

АНТИАПОПТОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕЦЕПТОРА CD95 В НАИВНЫХ CD8⁺ Т-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Е.Н. Филатова¹, Е.В. Анисенкова¹, Н.Б. Преснякова¹, Т.Д. Сычева², Е.А. Кулова², О.В. Уткин^{1,2}

¹ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

² ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Острый инфекционный мононуклеоз — широко распространенное вирусное заболевание, наиболее часто проявляющееся в детском возрасте. Развитие ОИМ сопровождается изменением соотношения CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в сторону увеличения количества вирусспецифических CD8⁺ Т-лимфоцитов. Одним из механизмов регуляции численности Т-лимфоцитов является модуляция апоптоза наивных клеток-предшественников. «Рецептор смерти» CD95 участвует в регуляции апоптоза Т-лимфоцитов, в том числе и наивных Т-клеток. Мы изучили влияние активации рецептора CD95 на апоптоз наивных CD4⁺ и цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов у здоровых детей и детей с острым инфекционным мононуклеозом. В исследование были включены дети с диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз» в возрасте от 9 до 16 лет. Для сравнения использовали здоровых детей, сопоставимых по возрасту с исследуемой группой, у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки заболевания. Выделение наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов и наивных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов проводили методом негативной магнитной иммуносепарации. Для оценки уровня апоптоза наивных Т-клеток, а также плотности экспрессии рецептора CD95 на их поверхности использовали метод проточной цитофлуориметрии. Анализировали клетки в трех вариантах: свежеизолированные наивные CD4⁺ Т-лимфоциты и наивные CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты, а также клетки после 24 часов культивирования с анти-CD95 моноклональными антителами или без них. В норме среди наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов апоптозу подвергались как CD95⁻, так и CD95⁺ клетки. При остром инфекционном мононуклеозе CD95⁻ наивные CD4⁺ Т-лимфоциты утрачивали восприимчивость к индукции апоптоза. В норме и при остром инфекционном мононуклеозе CD95⁻ наивные CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты были устойчивы к апоптозу в отличие от CD95⁺ наивных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов. В норме CD95 не являлся индуктором апоптоза изолированных наивных CD4⁺ и CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов. При остром инфекционном мононуклеозе CD95 вносил вклад в подавление апоптоза наивных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и не оказывал влияния на уровень гибели наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Мы предполагаем, что CD95-зависимое подавление апоптоза наивных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов является защитным механизмом, направленным на поддержание достаточного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови для реализации эффективного противовирусного иммунного ответа.

Ключевые слова: CD95, апоптоз, наивные Т-лимфоциты, CD4, CD8, острый инфекционный мононуклеоз.

Адрес для переписки:

Филатова Елена Николаевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
Нижегородский НИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.); 8 (906) 368-37-22 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniem.ru

Contacts:

Elena N. Filatova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Scientific Research Institute of Epidemiology
and Microbiology named after academician I.N. Blokhina.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office); +7 (906) 368-37-22 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniem.ru

Библиографическое описание:

Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д.,
Кулова Е.А., Уткин О.В. Антиапоптотическое действие рецептора
CD95 в наивных CD8⁺ Т-лимфоцитах у детей с острым инфекционным
мононуклеозом // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 3. С. 207–218.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-207-218

© Филатова Е.Н. и соавт., 2016

Citation:

Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Sycheva T.D.,
Kulova E.A., Utkin O.V. Anti-apoptotic effect of CD95 receptor in naive CD8⁺
T-lymphocytes in children with acute infectious mononucleosis // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 3,
pp. 207–218. doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-207-218

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-3-207-218>

ANTI-APOPTOTIC EFFECT OF CD95 RECEPTOR IN NAÏVE CD8⁺ T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Filatova E.N.^a, Anisenkova E.V.^a, Presnyakova N.B.^a, Sycheva T.D.^b, Kulova E.A.^b, Utkin O.V.^{a,b}

^a *Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

^b *Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

Abstract. Acute infectious mononucleosis is a widespread viral disease, which most often manifests in childhood. The development of acute infectious mononucleosis is accompanied by the change of the CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytes ratio and the increase of the virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes number. One of the T-lymphocytes number regulation mechanisms is the modulation of their progenitor cells apoptosis. The death receptor CD95 takes part in the regulation of T-lymphocytes apoptosis, including naïve T-cells. We studied the effect of CD95 receptor activation on apoptosis of naïve CD4⁺ and naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes in healthy children and children with acute infectious mononucleosis. In this study children with acute infectious mononucleosis at the age of 9 to 16 years were included. For comparison healthy children of the same age with no clinical and laboratory signs of the disease were used. Naïve CD4⁺ and naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes were isolated by negative magnetic immunoseparation. The analysis of naïve T-cells apoptosis and the CD95 receptor surface expression density was performed by using the flow cytometry analysis. The analysis of T-cells was performed in three variants: freshly isolated naïve CD4⁺ T-lymphocytes and naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes, and also cells after 24 hours of the cultivation with anti-CD95 monoclonal antibodies or without them. In healthy children both CD95⁻ and CD95⁺ naïve CD4⁺ T-lymphocytes underwent apoptosis. In children with acute infectious mononucleosis CD95⁻ naïve CD4⁺ T-lymphocytes lost their susceptibility to apoptosis induction. In healthy children and children with acute infectious mononucleosis CD95⁻ naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes were resistant to apoptosis in contrast to CD95⁺ naïve CD4⁺ T-lymphocytes. In healthy children CD95 receptor did not induce apoptosis of isolated naïve CD4⁺ T-lymphocytes and naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes. In children with acute infectious mononucleosis CD95 receptor was involved in inhibition of apoptosis of naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes and did not effect on the level of apoptosis of naïve CD4⁺ T-lymphocytes. We suggest that CD95-dependent suppression of naïve cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes apoptosis is a protective mechanism for the maintenance of a sufficient number of cytotoxic T-lymphocytes in the blood for the realization of effective antiviral immune response.

Key words: CD95, apoptosis, naïve T-lymphocytes, CD4, CD8, acute infectious mononucleosis.

Введение

Острый инфекционный мононуклеоз (ОИМ) — вирусное заболевание, характеризующееся пожизненной персистенцией возбудителя. Наиболее часто этиологическим агентом ОИМ является вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), реже — цитомегаловирус и вирус герпеса человека 6 типа. Носителями этих вирусов являются более 90% городского населения, однако острая форма заболевания развивается лишь у 10% инфицированных лиц [33]. Наиболее часто заболевание проявляется в детском возрасте [3].

Как в литической, так и в латентной стадиях ОИМ CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты играют важную роль в реализации иммунного ответа [5, 10]. У людей с дефектом активации данного звена иммунной системы заболевание развивается молниеносно и часто приводит к летальному исходу [19]. При ОИМ за счет значительного возрастания количества вирусспецифических CD8⁺ Т-лимфоцитов происходит снижение соотношения CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток [13, 27, 28]. Подобные изменения не наблюдаются при некоторых других изученных бактериальных и вирусных инфекциях [12, 31]. Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов при ОИМ поддерживается на постоянном, хоть и низком уровне. При этом в периферической крови с высокой частотой встречаются CD4⁺ Т-клетки, активированные антигенами возбудителей ОИМ [16, 26].

У пациентов с хроническим течением ОИМ в период реактивации наблюдается снижение содержания общего пула CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [17, 34]. Поддержание достаточного количества зрелых иммунокомпетентных клеток в периферической крови обеспечивается за счет сохранения пула наивных Т-лимфоцитов, обладающих пролиферативным и дифференцировочным потенциалом [14]. У детей поддержание гомеостаза Т-клеток может также зависеть от выхода свежих наивных Т-лимфоцитов из тимуса [9]. Усиление гибели наивных Т-лимфоцитов путем апоптоза потенциально снижает эффективность иммунных реакций при ОИМ.

Член белкового семейства «рецепторов смерти» — CD95 (Fas, APO-1) — экспрессируется на поверхности разных типов клеток, в том числе CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, участвуя в регуляции Т-клеточного гомеостаза. CD95 является бифункциональным рецептором, выполняющим про- и антиапоптотические функции в зависимости от клеточного микроокружения [6, 20]. Известно, что в норме стимуляция CD95 индуцирует гибель активированных Т-лимфоцитов [29]. Наивные Т-клетки, наоборот, отвечают на стимуляцию данного рецептора усилением пролиферативной активности [4].

В ранних исследованиях демонстрировалось усиление апоптоза культивируемых Т-клеток

у пациентов с ОИМ по сравнению с нормой [18]. В дальнейшем было показано, что, несмотря на повышение экспрессии CD95 на поверхности CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и возрастания их восприимчивости к апоптозу, *in vitro* не наблюдалось усиления гибели этих клеток по сравнению с контролем при инфицировании ВЭБ [30]. У пациентов с ОИМ обнаружена положительная корреляция между уровнем экспрессии CD95 на мембране лимфоцитов периферической крови и содержанием CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [25]. Ранее нами показано, что у пациентов с ОИМ по сравнению с нормой naive CD8⁺ Т-лимфоциты характеризовались более низким уровнем апоптоза, что может быть связано с активацией рецептора CD95 [2].

Целью данной работы явилась оценка влияния активации рецептора CD95 на апоптоз naive CD4⁺ (нТх) и цитотоксических CD8⁺ (нЦТЛ) Т-лимфоцитов у детей с ОИМ.

Материалы и методы

Исследуемые группы. В исследование были включены дети с диагнозом ОИМ в возрасте от 9 до 16 лет. У больных детей в крови выявлялись клинически значимые концентрации ДНК ВЭБ, ЦМВ либо вируса герпеса человека 6 типа. В 40% случаев наблюдали микст-инфекцию. Для сравнения использовали здоровых детей, сопоставимых по возрасту с исследуемой группой, у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки заболевания. Забор материала проводился с информированного согласия родителей или опекунов.

Проточная цитофлуориметрия. Использовали проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II («Becton, Dickinson and Company», США). Для нормализации напряжения на фотоумножителях применяли калибровочные частицы «Cytometry set up and tracking beads» («BD Biosciences», США). Настройки компенсации флуоресценции оптимизировали с помощью коммерческого набора «Anti-mouse Ig, k/negative control compensation particles set» («BD Biosciences», США). Для флуоресцентно меченых антител уровень фонового свечения, характеризующего неспецифическое связывание, определяли с применением соответствующих изотипических контролей. Сбор данных проводили с помощью программы FACSDiva («BD Biosciences», США). В каждом образце анализировали 30 000 клеток.

Получение культуры naive Т-лимфоцитов. Материалом для исследования явились образцы периферической крови. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови выделяли с применением раствора фикола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, «ПанЭко», Россия). Выделение нТх и нЦТЛ проводили методом негативной магнитной иммуносепарации с помощью коммерческих наборов серии EasySep («Stemcell Technologies»,

Великобритания) согласно инструкции производителя. Чистоту выделения naive Т-клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии с применением панели флуоресцентно меченых антител: CD3-PE, CD45RO-PE-Cy7, CD45RA-PerCP-Cy5.5 и CD4-APC-eFluor780 (либо CD8-APC-eFluor780) («eBioscience», США). Чистота выделения нТх и нЦТЛ составила более 98% (рис. 1).

Культивирование и активация naive Т-лимфоцитов. Изолированные нТх и нЦТЛ культивировали отдельно в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Австрия) и 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37°C и 5% CO₂. Специфическую активацию клеток проводили мышинными моноклональными антителами (МКА) против CD95 человека (изотип IgM, клон СН-11, «Beckman Coulter», США) в концентрации 200 нг/мл. В контрольные лунки вносили физиологический раствор.

Оценка уровня апоптоза и экспрессии CD95. Анализировали свежеизолированные нТх и нЦТЛ, а также клетки после 24 часов культивирования с анти-CD95 МКА или без них. Параметры оценивали методом проточной цитофлуориметрии. На основании прямого и бокового светорассеяния отделяли дедрис и выделяли общий гейт нТх либо нЦТЛ (рис. 2а). Для оценки уровня апоптоза применяли двойное окрашивание аннексином V-PE (AV) и 7-аминоактиномицином-D (7AAD) с использованием коммерческого набора «PE Annexin V Apoptosis Detection Kit» («BD Biosciences», США). На основании окраски по AV и 7AAD выделяли гейты живых лимфоцитов (AV⁻7AAD⁻), лимфоцитов в ранней (AV⁺7AAD⁻) и поздней (AV⁺7AAD⁺) стадиях апоптоза (рис. 2б). Определяли процент живых клеток, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза от общего числа клеток в гейте лимфоцитов. Гейты живых клеток и клеток в ранней стадии апоптоза в дальнейшем анализировали отдельно. Экспрессию CD95 на мембране лимфоцитов анализировали с помощью флуоресцентно меченых антител против CD95 (CD95-PE-Cy7, «eBioscience», США). Подсчитывали процент живых и находящихся в ранней стадии апоптоза CD95⁻ и CD95⁺ Т-лимфоцитов от общего количества клеток в гейте лимфоцитов. Плотность экспрессии CD95 на мембране лимфоцитов оценивали, исходя из средней интенсивности флуоресценции несущих рецепторы клеток. Процент CD95⁺ клеток в поздней стадии апоптоза и плотность экспрессии рецептора на их поверхности не оценивали (рис. 2в).

Анализ данных. Для сравнения выборок, имеющих нормальное распределение, применяли t-критерий Стьюдента для независимых выборок либо парный t-критерий Стьюдента, а также дисперсионный анализ с повторными измере-

ниями. В случае ненормального распределения данных применяли критерий Манна–Уитни для независимых выборок либо парный критерий Уилкоксона, а также критерий Фридмана. Для оценки связи между активацией рецептора CD95 и исследованными показателями использовали модель логистической регрессии со смешанными эффектами. Значения p при множественных сравнениях корректировали с помощью поправки Холма–Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Алгоритм статистического анализа был написан на языке R (версия 3.1) в оболочке «RStudio 0.98.1098» [23, 24]. При написании алгоритма использовали пакеты «stats», «flowCore», «lawstat», «multcomp» и «nlme» [8, 11, 15, 21, 22].

Иллюстрации создавали с применением пакета «ggplot2» [32], количественные переменные отображали в виде медианы и интерквартильного размаха.

Результаты

Экспрессия CD95 на мембране свежеизолированных нТх и нЦТЛ у здоровых детей и детей с ОИМ

В ходе данной работы нами оценивалась экспрессия рецептора CD95 на поверхности нТх и нЦТЛ у здоровых и больных детей. Показано, что плотность экспрессии CD95 повышалась на мембране наивных Т-лимфоцитов в ранней стадии апоптоза по сравнению с живыми клетками ($p < 0,05$ во всех изученных случаях). Как в нТх, так и в нЦТЛ повышение экспрессии CD95 при апоптозе свежеизолированных наивных Т-лимфоцитов было более выражено у детей с ОИМ, чем у здоровых детей (рис. 3).

У здоровых детей процент свежеизолированных нТх в ранней и поздней стадиях апоптоза был ниже по сравнению с нЦТЛ в 1,6 и в 3,3 раза соответственно ($p = 0,009$ и $p = 0,001$) (рис. 4а).

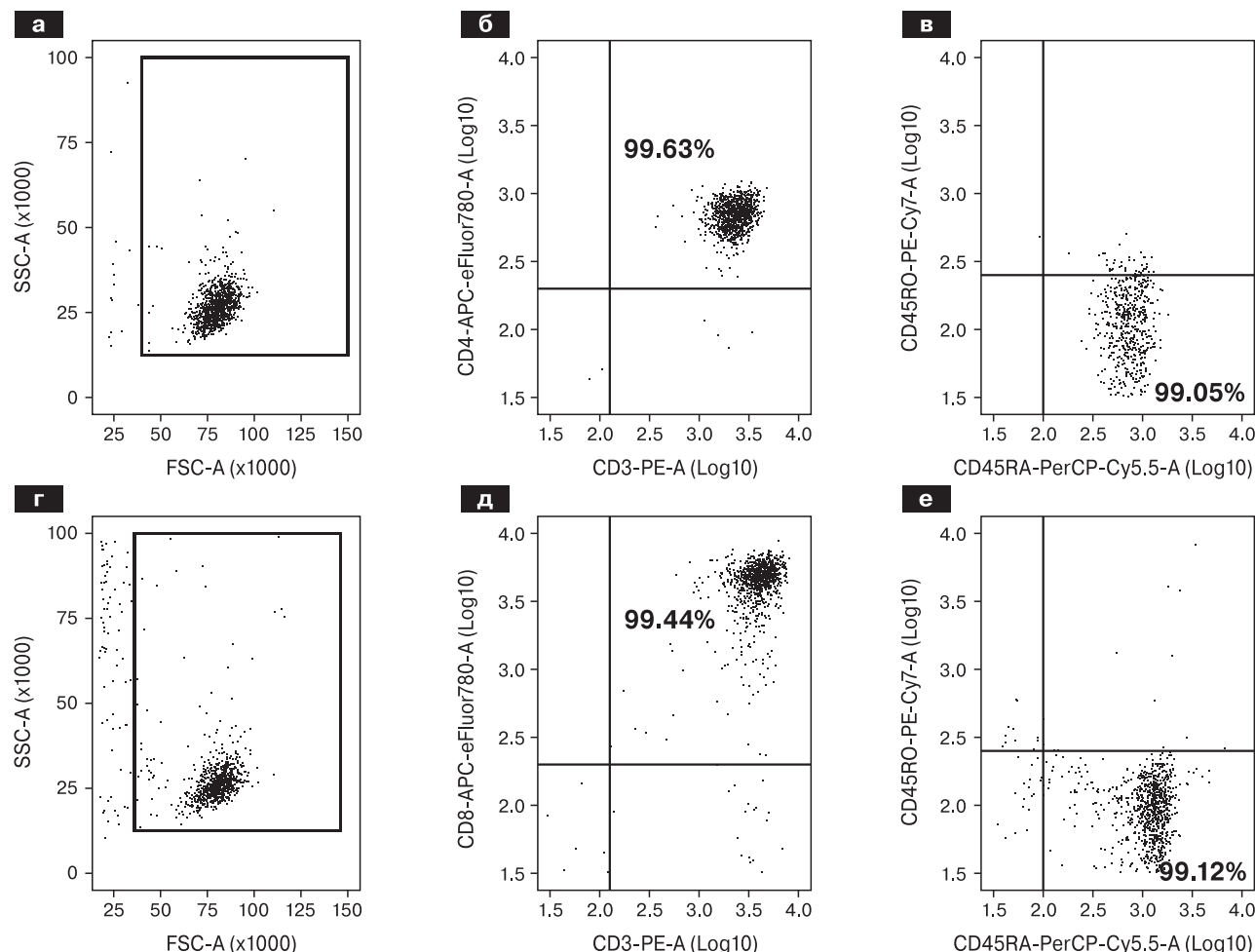


Рисунок 1. Чистота выделения нТх (а-в) и нЦТЛ (г-е) клеток

На основании прямого и бокового светорассеяния отделяли дебрис и выделяли гейт лимфоцитов (а, г). В выделенном гейте анализировали экспрессию маркеров CD3 и CD4 (или CD8). Содержание CD3⁺CD4⁺ (или CD3⁺CD8⁺) лимфоцитов составило более 99% (б, д). В пуле CD3⁺CD4⁺ (или CD3⁺CD8⁺) лимфоцитов анализировали экспрессию маркеров CD45RA и CD45RO. Содержание CD45RA⁺CD45RO⁻ клеток составило более 99% (в, е). Итоговое содержание наивных CD4⁺ (или CD8⁺) Т-лимфоцитов составило более 98%.

Процент живых нТх превышал процент живых нЦТЛ в 1,4 раза ($p < 0,001$). Дальнейший анализ показал, что снижение процента раннеапоптотических нТх относительно нЦТЛ достигалось за счет уменьшения процента $CD95^+$ клеток. Данный показатель в нТх был ниже по сравнению с нЦТЛ в 1,8 раза ($p = 0,006$). При этом плотность экспрессии рецептора на мембране данных типов клеток не изменялась. Процент $CD95^-$ клеток в ранней стадии апоптоза также не различался (рис. 4б, в). Процент живых $CD95^-$ нТх превышал процент живых $CD95^-$ нЦТЛ в 1,6 раза ($p = 0,003$). При этом процент живых $CD95^+$ нТх и нЦТЛ не различались. Однако плотность экспрессии $CD95$ на мембране живых нТх снижалась по сравнению с нЦТЛ в 1,1 раза ($p = 0,027$).

У детей с ОИМ свежеизолированные нТх и нЦТЛ не различались по уровню апоптоза клеток, проценту $CD95^-$ и $CD95^+$ Т-лимфоцитов и плотности экспрессии рецептора на их поверхности (рис. 4).

Свежеизолированные нТх у детей с ОИМ и здоровых детей не отличались по проценту живых и апоптотирующих клеток. Также не было выявлено различий процента $CD95^-$ и $CD95^+$ клеток. При этом плотность экспрессии $CD95$ у детей с ОИМ по сравнению с нормой повышалась на мембране живых нТх и раннеапоптотических клеток в 1,3 и в 1,4 раза соответственно ($p = 0,044$ и $p = 0,035$) (рис. 4).

Свежеизолированные нЦТЛ у детей с ОИМ и здоровых детей не отличались по проценту живых и раннеапоптотических клеток. Однако процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза у больных детей понижался в 2,0 раза по сравнению с нормой ($p = 0,005$). Процент живых $CD95^-$ нЦТЛ не различался, а процент живых $CD95^+$ клеток возрастал в 1,2 раза у детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми ($p = 0,018$). По сравнению с нормой, при ОИМ снижался в 1,2 раза процент $CD95^-$ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза ($p = 0,037$) на фоне отсутствия различий в проценте $CD95^+$ клеток. Плотность экспрессии $CD95$ на мембране свежеизолированных живых и раннеапоптотических нЦТЛ не различалась у больных и здоровых детей (рис. 4).

Влияние активации рецептора $CD95$ на апоптоз нТх и нЦТЛ у здоровых детей и детей с ОИМ

Культивирование наивных Т-лимфоцитов приводило к изменению содержания живых и апоптотических клеток, в частности $CD95^-$ и $CD95^+$ Т-клеток. Уровень апоптоза и характер экспрессии $CD95$ зависели от фенотипа клеток и различались у здоровых и больных детей.

У здоровых детей в контроле процент живых нТх снижался в 2,2 раза по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами ($p < 0,001$). При этом в контроле процент нТх в поздней стадии апоптоза увеличивался в 10,6 раза ($p < 0,001$). При добавлении анти- $CD95$ МКА, как в контро-

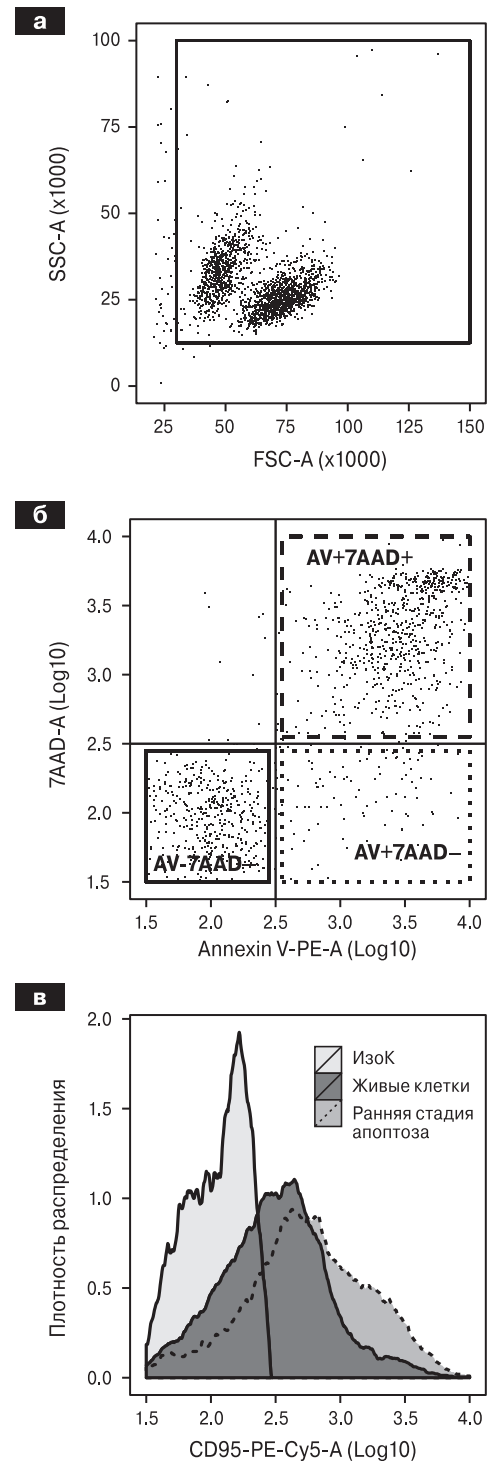


Рисунок 2. Принципы гейтирования

На основании прямого и бокового светорассеяния отделяли дебрис и выделяли гейт лимфоцитов (а). В выделенном гейте на основании двойного окрашивания AV и 7AAD выделяли гейты живых клеток (сплошная линия), клеток в ранней (точечный пунктир) и поздней стадиях апоптоза (штриховой пунктир). Определяли процент живых клеток, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза от общего пула лимфоцитов (б). В дальнейшем гейты живых клеток и клеток в ранней стадии апоптоза анализировали отдельно. В каждом из них определяли процент $CD95^+$ клеток от общего пула лимфоцитов и среднюю интенсивность флуоресценции $CD95$ на их поверхности (в). ИзоК — изотипический контроль.

ле, снижался процент живых нТх в 2,1 раза и увеличивался процент нТх в поздней стадии апоптоза в 11,4 раза ($p < 0,001$ в обоих случаях) по сравнению со свежеизолированными клетками. Процент нТх в ранней стадии апоптоза при культивировании нТх в норме не изменялся (рис. 5а).

У здоровых детей снижение процента живых нТх в контроле и при добавлении анти-CD95 МКА происходило за счет уменьшения в 2,1 раза количества живых CD95⁻ и CD95⁺ клеток ($p < 0,001$ во всех случаях). Плотность экспрессии CD95 на мембране живых нТх снижалась в 1,3 раза ($p = 0,005$) по сравнению со свежеизолированными клетками только при добавлении анти-CD95 МКА. В контроле изменений выявлено не было (рис. 5б, в).

У здоровых детей в контроле и при добавлении анти-CD95 МКА процент CD95⁻ и CD95⁺

нТх в ранней стадии апоптоза не изменялся по сравнению со свежеизолированными клетками. Однако в контроле выявлено снижение в 1,4 раза плотности экспрессии CD95 на мембране нТх в ранней стадии апоптоза ($p = 0,001$), не наблюдаемое при добавлении анти-CD95 МКА (рис. 5б, в).

Культивирование контрольных нЦТЛ здоровых детей сопровождалось снижением в 1,2 и в 1,7 раза процента живых и раннеапоптотизирующих клеток ($p = 0,045$ и $p < 0,001$ соответственно), а также увеличением в 3,0 раза процента клеток в поздней стадии апоптоза ($p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными нЦТЛ. Сходные результаты были получены при добавлении анти-CD95 МКА. Так, по сравнению со свежеизолированными клетками, снижался в 1,4 и в 1,7 раза процент живых нЦТЛ и клеток в ранней стадии

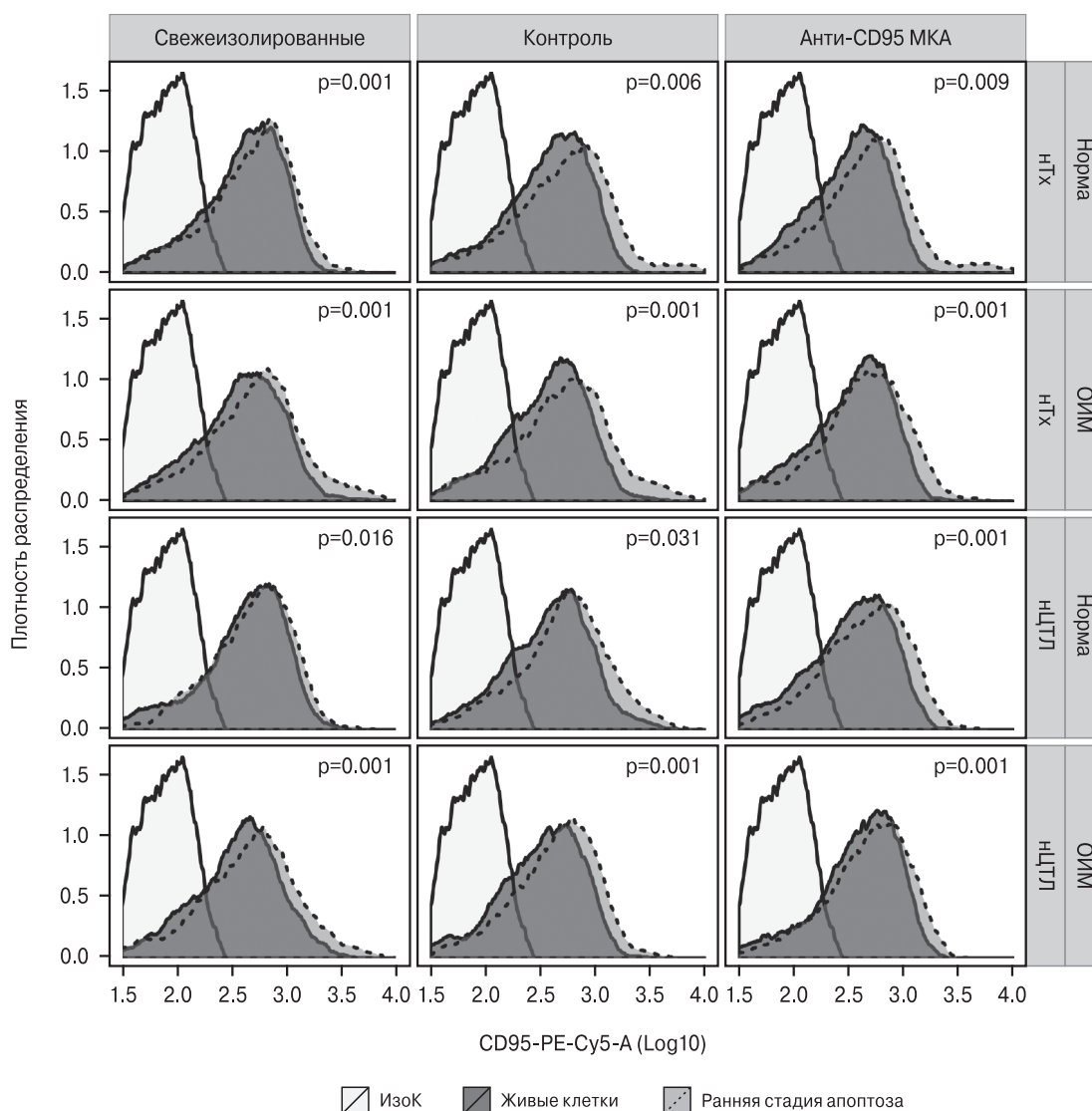


Рисунок 3. Экспрессия рецептора CD95 на мембране наивных Т-лимфоцитов у здоровых детей и детей с ОИМ

На рисунке указан уровень значимости разницы плотности экспрессии CD95 на поверхности живых клеток и клеток в ранней стадии апоптоза. ИзоК — изотипический контроль.

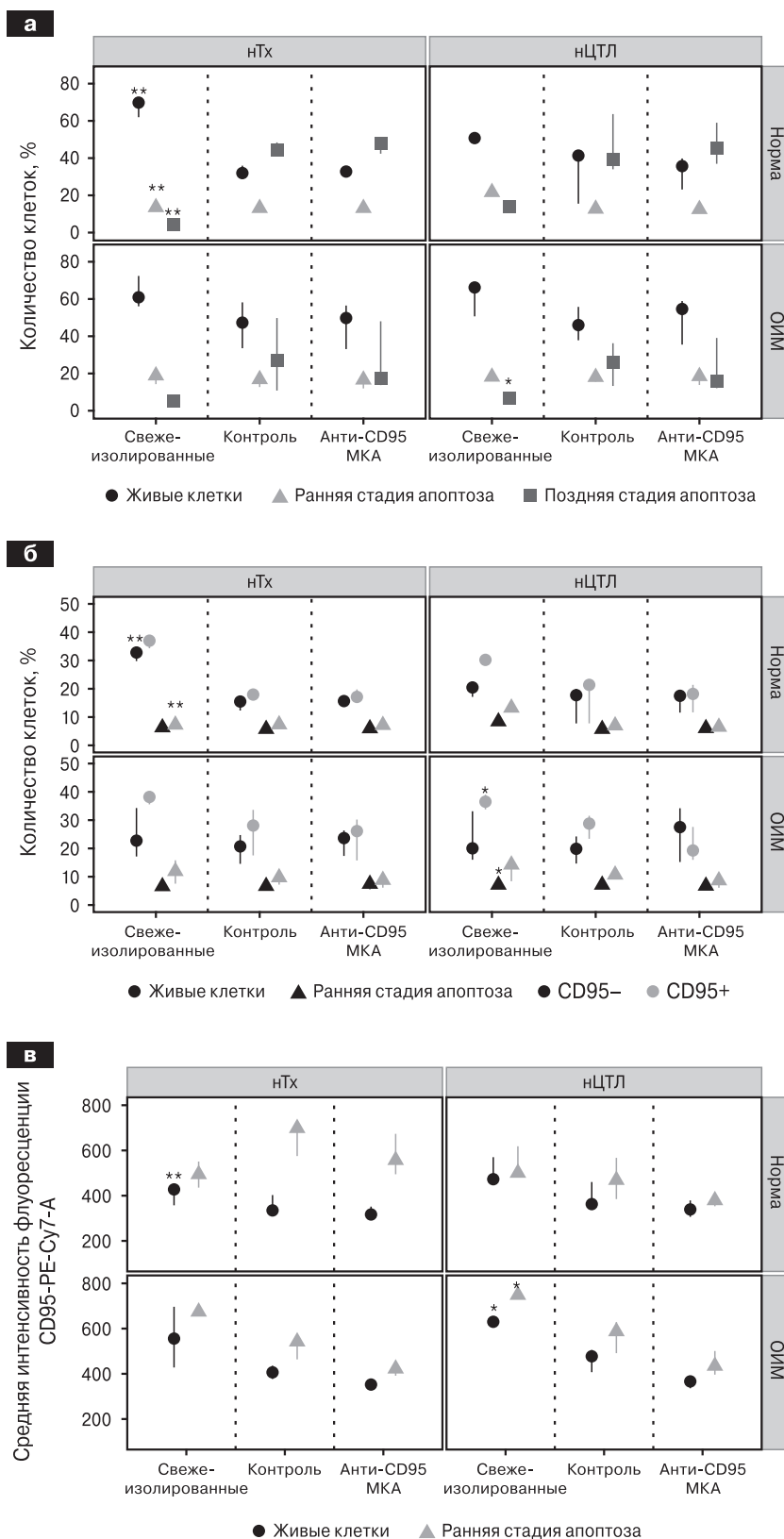


Рисунок 4. Содержание живых и апоптотических клеток, а также экспрессия рецептора CD95 среди нТх и нЦТЛ здоровых детей и детей с ОИМ

(а) Процент живых наивных Т-лимфоцитов, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. (б) Процент CD95⁻ и CD95⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. (в) Средняя интенсивность флуоресценции CD95⁻ PE-Cy7-A на поверхности CD95⁺ наивных Т-лимфоцитов. * — статистически значимые различия при сравнении свежеизолированных нЦТЛ детей с ОИМ и здоровых детей (p < 0,05); ** — статистически значимые различия при сравнении свежеизолированных нТх и нЦТЛ здоровых детей (p < 0,05). На рисунке данные приведены с указанием медианы, 25 и 75 перцентилей.

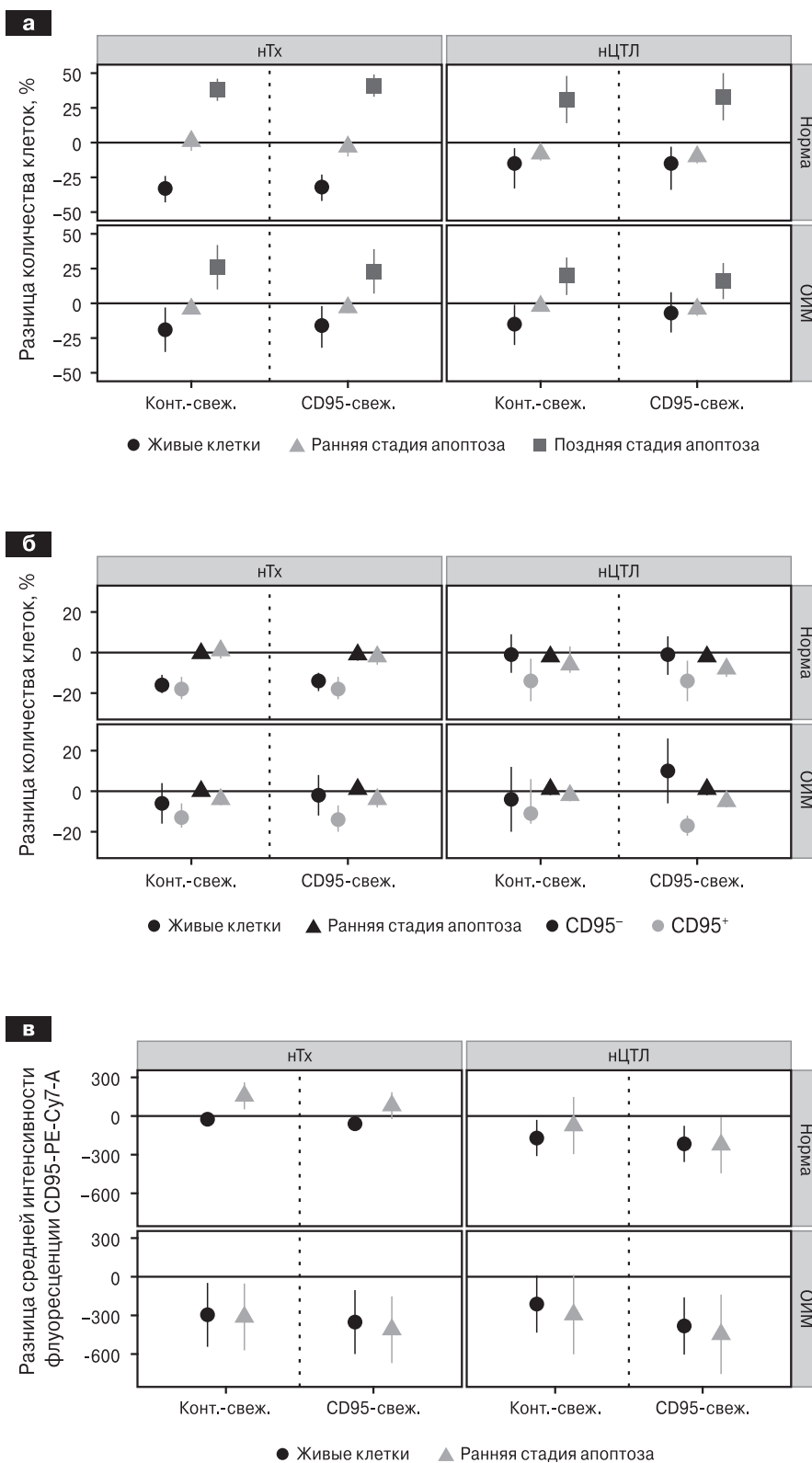


Рисунок 5. Разница и 95%-ный доверительный интервал разницы измеренных параметров при сравнении свежеизолированных и культивируемых наивных Т-лимфоцитов здоровых детей и детей с ОИМ

(а) Разница процента живых клеток, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. (б) Разница процента живых и апоптотических CD95⁻ и CD95⁺ наивных Т-клеток. (в) Разница средней интенсивности флуоресценции CD95-PE-Cy7-A на поверхности живых и апоптотических клеток. Конт.-свеж — разница параметров при сравнении наивных Т-лимфоцитов, культивируемых без добавления анти-CD95 МКА и свежеизолированных клеток. CD95-свеж. — разница параметров при сравнении наивных Т-лимфоцитов, культивируемых с добавлением анти-CD95 МКА и свежеизолированных клеток.

апоптоза ($p = 0,045$ и $p < 0,001$ соответственно) и возрастал в 3,4 раза процент клеток в поздней стадии апоптоза ($p < 0,001$) (рис. 5а).

У здоровых детей в контроле и при добавлении анти-CD95 МКА снижение процента живых нЦТЛ происходило за счет уменьшения содержания CD95⁺ клеток. В контроле процент живых CD95⁺ клеток уменьшался в 1,4 раза, а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,6 раза ($p = 0,003$ в обоих случаях). Процент живых CD95⁻ нЦТЛ не изменялся. При этом выявлено снижение плотности экспрессии CD95 на поверхности живых клеток: в контроле в 1,3 раза ($p = 0,009$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными клетками (рис. 5б, в).

Сходная картина наблюдалась у здоровых детей в отношении нЦТЛ в ранней стадии апоптоза. Так в контроле и при добавлении анти-CD95 МКА процент CD95⁻ нЦТЛ не изменялся, но снижался процент CD95⁺ клеток в контроле в 1,9 раза, а при добавлении анти-CD95 МКА — в 2,0 раза ($p < 0,001$ в обоих случаях). В отличие от живых нЦТЛ, плотность экспрессии CD95 на мембране раннеапоптотических клеток снижалась в 1,3 раза только при добавлении анти-CD95 МКА ($p = 0,055$). В контроле данный параметр не изменялся (рис. 5б, в).

У детей с ОИМ (как и у здоровых детей) культивирование нТх приводило к снижению процента живых клеток и увеличению процента клеток в поздней стадии апоптоза. В контроле и при добавлении анти-CD95 МКА процент живых клеток снижался в 1,3 и в 1,2 раза ($p = 0,019$ и $p = 0,046$ соответственно), а процент нТх в поздней стадии апоптоза возрастал в 5,4 и в 3,5 раза ($p < 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно) по сравнению со свежеизолированными клетками. Процент нТх в ранней стадии апоптоза при этом не изменялся (рис. 5а).

В отличие от нормы, снижение процента живых нТх у детей с ОИМ происходило только за счет снижения процента живых CD95⁺ клеток, в то время как процент живых CD95⁻ нТх не изменялся. В контроле и при добавлении анти-CD95 МКА процент живых CD95⁺ нТх был ниже в 1,4 и в 1,5 раза соответственно ($p < 0,001$ в обоих случаях) по сравнению со свежеизолированными клетками. Также выявлено снижение плотности экспрессии рецептора на поверхности живых клеток в контроле в 1,4 раза ($p = 0,010$) и при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,5 раза ($p = 0,003$) (рис. 5б, в).

У детей с ОИМ, в отличие от здоровых детей, не наблюдали изменений процента CD95⁻ и CD95⁺ нТх в ранней стадии апоптоза как в контроле, так и при добавлении анти-CD95 МКА. При этом выявлено снижение плотности экспрессии CD95 в контроле — в 1,2 раза ($p = 0,010$) и при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,6 раза ($p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными клетками (рис. 5б, в).

При ОИМ в отличие нормы процент живых нЦТЛ изменялся только в контроле. По сравнению со свежеизолированными клетками он снижался в 1,4 раза ($p = 0,040$). В контроле процент нЦТЛ в ранней стадии апоптоза не изменялся, а при добавлении анти-CD95 МКА — понижался в 1,1 раза ($p = 0,045$). Процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза возрастал как в контроле — в 3,8 раза ($p = 0,009$), так и при добавлении анти-CD95 МКА — в 2,7 раза ($p = 0,001$) (рис. 5а).

У детей с ОИМ в контроле и при добавлении анти-CD95 МКА изменялся процент только живых CD95⁺ нЦТЛ. Он снижался в контроле в 1,4 раза, а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,9 раза ($p < 0,001$ в обоих случаях). При этом только при добавлении анти-CD95 МКА наблюдалось снижение в 1,7 раза плотности экспрессии CD95 на мембране живых нЦТЛ по сравнению со свежеизолированными клетками (рис. 5б, в).

У больных детей процент CD95⁻ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза в контроле и при добавлении анти-CD95 МКА не изменялся. При этом добавление анти-CD95 МКА приводило к снижению в 1,6 раза процента раннеапоптотических CD95⁺ нЦТЛ ($p = 0,003$). В контроле таких изменений не наблюдалось. Выявлено снижение плотности экспрессии CD95 на мембране нЦТЛ в ранней стадии апоптоза в контроле в 1,3 раза ($p = 0,002$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,7 раза ($p = 0,050$) по сравнению со свежеизолированными клетками (рис. 5б, в).

Следует отметить, что у детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми при активации рецептора CD95 процент нЦТЛ на стадии позднего апоптоза снижался в 2,0 раза ($p = 0,029$). В контроле таких различий не выявлено (рис. 4а).

Обсуждение

Исследованы особенности экспрессии рецептора CD95 на мембране наивных Т-лимфоцитов у здоровых детей и детей с ОИМ. Нами показано, что в обоих случаях экспрессия рецептора повышается на поверхности апоптотизирующих нТх и нЦТЛ по сравнению с живыми клетками. При этом стимуляция рецептора CD95 у здоровых детей не приводила к усилению апоптоза нТх и нЦТЛ и не оказывала значимого влияния на процент живых или раннеапоптотических CD95⁻ и CD95⁺ клеток по сравнению с контролем.

Мы полагаем, что у здоровых детей рецептор CD95 не принимает участие в индукции апоптоза изолированных нТх и нЦТЛ. Ранее на мышах было показано, что связывание CD95 на поверхности наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в присутствии анти-CD3 МКА приводит к усилению их гибели [7]. Следовательно, CD95 способен индуцировать апоптоз наивных Т-клеток при условии их активации через Т-клеточный рецептор. При изолированном культивировании, в от-

сутствие межклеточного взаимодействия с другими иммунокомпетентными клетками, функция CD95 как индуктора апоптоза нТх и нЦТЛ в норме не проявлялась.

Степень выраженности апоптоза в различных популяциях изолированных наивных Т-лимфоцитов может зависеть от содержания CD95⁺ клеток. В пользу данного предположения говорит ряд фактов. Так у здоровых детей в свежеизолированных нТх процент живых клеток был выше, а процент клеток в ранней стадии апоптоза ниже по сравнению с нЦТЛ. При этом в нТх процент живых CD95⁻ клеток был выше, а процент живых CD95⁺ клеток ниже, чем в нЦТЛ. Кроме того, вне зависимости от условий культивирования мы наблюдали снижение процента нЦТЛ в стадии раннего апоптоза до уровня, сопоставимого с нТх, на фоне уменьшения содержания фракции CD95⁺ клеток.

Нами показано, что у здоровых детей живые нТх и нЦТЛ отличаются восприимчивостью к апоптозу в зависимости от экспрессии CD95. Культивирование нТх приводило к снижению процента живых CD95⁻ и CD95⁺ клеток. При этом культивирование нЦТЛ сопровождалось снижением процента лишь живых CD95⁻ клеток, тогда как процент CD95⁺ клеток не изменялся. Мы полагаем, что у здоровых детей фракции CD95⁻ и CD95⁺ нТх в равной мере чувствительны к апоптозу. В нЦТЛ, наоборот, апоптозу в основном подвергаются CD95⁺ Т-лимфоциты, в то время как CD95⁻ клетки устойчивы к его индукции. Таким образом, наше предположение о взаимосвязи содержания CD95⁺ клеток и уровня апоптоза суммарного пула наивных Т-лимфоцитов в большей степени относится к нЦТЛ, чем нТх.

Добавление анти-CD95 МКА к нТх и нЦТЛ здоровых детей приводило к специфическому снижению плотности экспрессии рецептора CD95 на поверхности клеток. Следует отметить, что в нТх экспрессия CD95 снижалась на поверхности живых клеток, а в нЦТЛ — на поверхности клеток в ранней стадии апоптоза. Это позволяет предположить, что CD95⁺ нТх и нЦТЛ могут обладать различной восприимчивостью к CD95-зависимому апоптозу. Добавление к нТх анти-CD95 МКА вызывает потерю живыми клетками данного рецептора, что снижает вероятность его связывания с лигандом. В нЦТЛ, наоборот, живые клетки характеризуются постоянным уровнем экспрессии CD95 вне зависимости от стимуляции рецептора. Таким образом, повышенный уровень апоптоза свежеизолированных нЦТЛ по сравнению с нТх может быть связан с повышенной восприимчивостью фракции CD95⁺ нЦТЛ.

У детей с ОИМ процент живых и апоптотирующих свежеизолированных нТх не отличался от нормы. Также не было обнаружено различий в процентном соотношении живых и апоптотирующих CD95⁻ и CD95⁺ нТх у здо-

ровых и больных детей. Вместе с тем, ОИМ характеризуется повышением плотности экспрессии CD95 на поверхности живых и апоптотирующих нТх по сравнению с нормой. В отличие от здоровых детей, у детей с ОИМ при культивировании процент живых клеток снижался только за счет уменьшения количества CD95⁺ клеток (результат получен как в контроле, так и при добавлении анти-CD95 МКА). Процент живых CD95⁻ нТх при этом не изменялся. Мы полагаем, что при ОИМ усиливается восприимчивость CD95⁺ нТх к апоптозу и клетки с таким фенотипом вносят основной вклад в общий уровень апоптоза. В то же время отсутствие различий в содержании CD95⁻ нТх потенциально указывает на снижение их восприимчивости к апоптозу при ОИМ и может являться одним из возможных механизмов поддержания количества нТх на достаточном уровне, необходимом для реализации эффективного иммунного ответа.

При ОИМ процент свежеизолированных нЦТЛ в поздней стадии апоптоза был снижен по сравнению с нормой. При этом процент живых CD95⁺ клеток был выше, чем у здоровых детей. Возможно, что при ОИМ CD95⁺ нЦТЛ менее восприимчивы к индукции апоптоза по сравнению с нормой. При культивировании нЦТЛ детей с ОИМ в контроле снижался процент живых клеток, а при добавлении анти-CD95 МКА этот показатель не изменялся по сравнению со свежеизолированными клетками. Также добавление анти-CD95 МКА приводило к снижению процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза за счет уменьшения содержания CD95⁺ клеток. Таким образом, устойчивость CD95⁺ нЦТЛ к апоптозу при ОИМ реализуется при активации рецептора CD95.

Следует отметить, что при ОИМ добавление анти-CD95 МКА приводило к снижению процента живых CD95⁺ нЦТЛ по сравнению со свежеизолированными клетками, в то время как общее количество живых нЦТЛ не изменялось. При этом мы наблюдали выраженное (в 1,4 раза), хотя и статистически незначимое повышение процента живых CD95⁻ нЦТЛ по сравнению со свежеизолированными клетками. Полученные результаты позволяют предположить, что при ОИМ активация рецептора CD95 на поверхности живых нЦТЛ приводит к смене фенотипа клеток с CD95⁺ на CD95⁻.

Существует два возможных пути потери клетками мембранного рецептора: его интернализация и шеддинг. Известно, что для реализации сигнального каскада, опосредованного «рецепторами смерти», требуется формирование мембранных кластеров, содержащих комплексы рецептора, лиганда и адапторных молекул, а также интернализация таких ассоциатов. Интернализация CD95 при связывании с лигандом может приводить к смене фенотипа клетки. При этом устойчивость клеток к апоптозу может

достигаться за счет усиленной экспрессии антиапоптотических факторов Vcl-2 и Vcl-X_L, наблюдаемой в CD95⁺CD8⁺ Т-лимфоцитах периферической крови при ВЭБ-инфекции [30].

Другим возможным механизмом смены фенотипа CD95⁺ нЦТЛ при ОИМ может быть шеддинг мембранной формы рецептора с образованием растворимой формы sCD95. Показано, что уровень sCD95 в сыворотке крови пациентов с инфекционным мононуклеозом повышен по сравнению со здоровыми волонтерами [25]. В данном контексте потеря поверхностного CD95 при ОИМ может рассматриваться как защитный механизм, предотвращающий связывание рецептора с лигандом и развитие CD95-опосредованного апоптоза в нЦТЛ.

Считается, что снижение экспрессии CD95 на циркулирующих лимфоцитах у детей с ВЭБ ассоциировано с усилением клинических симптомов ОИМ и расценивается как неблагоприятный признак [1]. Наши результаты позволяют предположить, что при ОИМ, по крайней мере

для нЦТЛ, CD95 может играть протективную роль, способствуя снижению чувствительности клеток к апоптозу и сохранению общего пула цитотоксических Т-лимфоцитов, играющих ведущую роль в реализации противовирусного иммунного ответа.

Таким образом, нами показано, что у здоровых детей апоптозу подвергались как CD95⁺, так и CD95⁻ нТх, в то время как для нЦТЛ была характерна гибель только CD95⁺ клеток. При этом в норме у детей рецептор CD95 не являлся индуктором апоптоза изолированных Т-лимфоцитов. В отличие от здоровых детей при развитии ОИМ апоптозу подвергались только CD95⁺ клетки, тогда как CD95⁻ нТх и нЦТЛ не были восприимчивы к индукции клеточной гибели. При этом специфическая активация рецептора CD95 сопровождалась снижением чувствительности к апоптозу нЦТЛ. Подобные изменения могут являться частью защитного механизма при ОИМ, который выражается в уходе нЦТЛ от апоптоза.

Список литературы/References

1. Сомова Л.М., Беседнова Н.Н., Плехова Н.Г. Апоптоз и инфекционные болезни // *Инфекция и иммунитет*. 2014. Т. 4, № 4. С. 303–318. [Somova L.M., Besednova N.N., Plekhova N.G. Apoptosis and infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 303–318. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-303-318 (In Russ.)]
2. Филатова Е.Н., Уткин О.В., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д., Краснов В.В., Сениягина Н.Е., Кулова Е.А., Ефимов Е.И. Оценка уровня апоптоза наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с острым инфекционным мононуклеозом при активации рецепторов CD95 и DR3 // *Современные технологии в медицине*. 2015. Т. 7, № 3. С. 109–118. [Filatova E.N., Utkin O.V., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Sycheva T.D., Krasnov V.V., Senyagina N.E., Kulova E.A., Efimov E.I. Assessment of apoptosis level of naive CD8⁺ T-lymphocytes in children with acute infectious mononucleosis in CD95 and DR3 receptors activation. *Sovremennye tehnologii v medicine = Modern Technologies in Medicine*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 109–118. doi: 10.17691/stm2015.7.3.16 (In Russ.)]
3. Электронный эпидемиологический атлас Приволжского федерального округа [Electronic epidemiological atlas of the Volga Federal District]. URL: <http://epid-atlas.nniem.ru> (дата обращения: 20.01.2016)
4. Alderson M.R., Armitage R.J., Maraskovsky E., Tough T.W., Roux E., Schooley K., Ramsdell F., Lynch D.H. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, no. 6, pp. 2231–2235.
5. Balfour H.H., Dunmire S.K., Hogquist K.A. Infectious mononucleosis. *Clin. Transl. Immunol.*, 2015, vol. 4, no. 2, e:33. doi:10.1038/cti.2015.1
6. Budd R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 109, no. 4, pp. 437–442.
7. Desbarats J., Wade T., Wade W.F., Newell M.K. Dichotomy between naive and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, no. 14, pp. 8104–8109.
8. Gastwirth J.L., Gel Y.R., Hui W.L.W., Lyubchich V., Miao W., Noguchi K. lawstat: an R package for biostatistics, public policy, and law. Version 2.4.1, 2013. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/lawstat/index.html>
9. Napurachchi T., Lewis J., Callard R.E. A mechanistic model for naive CD4 T cell homeostasis in healthy adults and children. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 4, no. 366. doi:10.3389/fimmu.2013.00366
10. Hislop A.D., Taylor G.S., Sauce D., Rickinson A.B. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein–Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 25, pp. 587–617. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553
11. Hothorn T., Bretz F., Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.*, 2008, vol. 50, no. 3, pp. 346–363. doi: 10.1002/bimj.200810425
12. Janols H., Bredberg A., Thuvesson I., Janciauskiene S., Grip O., Wullt M. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. *BMC Infect. Dis.*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2334-10-205
13. Karcheva M., Lukanov T., Gecheva S., Slavcheva V., Veleva G., Nachev R. Infectious mononucleosis diagnostic potentials. *J. IMAB*, 2008, vol. 14, no. 1, pp. 9–13.
14. Kimura M.Y., Pobezinsky L.A., Guinter T., Thomas J., Adams A., Park J.H., Tai X., Singer A. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8 T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 143–151. doi: 10.1038/ni.2494
15. Le Meur N., Hahne F., Ellis B., Haaland P. flowCore: Basic structures for flow cytometry data. R package version 3.1.1., 2014. URL: <http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/flowCore.html>
16. Long H.M., Chagoury O.L., Leese A.M., Ryan G.B., James E., Morton L.T., Abbott R.J.M., Sabbah S., Kwok W., Rickinson A.B. MHC II tetramers visualize human CD4⁺ T cell responses to Epstein–Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J. Exp. Med.*, 2013, vol. 210, no. 5, pp. 933–949. doi: 10.1084/jem.20121437

17. Mao J.Q., Yang S.L., Song H., Zhao F.Y., Xu X.J., Gu M.E., Tang Y.M. Clinical and laboratory characteristics of chronic active Epstein–Barr virus infection in children. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2014, vol. 16, no. 11, pp. 1081–1085.
18. Moss D.J., Bishop C.J., Burrows S.R., Ryan J.M. T lymphocytes in infectious mononucleosis. I. T cell death in vitro. *Clin. Exp. Immunol.*, 1985, vol. 60, no. 1, pp. 61–69.
19. Palendira U., Low C., Chan A., Hislop A.D., Ho E., Phan T.G., Deenick E., Cook M.C., Riminton D.S., Choo S., Loh R., Alvaro F., Booth C., Gaspar H.B., Moretta A., Khanna R., Rickinson A.B., Tangye S.G. Molecular pathogenesis of EBV susceptibility in XLP as revealed by analysis of female carriers with heterozygous expression of SAP. *PLoS Biol.*, 2011, vol. 9, no. 11, e:1001187. doi: 10.1371/journal.pbio.1001187
20. Paulsen M., Janssen O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. *Cell Commun. Signal*, 2011, vol. 9, no. 7. doi: 10.1186/1478-811X-9-7
21. Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D., R Core Team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Version 3.1-117, 2014. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>
22. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL: <https://www.r-project.org>
23. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. URL: <https://www.r-project.org>
24. RStudio Team. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, 2015. URL: <https://www.rstudio.com/products/rstudio>
25. Sato T., Hirasawa A., Kawabuchi Y., Nishikawa T., Wakabayashi Y. Cellular expressions and serum concentrations of Fas ligand and Fas receptor in patients with infectious mononucleosis. *Int. J. Hematol.*, 2000, vol. 72, no. 3, pp. 329–336.
26. Scherrenburg J., Piriou E.R.W.A.N., Nanlohy N.M., Van Baarle D. Detailed analysis of Epstein–Barr virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, vol. 153, no. 2, pp. 231–239. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03699.x
27. Shapiro M., Duca K., Lee K., Delgado-Eckert E., Hawkins J., Jarrah A.S., Laubenbacher R., Polys N.F., Hadinoto V., Thorley-Lawson D.A. A virtual look at Epstein–Barr virus infection: simulation mechanism. *J. Theor. Biol.*, 2008, vol. 252, no. 4, pp. 633–648. doi: 10.1016/j.jtbi.2008.01.032
28. Sulik A., Oldak E., Kroten A., Lipska A., Radziwon P. Epstein–Barr virus effect on frequency of functionally distinct T cell subsets in children with infectious mononucleosis. *Adv. Med. Sci.*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 227–231. doi: 10.1016/j.advms.2014.04.003
29. Tanaka M., Suda T., Takahashi T., Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, pp. 1129–1135.
30. Tanner J.E., Alfieri C. Epstein–Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 6, pp. 3439–3447.
31. Van den Heuvel D., Jansen M.A.E., Dik W.A., Bouallouch-Charif H., Zhao D., Van Kester K.A.M., Smits-Te Nijenhuis M.A.W., Koliijn-Couwenberg M.J., Jaddoe V.W.V., Arens R., Van Dongen J.J.M., Moll H.A., Van Zelm M.C. Cytomegalovirus- and Epstein–Barr virus-induced T-cell expansions in young children do not impair naive T-cell populations or vaccination responses: the generation R study. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 213, no. 2, pp. 233–242. doi: 10.1093/infdis/jiv369
32. Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. *New York: Springer*, 2009, 182 p.
33. Womack J., Jimenez M. Common questions about infectious mononucleosis. *Am. Fam. Physic.*, 2015, vol. 91, no. 6, pp. 372–376.
34. Xing Y., Song H.M., Wei M., Liu Y., Zhang Y.H., Gao L. Clinical significance of variations in levels of Epstein–Barr virus (EBV) antigen and adaptive immune response during chronic active EBV infection in children. *J. Immunotoxicol.*, 2013, vol. 10, no. 4, pp. 387–392. doi: 10.3109/1547691X.2012.758199

Авторы:

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

Анисенкова Е.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

Сычева Т.Д., ординатор кафедры детских инфекций ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия;

Кулова Е.А., к.м.н., ассистент кафедры детских инфекций ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной; доцент кафедры микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Anisenkova E.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Presnyakova N.B., Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Sycheva T.D., Resident Physician, Department of Children Infections, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kulova E.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.02.2016
Принята к печати 25.02.2016

Received 11.02.2016
Accepted 25.02.2016