В обоих случаях ингибирующий эффект ZP2 зависел от концентрации фактора (дозозависимость) и нарастал при переходе бактериальных культур в фазу интенсивного роста (с 2 до 6 часов). Однако максимальные значения Индекса ингибирования роста *S. aureus* 209P наблюдались на 6 часах, тогда как наиболее выраженное снижение биомассы (относительно контроля) у *M. luteus var. lysodeikticus* регистрировалось на 24 часах.

Характер роста популяции *S. epidermidis* №711 в МПБ при воздействии ZP2 можно оценить по динамике ОД, представленной на рисунке 3.

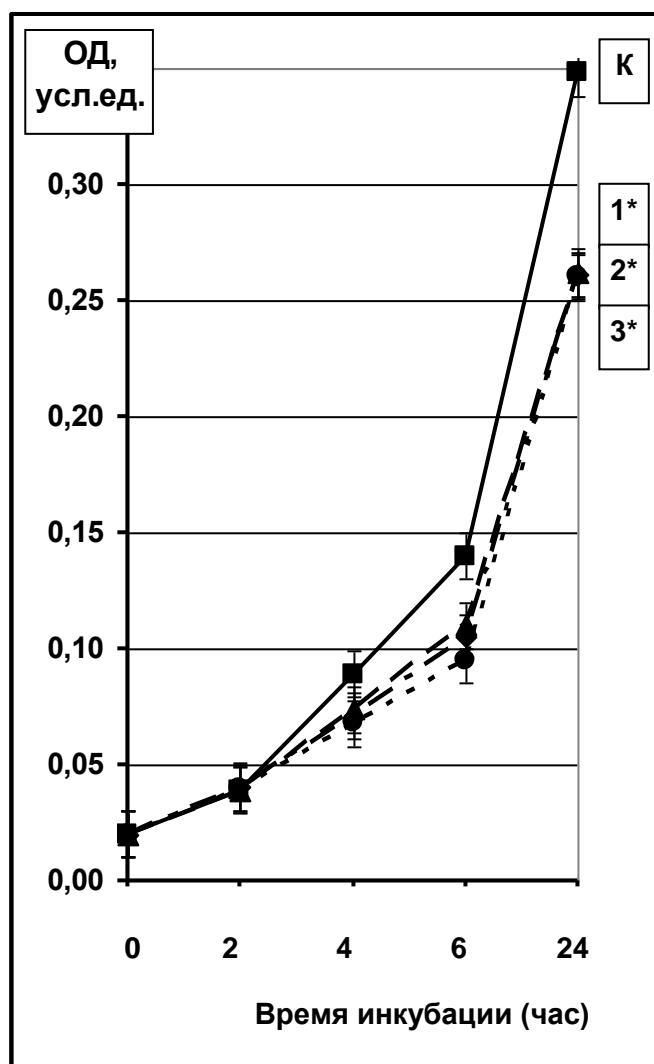


Рис. 3. Влияние на рост популяции *S. epidermidis* №711 (ОД, усл. ед.) ZP2 при разной концентрации (мкг/мл): 1 – 10; 2 – 30; 3 – 100; К – контроль; * - достоверные отличия от контроля (p < 0,05).

Как и в опытах с *S. aureus* 209P, культуры эпидермального стафилококка наиболее выражено замедляли свой рост в присутствии ZP2 на 4-6 часах, когда отмечался четкий дозо-зависимый эффект ингибирования развития популяций бактерий (табл. 3).

Таблица 3. Зависимость Индекса ингибирования (ИИ, %) роста в жидкой питательной среде S. epidermidis №711 от концентрации ZP2 и фазы культивирования

Время культивирования	Индекс ингибирования (ИИ, %) роста бактерий при разной концентрации ZP2 в питательной среде		
	10 мкг/мл	30 мкг/мл	100 мкг/мл
2 час	0,1±0,1	-3,8±0,4	-2,6±0,4
4 час	16,9±0,3*	20,2±0,4*	23,6±0,3*
6 час	21,4±0,7*	25,0±0,6*	32,1±0,8*
24 час	24,7±0,7*	25,0±0,5*	25,3±0,6*

Вместе с тем особенностью влияния ZP2 на рост *S. epidermidis* №711 являлось то, что Индекс ингибирования на 24 часах сохранялся на относительно высоких уровнях (24,7-25,3%), тогда как в опытах с золотистым стафилококком значения этого показателя к 24 часам снижались (относительно 6 часов) и не превышали 4,2-16,5% (см. табл. 2).

Заключение

Оценивая полученные результаты в целом, можно констатировать, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 при добавлении в жидкую питательную среду дозо-зависимо ингибировал рост грамположительных кокков. При этом выраженность ингибирующего эффекта ZP2 зависела от таксономической принадлежности (род/вид) микроорганизмов и фазы роста бактериальных культур.

Исходя из представленных данных, указанный пептид наиболее интенсивно ингибировал развитие популяций грамположительных кокков в фазу их максимальной ростовой активности, которая наблюдалась в период со 2 часа по 6 час. При этом проявления ингибирующего эффекта ZP2 на 24 часах в большей степени сохранялись в случаях *M. luteus var. lysodeikticus* и *S. epidermidis* №711, тогда как в опытах с *S. aureus* 209P значения Индекса ингибирования несколько снижались, что могло отражать своеобразную адаптацию этих микроорганизмов к антибактериальному действию данного пептида и/или более высокую устойчивость золотистых стафилококков, переходящих

в стационарную фазу, характеризующуюся замедлением темпа роста.

Учитывая, что этиологическими агентами многих инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе эндогенной природы, являются золотистые и коагулазоотрицательные стафилококки, описанные особенности влияния синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 на эталонные микроорганизмы могут служить реперной информацией для дальнейших исследований, конечной целью которых должно стать обоснование использование указанного пептида в качестве действующего начала новых лекарственных препаратов для борьбы с инфекционной патологией [4, 6, 7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунология: структура и функции иммунной системы / Под ред. Р.М. Хаитова. М., 2013. 280 с.
2. Murphy J.M., Young I.G. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam. Horm.* 2006. 74: 1-30. DOI:10.1016/S0083-6729(06)74001-8.
3. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Суховой Ю.Г. и др. Иммунотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2011. 2/2 (35): 23-24.
4. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Костоломова Е.Г. и др. Антибактериальные, иммунотропные и репарационные свойства пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефензинов и веществ, полученных из супернатантов CD34⁺45⁻-клеток - предшественников гемопоэза. *Российский иммунологический журнал.* 2012. Т. 6 (14). 3 (1): 78-79.
5. Зурочка А.В. Зурочка В.А., Костоломова Е.Г. и др. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств синтетических пептидов активного центра GM-CSF и веществ, полученных из супернатантов CD34⁺45^{dim} клеток-предшественников гемопоэза. *Цитокины и воспаление.* 2012. Т. 11. 2: 96-99.
6. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Гольцова И.А., Гриценко В.А. Новые подходы к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. *Российский иммунологический журнал* 2014. Т. 8 (17). 3: 690-693.
7. Гриценко В.А., Аминин Д.Л., Зурочка А.В. и др. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2012. 3: 1-17 (URL: [http:// el-mag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf](http://el-mag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf)).
8. Бухарин О.В., Гриценко В.А. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка "Интерцид" на *Escherichia coli*. *Антибиот. и химиотер.* 2000. 45 (1): 16-20.
9. Лакин Г.Ф. *Биометрия.* М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

Поступила 30.03.2015 г.

(Контактная информация: Зурочка Владимир Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УрО РАН; адрес: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; тел.: +7(343)374-00-70; E-mail: v_zurochka@mail.ru;

Добрынина Мария Александровна – аспирант Института иммунологии и физиологии УрО РАН; адрес: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; тел.: +7(343)374-00-70; E-mail: secretar@iip.uran.ru;

Зурочка Александр Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УрО РАН; адрес: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; тел.: +7(343)374-00-70; E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Гриценко Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ученый секретарь Президиума Оренбургского научного центра УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: +7(3532)77-05-12; E-mail: vag59@mail.ru

LITERATURA

1. Immunologija: struktura i funkcii immunnoj sistemy / Pod red. R.M. Haitova. M., 2013. 280 s.
2. Murphy J.M., Young I.G. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam. Horm.* 2006. 74: 1-30. DOI:10.1016/S0083-6729(06)74001-8.
3. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Suhovej Ju.G. i dr. Immunotropnye i biologicheskie jeffekty sinteticheskikh peptidov aktivnogo centra GM-KSF. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki.* 2011. 2/2 (35): 23-24.
4. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Kostolomova E.G. i dr. Antibakterial'nye, immunotropnye i reparacionnye svojstva peptidov aktivnogo centra GM-KSF, razlichnyh defensinov i veshhestv, poluchennyh iz supernatantov CD34+45--kletok - predshestvennikov gemopojeza. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal.* 2012. T. 6 (14). 3 (1): 78-79.
5. Zurochka A.V. Zurochka V.A., Kostolomova E.G. i dr. Sravnitel'naja harakteristika antibakterial'nyh svojstv sinteticheskikh peptidov aktivnogo centra GM-CSF i veshhestv, poluchennyh iz supernatantov CD34+45dim kletok-predshestvennikov gemopojeza. *Citokiny i vospalenie.* 2012. T. 11. 2: 96-99.
6. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Gol'cova I.A., Gricenko V.A. Novye podhody k izucheniju spektra biologicheskoy aktivnosti sinteticheskikh peptidov aktivnogo centra GM-KSF. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal* 2014. T. 8 (17). 3: 690-693.
7. Gritsenko V.A., Aminin D.L., Zurochka A.V. i dr. Nekotorye biologicheskie jeffekty immonomoduljatorov estestvennogo i sinteticheskogo proishozhdenija in vitro kak osnova sozdaniya novyh lekarstvennyh sredstv dlja bor'by s jendogennymi infekcijami. *Bjulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN.* 2012. 3: 1-17 (URL: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>).
8. Buharin O.V., Gritsenko V.A. Vlijanie in vitro preparata lejkocitarnogo kationnogo belka "Intercid" na Escherichia coli. *Antibiot. i himioter.* 2000. 45 (1): 16-20.
9. Lakin G.F. *Biometrija.* M.: Vysshaja shkola, 1990. 352 s.