

ВКЛАД РЕЦЕПТОРОВ CD95 И DR3 В АПОПТОЗ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ В ПЕРИОД РЕКОНВАЛЕСЦЕНЦИИ

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

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

²ФГБОУ ВО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Инфекционный мононуклеоз — широко распространенное заболевание, вызываемое некоторыми представителями семейства *Herpesviridae*. Острая форма инфекционного мононуклеоза развивается преимущественно у детей и на уровне иммунного ответа сопровождается увеличением в периферической крови числа циркулирующих наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Нормализация иммунологических показателей достигается в течение 4–6 месяцев после выздоровления, что служит индикаторным показателем адекватного функционирования иммунной системы. «Рецепторы смерти» CD95 и DR3 участвуют в инициации апоптоза наивных Т-лимфоцитов, как в норме, так и при остром инфекционном мононуклеозе. Целью работы явилась оценка способности рецепторов CD95 и DR3 инициировать апоптоз наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с инфекционным мононуклеозом в период реконвалесценции. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови детей, ранее перенесших инфекционный мононуклеоз. Забор крови проводили повторно спустя 4–6 месяцев после заболевания. На момент проведения исследования у детей не выявлялись клинические и лабораторные признаки инфекционного мононуклеоза. В качестве группы сравнения выступали дети, которые обследовались нами ранее в период развития у них острого инфекционного мононуклеоза, а также условно здоровые дети. Выделение наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов проводили методом негативной магнитной иммуносепарации. Для специфической стимуляции рецепторов CD95 и DR3 использовали моноклональные антитела. Уровень апоптоза и экспрессию «рецепторов смерти» оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Анализировали свежеизолированные клетки, а также клетки, культивируемые с добавлением соответствующих моноклональных антител. Показано, что период выздоровления сопровождался усилением апоптоза свежеизолированных наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с острой фазой инфекционного мононуклеоза. При этом в обеих популяциях наивных Т-лимфоцитов наблюдалось повышение восприимчивости CD95⁺ клеток к апоптозу. В культуре клеток стимуляция CD95 не приводила к изменению уровня апоптоза наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. В свежеизолированных наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах DR3⁺ клетки были резистентными к апоптозу, а в процессе культивирования их чувствительность изменялась в зависимости от субпопуляционной принадлежности. Так, в культуре наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов DR3 не участвовал в передаче проапоптотического сигнала. В культуре наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов DR3⁺ клетки усиливали апоптоз клеток, не экспрессирующих этот рецептор. При этом активация DR3 моноклональными антителами в культуре вызывала гибель DR3⁺ наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов,

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.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniem.ru

Contacts:

Elena N. Filatova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya Yamskaya str., 71,
Blokhiina Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniem.ru

Библиографическое описание:

Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Кулова Е.А., Уткин О.В.
Вклад рецепторов CD95 и DR3 в апоптоз наивных Т-лимфоцитов
у детей с инфекционным мононуклеозом в период реконвалесценции //
Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 141–150.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-141-150

Citation:

Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Kulova E.A., Utkin O.V.
Role of CD95 and DR3 receptors in naive T-lymphocytes apoptosis in children
with infectious mononucleosis during convalescence // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2,
pp. 141–150. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-141-150

© Филатова Е.Н. и соавт., 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-141-150>

что закономерно сопровождалось снижением проапоптотической активности этих клеток и приводило к ингибированию апоптоза суммарного пула наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Таким образом, функциональная способность рецепторов CD95 и DR3 участвовать в инициации апоптоза наивных Т-лимфоцитов у детей в период реконвалесценции инфекционного мононуклеоза различается и зависит от их принадлежности к наивным CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам.

Ключевые слова: CD95, DR3, апоптоз, наивные Т-лимфоциты, CD4, CD8, инфекционный мононуклеоз.

ROLE OF CD95 AND DR3 RECEPTORS IN NAÏVE T-LYMPHOCYTES APOPTOSIS IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS DURING CONVALESCENCE

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

^a Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

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

Abstract. Infectious mononucleosis is a widespread disease caused by certain members of *Herpesviridae* family. Acute infectious mononucleosis develops predominantly in children and is accompanied by an increase of the number of circulating naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes in the peripheral blood. The normalization of immunological parameters is achieved within 4–6 months after recovery and that is an indicator of a proper functioning of the immune system. CD95 and DR3 death receptors are involved in the initiation of apoptosis of naive T-lymphocytes in healthy people and in patients with infectious mononucleosis. The aim of the study was to evaluate the ability of CD95 and DR3 receptors to initiate apoptosis of naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes in children with infectious mononucleosis during convalescence. The material for the study was the samples of the peripheral blood of children who previously had infectious mononucleosis. The blood sampling was carried out again after 4–6 months after the disease. At the time of the study, children did not display clinical and laboratory signs of infectious mononucleosis. Same children who were examined earlier in the period of the development of acute infectious mononucleosis, as well as relatively healthy children were used as the comparison groups. Isolation of naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes was performed by negative magnetic immunoseparation. For specific stimulation of CD95 and DR3 receptors monoclonal antibodies were used. The level of apoptosis and expression of death receptors were evaluated by flow cytometry. Freshly isolated cells were analyzed, as well as cells cultured with the addition of appropriate monoclonal antibodies. It was shown that the recovery period was accompanied by increased apoptosis of freshly isolated naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes compared with the acute phase of infectious mononucleosis. Thus in both populations of naive T-cells showed an increase of CD95⁺ cells' susceptibility to apoptosis. CD95 stimulation in the cell culture did not lead to the change in the level of apoptosis of naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes. The freshly isolated naive CD4⁺ and naive CD8⁺ T-lymphocytes DR3⁺ cells were resistant to apoptosis, and in the process of cultivating their sensitivity varied depending on the subpopulation belonging. Thus in the culture of naive CD4⁺ T-lymphocytes DR3 was not involved in the transfer of pro-apoptotic signal. In the culture of naive CD8⁺ T-lymphocytes DR3⁺ cells were possible to increase the apoptosis of DR3-negative cells. At the same time the DR3 activation by monoclonal antibodies in the culture caused the death of DR3⁺ naive CD8⁺ T-lymphocytes that naturally associated with decreased proapoptotic activity of these cells and resulted in inhibition of apoptosis of total pool of naive CD8⁺ T-lymphocytes. Thus, the functional ability of CD95 and DR3 receptors to trigger an apoptosis of naive T-lymphocytes in children during convalescence of infectious mononucleosis varied and depended on their belonging to naive CD4⁺ or naive CD8⁺ T-lymphocytes.

Key words: CD95, DR3, apoptosis, naive T-lymphocytes, CD4, CD8, infectious mononucleosis.

Введение

В настоящее время в педиатрической практике проблема инфекционного мононуклеоза (ИМ) является одной из наиболее актуальных. Инфекционный мононуклеоз — полиэтиологичное заболевание, чаще всего вызываемое вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловирусом (ЦМВ) и герпесвирусом человека 6 типа (ВГЧ 6). Данными возбудителями инфицировано более 90% мирового населения, однако симптомы острого заболевания развиваются редко, чаще всего у детей и подростков [6].

Иммунный ответ при остром ИМ характеризуется увеличением числа специфических противовирусных CD4⁺ и, в большей степени, CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови [7, 10, 11]. Абсолютное содержание наивных Т-клеток, являющихся предшественниками эффекторных Т-лимфоцитов, также возрастает в течение острой стадии заболевания [1, 12, 14]. Снижение абсолютного количества наивных CD4⁺ (нТх) и CD8⁺ (нЦТЛ) Т-лимфоцитов в этот период является неблагоприятным признаком и свидетельствует о хронизации инфекции [13, 15]. Содержание наивных Т-лимфоцитов в кро-

ви зависит от уровня апоптоза покоящихся и делящихся клеток [9]. На молекулярном уровне инициация клеточной гибели Т-лимфоцитов реализуется с участием так называемых «рецепторов смерти» [3].

В период реконвалесценции ИМ наблюдается нормализация иммунологических показателей в течение 4–6 месяцев. Однако у части детей, перенесших острый ИМ, отклонения показателей клеточного звена иммунитета продолжают выявляться спустя полгода и более, что связывают с формированием вторичного иммунодефицита. Выявление признаков нарушения работы иммунной системы в эти сроки, в том числе на молекулярном уровне, требует проведения активных мероприятий, направленных на подавление инфекционного процесса и восстановление иммунологических функций [1].

Ранее нами показано, что у детей в норме и при остром течении ИМ члены белкового семейства «рецепторов смерти» CD95 (Fas, Apo-1) и DR3 (LARD, Apo-3) играют неоднозначную роль в инициации апоптоза иммунокомпетентных клеток, в том числе наивных Т-лимфоцитов [2, 4]. При остром ИМ наблюдали снижение уровня апоптоза нЦТЛ после активации рецепторов CD95 и DR3. Уровень апоптоза нТх при заболевании не изменялся [5, 8]. Функциональная направленность рецепторов CD95 и DR3 в отношении наивных Т-лимфоцитов детей с ИМ в период реконвалесценции не известна.

Целью данного исследования явилась апоптоз-ассоциированная оценка последствий активации рецепторов CD95 и DR3 для наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с ИМ в период реконвалесценции.

Материалы и методы

Данная работа явилась заключительным этапом в изучении вклада рецепторов CD95 и DR3 в апоптоз наивных Т-лимфоцитов у детей при ИМ. В исследовании приняли участие дети в возрасте от 9 до 16 лет, ранее переболевшие острым ИМ. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови. Забор крови проводили повторно спустя 4–6 месяцев после заболевания по согласованию с родителями или опекунами, а также с разрешения этического комитета. На момент забора материала у детей не выявлялись клинические и лабораторные признаки ИМ. В качестве группы сравнения выступали те же дети, которые обследовались нами ранее в период развития острого ИМ, а также условно здоровые дети сопоставимого пола и возраста (результаты опубликованы в предыдущих работах) [5, 8].

Ход работы полностью соответствовал описанному ранее. Популяции нТх и нЦТЛ вы-

деляли методом негативной магнитной иммуносепарации с применением коммерческих наборов серии EasySep («Stemcell Technologies», Великобритания) согласно инструкции производителя. Чистоту выделения наивных Т-клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии с применением панели флуоресцентно меченых антител. Чистота выделения наивных Т-лимфоцитов составила более 98%. 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 мышиными моноклональными антителами (МКА) против CD95 человека (изотип IgM, клон СН-11, «Beckman Coulter», США) либо против DR3 человека (клон JD3, изотип IgG1 kappa, «eBioscience», США) в концентрации 200 нг/мл. Контрольные наивные Т-клетки инкубировали с добавлением фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4).

Оценку уровня апоптоза и экспрессии рецепторов CD95 и DR3 проводили методом проточной цитофлуориметрии. Использовали проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II («Becton, Dickinson and Company», США). Настройки напряжения на фотоумножителях и настройки компенсации флуоресценции оптимизировали с помощью коммерческих наборов «Cytometry set up and tracking beads» и «Anti-mouse Ig, k/negative control compensation particles set» («BD Biosciences», США). Уровень фонового свечения для флуоресцентно меченых антител определяли с применением соответствующих изотипических контролей. Сбор данных проводили в программе FACSDiva («BD Biosciences», США). В каждом образце анализировали 30 000 клеток. Анализировали клетки в четырех вариантах: свежеизолированные, культивируемые контрольные, культивируемые с добавлением анти-CD95 МКА и культивируемые с добавлением анти-DR3 МКА.

Уровень апоптоза наивных Т-лимфоцитов определяли с применением флуоресцентно меченых антител Annexin V-FITC (AV) («eBioscience», США) и 7-аминоактиномицином-D (7AAD) («BD Pharmigen», США). В зависимости от двойного окрашивания лимфоциты различали как живые (AV⁻7AAD⁻), в ранней стадии апоптоза (AV⁺7AAD⁻) и в поздней стадии апоптоза (AV⁺7AAD⁺). Определяли процент живых клеток, клеток в ранней и поздней стадии апоптоза от общего числа клеток в гейте лимфоцитов. В дальнейшем гейты живых и ранне-апоптотических Т-лимфоцитов анализировали отдельно.

В каждом гейте определяли поверхностную экспрессию CD95 и DR3. Применяли флуоресцентно окрашенные антитела CD95-PE-Cy7 и DR3-PE («eBioscience», США). Подсчитывали процент живых и находящихся в ранней стадии апоптоза CD95⁻, CD95⁺, DR3⁻ и DR3⁺ клеток от общего количества клеток в гейте лимфоцитов. Плотность экспрессии молекул на поверхности наивных Т-лимфоцитов оценивали исходя из средней интенсивности флуоресценции несущих рецепторы клеток (MFI).

Статистический анализ проводили с применением парного и непарного t-критерия Стьюдента либо парного и непарного критерия Уилкоксона. Для оценки влияния условий культивирования Т-лимфоцитов на исследуемые параметры использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями либо критерий Фридмана, а также модель логистической регрессии со смешанными эффектами. Значения «р» при множественных сравнениях корректировали с помощью поправки Холма-Бонферрони. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. В тексте результаты представляли с указанием 95%-ного доверительного интервала (ДИ) разницы средних в абсолютных значениях.

Результаты

Оценка уровня апоптоза и экспрессии рецепторов CD95 и DR3 в свежеизолированных нТх детей с ИМ в период реконвалесценции

Выздоровление после ИМ сопровождалось снижением количества живых нТх и увеличением числа клеток в ранней стадии апоптоза по сравнению с острым периодом заболевания. Количество живых нТх снижалось в 1,27 раза (ДИ = 3,76–26,47%, $p = 0,016$), а содержание клеток в ранней стадии апоптоза увеличивалось в 2,08 раза (ДИ = 6,65–23,82%, $p = 0,004$). Процент нТх в поздней стадии апоптоза не изменялся (рис. 1А).

При сравнении реконвалесцентом и условно здоровых детей различий в процентах живых и апоптотирующих свежеизолированных нТх выявлено не было (рис. 2А).

В период реконвалесценции процент свежеизолированных живых CD95⁺ нТх снижался в 1,31 раза (ДИ = 1,88–17,57%, $p = 0,022$) по сравнению с острым периодом заболевания. Процент живых CD95⁻ клеток, а также плотность экспрессии данного рецептора на мембране нТх не изменялись. На стадии выздоровления наблюдалось снижение процента живых DR3⁻ нТх в 1,50 раза (ДИ = 10,68–34,43%, $p = 0,003$) и возрастание процента живых DR3⁺ клеток в 3,56 раза (ДИ = 4,58–10,30, $p < 0,001$). Также выявлено повышение плотности экспрессии DR3 в 2,11 раза (ДИ = 17,50–47,76, $p = 0,002$) на поверхности живых нТх у детей после пере-

несенного заболевания по сравнению с острой фазой ИМ (рис. 1Б–Г).

При сравнении свежеизолированных живых нТх условно здоровых детей и детей в период реконвалесценции различий в экспрессии CD95 и DR3 обнаружено не было (рис. 2Б–Г).

По сравнению с острым периодом ИМ при реконвалесценции процент раннеапоптотических CD95⁻ нТх возрастал в 2,35 раза (ДИ = 2,68–11,24%, $p = 0,006$), а процент CD95⁺ клеток — в 1,93 раза (ДИ = 3,40–13,15%, $p = 0,005$). При этом процент раннеапоптотических DR3⁻ нТх увеличивался в 1,85 раза (ДИ = 3,54–17,66%, $p = 0,009$), а процент DR3⁺ клеток в 3,90 раза (ДИ = 2,68–6,59%, $p < 0,001$). Плотность экспрессии «рецепторов смерти» на мембране раннеапоптотических нТх при реконвалесценции, наоборот, снижалась в 1,99 раза (ДИ = 29,18–1207,18, $p = 0,023$) и в 10,11 раза (ДИ = 92,02–1571,47, $p = 0,033$) (для рецепторов CD95 и DR3 соответственно) (рис. 1Б–Г).

При сравнении свежеизолированных нТх детей после выздоровления с условно здоровыми детьми выявлено возрастание процента раннеапоптотических DR3⁻ клеток у реконвалесцентом в 1,81 раза (ДИ = 1,81–18,72%, $p = 0,021$). Других отличий в экспрессии CD95 и DR3 не обнаружено (рис. 2Б–Г).

Оценка уровня апоптоза и экспрессии рецепторов CD95 и DR3 в свежеизолированных нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции

Как и в нТх, в свежеизолированных нЦТЛ детей в период выздоровления выявлены изменения уровня апоптоза клеток по сравнению с острым периодом ИМ. Реконвалесценция сопровождалась снижением процента живых нЦТЛ в 1,42 раза (ДИ = 5,98–31,89%, $p = 0,011$) и возрастанием процента клеток в ранней стадии апоптоза в 2,01 раза (ДИ = 8,79–24,46%, $p = 0,002$). Процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза не изменялся (рис. 1А).

В свежеизолированных нЦТЛ детей после выздоровления выявлено возрастание процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза в 1,45 раза (ДИ = 1,54–20,19%, $p = 0,025$) по сравнению с условно здоровыми детьми. Других различий в содержании нЦТЛ не обнаружено (рис. 2А).

В период реконвалесценции по сравнению с острым периодом ИМ изменения экспрессии CD95 и DR3 в живых нЦТЛ были аналогичны нТх. Реконвалесценция сопровождалась снижением процента свежеизолированных живых CD95⁺ нЦТЛ в 1,56 раза (ДИ = 5,07–22,49%, $p = 0,007$), тогда как процент живых CD95⁻ клеток и плотность экспрессии данного рецептора не изменялись. Процент живых DR3⁻ нЦТЛ при выздоровлении снижался в 1,72 раза (ДИ = 12,25–35,59%, $p = 0,003$), а процент живых DR3⁺

клеток возрастал в 3,04 раза (ДИ = 3,65–9,32%, $p = 0,001$). Также выявлено увеличение плотности экспрессии DR3 в 2,25 раза (ДИ = 21,44–50,01, $p < 0,001$) на мембране живых нЦТЛ у реконвалесцентов (рис. 1Б-Г).

У детей после выздоровления выявлено увеличение плотности экспрессии CD95 в 1,05 раза

(ДИ = 68,34–93,83, $p < 0,001$) и снижение плотности экспрессии DR3 в 1,54 раза (ДИ = 17,92–70,61, $p < 0,001$) на поверхности живых нЦТЛ по сравнению с условно здоровыми детьми. В данных группах сравнения других различий в экспрессии «рецепторов смерти» не обнаружено (рис. 2Б-Г).

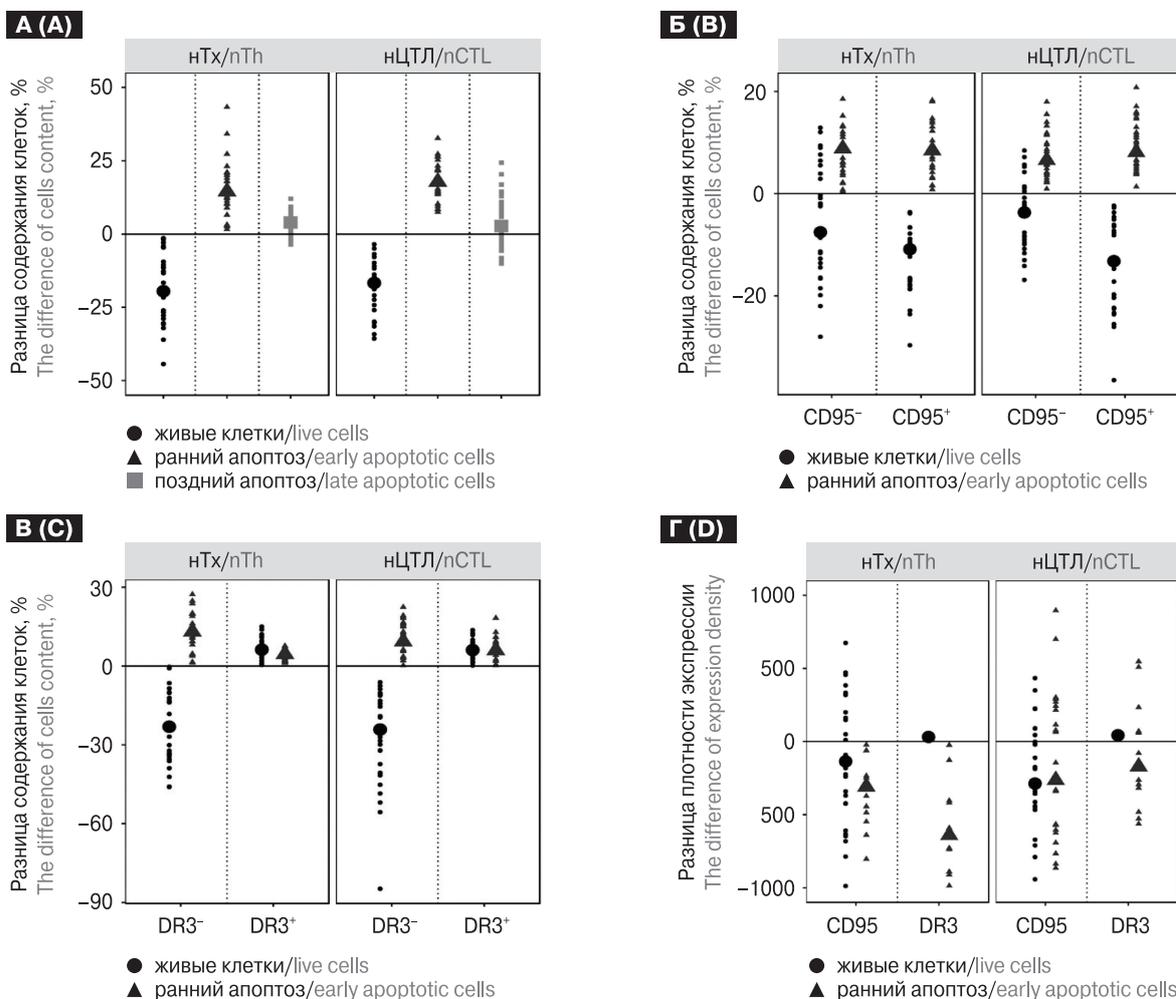


Рисунок 1. Разница содержания живых и апоптотических клеток, а также экспрессии рецепторов CD95 и DR3 среди нТх и нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции по сравнению с периодом острого заболевания

Figure 1. The difference between the content of live and apoptotic cells and the expression of CD95 and DR3 receptors among nTh and nCTL in children with infectious mononucleosis (IM) during convalescence compared with the period of acute illness

Примечания. На рисунке приведены разности параметров детей в период реконвалесценции и в период острого ИМ. Крупным знаком обозначены медианы выборок. А) Разница процента живых наивных Т-лимфоцитов, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. Б) Разница процента CD95⁻ и CD95⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. В) Разница процента DR3⁻ и DR3⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. Г) Разница плотности экспрессии CD95 на поверхности CD95⁺ наивных Т-лимфоцитов и DR3 на поверхности DR3⁺ наивных Т-лимфоцитов. Для наглядности указаны значения в интервале [-1000; +1000].

Notes. The figure shows the difference between the parameters in children during convalescence and acute IM. The large sign marks the sample median. A) The difference between the percentages of live naive T-lymphocytes, cells in the early and late stages of apoptosis. B) The difference between the percentage of CD95⁻ and CD95⁺ cells in live and apoptotic naive T-lymphocytes. C) The difference between the percentages of DR3⁻ and DR3⁺ cells in live and apoptotic naive T-lymphocytes. D) The difference between densities of the CD95 expression on the surface of CD95⁺ naive T-lymphocytes and DR3 expression on the surface of DR3⁺ naive T-lymphocytes. For clarity the values listed in the range [-1000; +1000].

По сравнению с периодом острого ИМ при реконвалесценции процент раннеапоптотических CD95⁻ нЦТЛ увеличивался в 2,46 раза (ДИ = 4,10–12,09%, $p = 0,002$), а процент раннеапоптотических CD95⁺ клеток в 1,79 раза (ДИ = 4,36–12,70%, $p = 0,002$). Процентное содержание DR3⁻ и DR3⁺ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза при выздоровлении также возрастало в 1,71 и 4,29 раза (ДИ = 5,05–15,42%, $p = 0,002$ и ДИ = 2,98–9,80%, $p = 0,003$) соответственно. Плотность экспрессии CD95 на мембране нЦТЛ в ранней стадии апоптоза, наоборот, снижалась в 1,98 раза (ДИ = 52,12–1155,98, $p = 0,023$) на фоне отсутствия изменений плотности экспрессии DR3 (рис. 1Б-Г).

По сравнению с условно здоровыми детьми у реконвалесцентов наблюдалось повышение процента свежеизолированных раннеапоптотических CD95⁻ и CD95⁺ нЦТЛ в 1,44 и 1,46 раза (ДИ = 0,27–9,87%, $p = 0,046$ и ДИ = 1,11–11,59%, $p = 0,021$) соответственно. Процент раннеапоптотических DR3⁻ нЦТЛ возрастал в 1,58 раза (ДИ = 2,31–16,98%, $p = 0,013$), а процент раннеапоптотических DR3⁺ клеток, а также плотность экспрессии CD95 и DR3 не изменялись (рис. 2Б-Г).

Влияние активации рецепторов CD95 и DR3 на апоптоз нТх детей с ИМ в период реконвалесценции

У детей в период реконвалесценции культивирование контрольных нТх приводило к снижению процента живых и раннеапоптотических клеток в 1,22 и в 1,50 раза (ДИ = 3,00–24,32%, $p = 0,008$ и 2,98–18,17%, $p = 0,003$) соответственно, по сравнению со свежеизолированными клетками. Процент нТх в поздней стадии апоптоза, наоборот, возрастал в 3,31 раза (ДИ = 7,45–31,29%, $p < 0,001$). Схожие результаты были получены при специфической активации рецепторов CD95 и DR3. При добавлении анти-CD95 МКА процент живых и раннеапоптотических нТх снижался в 1,24 раза и в 1,64 раза (ДИ = 3,22–28,63%, $p = 0,10$ и ДИ = 5,14–20,46%, $p < 0,001$), соответственно, а процент нТх в поздней стадии апоптоза возрастал в 3,50 раза (ДИ = 8,28–39,52%, $p = 0,001$). Добавление анти-DR3 МКА приводило к снижению процентного содержания живых и раннеапоптотических нТх в 1,23 раза и в 1,34 раза (ДИ = 2,82–24,15%, $p = 0,008$ и ДИ = 1,06–16,26%, $p = 0,015$) соответственно. Процент нТх в поздней стадии апоптоза при этом возрастал в 2,87 раза (ДИ = 4,99–28,83%, $p = 0,002$) (рис. 2А).

При активации CD95 различий в экспрессии данного рецептора живыми и апоптотирующими нТх обнаружено не было. Как в культивируемом контроле, так и при добавлении анти-CD95 МКА наблюдалось уменьшение

процента живых CD95⁺ клеток. В контроле процент живых CD95⁺ нТх снижался в 1,26 раза (ДИ = 2,95–18,00%, $p = 0,003$), а при активации CD95 в 1,31 раза (ДИ = 1,23–16,28%, $p = 0,013$). Процент живых CD95⁻ нТх в обоих случаях не изменялся. Обнаружено снижение плотности экспрессии CD95 на мембране живых нТх при культивировании по сравнению со свежеизолированными клетками. В контроле плотность экспрессии снижалась в 1,28 раза (ДИ = 27,05–152,08, $p = 0,002$), а при активации CD95 в 1,21 раза (ДИ = 6,25–131,56, $p = 0,019$). Как в контроле, так и при специфической активации CD95 процент CD95⁻ и CD95⁺ нТх в ранней стадии апоптоза не изменялся. При этом в обоих случаях культивирование приводило к снижению плотности экспрессии рецептора на мембране раннеапоптотических клеток: в контроле — в 1,30 раза (ДИ = 34,65–179,08, $p = 0,002$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,25 раза (ДИ = 6,75–151,18, $p = 0,021$) (рис. 2Б, Г).

Как в контроле, так и при активации DR3 в пуле живых нТх снижался процент DR3⁻ и DR3⁺ клеток, а плотность экспрессии DR3 не изменялась по сравнению со свежеизолированными нТх. В контроле процент живых DR3⁻ клеток снижался в 1,19 раза (ДИ = 0,85–19,67%, $p = 0,026$), а процент живых DR3⁺ нТх — в 1,42 раза (ДИ = 1,70–5,12%, $p < 0,001$). При добавлении анти-DR3 МКА процент живых DR3⁻ и DR3⁺ нТх также снижались в 1,19 раза (ДИ = 1,13–19,96%, $p = 0,026$) и в 1,32 раза (ДИ = 1,24–4,65%, $p < 0,001$). В пуле раннеапоптотических нТх независимо от стимуляции DR3 культивирование сопровождалось снижением процента DR3⁻ клеток на фоне отсутствия различий процента DR3⁺ нТх. Процент раннеапоптотических DR3⁻ нТх снижался в контроле в 1,45 раза (ДИ = 0,09–13,02%, $p = 0,042$), а при добавлении анти-DR3 МКА в 1,29 раза (ДИ = 1,57–14,68%, $p = 0,011$). Также в обоих случаях культивирование приводило к снижению плотности экспрессии DR3 на мембране нТх в ранней стадии апоптоза. В контроле плотность экспрессии рецептора снижалась в 1,23 раза (ДИ = 6,55–31,88, $p = 0,001$), а при добавлении анти-DR3 МКА в 1,33 раза (ДИ = 2,41–27,74, $p = 0,012$) (рис. 2В, Г).

Влияние активации рецепторов CD95 и DR3 на апоптоз нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции

При культивировании нЦТЛ детей в период выздоровления после острого ИМ нами выявлено снижение процента живых и раннеапоптотических нЦТЛ и возрастание процента клеток в поздней стадии апоптоза в контроле и при активации CD95. В контроле процент живых и раннеапоптотических нЦТЛ снижался в 1,22 и 1,83 раза (ДИ = 0,56–16,25%, $p = 0,023$ и ДИ =

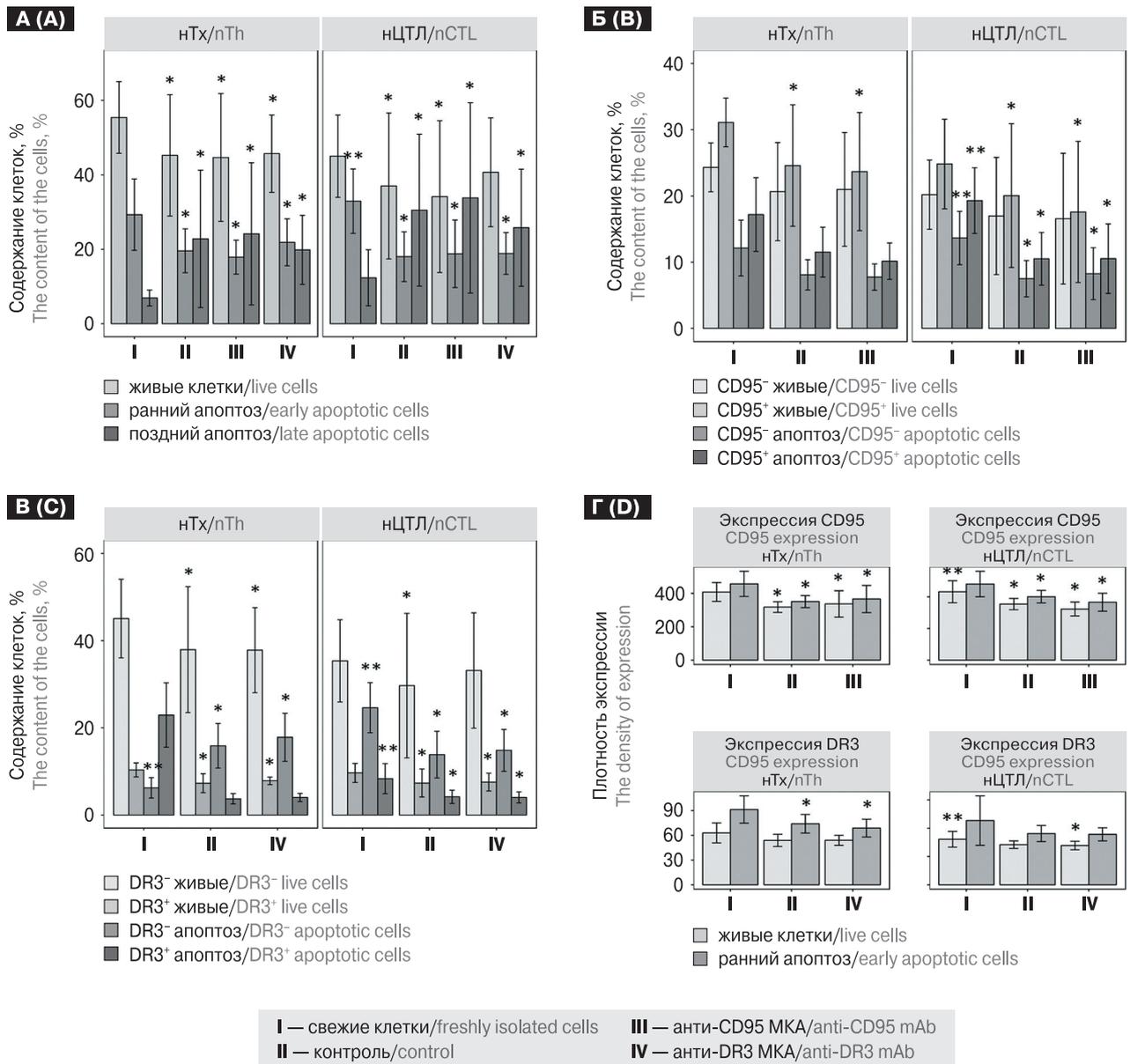


Рисунок 2. Содержание живых и апоптотических клеток, а также экспрессия рецепторов CD95 и DR3 среди нТх и нЦТЛ детей с ИМ в период реконвалесценции

Figure 2. Percentage of live and apoptotic cells and also the expression of CD95 and DR3 receptors among naive T-helpers (nTh) and naive cytotoxic T-lymphocytes (nCTL) in children with infectious mononucleosis (IM) during convalescence

Примечания. * — статистически значимые различия при сравнении со свежеизолированными клетками ($p < 0,05$); ** — статистически значимые различия при сравнении со свежеизолированными нТх и нЦТЛ условно здоровых детей ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее значение показателя и стандартное отклонение. 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) Процент DR3⁻ и DR3⁺ клеток среди живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. Г) Плотность экспрессии CD95 на поверхности CD95⁺ наивных Т-лимфоцитов и плотность экспрессии DR3 на поверхности DR3⁺ наивных Т-лимфоцитов.

Notes. * — statistically significant differences compared with freshly isolated cells ($p < 0,05$); ** — statistically significant differences compared with freshly nTh and nCTL of relatively healthy children ($p < 0,05$). Data are presented as the mean and standard deviation. A) The percentage of live naive T-lymphocyte, cells in the early and the late stages of apoptosis. B) The percentage of CD95⁻ and CD95⁺ cells in live and apoptotic naive T- lymphocytes. C) The percentage of DR3⁻ and DR3⁺ cells in live and apoptotic naive T-lymphocytes. D) The density of CD95 expression on the surface of CD95⁺ naive T-cells and DR3 expression on the surface of DR3⁺ naive T-lymphocytes.

8,07–22,91%, $p < 0,001$) соответственно, по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами. Процент клеток в поздней стадии апоптоза возрастал в 2,47 раза (ДИ = 9,36–28,22%, $p < 0,001$). Культивирование нЦТЛ с добавлением анти-CD95 МКА приводило к снижению процента живых и раннеапоптотических клеток в 1,32 и 1,75 раза (ДИ = 3,38–19,04%, $p = 0,002$ и ДИ = 6,29–23,38%, $p < 0,001$) соответственно. Процент клеток в поздней стадии апоптоза при активации CD95 увеличивался в 2,74 раза (ДИ = 10,42–33,69%, $p < 0,001$). При специфической активации DR3 культивирование нЦТЛ не сопровождалось изменением процента живых клеток. Однако процент раннеапоптотических нЦТЛ снижался в 1,75 раза (ДИ = 7,31–22,16%, $p < 0,001$). При этом процент клеток в поздней стадии апоптоза возрастал в 2,09 раза (ДИ = 4,79–23,65%, $p < 0,001$) (рис. 2А).

Как в культивируемом контроле, так и при добавлении анти-CD95 МКА в пуле живых клеток снижался процент только CD95⁺ нЦТЛ. В контроле процент живых CD95⁺ нЦТЛ снижался в 1,24 раза (ДИ = 3,04–11,87%, $p = 0,017$), а при активации CD95 в 1,41 раза (ДИ = 0,55–9,37%, $p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами. Процент живых CD95⁻ клеток в обоих случаях не изменялся. Культивирование сопровождалось снижением плотности экспрессии CD95 на мембране живых нЦТЛ. В контроле плотность экспрессии данного рецептора снижалась в 1,22 раза (ДИ = 21,64–115,62, $p = 0,001$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,32 раза (ДИ = 53,44–147,42, $p < 0,001$). При культивировании нЦТЛ процент CD95⁻ и CD95⁺ клеток в ранней стадии апоптоза снижался по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами вне зависимости от активации CD95. В контроле процент раннеапоптотических CD95⁻ нЦТЛ снижался в 1,82 раза (ДИ = 2,68–10,25%, $p < 0,001$), а процент раннеапоптотических CD95⁺ клеток — в 1,84 раза (ДИ = 4,27–13,79%, $p < 0,001$). При добавлении анти-CD95 МКА процент CD95⁻ клеток в ранней стадии апоптоза понижался в 1,65 раза (ДИ = 1,94–9,51%, $p < 0,001$), а процент раннеапоптотических CD95⁺ нЦТЛ — в 1,83 раза (ДИ = 4,36–13,88%, $p < 0,001$). Как в контроле, так и при активации CD95 плотность экспрессии рецептора на мембране раннеапоптотических нЦТЛ уменьшалась. В контроле плотность экспрессии снижалась в 1,20 раза (ДИ = 7,25–124,86, $p = 0,017$), а при добавлении анти-CD95 МКА — в 1,32 раза (ДИ = 41,76–159,38, $p < 0,001$) (рис. 2Б, Г).

Стимуляция рецептора DR3 при культивировании нЦТЛ сопровождалась изменением его экспрессии в живых клетках. В контроле наблюдалось снижение процента живых DR3⁻ нЦТЛ в 1,19 раза (ДИ = 0,97–13,00%, $p = 0,043$)

и DR3⁺ клеток в 1,31 раза (ДИ = 1,95–3,28%, $p < 0,001$) по сравнению со свежеизолированными Т-лимфоцитами. Культивирование с добавлением анти-DR3 МКА сопровождалось снижением только процента живых DR3⁺ клеток в 1,28 раза (ДИ = 0,74–3,62%, $p < 0,001$). Плотность экспрессии рецептора DR3 на мембране живых клеток при культивировании снижалась только при его активации в 1,16 раза (ДИ = 0,30–16,51, $p = 0,045$). В контроле различий обнаружено не было. В пуле раннеапоптотических нЦТЛ выявлено снижение процента DR3⁻ и DR3⁺ клеток вне зависимости от условий культивирования. В контроле процент раннеапоптотических DR3⁻ нЦТЛ снижался в 1,78 раза (ДИ = 5,75–17,02%, $p < 0,001$), а при добавлении анти-DR3 МКА — в 1,66 раза (ДИ = 4,86–16,13%, $p < 0,001$). Процент DR3⁺ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза в контроле снижался в 2,00 раза (ДИ = 1,73–6,48%, $p < 0,001$), а при активации рецептора — в 2,07 раза (ДИ = 1,86–6,62%, $p < 0,001$). Плотность экспрессии DR3 на мембране раннеапоптотических нЦТЛ не изменялась вне зависимости от добавления анти-DR3 МКА (рис. 2В, Г).

Обсуждение

Нами показано, что в период реконвалесценции у детей с острым ИМ наблюдалось изменение восприимчивости наивных Т-лимфоцитов к апоптозу, в инициации которого неоднозначную роль играли рецепторы CD95 и DR3. Их функциональная направленность зависела от популяционной принадлежности наивных Т-клеток (нТх или нЦТЛ).

В период выздоровления при изолированном культивировании нТх апоптозу подвергались преимущественно CD95⁺ клетки. При этом стимуляция клеток анти-CD95 МКА не оказывала влияние на уровень апоптоза суммарного пула нТх. Ранее нами показано, что CD95 проявляет аналогичные свойства в нТх детей с острым ИМ. У практически здоровых доноров, наоборот, изолированные CD95⁺ нТх человека не обладают повышенной чувствительностью к апоптозу, в том числе, CD95-индуцированному [5]. Мы полагаем, что на стадии выздоровления, как и в острый период ИМ, CD95 является корцепторной молекулой, повышающей восприимчивость экспрессирующих его нТх к апоптозу.

Как и в нТх, в культуре нЦТЛ в период реконвалесценции CD95⁺ нЦТЛ проявляли высокую сенситивность к апоптозу, однако его уровень также не изменялся при активации рецептора CD95. Сходная картина наблюдалась ранее при исследовании условно здоровых детей. Наоборот, в период острого ИМ CD95⁺ нЦТЛ проявляли резистентность к апоптозу, а стимуляция

анти-CD95 МКА вызывала его ингибирование в составе суммарной фракции нЦТЛ [5]. Таким образом, в период реконвалесценции ИМ антиапоптотический потенциал рецептора CD95 снижался на фоне частичного усиления его цитотоксической направленности, что рассматривается нами как элемент «нормализации» функциональных свойств рецептора.

При реконвалесценции DR3⁺ нТх в культуре были восприимчивы к апоптозу. Стимуляция рецептора DR3 не оказывала влияния на уровень апоптоза суммарной фракции наивных CD4⁺ Т-клеток. Вместе с тем, ранее показано, что у практически здоровых детей и в острый период ИМ DR3⁺ нТх проявляли резистентность к апоптозу и подавляли его развитие в DR3⁻ клетках при специфической активации рецептора [8]. Таким образом, в период выздоровления резко падает антиапоптотическая роль рецептора DR3 в составе нТх.

В культуре нЦТЛ, полученных у детей в период реконвалесценции ИМ, выявлена способность DR3⁺ клеток усиливать апоптоз наивных Т-клеток, не экспрессирующих данный рецептор. Сами DR3⁺ нЦТЛ к апоптозу были резистентны. Однако добавление анти-DR3 МКА вызывало гибель DR3⁺ клеток, что сопровождалось снижением их потенциально проапоптогенных свойств в отношении других субпопуляций нЦТЛ и закономерным ингибированием апоптоза суммарной фракции наивных Т-лимфоцитов. Предыдущие исследования показали, что аналогичные свойства рецептора DR3 проявляются в культуре нЦТЛ, полученных у детей в период острого ИМ. У практически здоровых детей в культуре DR3⁺ нЦТЛ, наоборот, проявляли чувствительность к апоптозу, а специфическая активация рецептора DR3 приводила к усилению их проапоптогенных свойств [8]. Следовательно, как в острый период ИМ, так и на стадии реконвалесценции функциональная роль рецептора DR3 сходна.

Нами обнаружено, что по сравнению с острым периодом заболевания у реконвалесцентов

свежеизолированные нТх и нЦТЛ отличались более выраженной чувствительностью к апоптозу. Изменялось относительное содержание этих популяций наивных Т-лимфоцитов, фенотипически различающихся по экспрессии рецепторов CD95 и DR3. Повышение восприимчивости клеток к апоптозу сопровождалось снижением относительного содержания CD95⁺ и увеличением числа DR3⁺ наивных Т-клеток. При этом как нТх, так и в нЦТЛ возрастала плотность экспрессии одного из «рецепторов смерти» — DR3. Таким образом, у детей в период выздоровления повышение уровня апоптоза наивных Т-лимфоцитов было обусловлено возрастанием чувствительности CD95⁺ Т-клеток к апоптозу. В то же время, DR3-экспрессирующие клетки проявляли выраженную резистентность к индукции клеточной смерти.

Усиление апоптоза наивных Т-клеток в период реконвалесценции ИМ, по-видимому, является одним из механизмов снижения количества циркулирующих наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, возрастающего в острой стадии заболевания. У детей в период выздоровления степень выраженности апоптоза свежеизолированных нТх достигала значений, присущих условно здоровым детям. В свежеизолированных нЦТЛ детей в период реконвалесценции уровень апоптоза, наоборот, превышал значения данного показателя в группе сравнения. В ходе исследования нами показано, что у детей в период выздоровления после ИМ рецепторы CD95 и DR3 могут участвовать в регуляции апоптоза наивных Т-лимфоцитов. Их роль различается в зависимости от фенотипической принадлежности клеток.

Усиление восприимчивости наивных Т-клеток к апоптозу, в том числе при специфической активации рецепторов CD95 и DR3, можно рассматривать как дополнительный иммунологический показатель, свидетельствующий о нормализации функционирования Т-клеточного звена иммунитета после перенесенного заболевания.

Список литературы/References

1. Кудин А.П., Романовская Т.Р., Белевцев М.В. Состояние специфического иммунитета при инфекционном мононуклеозе у детей // Медицинский журнал. 2007. № 1 (19). С. 102–106. [Kudin A.P., Romanovskaya T.R., Belevtsev M.V. Condition of the specific immunity in infectious mononucleosis in children. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal*, 2007, no. 1 (19), pp. 102–106. (In Russ.)]
2. Уткин О.В., Бабаев А.А., Филатова Е.Н., Янченко О.С., Старикова В.Д., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Новиков В.В. Оценка сыровоточного уровня растворимого DR3/LARD при заболеваниях разного генеза // Иммунология. 2013. Т. 34, № 3. С. 148–151. [Utkin O.V., Babaev A.A., Filatova E.N., Yanchenko O.S., Starikova V.D., Evsegneeveva I.V., Karaulov A.V., Novikov V.V. Evaluation of serum levels of soluble DR3/LARD in diseases of different genesis. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 3, pp. 148–151. (In Russ.)]
3. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 4. С. 381–390. [Utkin O.V., Novikov V.V. Death receptors in modulation of apoptosis. *Uspekhi sovremennoi biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2012, vol. 132, no. 4, pp. 381–390. (In Russ.)]

4. Уткин О.В., Свинцова Т.А., Кравченко Г.А., Шмелева О.А., Новиков Д.В., Бабаев А.А., Собчак Д.М., Караулов А.В., Новиков В.В. Экспрессия альтернативных форм гена CD95/Fas в клетках крови при герпесвирусной инфекции // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 189–193. [Utkin O.V., Svintsova T.A., Kravchenko G.A., Shmeleva O.A., Novikov D.V., Babayev A.A., Sobchak D.M., Karaulov A.V., Novikov V.V. Gene expression CD95/FAS in the cells of the blood in herpes-virus infection. *Immunologiya = Immunology*, 2012, vol. 33, no. 4, pp. 189–193. (In Russ.)]
5. 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. [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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 207–218. doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-207-218 (In Russ.)]
6. Шарипова Е.В., Бабаченко И.В. Герпес-вирусные инфекции и инфекционный мононуклеоз (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 2. С. 5–12. [Sharipova E.V., Babachenko I.V. Herpesvirus infection and infectious mononucleosis. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 5–12. doi: 10.22625/2072-6732-2013-5-2-5-12 (In Russ.)]
7. Balfour H.N., Dunmire S.K., Hogquist K.A. Infectious mononucleosis. *Clin. Transl. Immunol.*, 2015, vol. 4, no. 2: e33. doi: 10.1038/cti.2015.1
8. Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Utkin O.V. DR3 regulation of apoptosis of naive T-lymphocytes in children with acute infectious mononucleosis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2016, vol. 63, no. 3, pp. 339–357. doi: 10.1556/030.63.2016.007
9. Narparachchi 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: 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. Janols H., Bredberg A., Thuveesson 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
12. Kimura M.Y., Pobezinsky L.A., Guintert 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
13. 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 (In Chin.).
14. Tussey L., Speller S., Gallimore A., Vessey R. Functionally distinct CD8⁺ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur. J. Immunol.*, 2000, vol. 30, no. 7, pp. 1823–1829.
15. 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 НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;
Анисенкова Е.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;
Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, 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 НИИ эпидемиологии и микробиологии 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;
Kulova E.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Childhood Infections, 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.