

# ОЦЕНКА УРОВНЯ АПОПТОЗА НАИВНЫХ CD8<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ ПРИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ CD95 И DR3

УДК 616.988.55–053.2–002:577.24

Поступила 13.04.2015 г.

- © **Е.Н. Филатова**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии<sup>1</sup>;  
**О.В. Уткин**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии<sup>1</sup>; доцент кафедры микробиологии и иммунологии<sup>2</sup>;  
**Е.В. Анисенкова**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии<sup>1</sup>;  
**Н.Б. Преснякова**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии<sup>1</sup>;  
**Т.Д. Сычева**, ординатор кафедры детских инфекций<sup>2</sup>;  
**В.В. Краснов**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекций<sup>2</sup>;  
**Н.Е. Сенягина**, к.м.н., доцент кафедры детских инфекций<sup>2</sup>;  
**Е.А. Кулова**, к.м.н., ассистент кафедры детских инфекций<sup>2</sup>;  
**Е.И. Ефимов**, д.м.н., профессор, директор<sup>1</sup>; зав. кафедрой микробиологии и иммунологии<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, 603950, Н. Новгород, ул. Малая Ямская, 71;

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

**Цель исследования** — оценить связь активации рецепторов CD95 и DR3 с уровнем апоптоза наивных цитотоксических Т-лимфоцитов (нЦТЛ) у детей с острым инфекционным мононуклеозом (ОИМ).

**Материалы и методы.** Материалом для исследования явились образцы периферической крови здоровых детей и детей с диагнозом ОИМ. Выделение нЦТЛ осуществляли с помощью метода негативной магнитной иммуносепарации. Специфическую активацию рецепторов CD95 и DR3 проводили моноклональными антителами. Уровень апоптоза и экспрессию рецепторов анализировали методом проточной цитофлюориметрии.

**Результаты.** У детей с ОИМ в свежеизолированных нЦТЛ, а также при активации рецептора CD95 снижался процент апоптоза клеток по сравнению со здоровыми детьми. У здоровых детей независимо от условий культивирования апоптоз нЦТЛ сопровождался снижением количества CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток и плотности экспрессии CD95 на их поверхности. У детей с ОИМ снижение данных показателей требовало активации CD95. По сравнению со здоровыми детьми у детей с ОИМ процент CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток снижался при активации CD95. При активации рецептора CD95 у здоровых детей и детей с ОИМ содержание CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток прямо коррелировало с уровнем апоптоза. Активация рецептора DR3 не сопровождалась изменением уровня апоптоза нЦТЛ, а также содержания DR3<sup>+</sup> клеток как у здоровых детей, так и у детей с ОИМ.

**Заключение.** У детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми нЦТЛ менее чувствительны к апоптозу. Активация рецептора DR3 не приводит к изменению уровня апоптоза нЦТЛ как у здоровых детей, так и у детей с ОИМ. Активация CD95 у больных детей сопровождается повышением резистентности к апоптозу CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> и восприимчивости к апоптозу CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток. При ОИМ оценка восприимчивости нЦТЛ к CD95-индуцированному апоптозу может служить дополнительным критерием оценки состояния клеточного звена иммунитета.

**Ключевые слова:** CD95; DR3; апоптоз; наивные цитотоксические Т-лимфоциты; острый инфекционный мононуклеоз; «рецепторы смерти».

## English

## Assessment of Apoptosis Level of Naive CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in Children with Acute Infectious Mononucleosis in CD95 and DR3 Receptors Activation

**E.N. Filatova**, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology<sup>1</sup>;**O.V. Utkin**, PhD, Head of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology<sup>1</sup>; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology<sup>2</sup>;**E.V. Anisenkova**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology<sup>1</sup>;**N.B. Presnyakova**, Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology<sup>1</sup>;

**Для контактов:** Филатова Елена Николаевна, e-mail: filatova@nniiem.ru

**T.D. Sycheva**, Resident, Department of Children Diseases<sup>2</sup>;  
**V.V. Krasnov**, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Children Diseases<sup>2</sup>;  
**N.E. Senyagina**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Children Diseases<sup>2</sup>;  
**E.A. Kulova**, MD, PhD, Tutor, Department of Children Diseases<sup>2</sup>;  
**E.I. Efimov**, MD, DSc, Professor, Director<sup>1</sup>; Head of the Department of Microbiology and Immunology<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 71 Malaya Yamskaya, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

**The aim of the investigation** was to estimate the relation of CD95 and DR3 receptors activation with apoptosis level of naive cytotoxic T-lymphocytes (nCTL) in children with acute infectious mononucleosis (AIM).

**Materials and Methods.** The test materials were peripheral blood samples of healthy children and children with AIM. nCTL were isolated by negative immunomagnetic separation. Specific activation of CD95 and DR3 receptors was performed using monoclonal antibodies. An apoptosis level and expression of receptors were studied by flow cytometry.

**Results.** The percentage of cell apoptosis decreased in children with AIM in freshly isolated nCTL, as well as in CD95 receptor activation compared to healthy children. nCTL apoptosis in healthy children regardless of culture conditions was accompanied by the reduced quantity of CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> cells and CD95 expression density on their surface. In children with AIM the decrease of these indices required CD95 activation. Compared to healthy children, the percentage of CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> cells in children with AIM decreased in CD95 activation. In CD95 receptor activation in healthy children and children with AIM, the content of CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> cells correlated directly with an apoptosis level. DR3 receptor activation was accompanied neither by nCTL apoptosis level change nor the changed content of DR3<sup>+</sup> cells in both healthy children and children with AIM.

**Conclusion.** nCTL are less sensitive to apoptosis in children with AIM compared to healthy children. DR3 receptor activation results in no change of nCTL apoptosis level both in healthy children and children with AIM. CD95 activation in patients with AIM is accompanied by increased resistance of CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> cells to apoptosis and the susceptibility to apoptosis of CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> cells. The evaluation of nCTL susceptibility to CD95-induced apoptosis in AIM can serve as a substest to assess the state of a cell component of immune system.

**Key words:** CD95; DR3; apoptosis; naive cytotoxic T-lymphocytes; acute infectious mononucleosis; death receptors.

Острый инфекционный мононуклеоз (ОИМ) — широко распространенное вирусное заболевание. Возбудителями его являются представители семейства *Herpesviridae*: вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловирус (ЦМВ), герпесвирус человека 6-го типа. Носителями вирусов являются более 90% городского населения. Заболевание характеризуется пожизненной латентной персистенцией вируса и его периодической реактивацией в организме носителя. Острая форма заболевания развивается лишь у 10% инфицированных лиц и наиболее часто проявляется в детском возрасте [1, 2].

Возбудители ОИМ являются лимфотропными вирусами, влияющими на функциональное состояние клеток иммунной системы: например, вызывают анергию Т-лимфоцитов, а также регулируют пролиферацию и апоптоз иммунокомпетентных клеток [3].

В инициации апоптоза и пролиферации клеток участвуют представители белкового семейства «рецепторов смерти» — CD95 (Fas) и DR3 (LARD). Они экспрессируются на поверхности иммунокомпетентных клеток, в том числе CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [4–8]. В норме Т-лимфоциты различным образом реагируют на активацию данных рецепторов. Известно, что после стимуляции рецептора CD95 активированные Т-лимфоциты погибают путем апоптоза, а наивные Т-клетки начинают пролиферировать. Стимуляция рецептора DR3 может сопровождаться усилением как пролиферации, так и апоптоза активированных Т-лимфоцитов. При

этом наивные Т-клетки характеризуются резистентностью к апоптозу, опосредованному DR3 [7, 9–11].

Наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки являются предшественниками эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, играющих важную роль в реализации противовирусного иммунитета. Поддержание достаточного количества наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови, играет важную роль в иммунном ответе [12]. Усиление гибели наивных Т-лимфоцитов путем апоптоза потенциально снижает эффективность иммунных реакций.

ОИМ сопровождается значительным увеличением содержания суммарной фракции CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови [13]. У пациентов с хроническим течением заболевания в период реактивации наблюдается снижение их содержания, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [14]. При ОИМ отмечается повышение экспрессии рецептора CD95 на мембране Т-лимфоцитов, в том числе суммарной фракции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и усиление их апоптоза [3]. В то же время на модельных системах *in vitro* показано, что ЦМВ подавляет экспрессию CD95, а также ингибирует CD95-опосредованный апоптоз в инфицированных фибробластах человека и некоторых других клеточных линиях [15, 16]. Функциональная роль рецептора DR3 в иммунопатогенезе ОИМ практически не изучена. Известно, что мыши, не экспрессирующие DR3, более восприимчивы к ЦМВ-инфекции, в том числе вследствие недостаточной активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [17].

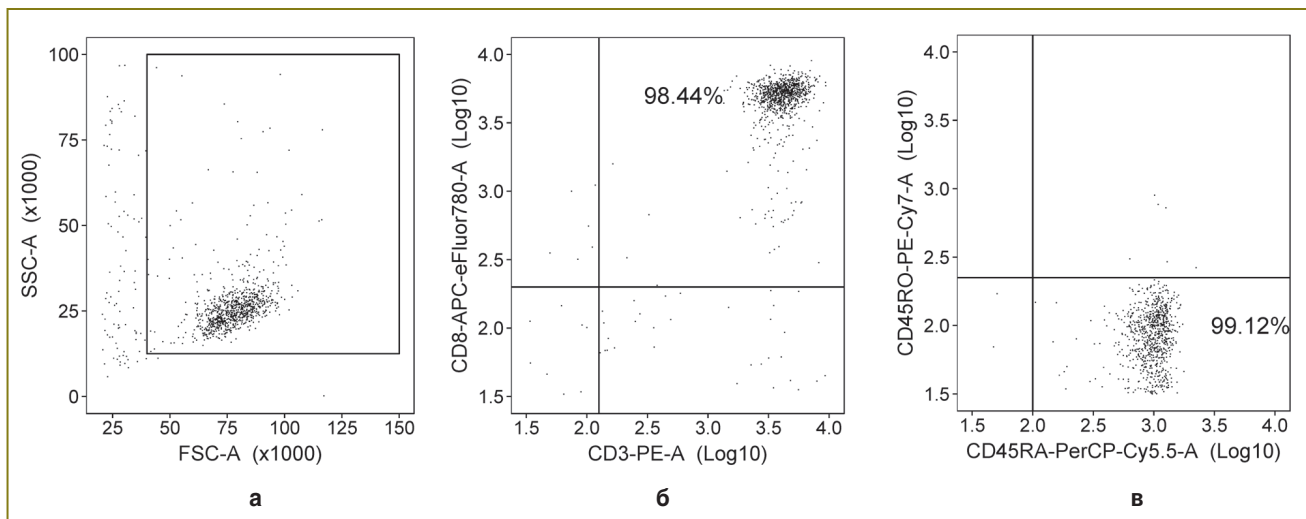
Вопрос об участии CD95 и DR3 в апоптозе наивных цитотоксических Т-лимфоцитов (нЦТЛ) при ОИМ, а также о прогностическом значении оценки функциональной активности этих рецепторов остается нерешенным.

**Цель исследования** — оценить связь активации рецепторов CD95 и DR3 с уровнем апоптоза наивных цитотоксических Т-лимфоцитов у детей с острым инфекционным мононуклеозом.

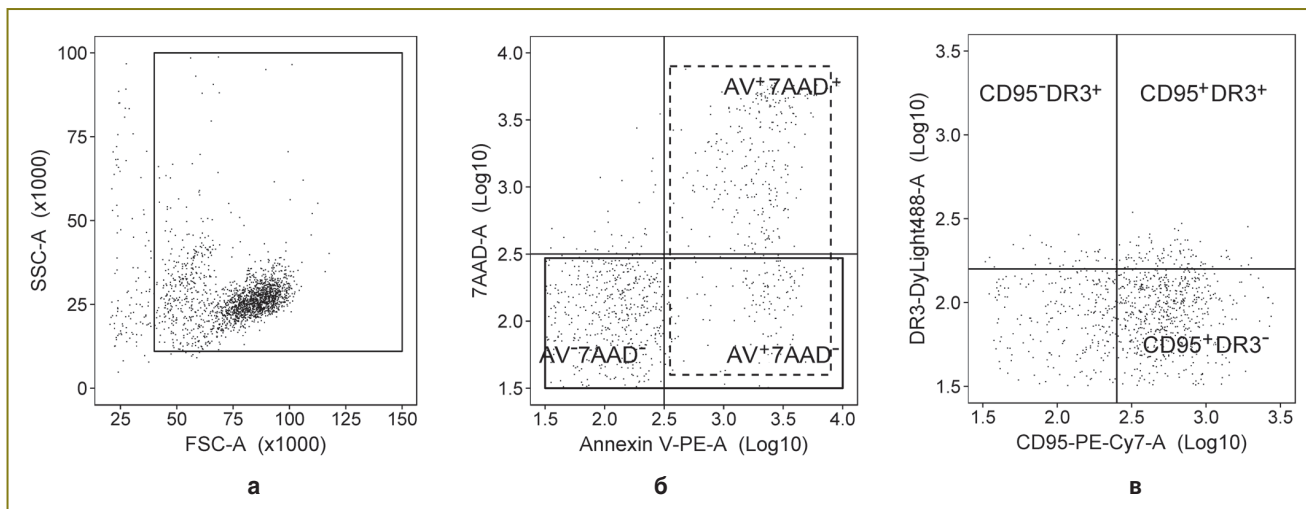
**Материалы и методы**

**Получение культуры нЦТЛ.** Материалом для исследования явились образцы периферической крови здо-

ровых детей и детей с диагнозом ОИМ в возрасте от 9 до 16 лет. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и одобрено Этическим комитетом НижГМА. Забор материала выполняли с информированного согласия родителей или опекунов. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови выделяли в градиенте плотности раствора Гистопак ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>, Sigma, США). Выделение нЦТЛ проводили методом негативной магнитной иммуносепара-



**Рис. 1.** Контроль чистоты выделения нЦТЛ методом проточной цитофлуориметрии: на основании прямого и бокового светорассеяния отделяли дебрис и выделяли гейт лимфоцитов (а); в выделенном гейте анализировали экспрессию маркеров CD3 и CD8, содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов составило более 98% (б); в пуле CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов анализировали экспрессию маркеров CD45RA и CD45RO, содержание CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> клеток составило более 99% (в). Итоговое содержание наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов составило более 97%



**Рис. 2.** Принципы гейтирования при анализе уровня апоптоза и экспрессии CD95 и DR3: гейт лимфоцитов выделяли на основании прямого и бокового светорассеяния (а); на основании двойной окраски AV и 7AAD лимфоциты разделяли на живые клетки, клетки в ранней и поздней стадиях апоптоза, уровень апоптоза определяли как суммарный процент клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза (пунктирная линия). Живые клетки и клетки в ранней стадии апоптоза выделяли в отдельный гейт (сплошная линия) (б); в выделенном гейте далее анализировали экспрессию рецепторов CD95 и DR3 (в)

ции с помощью коммерческих наборов серии EasySep (Stemcell Technologies, Великобритания) согласно инструкции производителя. Чистоту выделения нЦТЛ оценивали методом проточной цитофлуориметрии с применением панели флюоресцентно-меченых антител: CD3-PE, CD45RO-PE-Cy7, CD45RA-PerCP-Cy5.5 и CD8-APC-eFluor780 (eBioscience, США). Чистота выделения составила более 97% (рис. 1).

**Культивирование и активация нЦТЛ.** Изолированные нЦТЛ культивировали в концентрации  $1 \cdot 10^6$  кл./мл в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Специфическую активацию рецепторов проводили моноклональными антителами (МКА) против рецепторов CD95 (изотип IgM, клон CH-11, eBioscience, США) или DR3 (изотип IgG k, клон JD3, Beckman Coulter, США) человека в концентрации 200 нг/мл. Контролем служили клетки, культивируемые без добавления активаторов.

**Проточная цитофлуориметрия.** Использовали проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II (Becton, Dickinson and Company, США). Для нормализации напряжения на фотопомножителях применяли калибровочные частицы «Cytometry set up and tracking beads» (BD Biosciences, США). Настройки компенсации флюоресценции оптимизировали с помощью коммерческого набора «Anti-mouse Ig, k/negative control compensation particles set» (BD Biosciences, США). Для флюоресцентно-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.

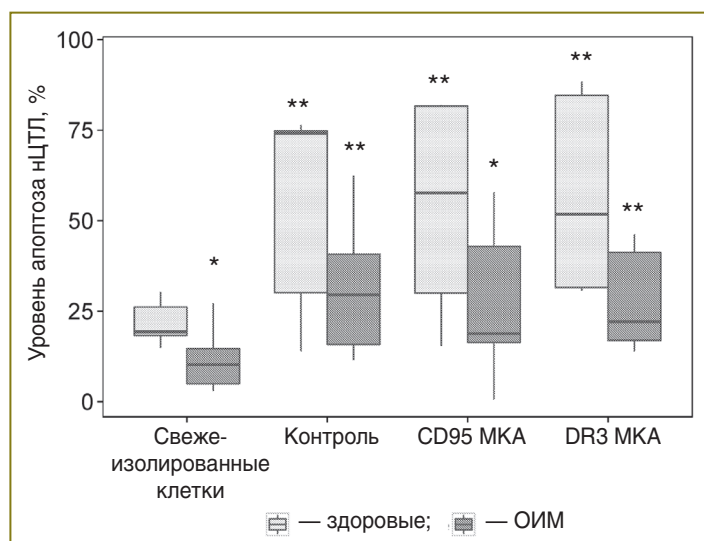
**Оценка уровня апоптоза и экспрессии CD95 и DR3.** Для оценки применяли метод проточной цитофлуориметрии. Анализировали свежеизолированные нЦТЛ, а также нЦТЛ после 20 ч культивирования с активаторами или без них. Для оценки уровня апоптоза использовали

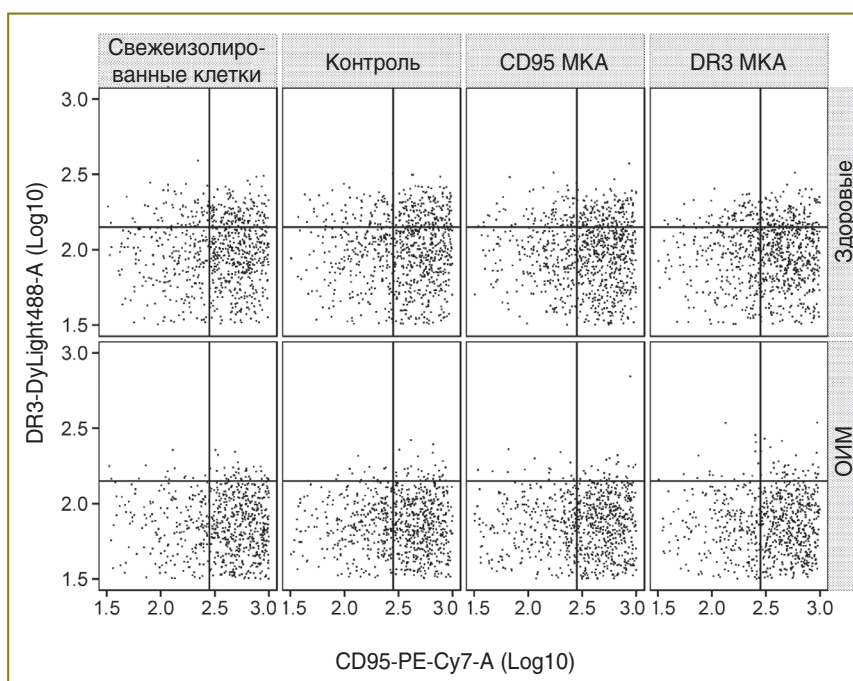
двойное окрашивание аннексином V-PE (AV) и 7-аминоактиномицином-D (7AAD) с применением коммерческого набора «PE Annexin V Apoptosis Detection Kit» (BD Biosciences, США). Экспрессию CD95 и DR3 на мембране лимфоцитов крови анализировали с помощью флюоресцентно-меченых антител против CD95-PE-Cy7 (eBioscience, США) и DR3-DyLight488 (Novus Biological, США). На основании прямого и бокового светорассеяния отделяли дебрис и выделяли общий гейт нЦТЛ (рис. 2, а). На основании окраски по AV и 7AAD выделяли гейты живых лимфоцитов (AV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>), лимфоцитов в ранней (AV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) и поздней (AV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) стадиях апоптоза. Суммарный уровень апоптоза определяли по совокупному проценту клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. Далее общий гейт живых клеток и клеток в ранней стадии апоптоза анализировали отдельно (рис. 2, б). На основании экспрессии рецепторов CD95 и DR3 выделяли клетки с тремя различными фенотипами: CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>, CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> (рис. 2, в). Подсчитывали процент клеток каждого фенотипа от общего количества клеток в гейте. Плотность экспрессии CD95 и DR3 на мембране лимфоцитов оценивали исходя из средней интенсивности флюоресценции несущих рецепторы клеток (MFI).

**Обработка данных.** Алгоритм анализа был написан на языке R в оболочке RStudio 0.98.507 (RStudio, США). В работе применяли t-тест Стьюдента для зависимых и независимых выборок, W-критерий Вилкоксона для зависимых и независимых выборок, дисперсионный анализ с повторными измерениями ANOVA, критерий Фридмана. Коэффициент корреляции рассчитывали с применением критерия Пирсона (r) и критерия Спирмена (r<sub>s</sub>). Значения «p» при множественных сравнениях корректировали с учетом поправки Холма–Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при p<0,05. Результаты представляли с указанием медианы, 25-го и 75-го процентилей.

**Результаты**

**Влияние активации рецепторов CD95 и DR3 на уровень апоптоза нЦТЛ.** По сравнению со здоровы-





**Рис. 4.** Экспрессия рецепторов CD95 и DR3 на поверхности нЦТЛ. МКА — моноклональные антитела

ми детьми у детей с ОИМ наблюдалось снижение в 1,9 раза числа апоптозирующих клеток в свежеизолированных нЦТЛ ( $p=0,023$ ), а при активации анти-CD95 антителами — в 3,1 раза ( $p=0,046$ ) (рис. 3). При активации анти-DR3 антителами, а также при культивировании без активаторов количество апоптозирующих нЦТЛ у здоровых и больных детей не различалось.

У здоровых детей культивирование нЦТЛ с анти-CD95 или анти-DR3 антителами, а также в отсутствии активаторов приводило к увеличению числа апоптозирующих клеток. По сравнению со свежеизолированными нЦТЛ уровень апоптоза повышался в контроле в 3,8 раза ( $p=0,005$ ), при активации анти-CD95 антителами — в 3,0 раза ( $p=0,005$ ), при активации анти-DR3 антителами — в 2,7 раза ( $p=0,002$ ). У детей с ОИМ обнаружено увеличение числа апоптозирующих клеток только в контроле и при культивировании с анти-DR3 антителами. По сравнению со свежеизолированными нЦТЛ уровень апоптоза возрастал в контроле в 2,9 раза ( $p=0,032$ ), при добавлении анти-DR3 антител — в 2,2 раза ( $p=0,003$ ).

**Характеристика нЦТЛ с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> у здоровых детей и детей с ОИМ.** У детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми не обнаружено различий в числе CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток и плотности экспрессии CD95 на их поверхности в свежеизолированных нЦТЛ, а также при культивировании, как в контроле, так и при активации, рецептора CD95 (рис. 4, 5).

У здоровых детей культивирование нЦТЛ по сравнению со свежеизолированными клетками сопровождалось снижением числа CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток и плотности экспрессии CD95 на их поверхности в контроле в 1,3

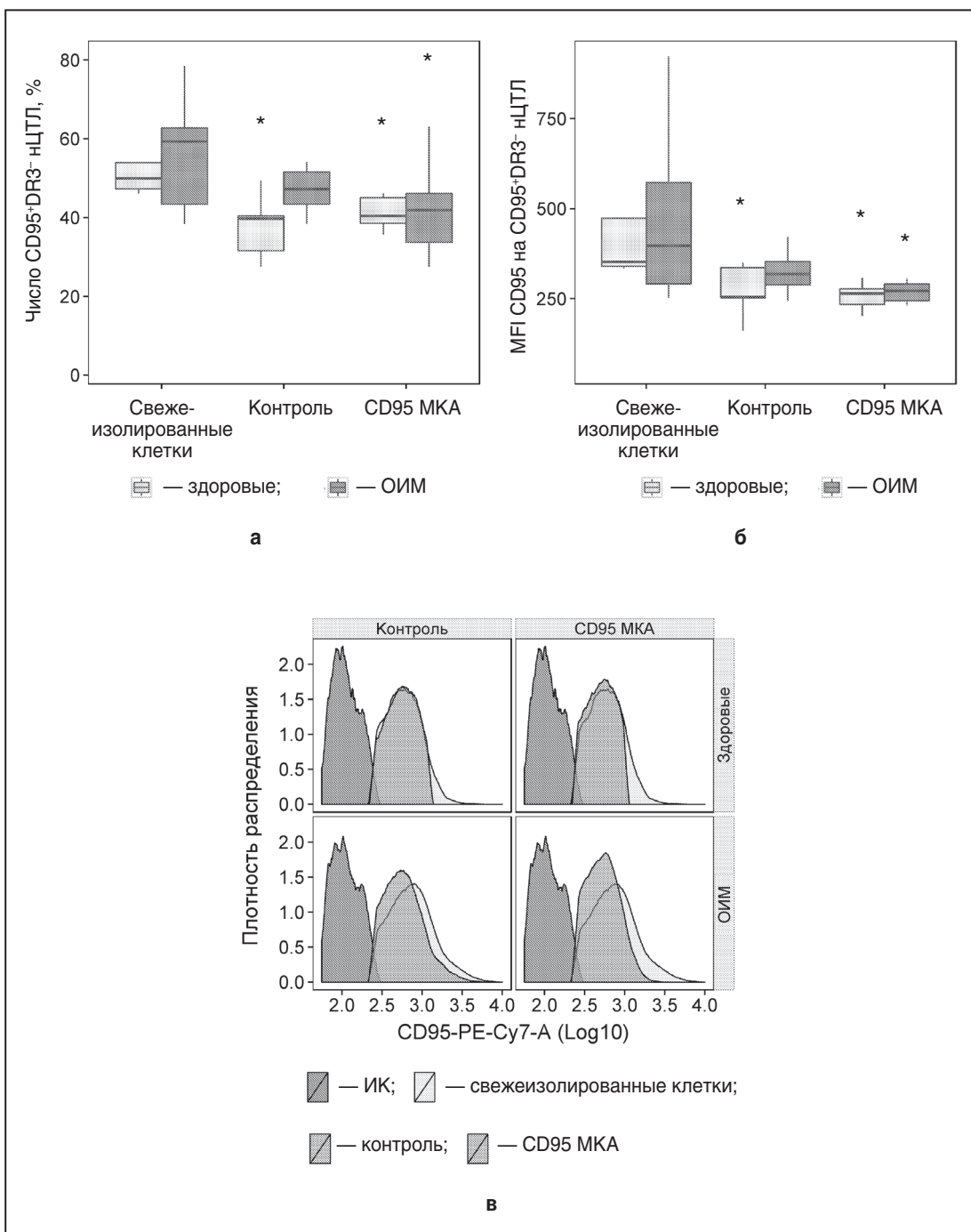
раза ( $p=0,034$ ) и 1,4 раза ( $p=0,018$ ), при активации анти-CD95 антителами — в 1,2 раза ( $p=0,034$ ) и 1,3 раза ( $p=0,013$ ) соответственно. При ОИМ наблюдалось снижение числа CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток и плотности экспрессии CD95 на их мембране только при стимуляции нЦТЛ анти-CD95 антителами — в 1,4 раза ( $p=0,001$ ) и 1,5 раза ( $p=0,001$ ) соответственно (см. рис. 5).

У здоровых детей и детей с ОИМ не обнаружено корреляции между уровнем апоптоза нЦТЛ и содержанием CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток, а также плотностью экспрессии CD95 на их поверхности во всех исследованных случаях.

**Характеристика нЦТЛ с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> у здоровых детей и детей с ОИМ.** У детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми выявлено снижение в 5,1 раза числа CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток в свежеизолированных нЦТЛ и культивируемых клетках контроля ( $p=0,013$  и  $p=0,038$  соответственно). При этом плотность экспрессии DR3 на поверхности CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток не изменялась. Также оба показателя не изменялись при добавлении анти-DR3 антител (см. рис. 4, рис. 6).

Вне зависимости от условий культивирования нЦТЛ здоровых детей и детей с ОИМ не выявлено различий в содержании CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток и плотности экспрессии DR3 на их поверхности по сравнению со свежеизолированными нЦТЛ (см. рис. 6).

Обнаружена прямая корреляция между уровнем апоптоза и содержанием CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ у здоровых детей и детей с ОИМ. У здоровых детей корреляция наблюдалась при стимуляции нЦТЛ анти-DR3 антителами ( $r=0,93$ ;  $p=0,023$ ). У детей с ОИМ взаимосвязь исследуемых показателей выявлялась в свежеизолированных нЦТЛ ( $r=0,79$ ;  $p=0,006$ ).

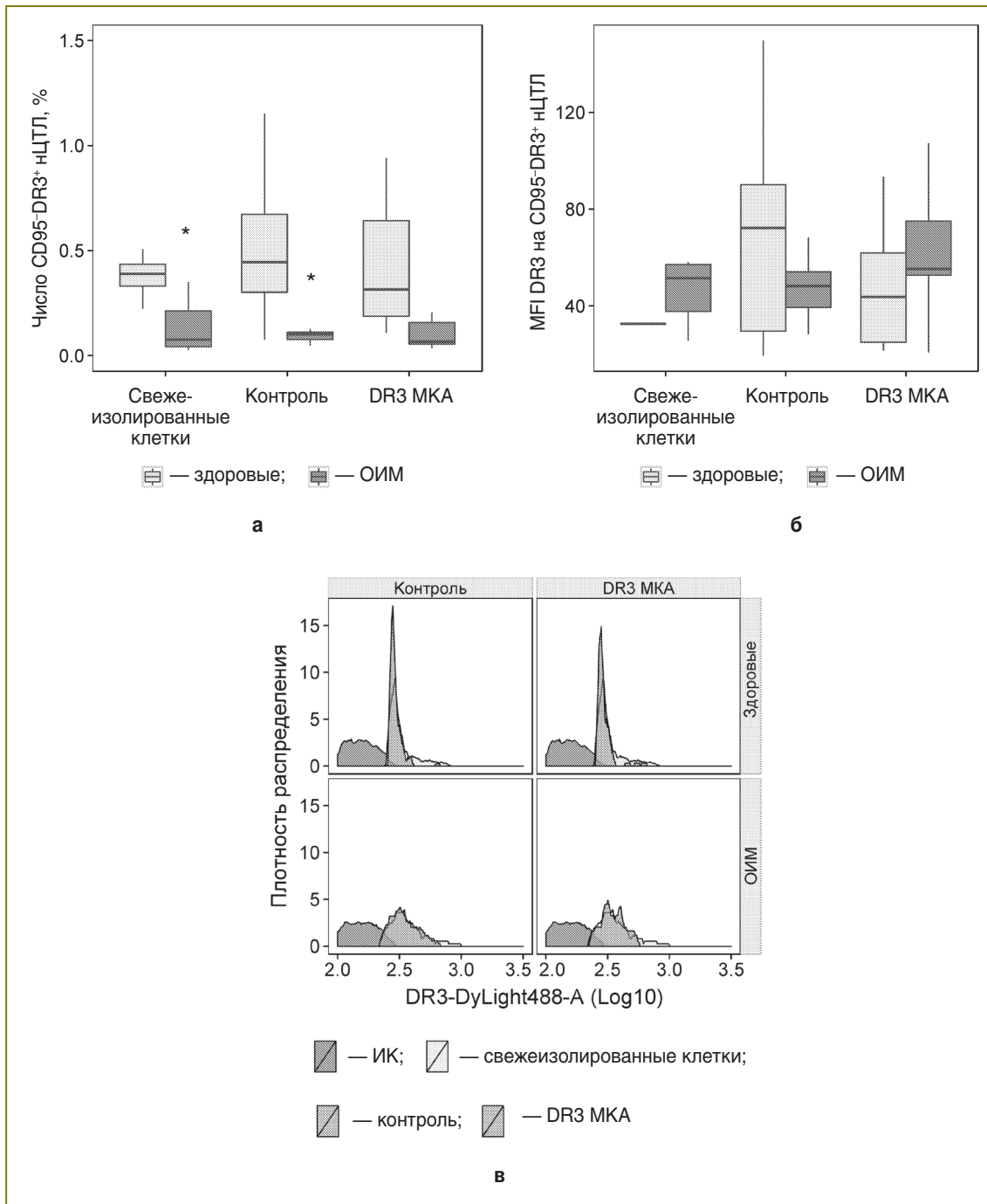


**Рис. 5.** Характеристика нЦТЛ с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>: процентное содержание CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток (а) и средняя интенсивность флуоресценции CD95 на их поверхности (б); сравнение плотности распределения уровня флуоресценции рецептора CD95 на поверхности свежеизолированных CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> нЦТЛ с данным показателем при культивировании без добавления активаторов или с добавлением анти-CD95 моноклональных антител (МКА) (в). ИК — изотипический контроль; ОИМ — острый инфекционный мононуклеоз; \* — статистически значимые различия со свежеизолированными нЦТЛ (p<0,05)

**Характеристика нЦТЛ с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> у здоровых детей и детей с ОИМ.** У детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми наблюдалось снижение в 1,6 раза числа CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток (p=0,011) при стимуляции нЦТЛ анти-CD95 антителами. В свежеизолированных нЦТЛ детей с ОИМ выявлено увеличение

в 1,7 раза плотности экспрессии DR3 на поверхности CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток (p=0,004). Во всех остальных случаях различий в содержании CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток, а также плотности экспрессии CD95 или DR3 на их поверхности не обнаружено (см. рис. 4, рис. 7).

Вне зависимости от условий культивирования нЦТЛ

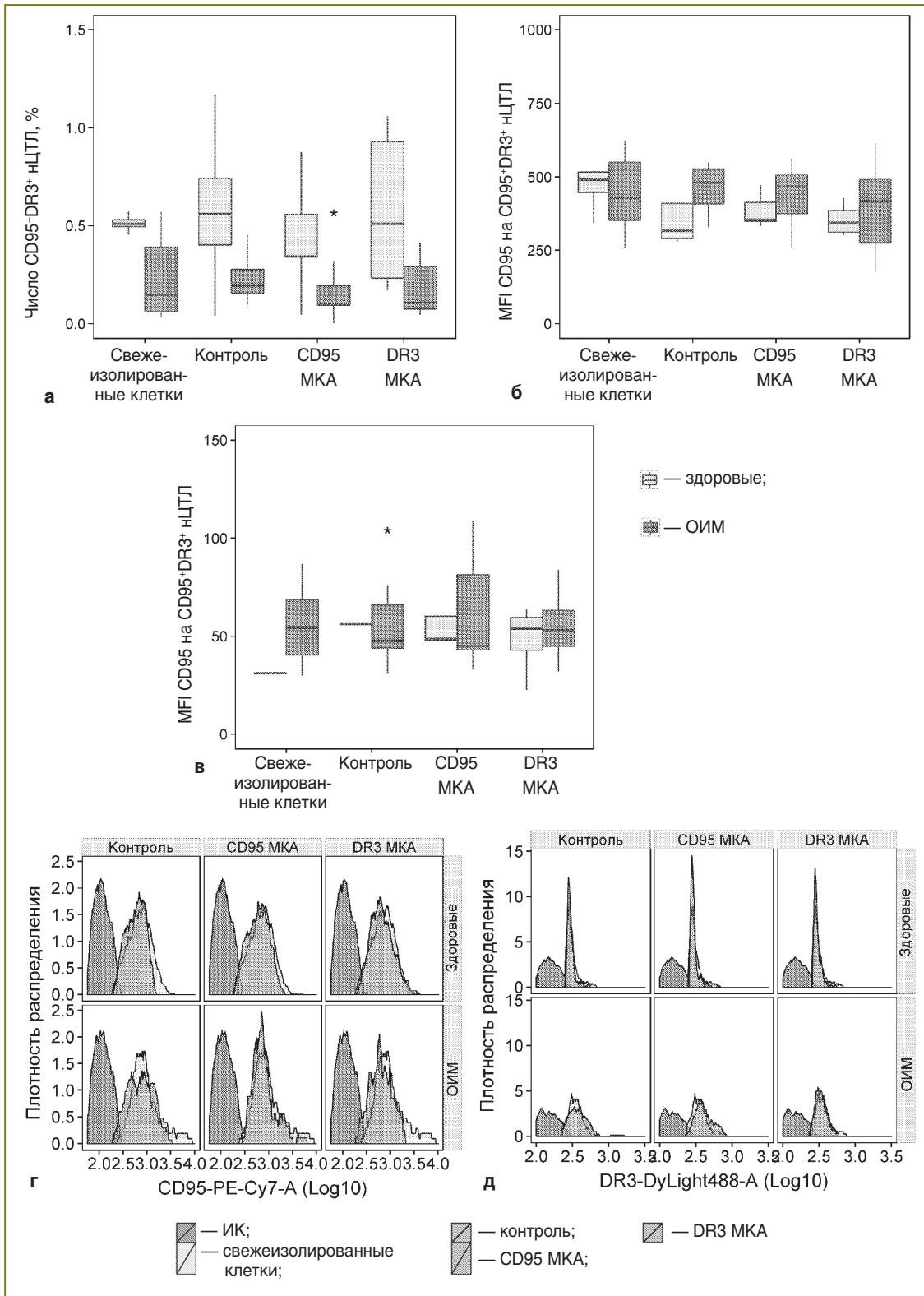


**Рис. 6.** Характеристика CD95-DR3<sup>+</sup> нЦТЛ: процентное содержание CD95-DR3<sup>+</sup> клеток (а) и средняя интенсивность флуоресценции DR3 на их поверхности (б); сравнение плотности распределения уровня флуоресценции рецептора DR3 на поверхности свежеизолированных CD95-DR3<sup>+</sup> нЦТЛ с данным показателем при культивировании без добавления активаторов или с добавлением анти-DR3 моноклональных антител (МКА) (в); \* — статистически значимые различия со здоровыми детьми ( $p < 0,05$ )

здоровых детей и детей с ОИМ не выявлено различий в содержании CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток и плотности экспрессии DR3 или CD95 на их поверхности по сравнению со свежеизолированными нЦТЛ (см. рис. 7).

Обнаружена прямая корреляция между уровнем апоптоза и содержанием CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток только при

культивировании нЦТЛ с добавлением анти-CD95 антител у здоровых детей ( $r=0,88$ ;  $p=0,049$ ) и детей с ОИМ ( $r=0,73$ ;  $p=0,010$ ). Не установлено корреляции между уровнем апоптоза и плотностью экспрессии CD95 или DR3 на поверхности CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток во всех рассматриваемых случаях.



**Рис. 7.** Характеристика CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ: процентное содержание CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток (а), средняя интенсивность флуоресценции CD95 (б) и средняя интенсивность флуоресценции DR3 (в) на их поверхности; сравнение плотности распределения уровня флуоресценции рецептора CD95 на поверхности свежеизолированных CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ с данным показателем при культивировании без добавления активаторов или с добавлением анти-CD95 или анти-DR3 МКА (г); сравнение плотности распределения уровня флуоресценции рецептора DR3 на поверхности свежеизолированных CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ с данным показателем при культивировании без добавления активаторов или с добавлением анти-CD95 или анти-DR3 моноклональных антител (МКА) (д); \* — статистически значимые различия со здоровыми детьми (p<0,05)



**Обсуждение.** При исследовании восприимчивости к апоптозу нЦТЛ у здоровых детей и детей с ОИМ оценивали экспрессию мембранных рецепторов CD95 и DR3. Общий пул нЦТЛ был разделен нами на три фенотипические группы в зависимости от особенностей экспрессии рецепторов CD95 и DR3 на их поверхности. Мы анализировали вклад каждого из фенотипов в общий уровень апоптоза суммарной фракции нЦТЛ.

У здоровых детей как в контроле, так и при специфической активации рецепторов CD95 или DR3 наблюдалось повышение уровня апоптоза общей фракции изолированных нЦТЛ. При этом на фоне такого повышения уменьшалось только количество клеток с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>. Плотность экспрессии рецептора CD95 на их поверхности также снижалась. Мы полагаем, что у здоровых детей основной вклад в уровень апоптоза нЦТЛ вносит субпопуляция с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>, т.е. именно эта субпопуляция наивных Т-лимфоцитов погибает путем апоптоза в первую очередь. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у здоровых детей индукция апоптоза CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> изолированных нЦТЛ не требует участия других иммунокомпетентных клеток, а также дополнительной стимуляции рецептора CD95.

У детей с ОИМ свежеизолированные нЦТЛ проявляли резистентность к апоптозу, что можно рассматривать как защитный механизм макроорганизма, направленный на сохранение пула нЦТЛ в ходе реализации противовирусного иммунного ответа. При обособленном культивировании нЦТЛ у детей с ОИМ теряли резистентность к апоптозу в контроле, но сохраняли устойчивость к нему при активации рецептора CD95. Можно предположить, что устойчивость нЦТЛ к апоптозу при ОИМ обусловлена участием рецептора CD95 и зависит от воздействия других иммунокомпетентных клеток.

Следует отметить, что при ОИМ активация CD95 не приводила к изменению уровня апоптоза общего пула нЦТЛ по сравнению со свежеизолированными клетками. При этом наблюдалось снижение содержания Т-лимфоцитов с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> и повышение содержания клеток с фенотипом CD95<sup>-</sup>DR3<sup>-</sup> (данные о нЦТЛ с фенотипом CD95<sup>-</sup>DR3<sup>-</sup> не представлены). Известно, что связывание рецептора CD95 на мембране клеток приводит к его интернализации [18]. Мы предполагаем, что при ОИМ дальнейшей передачи сигнала не происходит и апоптоз нЦТЛ не развивается. При этом вследствие интернализации рецептора CD95 изменяется фенотип клеток. Клетки с фенотипом CD95<sup>-</sup>DR3<sup>-</sup> потенциально более резистентны к индукции апоптоза с участием рецепторов CD95 и DR3. Возможно, что резистентность нЦТЛ к апоптозу при активации CD95 связана с изменением баланса про- и антиапоптотических факторов в этих клетках при ОИМ. Так, в исследованиях *in vitro* [3] продемонстрировано, что CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, экспрессирующие рецептор CD95, при ВЭБ-инфекции проявляют устойчивость к апоптозу вследствие повышения уровня экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2.

В общем пуле нЦТЛ количественно доминируют

клетки с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>, а DR3-экспрессирующие клетки (фенотипы CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup>) присутствуют в незначительном количестве. По сравнению со свежеизолированными нЦТЛ мы не наблюдали изменений в содержании DR3-экспрессирующих клеток вне зависимости от условий культивирования как у здоровых детей, так и у детей с ОИМ. В связи с этим при оценке вклада клеток с таким фенотипом в общий уровень апоптоза нЦТЛ нам представляется целесообразным рассматривать их только в качестве минорных субпопуляций, участвующих в регуляции апоптоза CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток.

В свежеизолированных клетках, а также в контроле у детей с ОИМ наблюдается снижение содержания клеток фенотипа CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> по сравнению со здоровыми детьми. При этом активация рецептора DR3 нивелирует выявленные различия. Следует отметить, что данный факт связан не с возрастанием количества CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ у детей с ОИМ, а со снижением данного показателя у здоровых детей. Также у здоровых детей при активации рецептора DR3 число CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> клеток прямо коррелирует с уровнем апоптоза пула нЦТЛ. Можно предположить, что в норме уровень апоптоза в свежеизолированных нЦТЛ не зависит от количества клеток с фенотипом CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup>. Такая зависимость появляется только в условиях активации рецептора DR3. При ОИМ прямая корреляция исследуемых показателей была изначально обнаружена только в свежеизолированных нЦТЛ и не выявлялась при активации рецептора DR3. Таким образом, клетки с фенотипом CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> вносят различный вклад в суммарный уровень апоптоза пула нЦТЛ у здоровых и больных детей.

С нашей точки зрения, особый интерес представляют нЦТЛ с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup>, способные отвечать на стимуляцию обоих рецепторов. Активация рецептора CD95 приводит к уменьшению числа клеток с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> на фоне снижения уровня апоптоза нЦТЛ у детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми. При этом у здоровых и больных детей уровень апоптоза прямо коррелирует с содержанием CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток. Мы полагаем, что у детей с ОИМ рецептор CD95 участвует в инициации апоптоза CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Несмотря на повышенную плотность экспрессии DR3 на поверхности CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток свежеизолированных нЦТЛ у детей с ОИМ, активация рецептора DR3 не приводит к изменению их числа и уровня апоптоза нЦТЛ по сравнению со здоровыми детьми. Данный факт свидетельствует о неучастии рецептора DR3 в инициации апоптоза CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> Т-клеток у здоровых и больных детей. Таким образом, стимуляция рецепторов CD95 или DR3 оказывает различный эффект на восприимчивость CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов к апоптозу при ОИМ. В целом минорная субпопуляция CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток вносит незначительный вклад в общий уровень апоптоза нЦТЛ при активации CD95. Возможно, что наблюдаемая разница в уровне апоптоза нЦТЛ у здоровых детей и детей с ОИМ связана с потенциальной способностью CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток модулировать восприимчивость CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> Т-лимфоцитов к апоптозу.

**Заключение.** Основной вклад в апоптоз наивных цитотоксических Т-лимфоцитов у здоровых детей вносят клетки с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>, в то время как клетки с фенотипом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> предположительно выполняют регуляторную функцию. ОИМ у детей сопровождается снижением чувствительности нЦТЛ к апоптозу, что считается благоприятным прогностическим признаком. Экспрессия DR3 на поверхности нЦТЛ здоровых детей и детей с ОИМ различается. Несмотря на это, активация DR3 не приводит к изменению восприимчивости нЦТЛ к апоптозу у детей с ОИМ по сравнению со здоровыми детьми. Мы полагаем, что в реализации механизма устойчивости нЦТЛ к апоптозу при ОИМ принимают участие CD95-опосредованные сигнальные пути в CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клетках.

Оценка восприимчивости нЦТЛ к CD95-индуцированному апоптозу может служить перспективным тестом, дополнительно характеризующим состояние клеточного звена иммунной системы при ОИМ.

**Финансирование исследования и конфликт интересов.** Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

#### Литература/References

1. Scherrenburg J., Piriou E.R.W.A.N., Nanlohy N.M., van Baarle D. Detailed analysis of Epstein–Barr virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses during infectious mononucleosis. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(2): 231–239, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03699.x>.
2. Womack J., Jimenez M. Common questions about infectious mononucleosis. *Am Fam Physician* 2015; 91(6): 372–376.
3. 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; 94(10): 3439–3444.
4. Walczak H., Krammer P.H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 58–66, <http://dx.doi.org/10.1006/excr.2000.4840>.
5. Papoff G., Hausler P., Eramo A., Pagano M.G., Di Leve G., Signore A., Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 1999; 274(53): 38241–38250, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.53.38241>.
6. Screaton G.R., Xu X.-N., Olsen A.L., Cowper A.E., Tan R., McMichael A.J., Bell J.I. LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(9): 4615–4619, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.9.4615>.
7. Meylan F., Davidson T.S., Kahle E., Kinder M., Acharya K., Jankovic D., Bundoc V., Hodges M., Shevach E.M., Keane-Myers A., Wang E.C., Siegel R.M. The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases. *Immunity* 2008; 29(1): 79–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.021>.
8. Buchan S.L., Taraban V.Y., Slebioda T.J., James S., Cunningham A.F., Al-Shamkhani A. Death receptor 3 is essential for generating optimal protective CD4<sup>+</sup> T-cell immunity against Salmonella. *Eur J Immunol* 2012; 42(3): 580–588, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201041950>.
9. Klas C., Debatin K.M., Jonker R.R., Krammer P.H. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993; 5(6): 625–630, <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/5.6.625>.
10. 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; 178(6): 2231–2235, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.178.6.2231>.
11. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза. Успехи современной биологии 2012; 132(4): 381–390. Уткин О.В., Новиков В.В. Death receptors in modulation of apoptosis. *Uspekhi sovremennoi biologii* 2012; 132(4): 381–390.
12. Brown I.E., Mashayekhi M., Markiewicz M., Alegre M.L., Gajewski T.F. Peripheral survival of naive CD8<sup>+</sup> T cells apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10(1): 5–11, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-005-6056-9>.
13. Balfour H.H. Jr., Odumade O.A., Schmeling D.O., Mullan B.D., Ed J.A., Knight J.A., Vezina H.E., Thomas W., Hogquist K.A. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein–Barr virus infection in university students. *J Infect Dis* 2013; 207(1): 80–88, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis646>.
14. 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; 16(11): 1081–1085.
15. Skaletskaya A., Bartle L.M., Chittenden T., McCormick A.L., Mocarski E.S., Goldmacher V.S. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 7829–7834, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.141108798>.
16. Seirafian S., Prod'homme V., Sugrue D., Davies J., Fielding C., Tomasec P., Wilkinson G.W. Human cytomegalovirus suppresses Fas expression and function. *J Gen Virol* 2014; 95(Pt 4): 933–939, <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.058313-0>.
17. Twohig J.P., Marsden M., Cuff S.M., Ferdinand J.R., Gallimore A.M., Perks W.V., Al-Shamkhani A., Humphreys I.R., Wang E.C. The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *FASEB J* 2012; 26(8): 3575–3586, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-200618>.
18. Schneider-Brachert W., Heigl U., Ehrenschwender M. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7): 14475–14503, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140714475>.