

## АНТИПЕПТИДНАЯ АКТИВНОСТЬ КИШЕЧНЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ КИШЕЧНОГО ГОМЕОСТАЗА

© 2018 г. Т. А. Бондаренко<sup>1</sup>, Е. И. Данилова<sup>2</sup>, И. Н. Чайникова<sup>1,2</sup>,  
О. Е. Челпаченко<sup>1</sup>, Е. В. Иванова<sup>1</sup>, Н. Б. Перунова<sup>1</sup>, И. А. Никифоров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, Оренбург, Россия;

<sup>2</sup>ГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия

Поступила: 07.05.2018. Принята: 14.06.2018

В работе приведены результаты исследования антипептидной активности в отношении про-(TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов экзометаболитов кишечной микрофлоры, выделенной у пациентов с эубиозом, дисбиозом толстого кишечника и реактивным артритом. Установлены различия у штаммов нормофлоры и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из различных источников, по спектру цитокинов и уровню снижения их содержания в культуральной среде при сокультивировании с экзометаболитами исследуемых культур микроорганизмов. Полученные результаты можно использовать для оценки иммунорегуляторных свойств микрофлоры при различных микроэкологических состояниях толстого кишечника человека и при внекишечной воспалительной патологии.

**Ключевые слова:** кишечные микросимбионты, цитокины, дисбиоз, реактивный артрит

DOI: 10.31857/S102872210002385-8

Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11. Чайникова  
Ирина Николаевна;  
Тел.: (3532) 77-44-63, 89228790981 (моб.), факс: 77-54-17,  
E-mail: inchainicova@yandex.ru

### Авторы:

**Бондаренко Т. А.**, научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН, Оренбург, Россия;

**Данилова Е. И.**, к.м.н., доцент кафедры педиатрии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

**Чайникова И. Н.**, д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН; профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

**Челпаченко О. Е.**, д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН Оренбург, Россия;

**Иванова Е. В.**, к.м.н., в.н.с. лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН, Оренбург, Россия;

**Перунова Н. Б.**, д.м.н., профессор РАН, заведующий лабораторией биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН, Оренбург, Россия;

**Никифоров И. А.**, канд. геолого-минералогических наук, в.н.с. лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН, Оренбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Стабильность кишечного гомеостаза обеспечивается различными структурными и функциональными компонентами, среди которых важное место принадлежит кишечной микробиоте и продуктам ее метаболизма [1, 2]. Нарушения в составе и количестве кишечных микросимбионтов рассматриваются как причинно-значимые триггерные факторы развития внекишечной воспалительной патологии, в частности, при заболеваниях суставов, включая реактивный артрит (РеА) [3]. В этом аспекте интерес представляют цитокины, участвующие в реализации всех процессов в организме, в том числе в формировании иммунной толерантности к нормальной микробиоте и воспалению, ассоциированному с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) человека [4, 5].

Влияние микроорганизмов на цитокины осуществляется через взаимодействие с рецепторами клеток и изменение их секреции, а также контактным путем посредством модификации

цитокинов: деградацией ферментами; нейтрализацией/блокированием клеточных и растворимых цитокиновых рецепторов; связыванием белками наружной мембраны [6, 7]. Способность экзометаболитов культур микроорганизмов изменять содержание цитокинов, являющихся полипептидами или белками, в культуральной среде после контакта *in vitro* с цитокинами оценивается как антипептидная активность в отношении определенного цитокина (АПА) [8]. Указанные свойства микроорганизмов рассматриваются как иммунорегуляторные, способные влиять на локальный цитокиновый баланс и, как следствие, на течение и исход воспалительных заболеваний и нарушений микробиоценозов открытых полостей организма человека.

**Целью исследования** явилась оценка АПА в отношении про-(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов экзометаболитов микросимбионтов, выделенных из кишечного биотопа с различным состоянием микробиоценоза (эубиоз, дисбиоз толстого кишечника человека без воспалительной патологии, микробиоценоз толстого кишечника детей с реактивным артритом).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 88 штаммов бифидобактерий, выделенных при обследовании 68 лиц в возрасте от 1 года до 45 лет на дисбиоз толстого кишечника. В работе также были использованы клинические штаммы (по 11 культур каждого вида) облигатно-анаэробных бактерий (*Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*), факультативно-анаэробных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*) и *Lactobacillus spp.*, изолированных из кишечного микросимбиоценоза человека. Для исследования АПА кишечных симбионтов у детей с РеА изучались штаммы, выделенные из фекалий у 34 детей с РеА и 25 условно здоровых детей.

Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами. Для получения экзометаболитов из суточной бульонной культуры симбионтов готовили фильтрат (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, «Millipore», USA). АПА оценивали путем соинкубирования экзометаболитов бактерий и грибов с рекомбинантными цитокинами («Sigma», INF- $\gamma$  – I3265-1MG, TNF- $\alpha$  – T6674-10UG, IL-6 – I1395-10UG, IL-10 – I9276-

5UG) [8]. Определение конечной концентрации цитокинов в опытных и контрольных пробах проводилось ИФА с использованием реагентов «Цитокин» (СП-6, Россия) и регистрацией результатов на фотометре при длине волны 492 нм. Количественные значения АПА выражались в условных единицах по соотношению опытных проб к контрольным.

Статистическую обработку проводили средствами пакета Statistica 10, включая методы параметрического (t-критерий Стьюдента), непараметрического (U-критерий Манна-Уитни) анализов. Результаты исследований представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – средняя арифметическая,  $m$  – стандартная ошибка средней, а также в виде  $Me$  (Q25; Q75), где  $Me$  медиана, нижний (Q25) и верхний (Q75) квартили. Статистически значимыми считали изменения при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование АПА микросимбионтов, выделенных от обследуемых с эубиозом толстого кишечника, показало, что экзометаболиты доминантных анаэробных симбионтов-бифидобактерий обладали высокой способностью в среде культивирования снижать концентрацию TNF $\alpha$  (0,67 [0,38–0,85] у.е.), IL-17 (0,69 [0,18–0,92] у.е.), IFN $\gamma$  (0,42 [0,30–0,93] у.е.). Высокий уровень АПА в отношении IFN $\gamma$  определялся также в супернатантах эубиотических штаммов лактобактерий (0,56 [0,30–0,65] у.е.), кишечных палочек (0,68 [0,54–0,56] у.е.), энтерококков (0,51 [0,42–0,55] у.е.). Выраженная способность снижать в культуральной среде концентрацию IL-10 была характерна для экзометаболитов эубиотических штаммов бифидобактерий, лактобактерий, энтерококков (соответственно 0,56 [0,49–0,63]; 0,73 [0,68–0,80]; 0,65 [0,54–0,95]; 0,54 [0,40–0,64] у.е.). Следует отметить, что в отношении IL-6 экзометаболиты исследуемых эубиотических культур микросимбионтов толстого кишечника не проявляли выраженной способности влиять на уровень АПА.

В условиях дисбиотических изменений из кишечного биотопа выделялись изоляты микросимбионтов, отличающиеся от эубиотических штаммов по уровню АПА, особенно при дисбиозе 3 степени. Для экзометаболитов дисбиотических штаммов лактобактерий по сравнению с эубиотическими было характерно увеличение уровня АПА в отношении TNF $\alpha$  (0,86 [0,85–0,92] против 0,51 [0,29–0,60] у.е.,  $p=0,05$ ) и снижение АПА в отношении и IL-10 (0,39

[0,35–0,49] против 0,73 [0,68–0,8] у.е.,  $p=0,03$ ). Увеличение АПА в отношении TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  было выявлено у штаммов кишечной палочки по сравнению с эубиотическими культурами (соответственно 0,68 [0,65–0,71] против 0,51 [0,29–0,60] у.е.,  $p=0,02$ ; 0,78 [0,76–0,81] против 0,68 [0,54–0,77] у.е.,  $p=0,03$ ).

У метаболитов культур бифидобактерий даже при тяжелых микроэкологических нарушениях в кишечном биотопе (дисбиоз 3 степени) сохранялся высокий уровень АПА в отношении IL-10, IL-17 и, напротив, значительно снижались значения данного показателя в отношении TNF $\alpha$  (соответственно 0,21 [0,15–0,25] против 0,67 [0,38–0,85] у.е.,  $p=0,008$ ).

Анализ АПА штаммов золотистого стафилококка, высеваемых при дисбиозе толстого кишечника (2–3 степень), показал увеличение уровня АПА в отношении IL-10 в ряду: 2 степень, 3 степень (0,37 [0,40–0,42] против 0,71 [0,69–0,75] у.е.,  $p=0,003$ ) и, напротив, значительное снижение – в отношении IFN $\gamma$  (0,52 [0,63–0,65] против 0,15 [0,12–0,16] у.е.,  $p=0,003$ ). Исследование АПА у других видов УПМ, выделяемых при дисбиозе 2–3 степени, показало, что супернатанты штаммов *K. pneumoniae* обладали достаточно высокой АПА в отношении IL-10 (0,54 [0,52–0,61] у.е.), менее выраженной для TNF $\alpha$  (0,35 [0,20–0,57] у.е.) и IFN $\gamma$  (0,22 [0,21–0,41] у.е.). Экзометаболиты псевдомонад и грибов рода *Candida* проявляли высокий уровень АПА в отношении 3-х исследуемых цитокинов – IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ : (соответственно для псевдомонад 0,69 [0,59–0,72]; 0,78 [0,71–0,81]; 0,54 [0,45–0,73] у.е.; для грибов 0,53 [0,51–0,63]; 0,58 [0,56–0,62]; 0,65 [0,59–0,71] у.е.). В отношении IL-6, как и при эубиозе, уровень АПА оставался низким без существенных различий между исследуемыми культурами.

На втором этапе работы была изучена АПА копроштаммов, выделенных при внекишечной воспалительной патологии (дети с РеА), группу сравнения составили условно здоровые дети. Следует отметить, что у подавляющего большинства детей с артритом выявлялся дисбиоз толстого кишечника 2–3 степени. Установлено, что в отношении TNF- $\alpha$  уровень АПА у представителей нормобиоты: *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E. coli (lac+)*, выделенных от больных артритом, не отличался от данного показателя у здоровых детей. В тоже время достоверно повышался уровень АПА в отношении TNF- $\alpha$  у УПМ, выделенных от больных

РеА в сравнении со здоровыми детьми: *Citrobacter spp.* (0,83  $\pm$  0,064; 0,58  $\pm$  0,098 у.е.,  $p<0,05$ ), *Staphylococcus spp.* (0,65  $\pm$  0,08; 0,48  $\pm$  0,11 у.е.,  $p<0,05$ ), *Candida spp.* (0,62  $\pm$  0,08; 0,45  $\pm$  0,09 у.е.,  $p<0,05$ ).

В отношении провоспалительных цитокинов INF- $\gamma$  и IL-6 уровень АПА у культур *Bifidobacterium spp.* и *E. coli* от детей с РеА, по сравнению со здоровыми, достоверно снижался ( $p<0,05$ ). Для INF- $\gamma$  – соответственно 0,32  $\pm$  0,08 против 0,86  $\pm$  0,069; 0,59  $\pm$  0,08 против 0,98  $\pm$  0,03 у.е. Для IL-6 значения АПА составили: у бифидобактерий – 0,25  $\pm$  0,074; 0,42  $\pm$  0,098 у.е.,  $p<0,05$ ; у кишечной палочки – 0,48  $\pm$  0,09; 0,98  $\pm$  0,02 у.е.,  $p<0,05$ . Обратная направленность была выявлена для экзометаболитов лактобацилл и УПМ, выделенных от пациентов с РеА. Для INF- $\gamma$  АПА составляла 0,6  $\pm$  0,08 против 0,2  $\pm$  0,08 у.е. у лактобактерий; 0,98  $\pm$  0,02 против 0,55  $\pm$  0,09 у.е. у *Citrobacter spp.*; 0,95  $\pm$  0,037; 0,14  $\pm$  0,07 у.е. у *Staphylococcus spp.*; 0,51  $\pm$  0,09; 0,21  $\pm$  0,08 у.е. у *Candida spp.* Соответственно для IL-6 у штаммов *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* от больных РеА АПА составила 0,54  $\pm$  0,09 против 0,098  $\pm$  0,059 у.е.,  $p<0,05$ ; 0,81  $\pm$  0,07 против 0,45  $\pm$  0,099 у.е.,  $p<0,05$ . Различий в уровне АПА у штаммов *Citrobacter spp.* и *Candida spp.* в исследуемых группах не выявлено.

Что касается способности микросимбионтов изменять *in vitro* уровень противовоспалительного цитокина IL-10, то для культур бифидобактерий различий в группах сравнения не выявлено. Вместе с тем определялось снижение уровня АПА у экзометаболитов *E. coli* (0,40  $\pm$  0,08 у больных против 0,67  $\pm$  0,09 у.е. у здоровых,  $p<0,05$ ) и повышение уровня АПА у *Lactobacillus spp.*, выделенных у больных (0,73  $\pm$  0,07 против 0,38  $\pm$  0,09 у.е. у здоровых,  $p<0,05$ ). Экзометаболиты штаммов УПМ, выделенных от больных артритом, по сравнению со здоровыми, характеризовались повышением уровня АПА ( $p<0,05$ ) в отношении IL-10 у *Citrobacter spp.* (0,83  $\pm$  0,06; 0,44  $\pm$  0,09 у.е.) и, напротив, снижением уровня АПА у *Staphylococcus spp.* (0,61  $\pm$  0,08; 0,80  $\pm$  0,08 у.е.).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Количественные и качественные изменения цитокинов, продуцируемых эпителиальными, иммунными клетками могут приводить к значительным нарушениям механизмов врожденного, адаптивного иммунитета и срыву толерантности к микробиоте [1, 5, 9]. Некоторые патогенные

и УПМ микроорганизмы секретируют ферменты, позволяющие им расщеплять практически все виды органических макромолекул, включая цитокины [6, 7, 9]. Используемый в настоящей работе метод сокультивирования экзометаболитов бактерий с рекомбинантными цитокинами позволяет количественно оценить суммарную способность компонентов, входящих в состав экзометаболитов кишечных микросимбионтов (пептиды, белки, ферменты, кислоты, полисахариды), изменять концентрацию цитокинов в культуральной среде.

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что экзометаболиты культур кишечной нормофлоры, выделенных при эубиозе, способны существенно изменять уровень про- и противовоспалительных цитокинов при непосредственном контакте их с цитокинами. В условиях нарушения нормального состава кишечной микробиоты с изменением соотношения и видов УПМ (состояние дисбиоза) доминантные анаэробные микросимбионты — бифидобактерии сохраняют высокий уровень АПА в отношении IL-10, IL-17, IFN $\gamma$  при снижении выраженности АПА для TNF- $\alpha$ . Особое значение имеет стабильность проявления у нормофлоры АПА в отношении IL-10, контролирующего отсутствие патологического иммунного ответа на нормальную флору [1, 4, 5]. Характерно, что подобные качества проявлялись и у бифидофлоры, выделяемой от детей с РеА, также имеющих дисбиоз кишечника 2–3 степени. У факультативно-анаэробных представителей нормобиоты — лактобактерий и кишечной палочки, выделенных при дисбиозе, значения АПА были менее стабильные. Экзометаболиты УПМ, выделенные при дисбиозе 3 степени (псевдомонады, грибы рода *Candida*), проявляли высокую способность снижать в культуральной среде уровень оппозитных цитокинов TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-10. Высоким уровнем АПА в отношении IL-10 обладали и экзометаболиты клебсиелл, золотистого стафилококка. Выявленные видовые и штаммовые различия в уровне АПА у УМП и нормобиоты могут быть связаны с особенностями состава исследуемых экзометаболитов. Показано, что компоненты метаболитов (короткоцепочные карбоновые кислоты, бутират, пропионат, протеазы, пептидазы и др.) микроорганизмов могут существенно влиять на уровень секреции и спектр продуцируемых цитокинов [2, 9].

Результаты исследования АПА в отношении про- и противовоспалительных цитокинов ки-

шечных микросимбионтов, выделенных у больных РеА, свидетельствуют о более выраженной способности штаммов УПМ изменять содержание флогогенных цитокинов по сравнению со здоровыми детьми. Следует отметить, что были выявлены различия в уровне АПА в отношении IL-6 для микросимбионтов, выделяемых из разных источников. Для штаммов микросимбионтов, выделяемых при дисбиозе кишечника от лиц без патологии суставов, существенных изменений в уровне АПА в отношении IL-6 не выявлялось. В тоже время, штаммы нормобиоты (бифидобактерии, кишечная палочка), выделяемые от детей с РеА, характеризовались низким уровнем АПА для IL-6 по сравнению с УПМ, экзометаболиты которых обладали высокими значениями АПА в отношении данного цитокина и IFN $\gamma$ . Выявленная особенность указанных симбионтов, на наш взгляд, может служить одним из критериев оценки артритогенного потенциала копрощаммов, поскольку IL-6 является типичным ранним индуцибельным цитокином, быстро накапливающимся в циркуляции при встрече с патогенами, их продуктами и служит главным активатором синтеза большинства острофазовых белков. Кроме того, его провоспалительное действие может реализовываться за счет усиления функциональной активности фибробластов, что может приводить к усилению воспалительной реакции в суставе [3,4].

Суммируя результаты анализа влияния экзометаболитов кишечных микросимбионтов, выделенных из разных источников (эубиоз/дисбиоз/РеА) на уровень АПА в отношении различных цитокинов, необходимо отметить их существенный вклад в проявление выраженности и направленности АПА, которая может, наряду с другими факторами, формировать локальный цитокиновый баланс, регулирующий взаимодействие в системе «комменсал-хозяин».

Таким образом, проведенные исследования позволили установить различия у штаммов нормофлоры и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из различных источников, по спектру цитокинов и уровню снижения их содержания в культуральной среде при сокультивировании с экзометаболитами исследуемых штаммов микросимбионтов. Полученные результаты могут быть использованы для оценки иммунорегуляторных свойств микрофлоры при различных микроэкологических состояниях толстого кишечника человека и при внекишечной воспалительной патологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Peterson C. T., Sharma V., Elmén L., Peterson S. N. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clinical and Experimental Immunology* 2015, 179(3), 363–377.
2. Gonçalves P., Araújo J. R., Di Santo J. P. A Cross-Talk Between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and the Host Mucosal Immune System Regulates Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2018, 24(3), 558–572.
3. Asquith M., Elewaut D., Lin P., Rosenbaum J. T. The role of gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014, 28(5), 687–702.
4. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. Фолиант, СПб, 2018, 512 с. [Simbirtsev A. S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. Foliant, St. Petersburg, 2018, 512 p.]
5. Hoespli R. E., Wu D., Cook L., Levings M. K. The Environment of Regulatory T Cell Biology: Cytokines, Metabolites, and the Microbiome. *Front Immunol.* 2015, 6: 61. doi: 10.3389/fimmu.2015.00061.
6. Wilson M., Seymour R., Henderson B. Bacterial perturbation of Cytokine Networks. *Infect. Immun.* 1998, 66(6), 2401–2409.
7. Potempa J., Pike R. N. Corruption of Innate Immunity by Bacterial Proteases. *J. Innate Immun.* 2009, 1 (2): 70–87.
8. Бухарин О. В., Перунова Н. В., Чайникова И. Н., Иванова Е. В., Смолягин А. И. Антицитокиновая активность микроорганизмов. *Журн. микробиол.* 2011, 4, 56–61. [Bukharin O. V., Perunova N. V., Chainikova I. N., Ivanova E. V., Smolyagin A. I. Anti-cytokine activity of microorganisms. *Journ. Microbiol.* 2011, 4, 56–61.]
9. Ma N., Guo P., Zhang J., He T., Kim S. W., Zhang G., Ma X. Nutrients Mediate Intestinal Bacteria–Mucosal Immune Crosstalk. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9, 5. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00005>

### ANTIPEPTIDE ACTIVITY OF INTESTINAL MICROSymbionTS FOR THE STATE OF INTESTINAL HOMEOSTASIS ESTIMATION

© 2018 Т. А. Bondarenko<sup>1</sup>, E. I. Danilova<sup>2</sup>, I. N. Chainikova<sup>1,2</sup>,  
O. E. Chelpachenko<sup>1</sup>, E. V. Ivanova<sup>1</sup>, N. B. Perunova<sup>1</sup>, I. A. Nikiforov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia;

<sup>2</sup>State budgetary educational institution of higher education “Orenburg State Medical University”  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russia

Received: 07.05.2018 Accepted: 14.06.2018

The paper presents the results of anti-peptide activity against pro (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines of exometabolites of the intestinal microflora, isolated in patients with eubiosis, dysbiosis of the large intestine and reactive arthritis. Differences in strains of normoflora and opportunistic microorganisms isolated from various sources, the spectrum of cytokines and the level of their decrease their content in the culture medium were determined upon co-cultivation with exometabolites of the cultures of microorganisms under study. The results obtained can be used to assess the immunoregulatory properties of microflora in various microecological conditions of the human colon and in extraintestinal inflammatory pathology.

*Key words:* intestinal microsymbionts, cytokines, dysbiosis, reactive arthritis

#### Authors:

**Bondarenko T. A.**, Researcher, Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetic Studies, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia;

**Danilova E. I.**, Ph.D, Docent, of the Pediatrics Department of State Medical University of Russian Federation Ministry of Health, Orenburg, Russia;

**Chainikova I. N.**, ✉ M.D., professor, Leading Researcher of Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetics Research, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS; Professor of the Department of Normal Physiology of State Medical University of Russian Federation Ministry of Health, Orenburg, Russia;

460000, Orenburg, Pionerskaya str., 11. Phone: (3532) 77-44-63, 89228790981 (mob.), **E-mail:** inchainicova@yandex.ru;

**Chelpachenko O. E.**, M.D., professor, Leading Researcher of Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetics Research, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia;

**Ivanova E. V.**, Ph.D, Docent, Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetic Research, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia;

**Perunova N. B.**, MD, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetic Research, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia;

**Nikiforov I. A.**, Ph. D., Leading Researcher of Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetics Research Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia.