

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ АПОПТОЗА И ВЫЖИВАНИЯ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ДЕТЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ТЕЧЕНИЯ ВГЧ-6-ИНФЕКЦИИ

Н.А. Сахарнов¹, О.В. Уткин¹, Е.Н. Филатова¹, Д.И. Князев¹, Е.А. Кулова²,
Н.Б. Преснякова¹

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

² ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Несмотря на исключительную распространенность вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), молекулярные механизмы патогенеза ВГЧ-6 инфекции остаются во многом неизученными. В настоящее время не выявлено специфичных молекулярных факторов неблагоприятного течения ВГЧ-6 инфекции, которые позволили бы облегчить выбор адекватной терапии и предупредить развитие осложнений. Целью настоящей работы является анализ экспрессии генов сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей 7–17 лет при различных формах течения ВГЧ-6-инфекции. Анализ проводился с помощью разработанных нами ДНК-микрочипов, позволяющих оценивать изменения уровней экспрессии как отдельных мРНК, так и суммарных уровней экспрессии генов (-Σ). В острой фазе ВГЧ-6 инфекции баланс уровней экспрессии исследуемых мРНК и генов смешался в сторону проапоптотических факторов, что может оказывать существенное влияние на чувствительность лейкоцитов к апоптозу. В фазе реконвалесценции большинство альтерированных уровней экспрессии мРНК и генов нормализовалось. Нами выявлен ряд мРНК и генов, уровни экспрессии которых значительно изменялись в острой фазе заболевания. По данным литературы такие факторы играют важную функциональную роль в регуляции исследуемых сигнальных путей. С целью поиска ВГЧ-6-ассоциированных факторов, влияющих на формирование клинической картины течения тяжелой герпесвирусной микст-инфекции, был проведен анализ выявленных нами значимых изменений уровней экспрессии мРНК и генов у пациентов с тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекцией и ВЭБ+ЦМВ микст-инфекцией средней тяжести по сравнению со здоровыми донорами. Обнаружены 5 мРНК (FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326, CASP8AP2-NM_001137667, CASP8-NM_033356, BTK-NM_001287345) и 3 гена (FAS-Σ, Puma/BBC3-Σ, ITCH-Σ), уровни экспрессии которых значительно повышались при ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции и оставались неизменными при ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции. Данные мРНК могут служить кандидными прогностическими факторами риска развития тяжелых форм герпесвирусной инфекции с участием ВГЧ-6. Настоящая работа значительно расширяет существующие представления о молекулярных механизмах

Адрес для переписки:

Сахарнов Николай Александрович
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. акад. И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.); 8 950 624-87-12 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: saharinov@nniem.ru; sakharnov_n@mail.ru

Contacts:

Nikolai A. Sakharnov
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Blokhina Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office); +7 950 624-87-12 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: saharinov@nniem.ru; sakharnov_n@mail.ru

Библиографическое описание:

Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Князев Д.И., Кулова Е.А.,
Преснякова Н.Б. Анализ экспрессии генов сигнальных путей апоптоза
и выживания в лейкоцитах крови детей при различных формах течения
ВГЧ-6-инфекции // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 315–328.
doi: 10.15789/2220-7619-ЕАО-1335

Citation:

Sakharnov N.A., Utkin O.V., Filatova E.N., Knyazev D.I., Kulova E.A.,
Presnyakova N.B. Expression analysis of apoptotic and survival genes
in blood leukocytes of children with various forms of HHV-6 infection //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020,
vol. 10, no. 2, pp. 315–328. doi: 10.15789/2220-7619-ЕАО-1335

патогенеза ВГЧ-6 инфекции с участием сигнальных путей апоптоза и выживания. Выявленные нами значимые изменения уровней экспрессии мРНК и генов с наибольшей вероятностью вносят вклад в патогенез ВГЧ-6 инфекции и тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции.

Ключевые слова: ВГЧ-6 инфекция, тяжелая ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция, лейкоциты, экспрессия мРНК, сигнальные пути, апоптоз, ДНК-микрочипы.

EXPRESSION ANALYSIS OF APOPTOTIC AND SURVIVAL GENES IN BLOOD LEUKOCYTES OF CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF HHV-6 INFECTION

Sakharnov N.A.^a, Utkin O.V.^a, Filatova E.N.^a, Knyazev D.I.^a, Kulova E.A.^b, Presnyakova N.B.^a

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

^b *Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

Abstract. Despite that human herpes virus type 6 (HHV-6) is extremely spread worldwide, molecular mechanisms of behind HHV-6 infection pathogenesis remain largely unexplored. No molecular markers were found linked to unfavorable course of HHV-6 infection which could allow to ease up selecting proper therapy and preventing development of complications. The aim of the study was to analyze expression of apoptosis and survival-related genes in blood leukocytes from 7–17-year-old children upon various forms of HHV-6 infection. The analysis was carried out by using DNA microarrays developed by us allowing to assess changes in expression level both of individual mRNAs and total gene set (-Σ). It was shown that during the acute phase of HHV-6 infection mRNA level was shifted toward pro-apoptotic factors. In the convalescence phase, most altered mRNA levels returned to normal. We have identified a set of mRNAs and genes whose expression level was significantly changed in acute disease phase. According to available data, these factors play an important role in regulation of studied signaling pathways. In order to search for HHV-6-associated factors, which markedly affect disease pattern of severe herpesvirus mixed infection, we analyzed significant changes of mRNA and genes expression levels in patients with severe HHV-6+EBV+CMV mixed infection and EBV+CMV mixed infection of moderate severity compared with healthy donors. The levels of 5 mRNAs (FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326, CASP8-NM_001137667, CASP8-NM_033356, BTK-NM_001287345) and 3 genes (FAS-Σ, Puma/BBC3-Σ, ITCH-Σ) were significantly increased in severe mixed infection comorbid with HHV-6 (EBV+CMV+HHV-6) but without HHV-6 (EBV+CMV) compared with healthy donors. Most of detected factors belong to Fas-mediated apoptosis pathway, and may be considered as candidate prognostic development factors of severe herpes virus infection involving HHV-6. This study profoundly extends existing understanding on molecular pathogenesis of HHV-6 infection involving apoptosis and pro-survival signaling pathways. Marked changes of mRNA and gene levels most likely contributed to the pathogenesis of HHV-6 as well as severe HHV-6+EBV+CMV mixed infection.

Key words: HHV-6 infection, severe HHV-6+EBV+CMV mixed infection, leukocytes, mRNA expression, signaling pathways, apoptosis.

Введение

Вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) отличается исключительно широким распространением, его носителями является до 95% мирового населения. Инфицирование происходит преимущественно в раннем возрасте и сохраняется пожизненно [6, 7, 9]. ВГЧ-6 является этиологическим агентом внезапной экзантемы (розеолы) у детей [7, 25, 29], а также участвует в развитии инфекционного мононуклеоза [2, 3]. Реактивация ВГЧ-6 инфекции часто возникает у иммунокомпromетированных больных и может приводить к серьезным осложнениям, в том числе гепатиту, энцефалиту и пневмонии вплоть до летального исхода [6, 10]. При микст-инфекции ВГЧ-6 с другими герпесвирусами (ВЭБ — вирусом Эпштейна–Барр и ЦМВ — цитомегаловирусом) усиливается степень выраженности и длительность клинических симптомов заболевания, повышается риск развития осложнений [12].

В настоящее время не выявлено специфических молекулярных факторов неблагоприятного течения ВГЧ-6 инфекции, которые позволили бы облегчить выбор адекватной терапии и предупредить возникновение осложнений. Это связано с недостаточной изученностью молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания. По данным литературы ВГЧ-6 инфицирует широкий спектр клеток иммунной системы, проявляя выраженный тропизм к CD4⁺ Т-лимфоцитам, моноцитам и ограниченно реплицируясь в CD8⁺ Т-клетках, В-лимфоцитах, НК-клетках и макрофагах [2, 5]. Хорошо известно, что другие лимфотропные герпесвирусы (ВЭБ, ЦМВ) эффективно модулируют иммунные реакции путем изменения экспрессии генов, регулирующих активацию, пролиферацию и апоптоз в клетках иммунной системы [4, 11, 14, 15, 16, 17, 24]. Выраженное изменение экспрессии генов (в том числе на уровне мРНК), участвующих в регуляции сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунных клет-

ках, может отражать молекулярные механизмы иммунопатогенеза ВГЧ-6 инфекции. Для комплексного анализа экспрессии большого количества мРНК традиционные методы исследования (ОТ-ПЦР и его различные варианты) являются трудоемкими и финансово затратными. Одним из возможных инструментов для решения таких задач являются ДНК-микрочипы, которые позволяют провести одновременную детекцию и полуколичественный анализ нескольких тысяч мРНК [1].

Целью настоящей работы является анализ экспрессии генов сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей, инфицированных ВГЧ-6, при различных формах течения инфекции.

Материалы и методы

Материалом исследования явились образцы периферической крови, полученные от детей и подростков 7–17 лет в острой фазе ВГЧ-6 инфекции средней тяжести (N = 21), в острой фазе ВЭБ+ЦМВ-микст-инфекции средней тяжести (N = 9) и в острой фазе тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции (N = 9). Далее производили повторное взятие образцов крови у тех же пациентов в фазе реконвалесценции при отсутствии клинических и лабораторных признаков заболевания в среднем через 2–2,5 месяца от начала манифестации заболевания. В качестве группы сравнения использовались образцы периферической крови практически здоровых доноров сопоставимого пола и возраста (N = 23) (табл. 1).

В работе использовались остаточные количества образцов, полученных для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с Хельсинской декларацией было получено лечащими врачами клиники.

Характеристика пациентов. Набор группы пациентов проводился на базе ГБУЗ НО ДГКБ № 27 «Айболит» г. Нижнего Новгорода. Клинические симптомы герпесвирусной инфекции оценивались на основании физикального исследования и лабораторных данных. Ведущими клиническими симптомами пациентов были острый тонзиллит, тонзиллофарингит, лимфаденопатия, гепатоспленомегалия, лихорадка, фебрильный судорожный приступ, реже — инфекционная экзантема. Из лабораторных анализов пациентам проводился общий (определение доли атипичных мононуклеарных клеток) и биохимический (определение уровней ферментов печени — АсАТ и АлАТ) анализ крови (табл. 1). Выявление этиологических аген-

Таблица 1. Клинические и лабораторные параметры пациентов исследуемых групп
Table 1. Clinical and laboratory parameters of studied groups patients

Диагноз, количество образцов Diagnosis, number of samples	Средний возраст, лет Average age, years old	Тяжесть заболевания Severity of disease	Наличие антител против ВГЧ-6, ВЭБ, ЦМВ Presence of antibody against HHV-6, EBV, CMV	Наличие ДНК ВГЧ-6, ВЭБ, ЦМВ Presence of DNA HHV-6, EBV, CMV	% атипичных мононуклеарных клеток % atypical mononuclear cells	Кратность повышения уровней АсАТ и АлАТ по сравнению с нормой Increase AST, ALT levels compared with normal values	Размеры поднижнечелюстных, околушных и заднешейных лимфатических узлов, см Dimensions of sub-mandibular, parotid and posterior cervical lymphatic nodes, cm
Острая ВГЧ-6 инфекция Acute HHV-6 infection N = 21	10,5	средняя moderate	IgG (ВГЧ-6)+ IgG (HHV-6)+	ВГЧ-6+ HHV-6+	8–15	АсАТ, АлАТ в 1–3 раза AST and ALT 1–3 normal values	1,5–2,5
Острая ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция Acute EBV+CMV mixed infection N = 9	12,5	средняя moderate	IgM (ВЭБ)+ IgM (ЦМВ)+ IgM (EBV)+ IgM (CMV)+	ВЭБ+ЦМВ+ EBV+CMV+	9–10	АсАТ, АлАТ в 2–3 раза AST and ALT 2–3 normal values	1,5–2,5
Острая ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция Acute HHV-6+EBV+CMV mixed infection N = 9	13,5	тяжелая severe	IgM (ВЭБ)+ IgM (ЦМВ)+ IgG (ВГЧ-6)+ IgM (EBV)+ IgM (CMV)+ IgG (HHV-6)+	ВГЧ-6+ ВЭБ+ ЦМВ+ HHV-6+ EBV+ CMV+	13–25	АсАТ в 2–6 раз, АлАТ 1–5 раз AST 2–6 normal values, ALT 1–5 normal values	2,0–6,5
Здоровые доноры Healthy donors N = 23	12	-	-	-	-	-	-

тов инфекции (ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) проводили на основании методов ИФА и ПЦР в реальном времени. С помощью наборов «Вектор-Бест» (Россия) определяли наличие антител классов IgM и IgG к антигенам ВГЧ-6, ВЭБ и ЦМВ в сыворотке крови пациентов. С помощью наборов «АмплиСенс® EBV-СМV-ННV6-скрин-FL» методом ПЦР в реальном времени выявляли наличие ДНК ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6 в образцах периферической крови пациентов. ВГЧ-6 инфекция диагностировалась при наличии в крови ДНК ВГЧ-6 и антител IgG к антигенам ВГЧ-6, а микст-инфекция при наличии в крови ДНК и антител IgM/IgG к антигенам ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6 в разных сочетаниях. Тяжесть заболевания определялась по комплексным клиническим и лабораторным критериям. Большинство пациентов поступали в стационар в состоянии средней степени тяжести. Тяжелые случаи течения заболевания были выявлены при микст-инфекции ВЭБ+ЦМВ+ВГЧ-6. На основании полученных данных были сформированы группы исследования. Критериями включения пациентов в группы явились: возраст от 7 до 17 лет, установленные диагнозы «ВГЧ-6-инфекция средней тяжести», «ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция средней тяжести», «тяжелая ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция». Критериями невключения явились: возраст младше 7 и старше 17 лет; наличие сопутствующей хронической патологии, влияющей на течение ВГЧ-6-инфекции (туберкулез, ВИЧ-инфекция, сахарный диабет, иммунодефицит). Характеристика клинических и лабораторных параметров пациентов исследуемых групп отражена в таблице 1. Все дети получали симптоматическое лечение герпесвирусной инфекции. В качестве этиотропной терапии ВГЧ-6 инфекции пациентам назначались противовирусные средства (ацикловир, рекомбинантный человеческий интерферон альфа-2 бета с таурином (pIFN α 2 β), ганцикловир с 12 лет) по показаниям.

В качестве группы сравнения были взяты образцы крови 23 клинически здоровых детей. Набор группы здоровых детей осуществлялся на базе поликлинического отделения ГБУЗ НО ДГКБ № 27 «Айболит» г. Нижнего Новгорода. В исследование включались пациенты, приходившие на плановый прием врача-педиатра и/или диспансеризацию. Критериями включения в группу здоровых детей были: возраст от 7 до 17 лет, отсутствие признаков хронической соматической патологии на момент осмотра, отсутствие установленных проявлений герпесвирусной инфекции (инфекционный мононуклеоз, внезапная экзантема, герпетический стоматит) в течение года до осмотра. Критериями невключения в группу здоровых детей были возраст младше 7 и старше 17 лет,

наличие эпизодов герпесвирусной инфекции в течение 3 месяцев до осмотра, наличие хронической соматической патологии.

Дизайн ДНК-микрочипа. С помощью разработанного нами ранее алгоритма «Splice variants microarray design pipeline» [27] были выбраны последовательности ДНК-зондов, специфичных для мРНК 201 гена сигнальных путей апоптоза и выживания.

Дизайн ДНК-микрочипа моделировали на основе кодирующих (NM_Protein-coding) и некодирующих (NR_Non-protein-coding) последовательностей мРНК, аннотированных в базе данных Ref Seq NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Разработанный микрочип содержал 316 ДНК-зондов для оценки уровней экспрессии сплайсированных изоформ мРНК разных генов (далее — уровни экспрессии мРНК), и 138 ДНК-зондов для оценки суммарных уровней экспрессии мРНК, являющихся продуктами одного гена (далее — уровни экспрессии гена, отмечены знаком Σ). Синтез ДНК-зондов проводили на слайдах 12K microarray *in situ* с помощью аппарата «V3 Synthesizer» (CustomArray Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Пробоподготовка и гибридизация РНК. Образцы крови обрабатывали раствором «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия) для удаления эритроцитов. Из полученной фракции лейкоцитов выделяли тотальную РНК с помощью набора «Магно-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) с последующей очисткой и концентрацией с помощью фенол-хлороформа. Тотальную мРНК (1,5–2 мкг) подвергали обратной транскрипции с помощью набора «Mint cDNA synthesis kit» (Евроген, Россия). Полученную кДНК амплифицировали в ходе ПЦР с помощью набора Encyclo («Евроген», Россия) по программе (95°C 25 с — 60°C 25 с — 72°C 6 мин). Амплифицированную кДНК (2 мкг) подвергали транскрипции с помощью набора «T7 RNA-polimerase» (Thermo Scientific, EU). Половина количества уридинтрифосфатов (УТР) в реакционной смеси была заменена на биотинилированные уридинтрифосфаты (ДНК-синтез, Россия), в результате получали пул биотин-меченой РНК, обратно комплементарной мРНК исследуемого образца. Фрагментированную биотин-меченую РНК (2 мкг) гибридизовали на микрочипы при 40°C в течение 18–20 ч. Процессинг микрочипов (блокирование, мечение, отмывка и внесение субстрата) выполняли с помощью набора «ElectraSense Detection Kit» (CustomArray Inc., США) в соответствии с протоколами производителя. Считывание сигналов гибридизации проводили амперометрическим методом с помощью прибора «ElectraSense Reader» и программы «ElectraSense application software» (CustomArray Inc., США).

Проточная цитофлуориметрия. В образцах исследуемых групп и в группе здоровых доноров был проведен анализ содержания субпопуляций лейкоцитов (CD45⁺), Т-клеток (CD3⁺), Т-киллеров (CD3⁺ CD8⁺), Т-хелперов (CD3⁺ CD4⁺), дубль-позитивных Т-клеток (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺), В-клеток (CD19⁺) и NK-клеток (CD16⁺ CD56⁺) (табл. 4). Подсчет количества клеток различных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови проводили методом 6-цветной проточной цитофлуориметрии. Использовали проточный цитофлуориметр «BD FACS Canto II» (Becton, Dickinson and Company, США). Для настройки напряжения на фотоумножителях и коэффициентов компенсации применяли калибровочные частицы «BD FACS™ 6-Color Setup Beads» (BD Biosciences, США). Расчет абсолютного и относительного содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови проводили с применением 6-цветной панели реагентов «BD Multitest™» (BD Biosciences, США) и программного обеспечения «BD FACS Canto clinical software» (BD Biosciences, США).

Алгоритм анализа данных. Расчет изменений относительных уровней экспрессии мРНК проводили по следующему алгоритму: полученные сигналы гибридизации в виде .esd-файлов экспортировали в .csv-файлы с помощью программы «ElectraSense Analysis 3.4.2» (CustomArray Inc., США). Далее все расчеты проводили в свободно распространяемой среде программирования R версии 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc.). Данные нормализовали с помощью алгоритма квантильной нормализации [28].

Полученные значения рассматривали в качестве относительных уровней экспрессии изучаемых мРНК (далее — уровней экспрессии мРНК). Для расчета изменений уровней экспрессии мРНК (FC/fold-change) использовали средние значения уровней экспрессии мРНК и генов в группах ВГЧ-бостр., ВГЧ-брек., ВЭБ+ЦМВостр., ВЭБ+ЦМВрек., ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВостр., ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВрек. и НОРМ. Показатель FC по отношению к норме рассчитывали по формуле: $FC\ X\ (\%) = (X_{\text{сред.}} \times 100 / \text{НОРМ}_{\text{сред.}}) - 100$, где X — название исследуемой группы.

Далее оценивалась статистическая значимость изменений уровней экспрессии мРНК. Для этого средние значения уровней экспрессии мРНК в группах исследования и у здоровых доноров сравнивали с помощью Т-теста с поправкой на ожидаемую долю ложных отклонений (FDR/False discovery rate test) с расчетом показателя статистической значимости q. При q < 0,05 различия между средними значениями считали статистически значимыми.

Нами были сформулированы два основных критерия отбора значимых изменений уровней

экспрессии мРНК при ВГЧ-6 инфекции — значения q < 0,05 и |FC| > 20%. При |FC| < 20% изменения считались не значимыми и далее не рассматривались.

Анализ различий количества клеток субпопуляций лимфоцитов в исследуемых группах по сравнению со здоровыми донорами проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни–Вилкоксона при пороговом значении уровня значимости p < 0,05. Расчет корреляций уровней экспрессии мРНК с абсолютным содержанием субпопуляций лимфоцитов проводили с помощью критерия Спирмена при пороговом значении уровня значимости p < 0,05.

Результаты

Изменения уровней экспрессии мРНК при ВГЧ-6 инфекции

Нами проведен анализ уровней экспрессии мРНК и генов апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей в группе пациентов с острой ВГЧ-6 инфекцией средней тяжести и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами. Анализируемые мРНК и гены были сгруппированы по функциональной роли в сигнальных каскадах. В результате анализа нами выявлен ряд значимых изменений уровней экспрессии мРНК и генов, описанных далее.

Из проапоптотических факторов внешнего пути апоптоза в острой фазе заболевания выявлялось повышение уровней экспрессии мРНК и генов, кодирующих лиганды рецепторов смерти (TRAIL/TNFSF10-Σ, HVEM-L/TNFSF14-Σ), рецепторы смерти (FAS-Σ, DR3/TNFRSF25-Σ, DR4/TNFRSF10A-NM_003844 и DR5/TNFRSF10B-Σ), медиаторы апоптоза (FADD-NM_003824 и FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326, FLASH/CASP8AP2-NM_001137667), инициаторные каспазы (CASP8-NM_033356, CASP2-Σ) и Fas-активируемую киназу FASTK-Σ. В фазе реконвалесценции уровни экспрессии всех перечисленных мРНК нормализовались (табл. 2).

Среди проапоптотических факторов митохондриального пути апоптоза в острой фазе заболевания выявлялось повышение уровней экспрессии генов PUMA/BBC3-Σ и BAX-Σ. Из других проапоптотических факторов наблюдалось резкое повышение уровня экспрессии гена OMI/HTRA2-Σ, а также уровней экспрессии мРНК и генов элементов апптосомы (CYCS-NM_018947, APAF-1-Σ, CASP-9-Σ). Из антиапоптотических факторов в острой фазе заболевания детектировалось значительное повышение уровней экспрессии генов BCL2-Σ и BclXL/BCL2L1-Σ, ITCH-Σ, а также уровня экспрессии мРНК ITCH-NM_001257138. В фазе реконва-

Таблица 2. Изменения уровней экспрессии мРНК (FC) в острой фазе ВГЧ-6 инфекции и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами

Table 2. Changes of mRNA expression levels (FC) in acute phase of HHV-6 infection and in recovery phase compared to healthy donors

Название гена и номер мРНК в GenBank Gene name and mRNA number in GenBank	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal	Название гена и номер мРНК в GenBank Gene name and mRNA number in GenBank	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal
Лиганды рецепторов смерти Death receptors ligands			Медиаторы апоптоза Mediators of apoptosis		
TRAIL/TNFRRelated Apoptosis Inducing Ligand/TNFSF10-Σ	39,05, q = 0,01	-4,65, q = 0,69	FAS-Associated Death Domain Protein/FADD-NM_003824	32,39, q = 0,01	5,83, q = 0,57
HVEM-L/Herpesvirus Entry Mediator Ligand/TNFSF14-Σ	45,89, q = 0,01	1,80, q = 0,89	FAS-Associated Factor 1/FAF1-NM_007051	31,22, q = 0,01	-4,42, q = 0,65
Рецепторы смерти Death receptors			Death Associated Protein Kinase 2/DAPK2-NM_014326	43,38, q = 0,02	-1,29, q = 0,93
Fas Cell Surface Death Receptor/FAS-Σ	31,13, q = 0,03	-5,31, q = 0,62	FLASH/Caspase 8 Associated Protein 2/CASP8AP2-NM_001137667	32,61, q = 0,04	-17,20, q = 0,15
DR3/Death receptor 3/TNFRSF25-Σ	57,10, q < 0,01	4,46, q = 0,75	Fas-activated Serine/Threonine Kinase/FASTK-Σ	180,82, q < 0,01	31,43, q = 0,21
DR4/Death receptor 4/TNFRSF10A-NM_003844	20,90, q = 0,03	-1,88, q = 0,82	Инициаторные каспазы Initiator caspases		
DR5/Death receptor 5/TNFRSF10B-Σ	42,95, q = 0,03	-9,36, q = 0,48	Caspase 8/CASP8-NM_033356	48,81, q = 0,04	-7,73, q = 0,63
-	-	-	Caspase 2/CASP2-Σ	51,29, q = 0,01	-2,98, q = 0,81
Проапоптотические митохондриальные факторы Pro-apoptotic mitochondrial factors			Антиапоптотические митохондриальные факторы Anti-apoptotic mitochondrial factors		
PUMA/Bcl-2-Binding Component 3/BBC3-Σ	59,84, q = 0,01	4,50, q = 0,78	Apoptosis Regulator Bcl-2/BCL2-Σ	75,18, q = 0,02	29,27, q = 0,23
BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator/BAX-Σ	23,08, q = 0,04	-6,8, q = 0,48	BclXL/BCL2 Like 1/BCL2L1-Σ	71,26, q < 0,01	7,81, q = 0,69
Элементы апоптосомы Apoptosome elements			Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase/ITCH-Σ	29,65, q = 0,04	-11,60, q = 0,29
Cytochrome C/CYCS-NM_018947	21,63, q = 0,04	4,73, q = 0,64	Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase/ITCH-NM_001257138	42,20, q = 0,04	-15,20, q = 0,27
Apoptotic Protease-Activating Factor-1/APAF-1-Σ	86,19, q < 0,01	-24,4, q = 0,18	Активаторы каспаз Caspase activators		
Caspase 9/CASP-9-Σ	71,46, q = 0,01	21,98, q = 0,31	HtrA Serine Peptidase 2/OMI/HTRA2-Σ	127,96, q < 0,01	49,03, q = 0,07
Эффекторные каспазы Effector caspases			Ингибиторы каспаз Caspase inhibitors		
Caspase 7/CASP7-NM_001267057	22,68, q = 0,04	-7,24, q = 0,44	Baculoviral IAP Repeat Containing 2/BIRC2-Σ	39,07, q = 0,04	-12,90, q = 0,32
Эффекторы апоптоза Apoptotic effectors			NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein/NAIP-Σ	135,38, q = 0,01	48,49, q = 0,14
Endonuclease G/ENDO G-NM_004435	24,99, q = 0,02	1,95, q = 0,83	Baculoviral IAP Repeat Containing 2/BIRC3-Σ	-34,94, q = 0,01	-23,60, q = 0,02

Название гена и номер мРНК в GenBank Gene name and mRNA number in GenBank	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal	Название гена номер мРНК в GenBank Gene name and mRNA number in GenBank	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal
Элементы NF-κB-сигнального пути NF-κB signaling elements			Элементы JNK-сигнального пути JNK signaling elements		
Bruton Tyrosine Kinase/BTK- NM_001287345	43,34, q = 0,04	-11,5, q = 0,47	TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1/ TAB1-Σ	34,72, q = 0,02	-10,5, q = 0,31
TNFR-associated Protein 1/TRAP-1-Σ	63,98, q < 0,01	-1,1, q = 0,93	MAPK/ERK Kinase Kinase 4/MAP4K4- NM_001242560	21,11, q = 0,04	1,21, q = 0,9
TNFR-associated Protein 5/TRAF-5-Σ	48,61, q = 0,01	5,101, q = 0,7	MAP Kinase Kinase 4/ MAP2K4-Σ	69,20, q < 0,01	7,71, q = 0,61
NFKB Inhibitor Beta/ NFKBIB-Σ	39,55, q = 0,01	3,287, q = 0,78	Mitogen-Activated Protein Kinase 14/ MAPK14-Σ	118,02, q < 0,01	2,33, q = 0,9
Nuclear Factor Кappa B Subunit 1/ NFKB1-Σ	30,27, q = 0,07	2,708, q = 0,84	Mitogen-Activated Protein Kinase 14/ MAPK14-NM_001315	33,68, q = 0,02	0,73, q = 0,95
Nuclear Factor Кappa B Subunit 2/ NFKB2-Σ	0,996, q = 0,91	-13,8, q = 0,11	C-Jun N-Terminal Kinase 1/JNK1/ MAPK8-Σ	38,19, q = 0,04	-4,26, q = 0,77
-	-	-	C-Jun N-Terminal Kinase 2/JNK2/ MAPK9-Σ	41,76, q = 0,02	20,43, q = 0,22
-	-	-	Jun Proto-Oncogene/ JUN-NM_002228	7,08, q = 0,56	-14,3, q = 0,17

Примечания. Положительные значения FC — повышение уровня экспрессии мРНК по сравнению с донорами. Отрицательные значения FC — снижение уровня экспрессии мРНК по сравнению с донорами. Σ — суммарный уровень экспрессии гена. Серым отмечены статистически значимые различия при $q < 0,05$.

Notes. Positive FC values indicate an increase in the level of mRNA expression compared to donors. Negative FC values indicate a decrease in the level of mRNA expression compared to donors. Σ — is the total level of gene expression. Gray indicates statistically significant differences at $q < 0,05$.

лесценции уровни экспрессии всех перечисленных мРНК и генов нормализовались (табл. 2).

Из эффекторных каспаз в острой фазе заболевания наблюдалось повышение уровня экспрессии мРНК CASP7-NM_001267057, который нормализовался в фазе реконвалесценции. Среди ингибиторов каспаз в острой фазе инфекции выявлялось повышение уровней экспрессии генов BIRC2-Σ (сIAP-1) и NAIP-Σ (BIRC-1). В то же время уровень экспрессии гена BIRC3-Σ (сIAP-2) снижался и оставался пониженным в фазе реконвалесценции, уровни экспрессии других перечисленных мРНК нормализовались. Из эффекторов апоптоза в острой фазе инфекции отмечалось повышение уровня экспрессии мРНК ENDOG-NM_004435, который нормализовался в фазе реконвалесценции (табл. 2).

Среди активаторов NF-κB-сигналинга в острой фазе заболевания выявлялось повышение уровня экспрессии мРНК BTK-NM_001287345 и уровней экспрессии генов-медиаторов TRAP-1-Σ и TRAF-5-Σ. С другой стороны наблюдалось повышение уровня экспрессии гена NFKBIB-Σ — ингибитора NF-κB. В фазе реконвалесценции уровни перечислен-

ных мРНК нормализовались. Уровни экспрессии генов эффекторного звена NF-κB-сигналинга (NF-κB1-Σ и NF-κB2-Σ) оставались неизменными как в острой фазе заболевания, так и в фазе реконвалесценции (табл. 2).

Из активаторов и медиаторов JNK-сигналинга в острой фазе заболевания повышались уровни экспрессии генов TAB1-Σ, MAP2K4-Σ, MAPK14-Σ, JNK1/MAPK8-Σ и JNK2/MAPK9-Σ, а также уровни экспрессии мРНК MAP4K4-NM_001242560, MAPK14-NM_001315 (табл. 2). В фазе реконвалесценции экспрессия перечисленных факторов нормализовалась. Необходимо отметить, что уровень экспрессии мРНК JUN-NM_002228 (эффектор JNK-сигналинга) не изменялся как в острой фазе заболевания, так и в фазе реконвалесценции (табл. 2).

Изменения уровней экспрессии мРНК у пациентов с тяжелой (ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ) микст-инфекцией

Был проведен анализ уровней экспрессии мРНК ключевых участников сигнальных каскадов апоптоза и выживания у пациентов с тяжелой микст-инфекцией с участием ВГЧ-6 (ВГЧ-6+

Таблица 3. Изменения уровня экспрессии мРНК (FC) в острой фазе ВГЧ-6 инфекции, тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции, ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами

Table 3. Changes of mRNA expression levels (FC) in acute phase of HHV-6 infection, severe HHV-6 + EBV + CMV mixed infection, EBV + CMV mixed infection and in recovery phase compared to healthy donors

Название гена и номер мРНК в GenBank Gene name and mRNA number in GenBank	ВГЧ-6 инфекция средней тяжести HHV-6 infection moderate severity		ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция тяжелая HHV-6+EBV+CMV mixt infection severe		ВЭБ+ЦМВ микст-инфекция средней тяжести EBV+CMV mixt infection moderate severity	
	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal	FC (%) в острой фазе, значение q FC% in acute phase, qVal	FC (%) в фазе реконвалесценции, значение q FC% in recovery phase, qVal
Fas Cell Surface Death Receptor/ FAS-Σ	31,13 q = 0,03	-5,31 q = 0,62	67,78 q = 0,04	3,40 q = 0,77	-6,55 q = 0,67	-16,35 q = 0,33
FAS-Associated Factor 1/FAF1- NM_007051	31,22 q = 0,02	-4,42 q = 0,66	55,14 q = 0,04	5,60 q = 0,61	-1,84 q = 0,90	-23,16 q = 0,11
Death Associated Protein Kinase 2/DAPK2-NM_014326	43,38 q = 0,02	-1,29 q = 0,93	91,56 q = 0,04	34,90 q = 0,057	-9,87 q = 0,59	-27,86 q = 0,129
Caspase 8 Associated Protein 2/ CASP8AP2-NM_001137667	32,61 q = 0,04	-17,22 q = 0,15	76,95 q = 0,04	45,88 q = 0,015	23,62 q = 0,30	-11,47 q = 0,57
Caspase 8/CASP8-NM_033356	48,81 q = 0,05	-7,73 q = 0,63	182,81 q = 0,03	5,99 q = 0,76	-28,99 q = 0,13	-33,42 q = 0,16
Bcl-2-Binding Component 3/ Puma/BBC3-Σ	59,84 q = 0,01	4,50 q = 0,78	115,87 q = 0,04	43,26 q = 0,04	-21,41 q = 0,21	-25,91 q = 0,20
Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase/ ITCH-Σ	29,65 q = 0,04	-11,63 q = 0,29	75,74 q = 0,04	22,73 q = 0,12	12,90 q = 0,519	-16,20 q = 0,37
Bruton Tyrosine Kinase/BTK- NM_001287345	43,34 q = 0,04	-11,51 q = 0,47	129,95 q = 0,04	37,45 q = 0,09	-18,56 q = 0,377	0,93 q = 0,97

Примечания. Положительные значения FC — повышение уровня экспрессии мРНК по сравнению с донорами. Отрицательные значения FC — снижение уровня экспрессии мРНК по сравнению с донорами. Σ — суммарный уровень экспрессии гена. Серым отмечены статистически значимые различия при $q < 0,05$.

Notes. Positive FC values indicate an increase in the level of mRNA expression compared to donors. Negative FC values indicate a decrease in the level of mRNA expression compared to donors. Σ — is the total level of gene expression. Gray indicates statistically significant differences at $q < 0,05$.

ВЭБ+ЦМВ), и микст-инфекцией средней тяжести без участия ВГЧ-6 (ВЭБ+ЦМВ) по сравнению со здоровыми донорами. В результате выявлено 5 мРНК (FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326, CASP8AP2-NM_001137667, CASP8-NM_033356, ВТК-NM_001287345) и 3 гена (FAS- Σ , PUMA/BBC3- Σ , ITCH- Σ) уровни экспрессии которых были значительно повышены в острой фазе тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции по сравнению со здоровыми донорами. При этом у пациентов в острой фазе ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции изменения уровней экспрессии данных мРНК и генов не были статистически значимыми. В фазе реконвалесценции после тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции уровень экспрессии мРНК CASP8AP2-NM_001137667 и уровень экспрессии гена PUMA/BBC3- Σ оставались повышенными по сравнению со здоровыми донорами (табл. 3).

Содержание субпопуляций лимфоцитов в образцах исследуемых групп

В острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами было выявлено повышение содержания CD45⁺ лейкоцитов (в 1,3 раза), CD3⁺ Т-клеток (в 1,3 раза) и CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов (в 1,5 раза). В фазе реконвалесценции количество клеток нормализовалось (табл. 4). В острой фазе ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции отмечалось снижение количества В-клеток (CD19⁺) (в 1,8 раза), которое оставалось сниженным в фазе реконвалесценции (в 1,9 раза) (табл. 4). В ходе тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции не было выявлено статистически значимых изменений количества клеток по сравнению с нормой (табл. 4).

Взаимосвязь между уровнями экспрессии мРНК и содержанием субпопуляций лимфоцитов в острой фазе ВГЧ-6 инфекции

Проведен корреляционный анализ уровней экспрессии 5 мРНК и 3 генов — кандидатных факторов риска развития тяжелых форм заболевания — с представленностью субпопуляций лимфоцитов в острой фазе ВГЧ-6 инфекции и в острой фазе тяжелой микст-инфекции. В острой фазе ВГЧ-6 инфекции уровень экспрессии мРНК FLASH/CASP8AP2-NM_001137667 коррелировал с содержанием CD3⁺ Т-клеток (0,456, $p = 0,038$) и CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов (0,543, $p = 0,011$), а уровень экспрессии мРНК FAF1-NM_007051 коррелировал с содержанием CD45⁺ лейкоцитов (0,558, $p = 0,009$) и CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов (0,468, $p = 0,032$). В острой фазе тяжелой микст-инфекции (а также и в других группах исследования) корреляций между уровнями экспрессии данных мРНК и содержанием перечисленных субпопуляций лимфоцитов не выявлялось.

Обсуждение

Особенности экспрессии генов апоптоза и выживания при ВГЧ-6 инфекции на уровне транскрипции практически не изучены. По немногим литературным данным исследования чувствительности различных типов ВГЧ-6-инфицированных клеток к апоптозу проводились на клеточном и белковом уровне. Было показано, что ВГЧ-6 инициирует апоптоз различных субпопуляций Т-клеток *in vitro* и *in vivo* [18, 21, 30]. В отдельных случаях добавление антител против рецептора смерти Fas усиливало данный эффект [21]. По данным Gupta и соавт. ВГЧ-6-индуцированный апоптоз Т-клеток ассоциировался с активацией каспаз 3, 8 и 9, что свидетельствовало об активности внешнего и внутреннего (митохондриального) сигнальных путей апоптоза [18].

Наши данные подтверждают активацию многих факторов внешнего пути апоптоза, в том числе участвующих в Fas-опосредованном сигнальном пути в лейкоцитах крови в острой фазе ВГЧ-6 инфекции. Показано, что в острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами баланс уровней экспрессии мРНК и генов смещается в сторону проапоптотических факторов. Был выявлен ряд мРНК и генов, изменения уровней экспрессии которых были значимыми согласно ранее установленным нами критериям. В фазе реконвалесценции большинство альтерированных уровней мРНК нормализовалось. Нами впервые показано, что в лейкоцитах периферической крови выявляется значительное повышение уровней экспрессии мРНК и генов-участников внешнего пути апоптоза: лигандов (TRAIL/TNFSF10- Σ), рецепторов (FAS- Σ , DR3/TNFRSF25- Σ , DR4/TNFRSF10A-NM_003844, DR5/TNFRSF10B- Σ), медиаторов (FADD-NM_003824, FAF1-NM_007051, FLASH/CASP8AP2-NM_001137667), киназы (FASTK- Σ) и инициаторной каспазы-8 (CASP8-NM_033356). Полученные данные указывают на активацию внешнего пути апоптоза, которая может одновременно индуцироваться несколькими рецепторами смерти и проапоптотическими медиаторами. FAF-1 и FLASH являются менее изученными проапоптотическими медиаторами по сравнению с FADD. Показано, что оба из них входят в состав комплекса DISC и ассоциированы с активацией Fas-опосредованного апоптоза [13, 20, 23, 26]. Отметим, что для острой фазы ВГЧ-6 инфекции было также характерно существенное повышение уровня экспрессии гена тирозин-киназы FASTK- Σ , которая, по данным литературы, является важным индуктором апоптоза лимфоцитов. Показано, что FASTK активируется

Таблица 4. Количество клеток субпопуляций лимфоцитов в группах исследования
 Table 4. The number of cells in leukocyte subpopulations in study groups

	Лейкоциты CD45⁺ кл/мкл, значение p Leukocytes CD45 ⁺ cell/ μ l, pVal	Т-клетки CD3⁺ кл/мкл, значение p T-cells CD3 ⁺ cell/ μ l, pVal	Т-киллеры CD3⁺CD8⁺ кл/мкл, значение p T-killers CD3 ⁺ CD8 ⁺ cell/ μ l, pVal	Т-хелперы CD3⁺CD4⁺ кл/мкл, значение p T-helper cells CD3 ⁺ CD4 ⁺ cell/ μ l, pVal	ДП-Т-клетки CD3⁺CD4⁺CD8⁺ кл/мкл, значение p Double positive T-cells CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ cell/ μ l, pVal	НК-клетки CD16⁺CD56⁺ кл/мкл, значение p NK-cells CD16 ⁺ CD56 ⁺ cell/ μ l, pVal	В-клетки CD19⁺ кл/мкл, значение p B cells CD19 ⁺ cell/ μ l, pVal
ВГЧ-6 в острой фазе HHV-6 in acute phase	3280,0 (3145,3; 3389,5) p = 0,006	2347,5 (1988,6; 2502,9) p = 0,010	793,7 (715,3; 942,2) p = 0,107	1317,4 (1043,1; 1462,4) p = 0,010	16,6 (10,7; 20,86) p = 0,962	436,9 (344,6; 549,7) p = 0,288	420,0 (284,6; 456,7) p = 0,962
ВГЧ-6 в фазе реконв. HHV-6 in recovery phase	3212,8 (2669,3; 3426,1) p = 0,055	2336,6 (1732,3; 2508,4) p = 0,077	701,1 (545,2; 956,1) p = 0,666	1215,9 (946,1; 1327,7) p = 0,083	17,5 (9,0; 39,3) p = 0,701	403,2 (324,4; 544,5) p = 0,310	426,7 (378,6; 542,2) p = 0,310
ВЭБ+ЦМВ в острой фазе EBV+CMV in acute phase	2601,3 (2359,2; 2859,4) p = 0,821	1690,3 (1519,4; 2182,7) p = 0,88	871,9 (616,5; 1075,5) p = 0,415	830,2 (774,3; 866,3) p = 0,312	10,3 (8,2; 20,4) p = 0,541	473,6 (444,7; 585,0) p = 0,134	193,9 (106,6; 233,7) p = 0,041
ВЭБ+ЦМВ в фазе реконв. EBV+CMV in recovery phase	2313,9 (2308,6; 2319,3) p = 0,427	1705,5 (1676,7; 1734,2) p = 0,88	656,6 (541,1; 772,1) p = 0,99	986,0 (924,0; 1048,0) p = 0,54	23,2 (16,2; 30,1) p = 0,88	401,1 (395,2; 407,2) p = 0,6	182,3 (161,0; 203,7) p = 0,027
ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ в острой фазе HHV-6+EBV+CMV in acute phase	2249,7 (2014,0; 2842,4) p = 0,88	1475,6 (1354,1; 1977,3) p = 0,821	544,3 (474,8; 838,2) p = 0,88	853,6 (746,8; 1040,2) p = 0,821	10,0 (8,7; 12,1) p = 0,113	335,8 (301,1; 509,1) p = 0,704	250,0 (242,2; 331,8) p = 0,395
ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ в фазе реконв. HHV-6+EBV+CMV in recovery phase	3049,8 (2578,4; 3330,8) p = 0,352	1696,4 (1547,4; 2174,0) p = 0,821	812,0 (667,9; 988,6) p = 0,352	808,2 (759,2; 1098,0) p = 0,762	13,5 (12,7; 14,1) p = 0,275	628,5 (440,6; 704,9) p = 0,182	437,4 (369,6; 492,7) p = 0,541
Здоровые доноры Healthy donors	2504,2 (2161,2; 2745,1)	1759 (1493,7; 1958,2)	718,2 (525,3; 809,1)	902,1 (824,6; 1039,1)	15,5 (13,9; 19,7)	354,1 (240,0; 461,5)	341,3 (259,6; 493,2)

Примечания. Значения количества клеток представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей, p — уровень статистической значимости различий значений пациентов и здоровых доноров. Серым отмечены значения p < 0,05.

Notes. Numbers of cells are presented as medians, 25 and 75 percentiles, p is the level of statistical significance of differences in values of patients and healthy donors. Gray indicates p < 0,05.

в ходе Fas-опосредованного апоптоза и фосфорилирует ядерный регулятор TIA-1, который изменяет баланс сплайсинга в сторону образования полноразмерной мРНК, кодирующей проапоптотическую форму Fas [22].

Нами показано, что в острой фазе ВГЧ-6 инфекции баланс уровней экспрессии мРНК и генов также смещался в сторону проапоптотических митохондриальных факторов (BAX- Σ , PUMA/BBC3- Σ) и элементов апоптосомы (CYCS-NM_018947, APAF-1- Σ , CASP-9- Σ), что указывает на активацию некоторых звеньев митохондриального пути апоптоза. Однако, наряду с этим, повышались и уровни экспрессии генов антиапоптотических митохондриальных факторов (BCL2- Σ , BCLXL/BCL2L1- Σ , ITCH- Σ), вносящих свой вклад в сложную картину межмолекулярных взаимоотношений в структуре апоптоз-ассоциированного сигнального пути. В период реконвалесценции альтерированные уровни экспрессии мРНК большинства факторов нормализовались. Известно, что фактор BCL-XL является специфическим антагонистом проапоптотического фактора PUMA/BBC3- Σ [31]. Возможно, выявленное нами синхронное повышение уровней экспрессии генов BCLXL- Σ и PUMA/BBC3- Σ взаимно нейтрализует их апоптоз-ассоциированную активность. Также известно, что убиквитин-лигаза ITCH опосредует протеасомную деградацию проапоптотического митохондриального фактора BID [8] и, таким образом, блокирует активацию митохондриального пути апоптоза.

Согласно полученным нами данным, в острой фазе ВГЧ-6 инфекции значительно повышались уровни экспрессии мРНК и генов каспазы CASP7-NM_001267057, активатора каспаз OMI/HTRA2- Σ и эндонуклеазы G ENDOG-NM_004435, что свидетельствует об активации факторов, участвующих в реализации эффекторной фазы апоптоза. В пользу этого также говорит снижение уровня экспрессии гена cIAP-2/BIRC3- Σ , являющегося ингибитором эффекторных каспаз. С другой стороны в острой фазе ВГЧ-6 инфекции детектировалось повышение уровней экспрессии двух генов cIAP-1/BIRC2- Σ и BIRC-1/NAIP- Σ , взаимодействующих с эффекторными каспазами, и проявляющих антиапоптотические свойства.

Таким образом, нами показано, что в лейкоцитах периферической крови в острой фазе ВГЧ-6 инфекции баланс уровней экспрессии мРНК смещается в сторону проапоптотических факторов, связанных с реализацией как внешнего, так и митохондриального путей апоптоза, а также активацией его эффекторных элементов. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым ВГЧ-6 может инициировать апоптоз различных субпо-

пуляций лимфоцитов в условиях *in vitro* и *in vivo* [18, 19, 30]; в отношении суммарной фракции лейкоцитов периферической крови данные получены нами впервые. С другой стороны мы обнаружили повышение экспрессии ряда мРНК с антиапоптотическими функциями, что может являться отражением антагонистических взаимодействий между проапоптотическим влиянием ВГЧ-6, направленным на апоптоз лимфоцитов, как факторов адаптивного иммунитета, так и иммунными факторами, направленными на выживание клеток в ходе антивирусного иммунного ответа.

Нами показано, что в острой фазе ВГЧ-6 инфекции в лейкоцитах периферической крови на фоне повышения уровней экспрессии мРНК и генов активаторов и медиаторов NF- κ B- и JNK-опосредованных сигнальных путей, уровни экспрессии мРНК и генов эффекторного звена (NF- κ B1, NF- κ B2, cJun) оставались неизменными по сравнению со здоровыми донорами, что может свидетельствовать об отсутствии выраженного иммунного ответа на инфекцию, а также косвенно объяснять менее острые клинические проявления ВГЧ-6 инфекции по сравнению с ВЭБ и ЦМВ инфекциями.

С целью поиска ВГЧ-6-ассоциированных факторов, влияющих на утяжеление клинической картины микст-инфекции, проведен анализ выявленных нами изменений уровней экспрессии мРНК и генов у пациентов с тяжелой микст-инфекцией с участием ВГЧ-6 (ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ), и микст-инфекцией средней тяжести без участия ВГЧ-6 (ВЭБ+ЦМВ) по сравнению со здоровыми донорами. В результате обнаружено 5 мРНК (FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326, CASP8AP2-NM_001137667, CASP8-NM_033356, BTK-NM_001287345), и 3 гена (FAS- Σ , Puma/BBC3- Σ , ITCH- Σ) уровни экспрессии которых были значительно повышены в острой фазе ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции и не изменялись в группе ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции (табл. 3), что указывает на ВГЧ-6-ассоциированный характер изменений данных факторов. По функциональной роли в сигнальных путях к антиапоптотическим относятся 2 фактора — BTK-NM_001287345 активатор В-клеточного иммунного ответа, и ITCH- Σ — ингибитор митохондриального апоптоза. Большинство выявленных нами факторов относятся к проапоптотическим участникам сигнального пути Fas-опосредованного апоптоза (FAS- Σ , CASP8-NM_033356, CASP8AP2-NM_001137667, FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326). Кроме того, PUMA/BBC3- Σ принадлежит к функциональной группе проапоптотических факторов митохондриального апоптоза. Необходимо отметить, что в фазе реконвалесценции после тяжелой

ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции уровни экспрессии мРНК CASP8AP2-NM_001137667 и гена PUMA/BBC3- Σ оставались повышенными по сравнению со здоровыми донорами, в отличие от ВГЧ-6 инфекции в фазе реконвалесценции, где данные уровни нормализовались (табл. 3), что отражает пролонгированное воздействие данных факторов в условиях тяжелой микст-инфекции и, возможно, связано с длительностью ее клинических проявлений.

Таким образом, специфическое влияние ВГЧ-6 на утяжеление клинической картины ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции может быть связано с изменением уровней экспрессии мРНК ряда проапоптотических факторов и активацией внешнего Fas-опосредованного пути апоптоза клеток. Выявленные нами мРНК могут служить кандидатными прогностическими факторами риска развития тяжелых форм герпесвирусной инфекции с участием ВГЧ-6.

Нами было показано, что в острой фазе ВГЧ-6 инфекции уровень экспрессии мРНК FLASH/CASP8AP2-NM_001137667 коррелировал с содержанием CD3⁺ Т-клеток и CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов, а уровень экспрессии мРНК FAF1-NM_007051 коррелировал с содержанием CD45⁺ лейкоцитов и CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов. Выявленные нами взаимосвязи соответствовали изменениям содержания субпопуляций (CD3⁺) Т-клеток, (CD3⁺CD4⁺) Т-хелперов и (CD45⁺) лейкоцитов в острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами. Мы предполагаем, что клетки данных субпопуляций вносят основной вклад в экспрессию мРНК FLASH/CASP8AP2-NM_001137667 и FAF1-NM_007051. Данные мРНК могут играть существенную роль в функционировании и регуляции содержания перечисленных субпопуляций лимфоцитов в ходе противовирусного иммунного ответа. В острой фазе тяжелой микст-инфекции (а также в других группах исследования) корреляций между уровнями экспрессии данных мРНК и содержанием перечисленных субпопуляций не выявлялось, что соответствовало факту отсутствия различий в содержании субпопуляций лимфоцитов в острой фазе тяжелой микст-инфекции по сравнению со здоровыми донорами. Для оценки непосредственного влияния обнаруженных нами изменений уровней мРНК на содержание и функциональные свойства клеток перечисленных субпопуляций в ходе ВГЧ-6 инфекции необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

С помощью ДНК-микрочипов проведен количественный анализ уровней экспрессии мРНК и генов апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с ВГЧ-6 инфекцией в острой фазе заболевания и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами. Показано, что в острой фазе инфекции баланс уровней экспрессии мРНК и генов смещался в сторону проапоптотических факторов, что может оказывать существенное влияние на чувствительность лейкоцитов к апоптозу. В фазе реконвалесценции большинство уровней экспрессии мРНК и генов нормализовалось. Нами выявлен ряд мРНК и генов, экспрессия которых значительно изменялась в острой фазе заболевания. Данные факторы по литературным данным играют важную функциональную роль в регуляции исследуемых сигнальных путей. С целью поиска ВГЧ-6-ассоциированных факторов, влияющих на утяжеление клинической картины течения герпесвирусной микст-инфекции, проведен анализ выявленных нами изменений уровней экспрессии мРНК и генов у пациентов с тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекцией и ВЭБ+ЦМВ микст-инфекцией средней тяжести по сравнению со здоровыми донорами. Обнаружены 5 мРНК и 3 гена, уровни экспрессии которых были существенно повышены при ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции и оставались неизменными при ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции. С точки зрения функциональной принадлежности большинство таких мРНК и генов являются ключевыми участниками сигнального пути Fas-опосредованного апоптоза. Таким образом, вклад ВГЧ-6 в утяжеление клинической картины тяжелой микст-инфекции предположительно связан с активацией данного сигнального пути и выявленные мРНК могут служить кандидатными прогностическими факторами риска развития тяжелых форм герпесвирусной инфекции с участием ВГЧ-6.

Настоящая работа значительно расширяет существующие представления о молекулярных механизмах патогенеза ВГЧ-6 инфекции, в реализации которых задействованы сигнальные пути апоптоза и выживания. Выявленные нами изменения уровней экспрессии мРНК и генов сигнальных путей апоптоза и выживания с наибольшей вероятностью вносят вклад в патогенез ВГЧ-6 инфекции и тяжелой ВГЧ-6+ВЭБ+ЦМВ микст-инфекции.

Список литературы/References

1. Князев Д.И., Старикова В.Д., Уткин О.В., Солнцев Л.А., Сахарнов Н.А., Ефимов Е.И. Особенности сплайсинг-ориентированных ДНК-микрочипов и их применение в биомедицинских исследованиях (обзор) // Современные технологии в медицине. 2015. Т. 7, № 4. С. 162–173. [Knyazev D.I., Starikova V.D., Utkin O.V., Solntsev L.A., Sakharov N.A., Efimov E.I. Features of splicing-oriented DNA microarrays and their application in biomedical research (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2015, vol. 7, no. 4. pp. 162–173. doi: 10.17691/stm2015.7.4.23 (In Russ.)]

2. Новосад Е.В., Шамшева О.В., Львов Н.Д., Мельниченко А.В., Егорова Н.Ю., Михайловская Г.В., Никитина А.А., Зоненшайн Т.П. Инфекционный мононуклеоз, ассоциированный с вирусом герпеса 6 типа // *Детские инфекции*. 2008. Т. 7, № 1. С. 36–38. [Novosad E.V., Shamsheva O.V., Lvov N.D., Melnichenko A.V., Egorova N.Yu., Mikhailovskaya G.V. Infectious mononucleosis associated with herpes simplex virus type 6. *Detskie Infektsii = Children Infections*, 2008, vol. 7, no. 1, pp. 36–38. (In Russ.)]
3. Тимченко В.Н., Хмилевская С.А. Болезни цивилизации (корь, ВЭБ-мононуклеоз) в практике педиатра: руководство для врачей. СПб.: Специальная Литература, 2017. 527 с. [Timchenko V.N., Khmilevskaya S.A. Diseases of civilization (measles, EBV-mono-nucleosis) in the practice of a pediatrician: a guide for doctors. *St. Petersburg: Special Literature*, 2017. 527 p. (In Russ.)]
4. Филатова Е.Н., Уткин О.В., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д., Краснов В.В., Сенягина 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 upon activation of CD95 and DR3 receptors. *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 109–118. doi: 10.17691/stm2015.7.3.16 (In Russ.)]
5. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции // *Медиаль*, 2014. С. 172–197. [Filatova E.N., Utkin O.V. Modern approaches to the modeling of herpes infection. *Medial*, 2014, vol. 2, no. 12, pp. 172–197. (In Russ.)]
6. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 2, pp. 313–335. doi: 10.1128/CMR.00122-14.
7. Akashi K., Eizuru Y., Sumiyoshi Y., Minematsu T., Hara S., Harada M., Kikuchi M., Niho Y., Minamishima Y. Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N. Engl. J. Med.*, 1993, vol. 329, pp. 168–171. doi: 10.1056/NEJM199307153290304
8. Azakir B.A., Desrochers G., Angers A. The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *FEBS J.*, 2010, vol. 277, no. 5, pp. 1319–1330. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07562.x
9. Balachandra K., Ayuthaya P., Auwanit W., Jayavasu C., Okuno T., Yamanishi K., Takahashi M. Prevalence of antibody to human herpesvirus 6 in women and children. *Microbiol. Immunol.*, 1989, vol. 33, pp. 515–518. doi: 10.1111/j.1348-0421.1989.tb02001.x
10. Beović B., Pečarić-Meglić N., Marin J., Bedernjak J., Muzlović I., Čižman M. Fatal human herpesvirus 6-associated multifocal meningoencephalitis in an adult female patient. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2001, vol. 33, no. 12, pp. 942–944. doi: 10.1080/00365540110076570
11. Brune W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res.*, 2011, vol. 15, pp. 144–150. doi: 10.1016/j.virus-res.2010.10.012
12. Cavallo M.L., Castrovilli A., D’Introno A., Perrone A., Polito A., Lenato G.M., Sabbà C.A. A systemic and severe infection via cytomegalovirus and other herpesviruses in a young apparently immunocompetent patient: a case report. *J. Med. Cases*, 2017, vol. 8, no. 9, pp. 265–268. doi: https://doi.org/10.14740/jmc2865w
13. Chu K., Niu X., Williams L.T. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, vol. 92, pp. 11894–11898
14. Fliss P.M., Brune W. Prevention of cellular suicide by cytomegaloviruses. *Viruses*, 2012, vol. 4, pp. 1928–1949. doi: 10.3390/v4101928
15. Floettmann J.E., Rowe M. Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-κB activation. *Oncogene*, 1997, vol. 15, pp. 1851–1858. doi: 10.1038/sj.onc.1201359
16. Fu Q., He C., Mao Z.R. Epstein–Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 8–24. doi: 10.1631/jzus.B1200189
17. Goldmacher V.S., Bartle L.M., Skaletskaya A., Dionne C.A., Kedersha N.L., Vater C.A., Han J.W., Lutz R.J., Watanabe S., Cahir McFarland E.D., Kieff E.D., Mocarski E.S., Chittenden T. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, pp. 12536–12541. doi: 10.1073/pnas.96.22.12536
18. Gupta S., Agrawal S., Gollapudi S. Differential effect of human herpesvirus 6A on cell division and apoptosis among naïve and central and effector memory CD4 and CD8 T-cell subsets. *J. Virol.*, 2009, pp. 5442–5450. doi: 10.1128/JVI.00106-09
19. Ichimi, R., Jin-no T., Ito M. Induction of apoptosis in cord blood lymphocytes by HHV-6. *J. Med. Virol.*, 1999, vol. 58, pp. 63–68. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199905)58:1<63::aid-jmv10>3.0.co;2-c
20. Imai Y., Kimura T., Murakami A., Yajima N., Sakamaki K., Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, 1999, vol. 398, pp. 777–785. doi: 10.1038/19709
21. Inoue Y., Yasukawa M., Fujita S. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J. Virology*, 1997, vol. 71, pp. 3751–3759.
22. Izquierdo J.M., Valcárcel J. Fas-activated serine/threonine kinase (FASTK) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 3, pp. 1539–1543. doi: 10.1074/jbc.C600198200
23. Milovic-Holm K., Kriehoff E., Jensen K., Will H., Hofmann T.G. FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J.*, 2007, vol. 26, pp. 391–401. doi: 10.1038/sj.emboj.7601504
24. O’Brien V. Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 1998, vol. 79, pp. 1833–1845. doi: 10.1099/0022-1317-79-8-1833
25. Pruksananonda P., Hall C.B., Insel R.A., McIntyre K., Pellett P.E., Long C.E., Schnabel K.C., Pincus P.H., Stamey F.R., Dambaugh T.R., Stewart J.A. Primary human herpesvirus infection in young children. *New Engl. J. Med.*, 1992, vol. 326, no. 22, pp. 1445–1452. doi: 10.1056/NEJM199205283262201
26. Ryu S.W., Lee S.J., Park M.Y., Jun J.I., Jung Y.K., Kim E. Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing Signaling Complex. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 24003–24010. doi: 10.1074/jbc.M302200200

27. Solntsev L.A., Starikova V.D., Sakharnov N.A., Knyazev D.I., Utkin O.V. Strategy of probe selection for studying mRNAs that participate in receptor-mediated apoptosis signaling. *Mol. Biol.*, 2015, vol. 49, no. 3, pp. 457–465. doi: 10.1134/S0026893315030164
28. Wu Z., Aryee M. J. Subset quantile normalization using negative control feature. *J. Comput. Biol.*, 2010, vol. 17, no. 10, pp. 1385–1395. doi: 10.1089/cmb.2010.0049
29. Yamanishi K., Okuno T., Shiraki K., Takahashi M., Kondo T., Asano Y., Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthema subitum. *Lancet*, 1988, vol. 1, pp. 1065–1067. doi: 10.1016/s0140-6736(88)91893-4
30. Yasukawa M., Inoue Y., Ohminami H., Terada K., Fujita S. Apoptosis of CD4 T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *J. Gen. Virol.*, 1998, vol. 79, pp. 143–147. doi: 10.1099/0022-1317-79-1-143
31. Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K.W., Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell*, 2001, vol. 7, no. 3, pp. 673–682.

Авторы:

Сахарнов Н.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Князев Д.И., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Кулова Е.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия;

Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

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

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

Knyazev D.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kulova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Infectious Diseases Department, Privolzhsky Research Medical University, 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.

Поступила в редакцию 16.12.2019
Отправлена на доработку 16.01.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 16.12.2019
Revision received 16.01.2020
Accepted 11.03.2020