

ЭФФЕКТ ФИБРОНЕКТИНА НА МИГРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ЛИНИИ EA.Hy926

**Александр Петрович ЛЫКОВ^{1,2}, Наталья Анатольевна БОНДАРЕНКО^{1,2},
Ирина Иннокентьевна КИМ^{1,2}, Ольга Владимировна ПОВЕЩЕНКО^{1,2},
Александр Федорович ПОВЕЩЕНКО^{1,2}, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ^{1,2}**

¹ ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² ФГБУ ННИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Целью исследования стало изучение миграционного потенциала клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 в направлении градиента концентрации цитокинов и ростовых факторов и влияния на него фибронектина. Установлено, что эритропоэтин, фактор некроза опухоли- α и фактор роста эндотелия сосудов стимулировали миграционный потенциал клеток EA.Hy926 уже в первые часы эксперимента. Выраженность миграции в направлении концентрации цитокинов и ростовых факторов зависит от условий кондиционирования с фибронектином.

Ключевые слова: фибронектин, ростовые факторы, миграция.

Известно, что репарация повреждений стенок сосудов и непосредственно формирование новых сосудов протекают поэтапно: разрыв базальной мембраны сосудов и матрикса эндотелиальными клетками (ЭК), миграция ЭК в направлении ангиогенных стимулов (хемотаксис), пролиферация и формирование трехмерных тубулярных структур (новых кровеносных сосудов) [7, 15]. Для взаимодействия ЭК с интимой сосудов требуется взаимодействие $\alpha 5\beta 1$ -интегрин с фибронектином, что способствует прикреплению клеток к стенке сосудов и их встраиванию в области повреждения сосудистой стенки [11]. Фибронектин (неколлагеновый структурный гликопротеин) является одним из ключевых белков межклеточного матрикса, который способен реагировать и связывать коллаген, протеогликаны, гиалуроновую кислоту, углеводы плазматических мембран, гепарин, а также трансглутаминазу. Помимо этого, фибронектин также способствует адгезии

и распространению эндотелиальных и мезенхимальных клеток, стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, контролирует дифференцировку и поддержание цитоскелета клеток, активно участвует в воспалительных и репаративных процессах, опосредуемых наличием в его структуре последовательности Арг-Гли-Асп (RGD), с помощью которой он может присоединяться к клеточным рецепторам (интегринам). Эти рецепторы опосредованно взаимодействуют с находящимися в цитозоле актиновыми микрофиламентами, в процессе участвуют талин, винкулин, α -актинин (белки прикрепления) [6, 8, 13]. С другой стороны, при дефиците рецептора CXCR2 отмечено снижение прикрепления ЭК к фибронектину [10]. Являясь активным белком внеклеточного матрикса, фибронектин не только поддерживает клеточную адгезию, но и координирует влияние различных факторов роста и цитокинов на эндотелиальные клетки. Поэтому целью данного исследова-

Лыков А.П. – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: lykovalex@freemail.ru

Бондаренко Н.А. – аспирант лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: bond802888@yandex.ru

Ким И.И. – научный сотрудник лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики, e-mail: kii5@yandex.ru

Повещенко О.В. – к.м.н., зав. лабораторией лимфотропной диагностики и лимфотропной терапии, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Повещенко А.Ф. – д.м.н., зав. лабораторией физиологии протективной системы, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Коненков В.И. – д.м.н., академик РАН, директор института, e-mail: lymphology@soramn.ru

дования стало изучение миграционной способности клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 на клеточном анализаторе xCELLigence System в режиме реального времени под влиянием цитокиновых стимулов с учетом наличия или отсутствия в питательной среде фибронектина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на клетках эндотелиальной линии EA.Hy926, любезно предоставленной Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Клетки EA.Hy926 культивировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки FCS (Биолот, Россия), 160 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия), 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) и НАГ, добавки к среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ICN, США), далее посадочная среда (ПС), в плоскодонных флаконах в концентрации $1,7 \times 10^5$ клеток/мл при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя.

В работе проведено изучение миграции клеток EA.Hy926 в трех экспериментальных моделях, по нашему мнению, отражающих эффекты фибронектина на ЭК *in vivo*. Первая модель эксперимента имитировала поведение циркулирующего пула ЭК при отсутствии влияния фибронектина. Вторая модель напоминала поведение ЭК, прикрепившихся в месте повреждения эндотелиальной выстилки сосудов. С этой целью разделяющую верхнюю и нижнюю камеры лунок мембрану предварительно инкубировали с 20 мкг/мл фибронектина (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин при температуре 37 °С. Третья модель схожа с поведением ЭК, мигрирующих в межклеточном пространстве в направлении дефектов стенки сосудов или же в область роста новых сосудистых структур, – фибронектин в дозировке 20 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США) вносили в нижнюю камеру лунки, тем самым создавая градиент вещества, в направлении которого мигрируют клетки эндотелиальной линии EA.Hy926.

Предложенные экспериментальные модели базировались на том факте, что фибронектин необходим ЭК для прикрепления и миграции в межклеточном пространстве в месте повреждения эндотелиальной выстилки сосудов [14].

По изменению клеточного импеданса на аппарате xCELLigence (Roche Applied Science, Германия) в двухуровневых камерах оценивали миграционную активность EA.Hy926. Миграцию клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 оценивали в отсутствие фибронектина, с предварительной инкубацией верхних лунок камеры

с фибронектином в течение 60 мин при 37 °С в дозировке 20 мкг/мл и с добавлением фибронектина в дозировке 20 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США) в нижние лунки камер. В нижние лунки вносили по 100 мкл ПС с добавлением ростовых факторов, в верхние лунки – 30 мкл ПС без клеток и снимали значение импеданса, далее вносили клетки EA.Hy926 в объеме 30 мкл ПС в верхнюю часть камеры. Диаметр пор в мембране дна верхней лунки равен 8 мкм. Оценивали влияние эритропоэтина (Epo, Рекормон, Германия; 33 МЕ/мл), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF; BioVision, США; 10 нг/мл) и фактора некроза опухоли-α (TNF-α; Sigma-Aldrich, США; 5 нг/мл) на миграционный потенциал EA.Hy926.

В условиях исследования задавались общее время сканирования и интервал сканирования, далее все измерения проводились в автоматическом режиме без вмешательства экспериментатора. Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как клеточный индекс (КИ), величина которого автоматически вычисляется программой: $КИ = (R_n - R_b)/t$, где R_b – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду, R_n – значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей помимо ростовой среды тестируемые клетки. КИ, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени.

Данные представляли в виде среднего значения (M) и ошибки среднего (m), достоверность различий рассчитывали по U-критерию Манна-Уитни и считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первая модель исследовала миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 и влияние на миграцию цитокинов VEGF, TNF-α и Epo в отсутствие фибронектиновых стимулов. Как видно из табл. 1, через 24 ч от начала эксперимента отмечено статистически значимое повышение миграции клеток EA.Hy926 при дополнительной стимуляции Epo ($p < 0,05$). И это с учетом того факта, что в FCS (добавление 10 % FCS при культивировании) содержится большое количество биологически активных веществ, в том числе цитокинов и ростовых факторов. Необходимо также указать, что при дополнительной стимуляции EA.Hy926 VEGF и TNF-α также отмечено стимулирование миграционной способности клеток эндотелиальной линии, но менее выраженное, чем при внесении в посадоч-

Таблица 1

Зависимость миграционной активности клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 от наличия цитокинов и фибронектина в лунках

Условие инкубации	Величина КИ		
	0 ч	2 ч	24 ч
Без фибронектина			
Спонтанная миграция	0,001 ± 0,001	0,025 ± 0,004	0,94 ± 0,07
Еро	0,001 ± 0,001	0,052 ± 0,002*	1,31 ± 0,01*
VEGF	-0,017 ± 0,004	0,043 ± 0,001*#	1,04 ± 0,03#
TNF-α	0,001 ± 0,001	0,036 ± 0,001*#	0,99 ± 0,01#
Фибронектин в нижней части камеры			
Спонтанная миграция	-0,002 ± 0,000	-0,31 ± 0,18	0,64 ± 0,23
Еро	-0,001 ± 0,000	0,027 ± 0,017	0,89 ± 0,09
VEGF	0,005 ± 0,000	0,087 ± 0,021#	1,18 ± 0,12
TNF-α	-0,002 ± 0,000	0,042 ± 0,011	0,78 ± 0,08
Предобработка мембраны фибронектином			
Спонтанная миграция	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,88 ± 0,01
Еро	0,002 ± 0,000	0,071 ± 0,000*	1,19 ± 0,03*
VEGF	-0,001 ± 0,000	0,067 ± 0,004	0,97 ± 0,01*#
TNF-α	-0,002 ± 0,000	0,07 ± 0,002*	1,06 ± 0,08

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – спонтанной миграции, # – проб с эритропозетином.

ную среду Еро (см. табл. 1). Известно, что TNF-α и VEGF способствуют активации пролиферации ЭК, увеличивают экспрессию молекул адгезии, что способствует повышению их миграционной активности [1, 3–5, 9], а также стимуляции к формированию сосудисто-подобных структур ЭК [1, 5, 7].

Далее был проведен анализ ранней миграции эндотелиальных клеток во временных рамках (1–4 ч). Надо отметить, что клеточный индекс миграции увеличивается и в отсутствие стимулов к 2 часам культивирования, а добавление в культуру Еро ведет к возрастанию значений КИ по сравнению с аналогичными показателями при стимуляции миграции клеток эндотелиальной линии VEGF и TNF-α (см. табл. 1). В то же время отмечено большее стимулирование миграции EA.Hy926 при внесении в ПС VEGF и TNF-α по сравнению с показателями миграции клеток без дополнительных стимулов.

Как видно из табл. 1, в эксперименте с миграцией EA.Hy926 в направлении градиента фибронектина было установлено, что VEGF и Еро статистически значимо стимулировали их миграционный потенциал по сравнению со спонтанным уровнем ($p < 0,05$), при этом эффект VEGF был более выраженным ($p < 0,01$). Установлено, что TNF-α также стимулировал миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 ($p < 0,05$). Следует отметить, что на ранних сро-

ках изучения клеточного импеданса мигрирующих эндотелиальных клеток VEGF оказывал наиболее выраженное стимулирование миграции клеток по сравнению со спонтанными значениями миграционной активности (см. табл. 1).

Преинкубация лунок камеры с фибронектином привела к резкому снижению миграции EA.Hy926 из верхней части камеры по направлению к градиенту плотности ростовых факторов, находящихся в нижней части камеры, особенно для миграции без активационных цитокиновых стимулов (см. табл. 1) в первые часы наблюдения. В то же время через 24 ч отмечено увеличение миграционного потенциала EA.Hy926 в лунках, содержащих VEGF, Еро или TNF-α. Необходимо отметить тот факт, что на ранних сроках наблюдения дополнительные стимулы (Еро, TNF-α, VEGF) приводили к незначительному увеличению миграционной активности EA.Hy926 по сравнению с показателями миграции без дополнительных стимулов (см. табл. 1).

В табл. 2 приведены результаты почасового исследования величины клеточного импеданса в различных моделях эксперимента на миграцию EA.Hy926 под влиянием эритропозетина. Так, в отсутствие фибронектина от момента начала эксперимента до 13 ч включительно выявлено менее выраженное стимулирование миграции EA.Hy926 по сравнению с аналогичными параметрами в условиях наличия фибронектина в

Таблица 2

Зависимость миграционной активности клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 в присутствии эритропоэтина от наличия фибронектина в лунках

Время, ч	Величина КИ		
	Без фибронектина	Фибронектин в нижней части камеры	Предобработка мембраны фибронектином
1	-0,0130 ± 0,0002	0,0150 ± 0,0012	0,0019 ± 0,0040*.#
2	0,0337 ± 0,0018	0,0712 ± 0,0003	0,0272 ± 0,0169*.#
3	0,0828 ± 0,0013	0,1118 ± 0,0001*	0,0624 ± 0,0263
4	0,1240 ± 0,0022	0,1534 ± 0,0008*	0,1053 ± 0,0359
5	0,1719 ± 0,0044	0,2000 ± 0,0007*	0,1535 ± 0,0454
6	0,2172 ± 0,0049	0,2448 ± 0,0006*	0,1990 ± 0,0543
7	0,2638 ± 0,0068	0,2950 ± 0,0004*	0,2483 ± 0,0624
8	0,3152 ± 0,0073	0,3432 ± 0,0007*	0,2904 ± 0,0696
9	0,3607 ± 0,0047	0,3933 ± 0,0001*	0,3281 ± 0,0734
10	0,4142 ± 0,0057	0,4365 ± 0,0009*	0,3575 ± 0,0742
11	0,4672 ± 0,0037	0,4840 ± 0,0022*	0,3902 ± 0,0751
12	0,5158 ± 0,0019	0,5326 ± 0,0026	0,4209 ± 0,0779
13	0,5695 ± 0,0009	0,5818 ± 0,0021*	0,4565 ± 0,0792
14	0,6301 ± 0,0011	0,6393 ± 0,0036	0,4824 ± 0,0815
15	0,6868 ± 0,0011	0,6933 ± 0,0043	0,5153 ± 0,0812
16	0,7538 ± 0,0042	0,7557 ± 0,0054	0,5548 ± 0,0843*.#
17	0,8147 ± 0,0102	0,8089 ± 0,0047	0,5884 ± 0,0868*.#
18	0,8792 ± 0,0125	0,8653 ± 0,0094	0,6278 ± 0,0910*.#
19	0,9511 ± 0,0119	0,9211 ± 0,0129	0,6662 ± 0,0915*.#
20	1,0075 ± 0,0120	0,9812 ± 0,0177	0,7062 ± 0,0933*.#
21	1,0901 ± 0,0121	1,0369 ± 0,0219	0,7439 ± 0,0930*.#
22	1,1731 ± 0,0074	1,0831 ± 0,0214*	0,7874 ± 0,0879*.#
23	1,2410 ± 0,0066	1,1343 ± 0,0226*	0,8572 ± 0,0941*.#
24	1,3092 ± 0,0026	1,1955 ± 0,0261*	0,8949 ± 0,0911*.#

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,01$) отличия от величин соответствующих показателей: * – пробы без фибронектина, # – пробы с фибронектином в нижней части камеры.

нижней части камеры. Только на последних часах эксперимента обнаружено более выраженное стимулирующее влияние эритропоэтина на миграцию клеток в условиях отсутствия фибронектина, которое было статистически значимо выше, чем в других условиях эксперимента.

Известно, что EPO оказывает протективный эффект и на клетки негемопоэтического ряда, обусловленный стимуляцией через экспрессируемые на поверхности клеток рецепторы к нему или же активацией в них генов EPO и синтезом EPO в клетках, тем самым осуществляя ауто- и паракринную регуляцию [2]. Кроме этого, EPO опосредованно, через влияние на эндотелиальные клетки, стимулирует процессы неоваскуляризации ишемизированных тканей [3] и снижает влияние окислительного стресса на ткани [12]. Также показано, что на клетках эндотелиальной линии EA.Hy926 имеются рецепторы к EPO, и при

взаимодействии лиганда с рецептором происходит активация киназы Jak-2, которая в свою очередь активирует STAT-5, тем самым способствуя накоплению внутри клеток ионов кальция. Кроме этого, отмечено стимулирующее влияние EPO на пролиферацию, миграцию и тубуло-формирование клетками эндотелиальной линии EA.Hy926 при культивировании их в матрикеле [2]. Поэтому выявленное стимулирующее влияние EPO на миграционный потенциал EA.Hy926 не противоречит имеющимся в литературе сведениям.

Что же касается снижения миграционной активности EA.Hy926, обнаруженного в результате преинкубации с фибронектином мембран, разделяющих верхние и нижние камеры лунок, оно объясняется наличием рецепторов к фибронектину, обуславливающего их адгезию к нему. Так как не исключено, что фибронектин адсорбировался не только на нижней поверхности мембраны

верхней части камеры, но и проник на ее верхнюю поверхность, то некоторая часть клеток могла прикрепиться к сорбированному в верхней части камеры фибронектину и не мигрировать в направлении градиента ростовых факторов, находящихся в нижней части камеры. Это косвенно подтверждается тем фактом, что при добавлении в ПС дополнительных источников ростовых факторов часть клеток мигрирует по направлению к градиенту стимуляторов пролиферации и миграции эндотелиоцитов, а также увеличением миграционной активности EA.Hy926 при добавлении фибронектина в нижнюю часть камеры как в спонтанном тесте (только ПС), так и при внесении ростовых факторов. Необходимо отметить, что полученные нами на клеточном анализаторе xCELLigence в режиме реального времени результаты существенно не противоречат исследованиям, выполненным с использованием других методик. Более того, полученные результаты исследования миграции на клеточном анализаторе позволили выявить изменения динамики миграции клеток под влиянием различных моделей экспериментальных исследований на ранних сроках экспериментов, что невозможно установить другими способами, особенно с учетом того, что на протяжении эксперимента все происходит в одной и той же лунке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящем исследовании результаты позволили заключить, что миграция клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 зависит от наличия в посадочной среде как ростовых факторов (VEGF, TNF- α , EPO), так и фибронектина, гликопротеина, обеспечивающих взаимодействие клеток в межклеточном пространстве и способствующих прикреплению и проникновению в межклеточное пространство эндотелиоцитов, тем самым обеспечивая процессы репарации и неангиогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.Hy926 и ее модуляция // Цитология. 2005. (5). 389–399.
2. Захаров М.Ю. Цитопротекторные функции эритропоэтина // Клинич. нефрол. 2009. (1). 16–21.
3. Коненков В.И., Повещенко О.В., Ким И.И. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у боль-

ных с хронической сердечной недостаточностью // КТТИ. 2011. (3). 71–6.

4. Коненков В.И., Покушалов Е.А., Повещенко О.В. и др. Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью // КТБМ. 2012. (1). 9–14.

5. Старикова Э.А., Амчиславский Е.И., Соколов Д.И. и др. Изменение поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Мед. иммунол. 2003. (1–2). 39–48.

6. Angelos M.G., Brown M.A., Satterwhite L.L. Dynamic adhesion of umbilical cord blood endothelial progenitor cells under laminar shear stress // Biophys. J. 2010. 99. 3545–3554.

7. Bendorf R., Boger R.H., Ergun S. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells // Circ. Res. 2003. 93. 438–447.

8. Bhatwadekar A.D., Glenn J.V., Li G. Advanced glycation of fibronectin impairs vascular repair by endothelial progenitor cells: implications for vasodeneration in diabetic retinopathy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008. 49. 1232–1241.

9. Drabarek B., Dymkowska D., Szczepanowska J. TNF α affects energy metabolism and stimulates biogenesis of mitochondria in EA.hy926 endothelial cells // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2012. 44. 1390–1397.

10. Hristov M., Zernecke A., Bidzhekov K. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury // Circ. Res. 2007. 100. 590–597.

11. Scharner D., Rossig L., Carmona G. Caspase-8 is involved in neovascularization-promoting progenitor cell functions // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009. 29. 571–578.

12. Stein A., Knodler M., Makowski M. Local erythropoietin and endothelial progenitor cells improve regional cardiac function in acute myocardial infarction // BMC Cardiovasc. Disord. 2010. 10. 43–52.

13. To W.S., Midwood K.S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair // Fibrogenesis Tissue Repair. 2011. 4. 21–37.

14. Yang N., Li D., Jiao P. et al. The characteristics of endothelial progenitor cells derived from mononuclear cells of rat bone marrow in different culture conditions // Cytotechnology. 2011. 63. 217–226.

15. Yuan Y.M., Fang S.H., Qian X.D. Leukotriene D4 stimulates the migration but not proliferation of endothelial cells mediated by the cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor via the extracellular signal-regulated kinase pathway // J. Pharmacol. Sci. 2009. 109. 285–292.

THE EFFECTS OF FIBRONECTIN ON THE MIGRATION ACTIVITY OF ENDOTHELIAL CELL LINE EA.HY926

**Aleksandr Petrovich LYKOV^{1,2}, Natalia Anatolievna BONDARENKO^{1,2},
Irina Innokentievna KIM^{1,2}, Olga Vladimirovna POVESHCHENKO^{1,2},
Aleksandr Fedorovich POVESHCHENKO^{1,2}, Vladimir Iosifovich KONENKOV^{1,2}**

¹ *Institute of Clinical and Experimental Lymphology of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *Institute of Circulation Pathology n.a. E.N. Meshalkin of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15*

Studying of migratory potential of endothelial cells line EA.Hy926 in the direction of gradient of cytokines concentration and growth factors and fibronectin influence on it was the research objective. It has been revealed that erythropoietin, tumor necrosis factor -alpha and vascular endothelial growth factor stimulate the migratory potential of EA.Hy926 in the first hours of the experiment. Expressiveness of migratory in the direction of cytokines concentration and growth factors depends on conditioning with fibronectin.

Key words: fibronectin, growth factors, migration.

***Lykov A.P.** – candidate of medical sciences, leading researcher of laboratory of lymphotropic therapy and lymphodiagnosics, e-mail: lykovalex@freemail.ru*

***Bondarenko N.A.** – postgraduate student of laboratory of lymphotropic therapy and lymphodiagnosics, e-mail: bond802888@yandex.ru*

***Kim I.I.** – researcher of laboratory of lymphotropic therapy and lymphodiagnosics, e-mail: kii5@yandex.ru*

***Poveshchenko O.V.** – candidate of medical sciences, head of the laboratory of lymphotropic therapy and lymphodiagnosics, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru*

***Poveshchenko A.F.** – doctor of medical sciences, head of the laboratory of physiology of the protective system, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru*

***Konenkov V.I.** – academician of RAS, doctor of medical sciences, director, e-mail: lymphology@soramn.ru*