

## ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ

© 2019 г. С. А. Заморина<sup>1\*</sup>, Л. С. Литвинова<sup>2</sup>, Н. М. Тодосенко<sup>2</sup>,  
В. П. Тимганова<sup>1</sup>, М. С. Бочкова<sup>1</sup>, К. Ю. Шардина<sup>1</sup>,  
П. В. Храмцов<sup>1</sup>, М. Б. Раев<sup>1</sup>, В. А. Черешнев<sup>1</sup>

\*E-mail: mantissa7@mail.ru

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия;

<sup>2</sup>Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Поступила: 27.05.2019. Принята: 30.06.2019

Изучали влияние альфа-фетопротеина (АФП) на провоспалительный цитокиновый профиль Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17. Установлено, что АФП не влиял на уровень IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , но в высоких концентрациях (50, 100 МЕ/мл) повышал продукцию IL-2 активированными Th17. В то же время, АФП в высокой концентрации (100 МЕ/мл) подавлял синтез IFN- $\gamma$ , а в низкой концентрации (10 МЕ/мл) – синтез G-CSF и GM-CSF. Таким образом, продемонстрированы новые аспекты действия АФП в отношении регуляции цитокиновой сети.

**Ключевые слова:** альфа-фетопротеин, беременность, CD4<sup>+</sup>- лимфоциты, ИЛ-17, Т-хелперы 17 типа (Th17), Т-хелперы 1 типа (Th1)

DOI: 10.31857/S102872210007246-5

**Адрес:** Пермь, Голева, 13, 614081, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Заморина Светлана Анатольевна. Тел.: +7(342)280–77–94.

**E-mail:** mantissa7@mail.ru

**Авторы:**

**Заморина С. А.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Литвинова Л. С.**, д.м.н., заведующая базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

**Тодосенко Н. М.**, к.б.н., научный сотрудник Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

**Тимганова В. П.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Бочкова М. С.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Шардина К. Ю.**, инженер лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Храмцов П. В.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Раев М. Б.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Черешнев В. А.**, академик РАН, д.м.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Во время беременности иммунная система матери подвергается аллоиммунизации фетоплацентарными антигенами. В результате формируется динамическое состояние иммунной толерантности, в поддержании которого важную роль играют белки, ассоциированные с беременностью. Альфа-фетопротеин (АФП) – одноцепочечный гликопротеин (M<sub>r</sub> 68–75 кДа, 3–5% углеводов), который синтезируется в период раннего развития эмбриона в желточном мешке, а затем в печени и желудочно-кишечном

тракте плода. Во время беременности концентрация АФП в крови растет, достигая значений 150–250 МЕ/мл, после родов его уровень резко снижается [1].

АФП способен проникать через фетоплацентарный барьер в материнский кровоток, при этом часть его молекул (около 10%) меняет свою конформацию, становясь так называемым трансформированным АФП (tAFP) [2]. tAFP обладает структурной особенностью, связанной с частичным разворачиванием нативной полноразмерной молекулы, вследствие чего появляется скрытый пептидный эпитоп. В сыворотке беременных женщин идентифицированы полноразмерный АФП и tAFP [2], взаимодействующие с клетками иммунной системы. Независимо от того, что иммуносупрессивные эффекты АФП известны, его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности остается мало изученной [3]. В частности, до сих пор не исследована роль АФП в регуляции функций и дифференцировки провоспалительной субпопуляции IL-17-продуцирующих Т-хелперов (Th17). Известно, что физиологическая беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови в сравнении с небеременными женщинами [4]. Повышение уровня Th17, в свою очередь, ассоциировано с патологическими процессами и может приводить к преждевременным родам или спонтанному аборту [5]. IL-17, являясь основным цитокином Th17, вызывает синтез IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 и ряда других воспалительных факторов, инициируя, таким образом, развитие воспалительной реакции. Известно, что IL-17 играет важную роль в патофизиологии ревматоидного артрита [6], а во время беременности симптомы этого заболевания становятся менее выраженными.

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния АФП на цитокиновый профиль Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на используемую экспериментальную схему получено разрешение Этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016. В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) доноров, которыми являлись здоровые небеременные женщины репродук-

тивного возраста (n=11). Клетки получали центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина (d = 1,077 г/см<sup>3</sup>). Монокультуры CD4<sup>+</sup>-клеток (Т-хелперы) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS<sup>®</sup> (“Miltenyi Biotec”, Германия) из суспензии МПК. После сепарации в полученных монокультурах Т-хелперов подтверждали отсутствие моноцитов (CD14<sup>+</sup>), NK-клеток (CD16<sup>+</sup>) и В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>). Выделенные Т-хелперы культивировали в 96-луночных планшетах (концентрация 10<sup>6</sup> клеток/мл) в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640 с L-глутамином, (“Sigma-Aldrich”, США), 10% ЭТС (“Sigma-Aldrich”), 10 мМ Hepes (“Amresco”, США) и 30 мкг/мл гентамицина (“KRKA”, Словения), в течение 48 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В качестве контроля использовали образец, где вместо белка добавляли ППС. В работе использовали физиологические концентрации (10, 50 и 100 МЕ/мл [7]) нативного (не рекомбинантного) препарата АФП (“Биалекса”, Россия), полученного из сыворотки крови беременных женщин. Эти концентрации АФП соответствовали таковым в периферической крови матери в динамике беременности. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали Т-Cell Activation/Expansion Kit human (TCR-активатор) (“Miltenyi Biotec”) – частицы MACSiBead<sup>™</sup>, покрытые антителами к CD2, CD3, CD28 человека. Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1 $\beta$  и IL-6 (по 10 нг/мл, «Miltenyi Biotec», Германия) [8]. Конверсию клеток в Th17 подтверждали, оценивая уровень экспрессии транскрипционного фактора ROR- $\gamma$ t [9] методом проточной цитометрии. Было установлено, что под воздействием TCR-активатора и провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6) количество Th17-клеток составляло 77,90 $\pm$ 8,30% против 1,14 $\pm$ 0,97 (n=11) в пробах без активаторов.

После 48 ч инкубации методом проточной флуориметрии (мультиплексный анализ, Luminex xMAP) в супернатантах культур Th17-клеток определяли содержание следующих цитокинов и хемокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ . Метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на микрочастицах, на которых сорбированы соответствующие антитела, с их последующим проточным флуоресцентным

анализом и одновременным определением концентрации исследуемых цитокинов. Процедуры осуществляли согласно протоколу “Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Panel”. Результаты регистрировали с помощью автоматического фотометра для микропланшетов Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, “Bio-Rad”, США) и программы Bio-Plex Manager (“Bio-Rad”). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 8.0. Достоверность разли-

чий оценивали при помощи парного критерия Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки эффектов АФП на продукцию цитокинов Т-хелперами использовали активационную модель, которая имитирует процесс взаимодействия Т-лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками (АПК) в присутствии

**Таблица 1.** Влияние АФП на продукцию цитокинов и хемокинов активированными Т-хелперами (n=11)

Цитокины/ хемокины, пг/мл	Контроль (без активаторов)	Контроль	АФП 10 МЕ/мл	АФП 50 МЕ/мл	АФП 100 МЕ/мл
		(±TCR-активатор; ±IL-1β и IL-6)			
IL-2	5,13 (2,85–9,92)	335,63 (245,64–442,40)*	466,42 (261,81–1097)	872,52 (449,52–1271)#	867,62 (301,39–1616)#
IL-4	0,29 (0,15–0,41)	11,70 (10,66–13,06)*	12,78 (11,36–13,48)	12,31 (11,93–13,75)	13,31 (12,19–13,95)
IL-5	7,05 (5,59–14,76)	275,23 (255,28–292,34)*	301,86 (280,97–346,64)	285,92 (274,07–328,66)	281,29 (266,54–361,13)
IL-7	0,55 (0,25–0,55)	2,44 (2,08–2,63)*	2,47 (2,22–2,83)	2,63 (1,79–3,19)	2,32 (2,09–2,63)
IL-8	2088 (1562–2412)	2568 (1774–3204)	2048 (1685–2892)	2546 (1793–3721)	2274 (1773–3727)
IL-10	5,65 (3,20–9,54)	1125 (968–1605)*	1652 (865–756)	1581 (1426–1720)	1642 (919–1874)
IL-12(p70)	3,10 (2,30–4,39)	7,18 (6,19–8,15)*	8,86 (7,41–9,70)	7,89 (6,84–9,08)	7,97 (7,18–9,00)
IL-13	0,46 (0,37–0,63)	360,56 (301,15–506,65)*	414,66 (327,31–539,86)	486 (309–1193)	389,33 (298,80–1193)
IL-17	8,89 (6,34–11,59)	7836 (6093–8037)*	7986 (7675–8135)	7996 (7213–809)	7968 (4087–8098)
G-CSF	9,75 (5,76–17,83)	35,45 (25,44–42,35)*	24,73 (16,66–29,69)#	35,23 (29,24–39,32)	30,15 (25,72–40,34)
GM-CSF	0,92 (0,53–1,90)	651,87 (524,99–786,04)*	453,11 (367,75–525,29)#	487,65 (433,28–601,59)	542,61 (416,70–1008,52)
IFN-γ	1,12 (0,77–2,09)	987,56 (746,74–1142,26)*	1153 (857–1173)	1136 (781–1183)	800,66 (768,06–1075)#
MCP-1	42,12 (41,58–65,42)	39,62 (37,53–43,76)	43,10 (39,70–47,51)	46,13 (37,77–50,55)	40,04 (38,95–51,81)
MIP-1β	166,53 (113,57–206,53)	1844 (1702–1878)*	1881 (1863–1899)	1879 (1862–1908)	1890 (1877–1917)
TNF-α	55,69 (36,22–166,80)	7357 (6550–11423)*	7689 (5051–14807)	7617 (5586–14886)	8846 (5219–15005)

**Примечание:** данные представлены в виде Ме (Q1 – Q3); \* – достоверные (p < 0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активатора и контролем с активаторами; # – достоверные (p < 0,05) по W-критерию Вилкоксона различия между контролем с активаторами и пробами с АФП.

провоспалительных цитокинов (IL1 $\beta$ +IL6) [8]. Взаимодействие Т-хелперов с TCR-активатором, заменяющим в системе *in vitro* АПК, инициирует такие процессы, как активация, дифференцировка и продукция цитокинов. Показано, что самостоятельный эффект активации клеток заключался в достоверном повышении продукции следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  (Таблица 1), что свидетельствует об адекватности выбранной экспериментальной модели.

При анализе цитокинового профиля было установлено, что АФП не влиял на IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ . Однако, показано, что АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл стимулировал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами. Помимо этого, низкая концентрация АФП (10 МЕ/мл) снижала продукцию колониестимулирующих факторов G-CSF и GM-CSF, а высокая концентрация АФП (100 МЕ/мл) – продукцию IFN- $\gamma$  (Таблица 1).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что клеточные культуры активированных Т-хелперов более чем на 70% состояли из Th17 клеток (CD4<sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>), существует вероятность, что часть цитокинов продуцируется Th1-клетками. Именно поэтому корректнее говорить в цитокиновом профиле активированных Т-хелперов. Итак, АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл стимулировал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами. Известно, что активация Т-лимфоцитов тесно связана с аутокринной продукцией IL-2, который запускает пролиферацию Т-клеток и их дифференцировку. Важно отметить, что IL-2 необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью [10]. Современная парадигма предполагает преобладание Treg над Th17 во время нормальной беременности, что необходимо для обеспечения фетопротекции [11]. Помимо этого, снижение продукции IFN- $\gamma$ , ключевого цитокина Th1-ответа, также способствует формированию противовоспалительного цитокинового профиля. По-видимому, повышение уровня IL-2, и снижение уровня IFN- $\gamma$  под воздействием АФП может играть важную роль в процессе формирования иммунной толерантности.

В то же время, GM-CSF вовлечён в обеспечение имплантации и прогрессирования бере-

менности *in vivo*, и его экспрессия повышается в матке и в сыворотке в период оплодотворения, имплантации и на ранних сроках беременности. Экспрессия GM-CSF запускается хорионическим гонадотропином [12], основным гормоном беременности плацентарного происхождения. АФП, наряду с другими белками беременности, по-видимому, осуществляет реципрокную регуляцию синтеза GM-CSF.

Важно отметить, что в данной работе мы изучали нативный препарат АФП, полученный из крови беременных женщин, что позволяет интерпретировать полученные данные как роль сывороточного АФП в формировании периферической иммунной толерантности на уровне организма матери. В частности, нами впервые показано, что АФП участвует в регуляции цитокинового профиля активированных Т-хелперов, повышая уровень IL-2 и снижая уровень IFN- $\gamma$ . Вероятно, данные изменения в ситуации *in vivo* ведут к формированию необходимого для нормальной беременности преобладания Treg над Th17. В итоге, полученные данные демонстрируют новые аспекты регуляции цитокиновой сети со стороны АФП.

### ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований впервые показано, что АФП участвует в регуляции цитокинового профиля активированных Т-хелперов, повышая уровень IL-2 и снижая уровень IFN- $\gamma$ . Обнаруженные нами эффекты свидетельствуют о том, что сывороточный АФП участвует в формировании периферической иммунной толерантности матери к полуаллогенному эмбриону.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 01201353248 («ИЭГМ УрО РАН»), программы повышения конкурентоспособности (5–100) и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Terentiev A. A., Moldogazieva N. T. Alpha-fetoprotein: A renaissance. *Tumor Biol.* 2013. V. 34. P. 2075–2091.
2. González-Bugatto F., Foncubierta E., Bailén Mde L., Illanes S., Hervías-Vivancos B., Bartha J. L. Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2009. V. 35(№ 2). P. 271–276.
3. Schumacher A., Costa S. D., Zenclussen A. C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front. Immunol.* 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00196

4. Santner-Nanan B., Peek M.J., Khanam R., Richards L., Zhu E., Fazekas de St. Groth. B., Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3<sup>+</sup> and IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. J. Immunol. 2009. V. 183, № 11. P. 7023–30.
5. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2010. V.601, № 63. 601–610.
6. Xie Q., Wang S. C., Li J. IL-17: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2012. № 7. P.1145–6.
7. Gagnon A., Wilson R. D., Audibert F., Allen V.M., Blight C., Brock J.A., Desilets V.A., Johnson J. A., Langlois S., Summers A., Wyatt P. Obstetrical Complications Associated With Abnormal Maternal Serum Markers Analytes. J. of Obstetrics and Gynaecology Canada. 2008. V. 30. P. 918–932.
8. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1β and 6 but not transforming growth factor-β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. Nat. Immunol. 2007. V. 8, № 9. P. 942–9.
9. Ivanov I. I., McKenzie B. S., Zhou L., Tadokoro C. E., Lepelley A., Lafaille J. J., Cua J., Littman D. R. The orphan nuclear receptor ROR γt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell. 2006 V. 126, № 6, P. 1121–1133.
10. Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S., Engeland K., Langwisch S, Dolaptchieva M., Alexander T., Taran A., Malfertheiner S. F., Costa S. D., Zimmermann G., Nitschke C., Volk H. D., Alexander H., Gunzer M., Zenclussen A. C. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal/maternal interface during early human pregnancy. J Immunol. 2009. V.9. P. 5488–5497.
11. Figueiredo A. S., Schumacher A. The T helper type 17/ regulatory T cell paradigm in pregnancy. Immunology. 2016 V.148, № 1, P. 13–21. doi: 10.1111/imm.12595.
12. Paiva P., Hannan N.J., Hincks C., Meehan K. L., Pruysers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. Hum. Reprod. 2011. V. 11. P. 1153–1162. doi: 10.1093/humrep/der027

## INFLUENCE OF ALPHA-FETOPROTEIN ON CYTOKIN PROFILE OF ACTIVATED T-HELPERS

© 2019 S. A. Zamorina<sup>1\*</sup>, L. S. Litvinova<sup>2</sup>, N. M. Todosenko<sup>2</sup>, V. P. Timganova<sup>1</sup>, M. S. Bochkova<sup>1</sup>, K. Y. Shardina<sup>1</sup>, P. V. Khrantsov<sup>1</sup>, M. B. Raev<sup>1</sup>, V. A. Chereshev<sup>1</sup>

\*E-mail: mantissa7@mail.ru

<sup>1</sup>«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences», Perm, Russia;

<sup>2</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 27.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The effect of alpha-fetoprotein (AFP) on the pro-inflammatory cytokine profile of activated T-helpers, polarized in phenotyp of Th17. It was found that AFP did not affect the level of IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1α, TNF-α, but in high concentrations (50, 100 IU/ml) increased IL-2 production by activated T-helper cells. At the same time, AFP in high concentration (100 IU/ml) suppressed the synthesis of IFN-γ, and in low (10 IU/ml) synthesis of G-CSF and GM-CSF. Thus, new aspects of the AFP action regarding the regulation of the cytokine network of Th17 are demonstrated.

*Key words:* alpha-fetoprotein (AFP), T-helper, Th17, Th1, cytokines profiles, pregnancy

**Authors:**

**Zamorina S. A.**, ✉ Ph.D., MD (Biology), leading researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

614081, Perm, st. Goleva, 13, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS». Phone: +7 (342) 280-77-94.

**E-mail:** mantissa7@mail.ru.

**Litvinova L. S.**, PhD, MD (Medicine), Head, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Todosenko N. M.**, PhD (Biology), Researcher, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Timganova V. P.**, Ph.D. (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Bochkova M. S.** Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Shardina K. Y.** researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Khramtsov P. V.**, Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», assistant professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Rayev M. B.**, Ph.D., MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Chereshnev V. A.**, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, Chief Researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.