

УДК 615.076.9:571.27:576.08
ББК Е 28.074

О.В. МЕЛЬНИКОВА, В.Е. СЕРГЕЕВА

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ CD4-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОГО УПОТРЕБЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ

Ключевые слова: селезенка, кальций, иммуногистохимия, CD4-позитивные клетки.

С помощью иммуногистохимической реакции изучены CD4-позитивные клетки 6 различных морфотипов в белой и красной пульпе, маргинальных синусах, трабекулах селезенки интактных крыс и после поступления соли кальция. После поступления кальция в течение 60 суток общее количество CD4-позитивных клеток снижается, но они в небольшом количестве появляются в периартериальной и реактивной зонах. Исследование показывает, что кальций оказывает иммуномодулирующее действие на CD4-позитивную популяцию лимфоцитов селезенки с Т-хелперной активностью.

**O. MELNIKOVA, V. SERGEEVA
IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS IN REVEALING CD4⁺ SPLEEN CELLS
AFTER PROLONGED USE OF CALCIUM**

Key words: spleen, calcium, immunohistochemistry, CD4⁺ cells.

Immunohistochemical reaction was used to study six different morphotypes of CD4⁺ cells in white and red pulp, marginal sinuses, spleen trabeculae of intact rats and experimental rats after they had been on a calcium-rich diet. The total number of CD4⁺ cells decreased after a 60-day calcium-rich diet, however they appeared in small numbers in periarterial and reactive zones. Our study shows that calcium has immunomodulatory effect on the spleen CD4⁺ T cells.

Интерес к иммуномодулирующей терапии резко возрос в последние годы ввиду снижения иммунологической реактивности населения в целом и, как следствие этого, повышения инфекционной, аутоиммунной, онкологической, аллергической заболеваемости. Известно большое количество различных иммуностимулирующих препаратов, из них минимальное внимание в этом списке уделяется макро- и микроэлементам. Исследования в данной области позволят по-новому подойти к селективной модуляции отдельных звеньев иммунитета с помощью таких препаратов [4].

Исследование структурно-функциональных особенностей селезенки является актуальной проблемой, так как селезенка как самый крупный периферический орган иммуногенеза ответственна за эффективность клеточного и гуморального иммунного ответа как врожденного, так и приобретенного иммунитета [7]. Всестороннее исследование влияния иммунотропных препаратов на органы иммунной системы, особенно на тканевом уровне, необходимо для избирательного, целенаправленного воздействия на нарушенные гистофизиологические процессы, что является обязательным условием успешной иммуномодуляции [12].

CD4 идентифицирован на мембранах Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител как маркер Т-хелперов. CD4 содержится на поверхности кортикальных тимоцитов, части зрелых периферических Т-лимфоцитов (40–50% из них – почти исключительно Т-хелперы). Он обнаруживается также на моноцитах, некоторых клетках головного мозга [14]. CD4-рецепторы существуют на мембранах и некоторых других клетках: макрофагах, эозинофилах, тимоцитах, мегакариоцитах, альвеолярных макрофагах легких, дендритных клетках, олигодендронцитах и астроцитах мозга, эпителиальных клетках кишки, клетках шейки матки [14, 17]. Функция CD4 обусловлена в первую очередь его способностью связываться с молекулами МНС класса II, а также передавать в клетку активационный сигнал [5]. Большой интерес представляет тот факт, что CD4-рецепторы клеток

мышей, крыс, кроликов имеют аналогичное строение и высокую гомологию с CD4-рецепторами клеток человека (более 50%), особенно в цитоплазматическом участке молекулы [13]. Этот факт определяет практическую значимость и возможность применения данного исследования в области медицины.

В многочисленных исследованиях, посвященных воздействию иммунотропных препаратов на организм, в основном использованы функциональные, клинические и иммунологические методы исследования [5, 13]. В научной литературе практически отсутствуют работы, в которых изучали бы структурную организацию и иммунокомпетентные клетки органов иммунной системы, и в частности селезенки, при поступлении кальция в организм. Кроме того, в условиях клиники органы иммунной системы недоступны для морфологического изучения после иммунокорректирующих лечебных мероприятий.

Цель исследования – изучение и морфофункциональная характеристика популяций CD4-позитивных клеток селезенки лабораторных крыс при употреблении соли кальция, поступающей с питьевой водой, в течение 60 суток.

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили 36 селезенки белых нелинейных лабораторных крыс-самцов одного возраста и одной массы (150–200 г). Экспериментальные животные разделены на 2 группы:

первая группа – контрольные животные ($n = 18$), получавшие *ad libitum* питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02;

вторая группа – подопытные животные ($n = 18$), получавшие *ad libitum* питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02 с добавлением хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в пересчете на кальций.

Ежедневно в течение двух месяцев опытные животные получали с питьевой водой в среднем 8,1–10,2 мг/кг кальция. Свободный доступ к питьевой воде был обусловлен моделированием поступления кальция в естественных условиях с питьевой водой. Выбор хлорида кальция для изменения концентрации кальция в питьевой воде был обусловлен его растворимостью и опытом использования другими исследователями [1].

Все действия, предусматривающие контакты с экспериментальными животными, проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 742 от 13.11.84 г. МЗ СССР), требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и принципам Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Выведение животных из эксперимента проводилось путем декапитации [3].

В работе использован иммуногистохимический стрептавидин-биотин-пероксидазный метод. После фиксации в 10%-ном растворе нейтрального формалина селезенки крыс заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовились на микротоме МПС-2 и после депарафинирования и регитратации в этаноле нисходящей концентрации срезы селезенки погружали в восстанавливающий цитратный буфер (рН 6,0). Затем проводили высокотемпературную обработку прогреванием на водяной бане при 90–95°C в течение 30 мин с целью демаскировки искомым антигенов в тканях. После ингибирования эндогенной пероксидазы 3%-ным раствором перекиси водорода на метаноле проводили иммуногистохимическую реакцию методом трехэтапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител (МКАТ) к антигенным маркерам CD4 в раз-

ведении 1:100 согласно рекомендации фирмы-изготовителя (Dako, Дания). Визуализацию первичных МКАТ, связавшихся с антигенами, проводили стандартным биотин-стрептавидин-пероксидазным методом с использованием набора LSAB-2 (Labeled Streptavidin Biotin System Peroxidase). На заключительном этапе срезы докрашивались гематоксилин-эозином [18].

Морфометрическое исследование участков селезенки проведено с применением компьютерного анализа микроскопических изображений. Определение размеров клеточных структур проводилось после фотографирования препаратов при увеличении объектива 40 и окуляра 10 с использованием светового микроскопа МИКМЕД-5. Линейные морфометрические измерения, измерения площадей клеток и структур, а также количественные морфометрические измерения интенсивности мембранных и цитоплазматических иммуногистохимических реакций выполнены с применением программы «Sigma Scan Pro 5.0» [2]. Границы каждого поля зрения препаратов селезенки записывали в формате JPEG, для каждого случая вычисляли количество CD4-позитивных клеток.

Оценка статистической значимости проводилась по *t*-критерию Стьюдента и критериям Вилкоксона – Манна – Уитни [9].

Результаты исследования и их обсуждение. Лимфатическая ткань селезенки крыс представлена белой пульпой и лимфоидными элементами красной пульпы. В ходе иммуногистохимических исследований нами было выявлено 6 различных морфотипов CD4-позитивных клеток селезенки крыс: I тип – крупные, с центрально расположенным округлым базофильным ядром, без видимых гранул и бледной светло-коричневой мембраной; II тип – крупные, с эксцентрично расположенным округлым ядром и неокрашенными пузырьками в цитоплазме; III тип – темно-коричневые грануляции, без цитоплазмы; IV тип – крупные, яркие, с эксцентрично расположенным округлым ядром, гранулами и отростками; V тип – малые, яркие, неправильной формы, без видимых гранул; VI тип – малые, бледные, правильной округлой формы, без гранул.

Таблица 1

Количественное распределение CD4-позитивных клеток в разных зонах ткани селезенки интактных крыс и после длительного употребления кальция, *M±m*

Группы животных	Микроструктуры селезенки						
	белая пульпа				маргинальный синус	красная пульпа	трабекула
	периартериальная зона	реактивная зона (герминативный центр)	мантийная зона	маргинальная зона			
Контроль	0	0	8,5±0,08	7,7±0,3	9,1±0,5	47,7±0,9	14,2±0,04*
Опыт	2,2±0,01	3,1±0,05	5,3±0,02	6,7±0,2	8,8±0,9	23,6±0,8	11,5±0,02*

Примечание. * – достоверность ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными данными.

В селезенке интактных животных CD4-позитивные клетки в основном располагаются в мантийной и маргинальной зонах, вдоль маргинальных синусов и в красной пульпе (рис. 1). Нами не обнаружены изучаемые клетки в периартериальной и реактивной (герминативный центр) зонах белой пульпы (табл. 1). Чаше выявляются в тканях селезенки CD4-позитивные клетки I, IV и VI типов.

После системного поступления кальция в организм крыс CD4-позитивные клетки преобладают в красной пульпе (рис. 2). Среди шести выделенных нами морфотипов клеток в тканях селезенки опытной группы преобладают клетки V и VI типов. Отличительной чертой срезов селезенки опытной группы является появление CD4-позитивных клеток в герминативном центре (3,1±0,05) и периартериальной лимфоидной муфте лимфоидных узелков (2,2±0,01). Соответственно,

после поступления кальция общее количество CD4-позитивных клеток снижается, но в белой пульпе – значительно увеличивается. Таким образом, кальций оказывает иммуномодулирующее действие на CD4-позитивную популяцию лимфоцитов селезенки с Т-хелперной активностью.

В красной пульпе селезенки обеих групп животных подавляющее большинство CD4-позитивных клеток представлены популяциями VI типа (малые, бледные, правильной округлой формы, без гранул, с площадью поверхности $102\text{-}686\text{ мкм}^2$), в белой пульпе – популяциями I и IV типов.

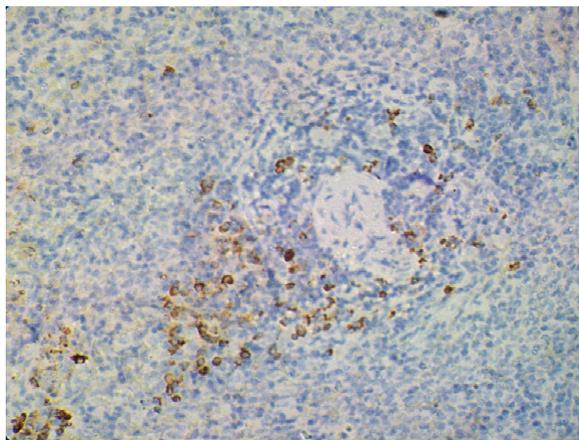


Рис. 1. Лимфоидный узелок селезенки крысы. Интактная группа. Иммуногистохимическая реакция с антителами CD4. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 10

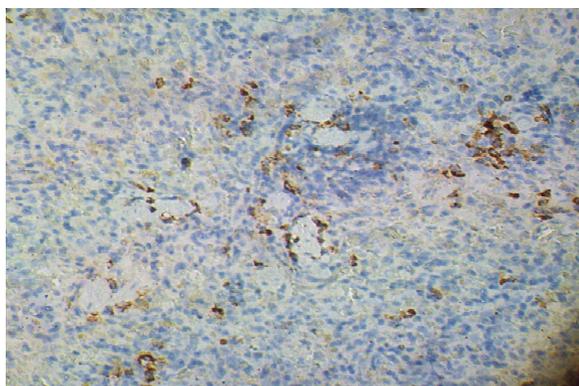


Рис. 2. Лимфоидный узелок селезенки крысы. После поступления кальция с питьевой водой в течение 60 суток. Иммуногистохимическая реакция с антителами CD4. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 10

С помощью морфометрического анализа площади клетки морфотипы CD4-позитивных клеток селезенки крыс были разделены на три группы – малые, средние и крупные. В популяции клеток обеих исследуемых групп преобладают клетки с малыми размерами – процент их количества составил 49,1% и 62,7%, соответственно (табл. 2).

Происходит увеличение абсолютного количества CD4-позитивных клеток после длительного употребления кальция с питьевой водой почти в два раза – на 82,7% относительно контрольной группы. Также обнаружено перераспределение клеток по размерам: значительное преобладание малых CD4-позитивных клеток (62,7%) и снижение числа клеток крупных размеров.

Таблица 2

**Морфометрические показатели
распределения CD4-позитивных клеток селезенки
интактных крыс и после длительного употребления кальция**

Популяции CD4-позитивных клеток селезенки крыс	Площадь клеток, мкм ²	Количество CD4-позитивных клеток, шт. (%)		Степень и направ- ленность изменений
		контрольная группа	опытная группа	
Малые	102–686	57 (49,1%)	133 (62,7%)*	+13,6%
Средние	687–1270	29 (25%)	75 (35,4%)*	+10,4%
Крупные	1271–1855	30 (25,9%)	4 (1,9%)*	-24,0%
Количество CD4-позитивных клеток в пяти полях зрения микроскопа		116	212	+82,7%

Примечание. * – достоверность ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными данными.

Известно, что влияние окружающей среды на человека складывается из непрерывных воздействий физических, химических, социальных факторов. Это связано как с развитием промышленности, так и с освоением новых территорий, характеризующихся различным соотношением химических элементов в почве и питьевой воде [10]. Неблагоприятная геохимическая обстановка часто усугубляется бесконтрольным применением фармакологических препаратов и биологически активных добавок, содержащих различные химические элементы [8]. Сложившаяся ситуация свидетельствует о необходимости расширения научных знаний о влиянии химических элементов на деятельность эндокринной, нервной и иммунной систем.

По данным исследований Д. Оберлиса, для нормального протекания жизненных процессов в клетках и тканях необходимы микро- и макроэлементы [6]. Доказано, что кальций активизирует многие катаболические процессы (гликогенолиз, липолиз, протеолиз), стимулирует синтез белка, мышечное сокращение и немышечную подвижность, экзо-, эндоцитоз, ионный транспорт, секрецию нейромедиаторов, работу нервной и сердечно-сосудистой системы [8]. Он принимает активное участие в процессах высвобождения катехоламинов из надпочечников и выделения нейромедиаторов пресинаптических мембран, участвует в стабилизации мембран тучных клеток, препятствует высвобождению гистамина и уменьшает проявление аллергических реакций, воспалительных процессов [8, 16]. Значимость для функционирования организма является причиной строгого поддержания постоянной концентрации ионов кальция в сыворотке крови: изменение ее лишь на 1% приводит в действие механизм, восстанавливающий необходимую концентрацию [6]. Показано, что интенсивность митотической активности в костном мозге и тимусе пропорциональна концентрации кальция в плазме. При отсутствии кальция большое число стимулированных антигеном клеток не может вступить в фазу активного синтеза ДНК, в результате чего иммунный ответ угнетается [5]. Удаление паращитовидных желез у крыс приводит к гипоплазии костного мозга, инво-

люции тимуса, снижению антителообразующих клеток (АОК) [7]. После удаления паразитовидных желез организм становится неспособным к увеличению количества АОК и повышению титров циркулирующих антител, снижается пролиферация тимических лимфобластов, что приводит к атрофии тимуса. Эффект восстанавливается введением ПТГ или кальция [8]. Повышение концентрации кальция вызывает деление и бласттрансформацию лимфоцитов [5]. Вышеизложенные факты позволяют думать о том, что для нормального функционирования лимфоидной ткани необходима стабильная концентрация кальция в организме [6].

По литературным данным, дифференцировка Т- и В- лимфоцитов происходит при участии стромального микроокружения селезенки [17] и антигенпредставляющих клеток, к которым относятся дендритные клетки [13], ретикулярные клетки [5] и макрофаги [12]. В селезенке наблюдается наибольшая функциональная активность лимфоидных клеток, так как хелперно-индукторная популяция CD4+ Т-лимфоцитов преобладает над CD8+ супрессорно-киллерной [5, 15].

Проведенные нами иммуногистохимические исследования микроструктур селезенки показали аналогичные результаты. В табл. 1 и 2 отображена качественная и количественная динамика распределения CD4-позитивных клеток в различных структурах селезенки в норме и после 60-дневного поступления соли кальция с питьевой водой. Таким образом, селезенка играет важную роль в развитии системного иммунного ответа, являясь «домом» для местно протекающих антигенстимулированных лимфоцитов.

Для более подробного изучения иммунокомпетентных клеток селезенки при поступлении кальция планируется проведение серии экспериментов по идентификации супрессорных (CD8) субпопуляций Т-лимфоцитов и CD20-позитивных В-лимфоцитов.

Экспериментальные исследования поддержаны научными грантами Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «Исследование морфофункциональных изменений биоаминсодержащих структур селезенки при водном воздействии кальция» (государственный контракт № 6975р/9584 от 04.09.2009); «Разработка оптимального состава хлеба, обогащенного кальцием, и исследование влияния продукта на показатели состояния здоровья обследуемых групп населения» (государственный контракт № 11306р/20545 от 14.01.2013).

Выводы. 1. С помощью иммуногистохимической реакции в селезенке крыс обнаружены CD4-позитивные клетки 6 различных популяций. Наибольшее количество CD4-позитивных клеток выявлено в красной пульпе селезенки.

2. Поступление с питьевой водой соли кальция отражается на распределении CD4-позитивных клеток селезенки крыс.

3. После поступления кальция общее количество CD4-позитивных клеток снижается, и впервые они в небольшом количестве появляются в периартериальной и реактивной зонах.

4. Происходит увеличение абсолютного количества и перераспределение по размерам CD4-позитивных клеток после длительного употребления кальция с питьевой водой.

5. Кальций оказывает иммуномодулирующее действие на CD4-позитивную популяцию лимфоцитов селезенки с Т-хелперной активностью.

Литература

1. Дьячкова И.М., Смородченкова А.Т. Изучение каспаз-9 позитивных клеток в тимусе лабораторных крыс при поступлении в организм хлорида кальция и метасиликата натрия с питьевой водой // Морфология в теории и практике: сб. материалов и тезисов (к 90-летию со дня рождения Д.С. Гордон). Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. С. 185–186.
2. Иммуногистохимическая характеристика акцидентальной инволюции тимуса после спленектомии / Е.В. Москвичев, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко и др. // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. 2012. Т. 7, № 2. С. 40–43.
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК, 2004. 608 с.
4. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 544 с.
5. Лунева А.Г. Роль Т-хелперного звена иммунитета в реакции отторжения аллогенного трансплантата почки человека: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Киев, 2003. 36 с.
6. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. СПб.: Наука, 2008. 273 с.
7. Онтогенетические аспекты стромально-паренхиматозных взаимоотношений в селезенке / А.И. Рябикина, М.Ю. Капитонова, А.А. Нестерова и др. // Морфология. 2008. Т. 132, № 2. С. 58.
8. Пилат Т.Л. Биологически активные добавки к пище. М.: Авалон, 2002. 710 с.
9. Платонова А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, логика, компьютерные методы. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с.
10. Сусликов В.Л., Толмачева Н.В. Эколого-биогеохимическое зонирование территорий – необходимый этап изучения причинно-следственных связей атеросклероза и его последствий // Фундаментальные исследования. 2007. № 12. С. 127–130.
11. Труффалкин В.А., Шурлыгина А.В. Проблемы гистофизиологии иммунной системы // Иммунология. 2002. № 1. С. 4–8.
12. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Иммуногенетика и биомедицина // Российский аллергологический журнал. 2013. № 1. С. 5–14.
13. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология. 2011. Т. 13, № 1. С. 7–16.
14. Яршин А.А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов: обзор // Иммунология. 2010. Т. 31, № 3. С. 153–168.
15. Ястребова С.А., Смирнова Т.Л., Ялалетдинова Л.Р. Реакция CD4-позитивных макрофагов селезенки на введение Т-активина // Вестник Чувашского университета. 2013. № 3. С. 578–580.
16. Ficher M., Enblad G. et al. Interactions between tumor cell and mast cell in Hogkin's disease. *Scand. J. Immunol.*, 2001, vol. 54, no. 1, p. 24.
17. Liu J. Enhanced CD4+ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice. *Immunity*, 2001, vol. 15(1), pp. 23–34.
18. Stemberger L.A., Petrali J.P. The unlabeled antibody enzyme method. Attempted use of peroxidase-conjugated antigen as the third layer in the technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, vol. 25(9), pp. 1036–1042.

References

1. D'yachkova I.M., Smorodchenkova A.T. *Izuchenie kaspaz-9 pozitivnykh kletok v timuse laboratornykh krys pri postuplenii v organizm khlorida kal'tsiya i metasilikata natriya s pit'evoi vodoi* [The study of CASPAS-9 positive cells in the thymus of laboratory rats at the receipt in an organism of calcium chloride and metasilicate with drinking water]. *Morfologiya v teorii i praktike: sb. materialov i tezisov (k 90-letiyu so dnya rozhdeniya D.S. Gordon)* [Morphology in the theory and practice: collection of materials and theses (to the 90th anniversary since the birth of D.S.Gordon)]. Cheboksary, Chuvash State Univesity Publ., 2012, pp. 185–186.
2. Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu. et al. *Immunogistokhimicheskaya kharakteristika aktsidental'noi involyutsii timusa posle splenektomii* [Immunohistochemical characterization of accidental evolution of the thymus after splenectomy]. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova* [Bulletin of national medical and surgical center named after N.I.Pirigov], 2012, vol. 7, no. 2, pp. 40–43.
3. Karkishchenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [Fundamentals of biomodelling]. Moscow, VPK Publ., 2004, 608 p.
4. Kudrin A.V., Gromova O.A. *Mikroelementy v immunologii i onkologii* [Microcells in immunology and oncology]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2007, 544 p.
5. Luneva A.G. *Rol' T-khelfernogo zvena immuniteta v reaksii ottorzheniya allogennogo transplantata pochki cheloveka: avtoref. dis. ... dokt. med. nauk* [The role of T-Hallertau immunity in the rejection of allogeneic transplant kidneys of humans and animals. Abstract of PhD thesis]. Kiev, 2003, 36 p.

6. Oberlis D., Kharland B., Skal'nyi A. *Biologicheskaya rol' makro- i mikroelementov u cheloveka i zhivotnykh* [The biological role of macro- and microelements in man and animals]. St. Petersburg, Nauka Publ., 2008, 273 p.
7. Ryabikina A.I., Kapitonova M.Yu., Nesterova A.A. et al. *Ontogeneticheskie aspekty stromal'no-parenkhimatoznykh vzaimootnoshenii v селезенке* [Ontogenetic aspects of stromal-parenchymal interactions in the spleen]. *Morfologiya* [Morphology], 2008, vol. 132, no. 2, pp. 58.
8. Pilat T.L. *Biologicheski aktivnye dobavki k pishche* [Biologically active food supplements]. Moscow, Avalon Publ., 2002, 710 p.
9. Platonova A.E. *Statisticheskii analiz v meditsine i biologii: zadachi, logika, komp'yuternye metody* [Statistical analysis in medicine and biology: challenges, logic, computer methods]. Moscow, RAMN Publ., 2000, 52 p.
10. Suslikov V.L., Tolmacheva N.V. *Ekologo-biogeokhimicheskoe zonirovanie territorii – neobkhodimyi etap izucheniya prichinno-sledstvennykh svyazei ateroskleroza i ego posledstviy* [Ecological-biogeochemical zoning is a necessary stage in the study of the causal relationship of atherosclerosis and its consequences]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Basic researches], 2007, no. 12, pp. 127–130.
11. Trufalkin V.A., Shurlygina A.V. *Problemy gistofiziologii immunnoi sistemy* [Problems of histophysiology immune system]. *Immunologiya* [Immunology], 2002, no. 1, pp. 4–8.
12. Khaitov R.M., Alekseev L.P. *Immunogenetika i biomeditsina* [Immunogenetic and Biomedicine]. *Rossiiskii allergologicheskii zhurnal* [Russian allergic magazine], 2013, no. 1, pp. 5–14.
13. Khaidukov S.V., Zurochka A.V. *Tsitometricheskii analiz subpopulyatsii T-khelperov (Th1, Th2, Treg, Th17, T-khelper aktivirovannye)* [Cytometric analysis of subpopulations of T-Hellerau (Th1, Th2, Treg, Th17)]. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical immunology], 2011, vol. 13, no. 1, pp. 7–16.
14. Yarilin A.A. *Transkriptsionnye regulatory differentsirovki T-khelperov: obzor* [Transcriptional regulators of differentiation of T-Hellerau: survey]. *Immunologiya* [Immunology], 2010, vol. 31, no. 3, pp. 153–168.
15. Yastrebova S.A., Smirnova T.L., Yalaletdinova L.R. *Reaktsiya CD4-pozitivnykh makrofagov selezenki na vvedenie T-aktivina* [The response of CD4-positive macrophages of the spleen to the introduction of T-activin]. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*, 2013, no. 3, pp. 578–580.
16. Ficher M., Enblad G. et al. Interactions between tumor cell and mast cell in Hogkin's disease. *Scand. J. Immunol.*, 2001, vol. 54, no. 1, p. 24.
17. Liu J. Enhanced CD4+ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice. *Immunity*, 2001, vol. 15(1), pp. 23–34.
18. Stemberger L.A., Petrali J.P. The unlabeled antibody enzyme method. Attempted use of peroxidase-conjugated antigen as the third layer in the technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, vol. 25(9), pp. 1036–1042.

МЕЛЬНИКОВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА – аспирант кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (olga1407@bk.ru).

MELNIKOVA OLGA – Post-Graduate Student, Department of Medical Biology with Microbiology and Virology Course, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.

СЕРГЕЕВА ВАЛЕНТИНА ЕФРЕМОВНА – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (kaf-biology@yandex.ru).

SERGEEVA VALENTINA – Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Medical Biology with Microbiology and Virology Course, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.
