

Светлана Сергеевна КОЛЫВАНОВА¹
Владимир Сергеевич СОЛОВЬЁВ²
Андрей Михайлович СУББОТИН³
Людмила Фёдоровна КАЛЁНОВА⁴
Максим Викторович НАРУШКО⁵

УДК 612.014
612.42

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД
ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ,
НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ
ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO**

¹ стажер-исследователь кафедры анатомии и физиологии человека и животных Института биологии Тюменского государственного университета
kolyvanova93@mail.ru

² доктор медицинских наук, заведующий кафедрой анатомии и физиологии человека и животных Института биологии Тюменского государственного университета
adapt78@yandex.ru

³ кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Отдела биоресурсов Тюменского научного центра СО РАН
subbotin.prion@yandex.ru

⁴ доктор биологических наук, главный научный сотрудник Отдела биоресурсов Тюменского научного центра СО РАН
lkalenova@mail.ru

⁵ стажер-исследователь Отдела биоресурсов Тюменского научного центра СО РАН
narushkomv@mail.ru

Цитирование: Колыванова С. С. Влияние метаболитов микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых пород Западной и Восточной Сибири, на пролиферативную активность лимфоцитов человека in vitro / С. С. Колыванова, В. С. Соловьёв, А. М. Субботин, Л. Ф. Калёнова, М. В. Нарушко // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2016. Том 2. № 2. С. 132-143.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-2-132-143

Аннотация

Исследовано влияние метаболитов 14 штаммов микроорганизмов (МО), выделенных из многолетнемерзлых пород (ММП) Западной (район Тарко-Сале) и Восточной (Чарская котловина Читинской области) Сибири и Центральной Якутии (Мамонтова гора), на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови (0(I)Rh+) в реакции бласттрансформации (РБТЛ). Учитывалось число бласттрансформированных лимфоцитов в спонтанном варианте РБТЛ (с-РБТЛ); под влиянием митогена для Т-лимфоцитов фитогемагглютинина (ФГА); метаболитов МО из ММП; комплекса «ФГА+метаболиты».

Установлено, что разные штаммы МО из ММП могут оказывать как стимулирующее, так и супрессивное влияние на пролиферацию лимфоцитов. Максимальное стимулирующее влияние оказал штамм F2 из ММП Центральной Якутии ($p < 0,01$), минимальное — штаммы 9/48(II) и 5/26 из ММП Западной Сибири ($p < 0,05$). Штамм F2 также способствовал увеличению уровня пролиферации лимфоцитов в комплексе с ФГА ($p < 0,05$). Достоверно снижают стимулированную ФГА пролиферацию лимфоцитов 2 штамма из ММП Западной Сибири — 9/48(II) и 3/07 ($p < 0,01$ в обоих случаях) и 2 штамма из ММП Восточной Сибири — 6/010 и 2/09 ($p < 0,01$ в обоих случаях).

Ключевые слова

Метаболиты микроорганизмов, многолетнемерзлые породы, бласттрансформация лимфоцитов.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-2-132-143

Введение

Разработанный как компонент стратегической безопасности России, «Системный экологический мониторинг» предусматривает установление связей между окружающей средой, здоровьем и качеством жизни людей; оценку и прогноз неблагоприятных явлений и процессов; предупреждение, минимизацию или ликвидацию негативных влияний природной, антропогенной и социальной окружающей сред на здоровье и качество жизни человека [10]. Важным компонентом окружающей среды являются микроорганизмы [11]. Они заселяют все слои биосферы и способны жить в самых неблагоприятных условиях.

Значительную часть территорий России занимает зона вечной мерзлоты, в которой обнаружены различные виды микроорганизмов (МО). Наличие МО в вечной мерзлоте — это, в определенной степени, уникальное явление, заключающееся в том, что в процессе длительной эволюции в условиях ограниченного метаболизма и низких температур, «пережив» несколько глобальных изменений температуры на планете, они приобрели особый биологический потенциал — сохранять жизнеспособность в неблагоприятных условиях внешней среды [8]. Вероятно, что для этого они должны иметь специальные механизмы

защиты и восстановления внутриклеточных структур, главным образом ДНК, которые склонны к разрушению из-за огромной продолжительности их существования.

МО многолетнемерзлых пород (ММП) представляют интерес для биотехнологии как продуценты биомолекул, биополимеров и биокатализаторов, активных при пониженных температурах [4]. Обладающие феноменальной способностью к сохранению жизнеспособности в экстремальных условиях, МО ММП — наиболее вероятные кандидаты для поиска приспособительных механизмов, которые можно использовать для повышения адаптационного потенциала современных организмов, в том числе человека. Экспериментальные исследования штамма МЗ *Bacillus sp.* из ММП позднего неогена возрастом 3,5-2,0 млн лет (Центральная Якутия) показали, что он обладает способностью повышать активность иммунной и нервной систем, а также качество и продолжительность жизни лабораторных животных [1, 3]. Представляет интерес изучение биологического потенциала других видов МО из ММП. Одним из широко используемых методов проведения скрининговых исследований по выявлению штаммов МО, способных оказывать модулирующее влияние на иммунную систему, является реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Цель исследования

Оценить влияние метаболитов 14 штаммов МО, выделенных из ММП Западной и Восточной Сибири, на реакцию бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека.

Материал и методы исследования

Из проб ММП Западной и Восточной Сибири было выделено и генетически идентифицировано методом сиквенса по 16S рибосомальной ДНК и переведено в коллекцию более 70 штаммов различных видов МО [12]. Из них, в качестве объектов исследования, выбраны штаммы микроорганизмов 8/75-1, 9/48(2), 4/25, 9/47, 10/50, 5/26, 4/22(2), 3/07 из ММП плейстоцен-голоценового периода (район Тарко-Сале Западной Сибири, возраст пород 35-40 тыс. лет); штаммы МЗ, F2 из ММП позднего неогена (опорный разрез Мамонтова гора в Центральной Якутии, возраст пород 3,5-2 млн. лет); штаммы 1/06, 2/09, 6/010, 9/08 из пород Чарской котловины (Чара, Читинская область, возраст пород 2-14 тыс. лет) (табл. 1).

Культивирование бактерий. Штаммы МО высевали в 5 пробирок на питательный ГРМ-агар (Оболенск) и культивировали при температуре +26° С в течение 48 часов. После этого МО смывали с поверхности агара стерильным физиологическим раствором. Концентрацию МО определяли культуральным методом предельных разведений по числу колонеобразующих единиц на агаризованной питательной среде в чашках Петри. Готовили рабочую концентрацию бактерий в 1×10^7 микробных клеток в 1 мл физиологического раствора (м. к./мл). Учитывая результаты ранее проведенных исследований [2], которые продемонстрировали высокую ферментативную активность МО ММП при высоких

Таблица 1

Штаммы микроорганизмов

Порядковый № штамма	Штамм	Вид (ММП)
1	1/06	<i>Bacillus</i> sp. (Чара)
2	2/09	<i>Bacillus</i> sp. (Чара)
3	6/010	<i>Bacillus</i> sp. (Чара)
4	8/75-1	<i>Bacillus megaterium</i> (Тарко-Сале)
5	9/48(II)	<i>Bacillus</i> sp. (Тарко-Сале)
6	9/08	<i>Bacillus</i> sp. (Чара)
7	М3	<i>Bacillus</i> sp. (Мамонтова гора)
8	9/47	<i>Achromobacter</i> sp. (Тарко-Сале)
9	10/50	<i>Achromobacter</i> sp. (Тарко-Сале)
10	5/26	<i>Stenotrophomonas</i> (Тарко-Сале)
11	4/25	<i>Acinetobacter</i> (Тарко-Сале)
12	F2	<i>Alcaligenes</i> sp. (Мамонтова гора)
13	4/22(2)	<i>Kosuria rhizophila</i> (Тарко-Сале)
14	3/07	<i>Artrobacter</i> (Тарко-Сале)

отрицательных температурах, в данном исследовании для получения метаболитов МО ММП выдерживали при -16°C 72 часа. Суспензию бактерий оттаивали при 24°C 30 минут, затем пропускали через микробиологические фильтры (Millipore, 0,22um, White GSWP, USA) и отделяли метаболиты в стерильные пробирки.

РБТЛ. В работе использовалась гепаринизированная периферическая донорская кровь (ПК), 0(Rh+). В стерильных условиях из ПК выделялась лейко-взвесь, содержащая собственную плазму, к которой добавлялась среда RPMI-1640 (контроль), поликлональный митоген для Т-лимфоцитов фитогемагглютинин (ФГА), метаболиты штаммов МО ММП (метаболиты) или комплекс ФГА с метаболитами (ФГА+метаболиты). Использовали метаболиты от 14 штаммов МО ММП (табл. 1). Культивирование клеток проводили в течение 72-х часов в стерильных условиях при 37°C и присутствии 5% CO_2 [6]. После инкубации клеточную взвесь центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 8 минут, супернатант удаляли, из клеточного осадка готовили мазки на предметном стекле, которые окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчет клеток осуществляли под иммерсионным объективом микроскопа по линии «Меандра» и выражали в процентах. За 100% принимали общее число лимфоцитов и бласттрансформированных

лимфоцитов. Достоверность различий между группами оценивали по t критерию Стьюдента в программе SPSS 11,5 for Windows.

Результаты исследования и их обсуждение

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) — трансформация лимфоцитов в бластные формы, способные к пролиферации и дальнейшей дифференцировке [9] (рис. 1). При просмотре контрольных мазков крови число спонтанно бласттрансформированных лимфоцитов было равно $2,09 \pm 0,33$ %, что не превышало 10% предела физиологической нормы взрослого здорового человека для данного показателя [5].

Известно, что бластная трансформация лимфоцитов под влиянием ФГА характеризует функциональную способность Т-лимфоцитов к трансформации и размножению под воздействием антигенов [7]. В данном исследовании уровень бласттрансформированных лимфоцитов под влиянием ФГА составил $55,9 \pm 3,44$ %, что также входит в пределы физиологической нормы (табл. 2) [5].

Исследуемые метаболиты штаммов бактерий в разной мере проявили свое лимфопролиферативное воздействие (рис. 2). Максимальное стимулирующее влияние на пролиферативную активность лимфоцитов оказали метаболиты штамма F2 из ММП Центральной Якутии. Численность бласттрансформированных лимфоцитов в этой группе составила $62,67 \pm 3,17$ % ($p < 0,01$ относительно спонтанной РБТЛ). Минимальное стимулирующее влияние на пролиферативную активность лимфоцитов оказали метаболиты 2 штаммов — 9/48(II) и 5/26 из ММП Западной Сибири. Уровень бласттрансформированных лимфоцитов в этих группах не превысил $0,33 \pm 0,33$ % в обоих случаях. В порядке убывания стимулирующего влияния метаболитов на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови человека штаммы МО ММП располагаются в следующей последовательности: F2, 4/22(2), 9/08, 3/07, 8/75-1, 1/06, 6/010, 2/09, МЗ, 4/25, 9/47, 10/50, 9/48(II), 5/26.

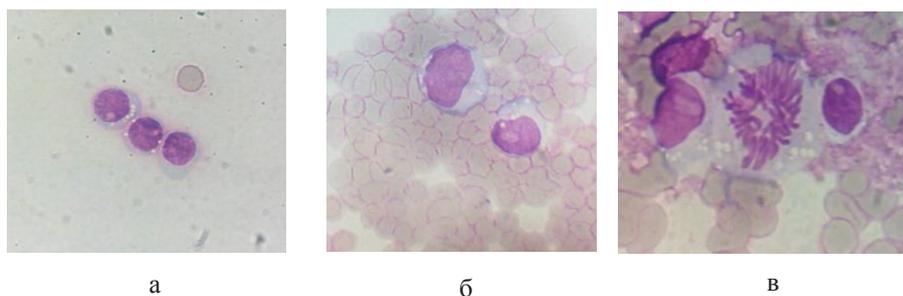


Рис. 1. Лимфоциты периферической крови в присутствии метаболитов МО ММП
 а — активированные лимфоциты; б — бластные формы лимфоцитов;
 в — бласттрансформированный лимфоцит в стадии митоза

Таблица 2

Содержание бласттрансформированных лимфоцитов (%)

Штамм	Метаболиты	ФГА+метаболиты
Контроль, уровень спонтанной РБТЛ	2,09±0,33	
ФГА, уровень стимулированной РБТЛ	55,9±3,44	
1/06	5,33±2,84*, ^	54,00±3,21**
2/09	3,33±1,45^^	0,33±0,33*, ^
6/010	3,67±1,85^^	32,00±3,78**, ^
8/75-1	9,67±7,75**, ^	49,33±12,71**
9/48(II)	0,33±0,33*, ^	37,33±11,14**, ^
9/08	14,67±2,72**, ^	48,67±10,41**
M3	3,00±3,00^^	56,00±4,93**
9/47	2,00±0,57, ^	56,67±6,69**
10/50	1,00±0,57^^	57,67±6,17**
5/26	0,33±0,33*, ^	55,33±2,33**
4/25	2,33±0,33^^	62,33±2,18**
F2	62,67±3,17**, ^	66,00±4,72**, ^
4/22(2)	28,00±6,02**, ^	49,33±4,91**
3/07	13,33±2,18**, ^	33,67±5,04**, ^

Примечание: достоверность отличия показателей в группе от контрольного уровня * — $p < 0.05$ и ** — $p < 0.01$; достоверность отличия показателей в группе от ФГА ^ — $p < 0.05$ и ^^ — $p < 0.01$

Сравнение пролиферативного влияния метаболитов от разных штаммов МО ММП с уровнем спонтанной пролиферации лимфоцитов ПК показало следующее (рис. 2). Достоверно стимулируют пролиферативную активность лимфоцитов 6 штаммов — 8/75-1 ($p < 0,01$), 4/22(2) ($p < 0,01$), 3/07 ($p < 0,01$), 9/08 ($p < 0,01$), 1/06 ($p < 0,05$) и F2 ($p < 0,01$). Достоверно блокируют пролиферацию лимфоцитов ПК человека 2 штамма — 9/48(II) ($p < 0,05$) и 5/26 ($p < 0,05$).

Сравнение пролиферативного влияния комплекса «ФГА+метаболиты» от разных штаммов МО ММП с уровнем стимулированной пролиферации лимфоцитов ПК под влиянием Т-митогена ФГА представлено на рисунке 3. Достоверно увеличивает пролиферативную активность лимфоцитов лишь 1 штамм — F2 ($p < 0,05$). Достоверно снижают стимулированную ФГА пролиферацию лимфоцитов ПК человека 4 штамма — 9/48(II) ($p < 0,01$), 3/07

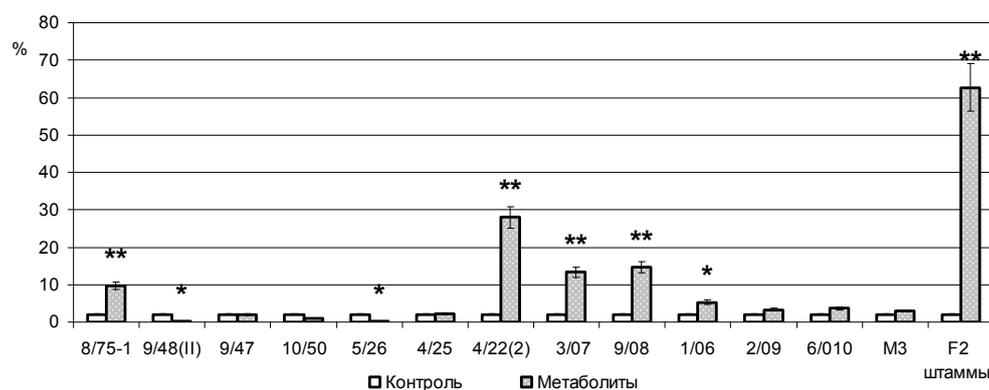


Рис. 2. Сравнение пролиферативной активности метаболитов с интактным контролем

Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контрольного уровня * — $p < 0,05$ и ** — $p < 0,01$

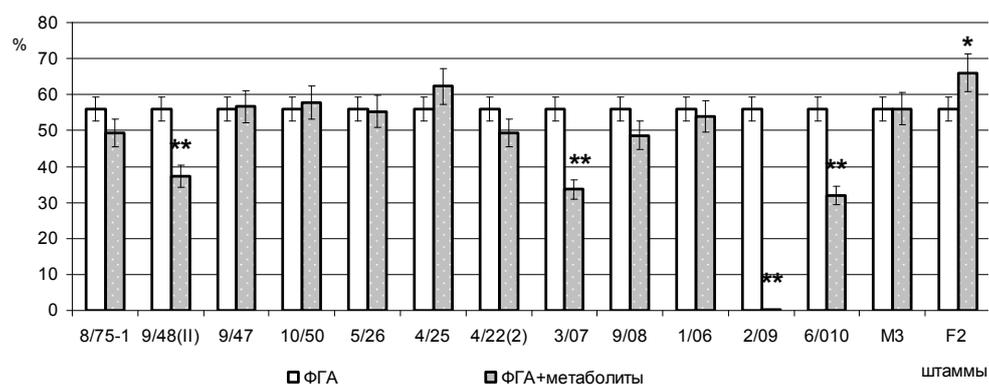


Рис. 3. Сравнение пролиферативной активности комплекса «ФГА+метаболиты» с ФГА

Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контрольного уровня * — $p < 0,05$ и ** — $p < 0,01$

($p < 0,01$), 6/010 ($p < 0,01$). практически полностью подавляет пролиферацию лимфоцитов штамм 2/09 ($p < 0,01$).

По результатам эксперимента, однозначных отличий влияния метаболитов бактерий, выделенных из разных геологических пород, выявлено не было, разграничить отдельные группы по конкретному критерию трудно. Тем не менее при сравнении результатов было обнаружено, что метаболиты бактерий из пород Чарской котловины имеют сходное действие разной степени выраженности. Они вызывают либо слабо выраженную бласттрансформацию,

либо не имеют достоверного влияния по сравнению с контролем. Однако все штаммы снижают количество лимфобластов сенсibilизированными ФГА (в среднем на 14,75%). Явное цитостатическое действие оказал штамм 2/09, полностью подавив РБТЛ по сравнению с митогеном ФГА. Метаболиты бактерий из района Тарко-Сале оказали различное действие на РБТЛ как самостоятельно, так и в комплексе с ФГА. Интересно действие метаболитов бактерий с Мамонтовой горы, оказавших различный характер влияния на РБТЛ. Штамм М3 не повлиял на бласттрансформацию лимфоцитов ни в изолированном варианте, ни в комплексе с ФГА, а метаболиты штамма F2 вызывают активную дифференцировку лимфоцитов в лимфобласты как самостоятельно, так и увеличивая действие ФГА на бласттрансформацию. Учитывая, что уровень РБТЛ под влиянием F2 значительно превышает уровень РБТЛ под влиянием ФГА (поликлональный активатор пролиферативной активности Т-лимфоцитов), можно допустить, что он проявляет также пролиферативную активность в отношении других субпопуляций лимфоцитов, в частности В-лимфоцитов.

Заключение

Таким образом, данное исследование показало, что разные штаммы МО ММП могут оказывать как супрессивное, так и стимулирующее влияние на пролиферативную активность лимфоцитов ПК человека *in vitro*. Метаболиты штаммов МО, способные увеличивать процессы пролиферации лимфоцитов, могут, по нашему мнению, проявлять, например, репаративное действие, однако могут обладать и онкогенным эффектом. Метаболиты некоторых штаммов бактерий из многолетнемерзлых пород в комплексе с ФГА оказывали ингибирующее действие на бласттрансформацию, т. е. проявляли действие цитостатиков, что, по нашему мнению, перспективно для разработки препаратов с последующим использованием в онкологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние микроорганизмов вечной мерзлоты на морфофункциональную активность иммунной системы в эксперименте / Л. Ф. Калёнова, Ю. Г. Суховой, А. В. Брушков // Бюл. экспер. биологии и медицины. 2011. Т. 151. № 2. С. 164-168.
2. Влияние температуры инкубации на биологическую активность микроорганизмов из вечной мерзлоты / Л. Ф. Калёнова, А. М. Субботин, М. А. Новикова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158, № 12. С. 737-741.
3. Калёнова Л. Ф. Влияние малых доз микроорганизмов *Bacillus* sp. из вечной мерзлоты на дифференцировку клеток в костном мозге в эксперименте / Л. Ф. Калёнова, М. А. Новикова, Е. Г. Костоломова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158, № 9. С. 352-355.
4. Карасев С. Г. Actinobacteria из многолетнемерзлых отложений Сибири: автореф. дис. канд. биол. наук / С. Г. Карасев. Пушино, 2007. 26 с.

5. Лебедев К. А. Иммунограмма в клинической практике / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. М.: Наука, 1990. 224 с.
6. Линг В. И. Стимуляция лимфоцитов: монография / Н. В. Линг. М., 1971. 288 с.
7. Назаренко Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. М.: Медицина, 2007. 541 с.
8. Рапопорт А. И. Анабиоз как природный способ сохранения микробного разнообразия. Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал / А.И. Рапопорт // Материалы III Международной конференции. Институт экологии и генетики микроорганизмов. УрО РАН: Пермь. 2008. С. 81.
9. Решетникова Л. К. Методы иммунодиагностики: учебное пособие Благовещенск, 2009. URL: http://www.amursma.ru/documents/Academiya/Zakr/6/Metody_immunodiagnostiki.pdf
10. Системный экологический мониторинг как компонент стратегической безопасности / Н. А. Агаджанян, О. И. Аптикаева, Г. А. Гамбурцев // Приложение к журналу "Безопасность жизнедеятельности". 2009. № 9. С. 1-24.
11. Черешнев В. А. Системный экологический мониторинг и здоровье. Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал / В. А. Черешнев // Материалы III Международной конференции. Институт экологии и генетики микроорганизмов. УрО РАН: Пермь. 2008. С. 107-108.
12. Relict Microorganisms of Cryolithozone as Possible Objects of Gerontology / A. V. Brouchkov, V. P. Melnikov, Yu. G. Sukhovei // *Advances in Gerontology*. 2011. Vol. 1. No. 1. Pp. 39-44.

Svetlana S. KOLYVANOVA¹
Vladimir S. SOLOVYOV²
Andrei M. SUBBOTIN³
Lyudmila F. KALYONOVA⁴
Maxsim V. NARUSHKO⁵

**INFLUENCE OF THE MICROORGANISMS' METABOLITES
FROM WEST AND EAST SIBERIA PERMAFROST ON PROLIFERATIVE
ACTIVITY OF HUMAN LYMPHOCYTES IN VITRO**

¹ Junior Resercher, Department of Anatomy and Physiology
of Humans and Animals, Institute of Biology,
Tyumen State University
kolyvanova93@mail.ru

² Dr. Sci. (Med.), Professor,
Head of the Department of Anatomy and Physiology
of Humans and Animals, Institute of Biology,
Tyumen State University
adapt78@yandex.ru

³ Cand. Sci. (Biol.), Associate Proffessor,
Senior Researcher, Department of Bioresources
of the Tyumen Scientific Center
subbotin.prion@yandex.ru

⁴ Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher,
Department of Bioresources of the Tyumen Scientific Center
lkalenova@mail.ru

⁵ Junior Resercher, Department of Bioresources
of the Tyumen Scientific Center
narushkomv@mail.ru

Citation: Kolyvanova S. S., Solovyov V. S., Subbotin A. M., Kalyonova L. F., Narushko M. V.
2016. "Influence of the microorganisms' metabolites from West and East Siberia permafrost on
proliferative activity of human lymphocytes in vitro". Tyumen State University Herald. Natural
Resource Use and Ecology, vol. 2, no. 2, pp. 132-141.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-2-132-143

Abstract

The effect of metabolites of 14 strains of the microorganisms isolated from the permafrost of West (near Tarko-Sale) and Eastern (Chara depression Chita Oblast) Siberia and Central Yakutia (Mamontova mountain) on the proliferative activity of peripheral blood lymphocytes (0(I)Rh+) in the reaction of blast-cell transformation. The authors consider the number of blast-cell transformed lymphocytes in the spontaneous blast-cell transformation under the influence of mitogen for T-lymphocytes of phytohemagglutinin (PHA) and under microbial metabolites of permafrost of PHA + metabolites complex. It is found that different strains of the permafrost microorganisms can have both stimulatory and suppressive effect on lymphocyte proliferation. The strain F2 from Central Yakutia permafrost is exerting maximum stimulating effect ($p < 0.01$), minimum — strains 9/48 (II) and 5/26 from Western Siberia permafrost ($p < 0.05$). Strain F2 is increasing the level of lymphocyte proliferation in combination with PHA ($p < 0.05$). Two strains of Western Siberia permafrost — 9/48 (II) and 3/07 ($p < 0.01$ in both cases) and two strains of Eastern Siberia permafrost — 6/010 and 2/09 ($p < 0.01$ in both cases) are significantly reducing PHA-stimulated lymphocyte proliferation.

Keywords

Metabolites of microorganisms, permafrost, blast transformation of lymphocytes.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-2-132-143

REFERENCES

1. Agadzhanyan N. A., Aptikaeva O. I., Gamburtsev G. A. 2009. Sistemnyy ekologicheskiy monitoring kak komponent strategicheskoy bezopasnosti [System Environmental Monitoring as a Component of Strategic Security]. Prilozhenie k zhurnalu "Bezopasnost zhiznedeyatelnosti" [Supplement to Health and Safety Journal], no. 9, pp. 1-24.
2. Brouchkov A. V., Melnikov V. P., Sukhovey Yu. G. 2011. Relict Microorganisms of Cryolithozone as Possible Objects of Gerontology. *Advances in Gerontology*, vol. 1, no. 1, pp. 39-44.
3. Chereshnev V. A. 2008. Sistemnyy ekologicheskiy monitoring i zdorove. Mikrobnoe raznoobrazie: sostoyanie, strategiya sohraneniya, biotekhnologicheskiy potencial [System Environmental Monitoring and Health. Microbial Diversity: Status, Conservation Strategy, and Potential of Biotechnology]. *Materialy III Mezhdunarodnoy konferencii. Institut ekologii i genetiki mikroorganizmov* [Proceedings of the 3d International Conference]. Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, pp. 107-108. Perm.
4. Kalyonova L. F., Sukhovey Yu. G., Brushkov A. V. 2011. Vliyaniye mikroorganizmov vechnoy merzloty na morfofunktsionalnuyu aktivnost immunnnoy sistemy v eksperimente [Influence of Microbial Permafrost Morpho-functional Activity on the Immune System in the Experiment]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i mediciny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], vol. 151, no. 2, pp. 164-168.
5. Kalyonova L. F., Novikova M. A., Kostolomova E. G. 2014. Vliyaniye mal'kh doz mikroorganizmov *Bacillus* sp. iz vechnoy merzloty na differentsirovku kletok v kostnom mozge v

- eksperimente [The Effect of Small Doses of Bacillus sp. Permafrost Microorganisms on the Differentiation of Cells in the Bone Marrow in the Experiment]. Byulleten eksperimentalnoy biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], vol. 158, no. 9, pp. 352-355.
6. Kalyonova L. F., Subbotin A. M., Novikov M. A. 2014. Vliyaniye temperatury inkubatsii na biologicheskuyu aktivnost mikroorganizmov iz vечноy merzloty [The Effect of Incubation Temperature on the Biological Activity of Permafrost Microorganisms]. Byulleten eksperimentalnoy biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], vol. 158, no. 12, pp. 737-741.
 7. Karasev S. G. 2007. Aktinobakterii iz mnogoletnemerzlykh otlozheniy Sibiri [Actinobacteria from Siberia Permafrost Sediments]. The synopsis of Cand. Sci. (Biol.) diss. Pushchino.
 8. Lebedev K. A., Ponyakina I. D. 1990. Immunogramma v klinicheskoy praktike [Immuno-gram in Clinical Practice], 224 p. Moscow: Nauka.
 9. Ling V. I. 1971. Stimulyatsiya limfocitov: monografiya [Stimulation of lymphocytes: monograph], 288 p. Moscow.
 10. Nazarenko G. I., Kishkun A. A. 2007. Klinicheskaya ocenka rezultatov laboratornykh issledovaniy [Clinical Evaluation of the Laboratory Tests Results], 541 p. Moscow: Medicina.
 11. Rapoport A. I. 2008. Anabioz kak prirodnyy sposob sohraneniya mikrobnogo raznoobraziya. Mikrobnoe raznoobrazie: sostoyaniye, strategiya sohraneniya, biotekhnologicheskyy potencial [Cryostasis as a Natural Way to Preserve Microbial Diversity. Microbial Diversity: Status, Conservation Strategy, and Potential of Biotechnology]. Materialy III Mezhdunarodnoy konferentsii. Institut ekologii i genetiki mikroorganizmov [Proceedings of the 3^d International Conference]. Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, 81 p. Perm.
 12. Reshetnikova L. K. 2009. Metody immunodiagnostiki: uchebnoe posobie [Immunodiagnostic Methods: Manual], Blagoveshchensk. http://www.amursma.ru/documents/Academiya/Zakr/6/Metody_immunodiagnostiki.pdf