

**САХАРНОВ НИКОЛАЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОСНОВНЫХ УЧАСТНИКОВ  
СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ АПОПТОЗА И ВЫЖИВАНИЯ  
В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ  
ПРИ ВЭБ И ВГЧ-6 ИНФЕКЦИИ**

**14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н.Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный руководитель:**

Кандидат биологических наук

**Уткин Олег Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

Кандидат биологических наук

**Кудрявцев Игорь Владимирович**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдел иммунологии, лаборатория клеточной иммунологии, заведующий лабораторией.

Доктор медицинских наук, доцент

**Макарова Екатерина Вадимовна**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения, Российской Федерации, кафедра пропедевтики внутренних болезней, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в «\_\_\_» часов на заседании Диссертационного совета Д208.072.05 Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва ул. Островитянова, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва ул. Островитянова, д. 1, и на сайте: <https://www.rsmu.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_ г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
Кандидат медицинских наук, доцент



**Кузнецова Татьяна Евгеньевна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования и степень ее разработанности**

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) и вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) являются представителями семейства герпесвирусов (*Herpesviridae*) и характеризуются исключительно широким распространением. По различным данным более 90% взрослого населения мира являются серопозитивными по отношению к ВЭБ и ВГЧ-6 (Панасенко Л.М., 2019; Arvin A. et al., 2007; Biganzoli P. et al., 2019).

ВЭБ и ВГЧ-6 участвуют в патогенезе широкого спектра заболеваний. ВЭБ является основным этиологическим агентом инфекционного мононуклеоза, а также играет роль в развитии злокачественных и аутоиммунных заболеваний, гемофагоцитарного синдрома, васкулитов, рассеянного склероза (Боковой А. Г. и др., 2014; Исаков В.А. и др., 2013; Касымова Е. Б. и др., 2017; Кудин А.П. и др., 2007; Arvin A. et al., 2007, Raab-Traub N., 2012). Тяжелая форма течения ВЭБ-инфекции может приводить к ее хронизации и развитию осложнений, таких как вторичная иммунная недостаточность и нарушения клеточных иммунных реакций (Кускова Т.К. и др., 2004; Kerr J. R., 2019; Pender M.P., 2012).

ВГЧ-6 является этиологическим агентом внезапной экзантемы детей (шестой болезни) и инфекционного мононуклеоза, а также ассоциирован с фебрильной лихорадкой, энцефалитом, гепатитом, пневмонией, поражениями центральной нервной системы, онкологическими заболеваниями (Кускова Т.К. и др., 2004; Murakami K., 2004; Никольский М. А., 2008, 2012; Bartolini L. et al., 2019; Ward K. N. et al., 2005, Lacroix A. et al., 2010, Wells M. J. et al., 2016). При общем сходстве клинических признаков ВЭБ и ВГЧ-6 - опосредованного мононуклеоза, последний характеризуется более мягким течением (Новосад Е. В. и др., 2008; Hashimoto H. et al., 2002).

В острой форме ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции чаще проявляются у детей и подростков, что обусловлено незрелостью механизмов иммунитета и влиянием гормональных сдвигов на иммунную систему. Показано, что у детей школьного возраста по сравнению с младшей группой чаще диагностируются тяжелые формы инфекции (Тимченко В.Н. и др., 2018).

Несмотря на активное изучение, молекулярные механизмы иммунопатогенеза ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции остаются во многом неисследованными. Поскольку ВЭБ и ВГЧ-6 преимущественно лимфотропны, их основное патогенетическое действие направлено на модуляцию активности иммунокомпетентных клеток, что позволяет вирусам успешно уклоняться от иммунного ответа и пожизненно персистировать в организме. Характер взаимодействий ВЭБ и ВГЧ-6 с клетками иммунной системы определяет тяжесть заболевания и вероятность возникновения осложнений (Железникова Г.Ф. и др., 2005; Dagna L. et al., 2013; Flamand L. et al., 1995; Mao J.Q. et al., 2014).

Динамика содержания клеточных популяций иммунной системы и, в конечном итоге, эффективность иммунной защиты зависит от баланса процессов апоптоза и пролиферации клеток. Управление этими процессами осуществляется элементами внутриклеточных путей передачи сигналов, стимулирующих апоптоз или выживание клеток. Нарушения регуляции данных сигнальных путей отмечены как при ВЭБ, так и при ВГЧ-6 инфекции. Так, в ходе ВЭБ инфекции наблюдается дисбаланс апоптоза и пролиферации иммунных клеток, нарушение механизмов Т- и NK-клеточного иммунного ответа, развитие неконтролируемых цитотоксических и воспалительных реакций (Houldcroft C.J. et al., 2015; Worth A. J. et al., 2016). Выявлены продукты генома ВЭБ, специфически воздействующие на элементы сигнальных путей апоптоза и выживания клеток (Fitzsimmons L. et al., 2017; Kanda T., 2018). ВГЧ-6-опосредованные механизмы и факторы регуляции апоптоза и выживания изучены в меньшей степени, чем при ВЭБ инфекции. Известно, что ВГЧ-6 может инициировать апоптоз Т-клеток (Ichimi, R. et al., 1999; Inoue Y. et al., 1997; Yasukawa M. et al., 1998).

Участники сигнальных путей апоптоза и выживания характеризуются высоким полиморфизмом, который обеспечивается на посттранскрипционном уровне. С помощью механизма альтернативного сплайсинга из одного гена может образовываться множество различных транскриптов, кодирующих белковые продукты с про- и антиапоптотическими свойствами (Pelli N. et al., 2007). Чувствительность клеток к апоптозу зависит от изменений уровней экспрессии генов и транскриптов – участников сигнальных путей апоптоза и выживания. Известно, что в ходе иммунного ответа при активации Т- и В- лимфоцитов, а также других иммунокомпетентных клеток выявляются существенные изменения характера сплайсинга и, соответственно, уровней экспрессии апоптоз-ассоциированных генов (Beisang D. et al., 2012; Grigoryev Y.A. et al., 2009, Pai A.A. et al., 2016). Особенности экспрессии генов и транскриптов сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции остаются во многом неизученными. Таким образом, поиск молекулярных механизмов и факторов иммунопатогенеза ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции целесообразно проводить путем оценки уровней экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках крови. Исследование этих объектов может быть полезным для разработки новых методов биотерапии и для оценки риска развития тяжелых форм течения данных заболеваний.

### **Цель исследования**

Анализ экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией.

## **Задачи исследования**

1. Выявить изменения уровней экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией по сравнению со здоровыми донорами.
2. Определить взаимосвязи между уровнями экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания и содержанием основных субпопуляций лимфоцитов при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции.
3. Провести поиск молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ инфекции.

## **Научная новизна исследования**

Впервые установлено, что в лейкоцитах крови в острой фазе ВЭБ инфекции по сравнению со здоровыми донорами повышаются уровни экспрессии антиапоптотических генов и транскриптов (DR5/TNFRSF10B-NR\_027140, DCR1/TNFRSF10C-NM\_003841, DCR2/TNFRSF10D-NM\_003840, CASP6-NM\_032992, cIAP-1/BIRC2-NM\_001166, cIAP-1/BIRC2-NM\_001256166) и генов сигналинга выживания (NIK/MAP3K14, NEMO/IKBKG), при этом снижаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10-NM\_003810, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, BAK1, BAX-NM\_138763, CASP7, CASP7-NM\_033338).

Впервые показано, что в лейкоцитах крови в острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами повышаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10, HVEM-L/TNFSF14, DR3/TNFRSF25, DR4/TNFRSF10A-NM\_003844, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, FAF1-NM\_007051, DAPK2-NM\_014326, FLASH/CASP8AP2-NM\_001137667, CASP2, FASTK, PUMA/BBC3, OMI/HTRA2, CASP7-NM\_001267057, ENDOG-NM\_004435), антиапоптотических генов и транскриптов (BCLXL/BCL2L1, ITCH, ITCH-NM\_001257138, BTK-NM\_001287345), а также генов и транскриптов сигналинга выживания (TRAF-1, TRAF-5, TAB1, MAP4K4-NM\_001242560, MAP2K4, MAPK14, MAPK14-NM\_001315, JNK1/MAPK8, JNK2/MAPK9).

Впервые выявлены взаимосвязи между уровнями экспрессии генов и транскриптов и содержанием субпопуляций иммунокомпетентных клеток (цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов, дубль-позитивных Т-клеток, В-клеток и НК-клеток) в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции.

Впервые предложен набор молекулярно-генетических маркеров (BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6), изменение экспрессии которых в лейкоцитах крови характерно для тяжелой формы течения ВЭБ инфекции.

### **Теоретическая значимость работы**

Полученные нами данные вносят значительный вклад в существующие представления о молекулярных механизмах регуляции апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции. Показано, что при острой ВЭБ инфекции в лейкоцитах крови по сравнению со здоровыми донорами баланс уровней экспрессии ряда генов и транскриптов сдвигался в сторону антиапоптотических факторов, а при острой ВГЧ-6 инфекции – в сторону проапоптотических. Выявленные гены и транскрипты могут оказывать влияние на количественное содержание субпопуляций иммунокомпетентных клеток (цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов, дубль-позитивных Т-клеток, В-клеток и НК-клеток) в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции. Предложенные молекулярно-генетические маркеры тяжелого течения ВЭБ инфекции (BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6) могут играть патогенетическую роль в ходе данного заболевания.

### **Практическая значимость работы**

Выявленные в ходе работы маркеры BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6 могут использоваться для разработки молекулярно-генетических подходов оценки риска развития тяжелых форм течения ВЭБ инфекции.

### **Методология и методы исследования**

Проведено сравнительное исследование экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках пациентов с ВЭБ инфекцией и ВГЧ-6 инфекцией в острой фазе заболевания и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами. При выполнении работы были использованы как общие, так и специальные методы исследования.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В острой фазе ВЭБ инфекции по сравнению со здоровыми донорами в лейкоцитах крови повышаются уровни экспрессии антиапоптотических генов и транскриптов сигнальных путей апоптоза (DR5/TNFRSF10B-NR\_027140, DCR1/TNFRSF10C-NM\_003841, DCR2/TNFRSF10D-NM\_003840, CASP6-NM\_032992, cIAP-1/BIRC2-NM\_001166, cIAP-1/BIRC2-NM\_001256166) и выживания (NIK/MAP3K14, NEMO/IKBKG), при этом снижаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10-NM\_003810, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, BAK1, BAX-NM\_138763, CASP7, CASP7-NM\_033338).

2. В острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами в лейкоцитах крови повышаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10, HVEM-L/TNFSF14, FAS, DR3/TNFRSF25, DR4/TNFRSF10A-NM\_003844 и DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, FAF1-NM\_007051, DAPK2-NM\_014326, FLASH/CASP8AP2-NM\_001137667, CASP8-NM\_033356, CASP2, FASTK, BAX, PUMA/BBC3,

OMI/HTRA2, APAF1, CASP-9, CYCS-NM\_018947, CASP7-NM\_001267057, ENDOG-NM\_004435), антиапоптотических генов и транскриптов (BCLXL/BCL2L1, ITCH, ITCH-NM\_001257138, BTK-NM\_001287345), а также генов и транскриптов сигналинга выживания (TRAF-1, TRAF-5, TAB1, MAP4K4-NM\_001242560, MAP2K4, MAPK14, MAPK14-NM\_001315, JNK1/MAPK8, JNK2/MAPK9).

3. В острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции выявлены взаимосвязи между уровнями экспрессии генов и транскриптов и содержанием цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов, дубль-позитивных Т-клеток, В-клеток и НК-клеток.

4. Тяжелая форма ВЭБ инфекции характеризуется изменениями уровней экспрессии генов и транскриптов B1M/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6 в лейкоцитах крови.

### **Степень достоверности результатов исследования**

Достоверность полученных результатов определяется достаточным объемом исследований с применением современных клинико-лабораторных, инструментальных, аналитических и статистических методов, соответствующих поставленной цели и задачам.

### **Апробация диссертации**

Апробация диссертационной работы была проведена на совместном заседании Ученого Совета ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол №8 от 29 октября 2020 года). Основные материалы исследования были доложены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения», посвященной 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Нижний Новгород, 11-12 сентября 2019 г.); XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов на Дону, 21-22 октября 2020 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы», Нижний Новгород 26–27 апреля 2021 г.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в организации всех этапов исследования – анализе литературы, планировании работы, разработке дизайна ДНК микрочипа, сборе клинических образцов, проведении анализов, обработке полученных данных, подготовке публикаций по теме исследования. Написание и оформление работы выполнены автором лично.

## **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, в частности пунктам «фундаментальные исследования, посвященные изучению функционирования иммунной системы» и «усовершенствование методов диагностики иммунопатологических процессов».

## **Реализация и внедрение полученных результатов в практику**

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора. Результаты исследования внедрены в экспериментальную работу данной лаборатории.

## **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК по теме специальности (14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология), 3 статьи, индексируемые в базе данных Web of Science, 1 статья – в базе данных Scopus, 1 статья – в базе данных РИНЦ/RSCI и 3 тезисов в материалах всероссийских конференций. Также по материалам диссертации зарегистрировано 4 патента РФ на изобретения.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 113 страницах печатного текста и состоит из введения, литературного обзора, главы материалов и методов исследования, глав собственных исследований, главы обсуждения, заключения и выводов. Список использованной литературы включает 203 источника, из них 167 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 9 таблицами.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Методология спланирована в соответствии со структурой диссертационного исследования и поставленными задачами. Материалом исследования служили образцы периферической крови детей 7-17 лет. Набор пациентов проводился на базе ГБУЗ НО ДГКБ № 27 «Айболит» г. Нижнего Новгорода. В работе использовали остаточные количества образцов, полученных для проведения диагностических исследований в клинической практике. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с Хельсинской декларацией было получено сотрудниками медицинского учреждения. На основании установленного лечащим врачом заключительного диагноза нами были сформированы следующие группы исследования: острая ВЭБ инфекция средней тяжести (N=9), острая ВЭБ инфекция с тяжелым течением (N=18), острая ВГЧ-6 инфекция средней

тяжести (N=21). Также были сформированы группы в фазе реконвалесценции: забор крови производился у тех же пациентов при отсутствии клинических и лабораторных признаков заболевания в среднем через 2-2,5 месяца после начала болезни. В качестве группы сравнения использовали образцы крови практически здоровых доноров сопоставимого пола и возраста (N=23).

Анализ содержания субпопуляций лимфоцитов (цитотоксических Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), дубль-позитивных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), В-клеток (CD19<sup>+</sup>) и NK-клеток (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)) в образцах групп исследования и у здоровых доноров проводили методом проточной цитофлуориметрии с помощью аппарата BD FACS Canto II и программного обеспечения BD FACS Canto clinical software v2.1 (Becton, Dickinson and Company, США) и 6-цветной панели реагентов «BD Multitest™ 6-color TBNK» (BD Biosciences, США).

Анализ содержания живых, апоптотических и погибших лейкоцитов в группах - острая фаза ВЭБ инфекции, острая фаза ВГЧ-6 инфекции и здоровые доноры - также проводили с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием витального красителя 7-амино-актиномицина D (PE-7AAD) (BD Pharmingen, USA) и антитела FITC-Annexin V (AV) (eBioscience, USA). Различия параметров в группах исследования по сравнению со здоровыми донорами оценивали с помощью Т-теста. Различия считались значимыми при значении  $p < 0,05$ .

Анализ экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания проводили с помощью ДНК-микрочипов. Подбор ДНК-зондов, являющихся функциональной основой ДНК-микрочипа, был проведен с помощью алгоритма «Splice variants microarray design pipeline». ДНК-микрочип содержал 336 ДНК-зондов для анализа экспрессии индивидуальных транскриптов и 147 ДНК-зондов для анализа суммарных уровней экспрессии транскриптов, являющихся продуктами одного гена (далее – экспрессии гена). ДНК-зонды синтезировали *in situ* на поверхность слайдов CustomArray Blank Slide 12K (США) с применением модифицированного амидофосфитного метода (Caruthers M.H., 1985) на аппарате CustomArray V3 Synthesizer (США) в соответствии с протоколом производителя (CustomArray Inc., США). Слайды состояли из 4 идентичных секторов, каждый из которых содержал 483 целевых зонда и 70 зондов отрицательного контроля (Negative control) – на основе последовательностей из бактериального генома *Rhizobium rubi*. Максимальная протяжённость зондов, синтезируемых на данной платформе, составляла 45 нуклеотидных оснований (н.о.).

Пробоподготовка РНК для гибридизации на ДНК-микрочипы проводилась следующим образом: образцы цельной крови обрабатывали реагентом «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия) для удаления эритроцитов. Из полученной фракции лейкоцитов выделяли тотальную РНК с помощью набора «Магно-сорб» (ЦНИИЭ, Россия). Дальнейшие процедуры выполняли с помощью амплификатора Maxu Gene Gradient (Axygen, США). Тотальную мРНК подвергали

обратной транскрипции с помощью набора «Mint cDNA synthesis kit» (Евроген, Россия). Полученную кДНК амплифицировали с помощью набора Encyclo («Евроген», Россия). Далее с полученной кДНК проводилась транскрипция с помощью набора «T7 RNA-polimerase» (Thermo Scientific, EU). Половину количества уридинтрифосфатов (УТР) в реакционной смеси заменяли на биотинилированные уридинтрифосфаты (ДНК-синтез, Россия), в результате получали пул биотин-меченой РНК, обратно комплементарной мРНК исследуемого образца. Фрагментированную биотин-меченую РНК гибридизовали на ДНК микрочипы при температуре 40°C в течение 18-20 часов. Процессинг ДНК-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 устройства ElectraSense Reader и программного обеспечения Combimatrix ElectraSense Software и ElectraSense Analysis 3.4.2 (CustomArray Inc., США).

Для полученных сигналов гибридизации проводили коррекцию фона с помощью алгоритма RMA (Robust Multi-Array Analysis) (Ritchie M.E. et al., 2007), и нормализацию методом квантильной нормализации (Quantile Normalization) (Bolstad B.M. et al., 2003, Wu Z. et al., 2010). Полученные значения рассматривали как уровни экспрессии исследуемых генов и транскриптов. Для дальнейших расчетов использовали средние значения уровней экспрессии генов и транскриптов в группах исследования и у здоровых доноров. Расчеты проводили в свободно распространяемой среде программирования R версии 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc).

Значения уровней экспрессии изучаемых генов и транскриптов в группах исследования сравнивали со значениями у здоровых доноров с помощью Т-теста с поправкой на ожидаемую долю ложных отклонений (FDR/False discovery rate test) с расчетом показателя статистической значимости  $q$ . Также производили расчет изменений уровней экспрессии генов и транскриптов (FC/fold-change) в группах исследования по сравнению со здоровыми донорами по формуле:

$$FCX(\%) = (\text{сред.}X \times 100 / \text{сред.}Y) - 100$$

где сред.Х - средние значения уровней экспрессии генов и транскриптов в группах исследования, сред.У – средние значения тех же показателей у здоровых доноров. Показатели FC рассчитывали для следующих групп исследования - острая фаза ВЭБ инфекции (независимо от степени тяжести), острая фаза ВГЧ-6 инфекции, ВЭБ инфекция в фазе реконвалесценции, ВГЧ-6 инфекция в фазе реконвалесценции. Нами были сформулированы два основных критерия отбора значимых изменений уровней экспрессии генов и транскриптов – значения  $q < 0,05$ ,  $|FC| > 10\%$  для ВЭБ и  $q < 0,05$ ,  $|FC| > 20\%$  для ВГЧ-6. При меньших значениях показателя

FC и/или больших значениях показателя  $q$  для генов и транскриптов изменения уровней экспрессии считались не значимыми и далее не рассматривались.

Анализ взаимосвязей между уровнями экспрессии генов и транскриптов с количественным содержанием субпопуляций лимфоцитов в образцах пациентов в острой фазе ВЭБ (без учета тяжести заболевания) и ВГЧ-6 инфекции и у здоровых доноров проводили методом канонических корреляций. В анализ включали два набора данных большой размерности:

1) Данные об экспрессии генов и транскриптов. Для анализа были выбраны гены и транскрипты, уровни экспрессии которых, как нами было ранее показано, значимо изменялись при развитии острой ВЭБ инфекции и острой ВГЧ-6 инфекции в лейкоцитах периферической крови.

2) Данные о количественном содержании субпопуляций иммунокомпетентных клеток в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции.

В связи со сравнительно небольшим количеством исследованных образцов при большом количестве анализируемых параметров вводили этап препроцессинга, редуцируя размерность данных методом главных компонент (Sherry A. et al., 2005, Song Y. et al., 2016). Главные компоненты (ГК) выделяли путем сингулярного разложения в каждом наборе данных после стандартизации. Те компоненты, собственные значения которых превышали единицу, использовали далее в корреляционном анализе. Расчет корреляций проводили с помощью критерия Уилкса, взаимосвязи считали значимыми при значении  $p < 0,05$ .

Поиск генов и транскриптов - молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ инфекции осуществляли с помощью программы MiDA (Microarray Data Analysis) по следующему алгоритму: проводили сравнение уровней экспрессии генов и транскриптов в лейкоцитах крови в трех комбинациях разных пар групп – тяжелая ВЭБ инфекция/здоровые доноры, ВЭБ инфекция средней тяжести/здоровые доноры, тяжелая ВЭБ инфекция/ВЭБ инфекция средней тяжести. Оценивали различия уровней экспрессии каждого гена и транскрипта в парах групп сравнения с помощью FDR теста, получая значения показателей статистической значимости  $q$ . Также для каждого гена и транскрипта в парах групп сравнения получали значение FC. Далее для разделения генов и транскриптов в каждой паре групп сравнения проводили дискриминантный анализ, строя классификационную модель методом градиентного бустинга над решающими деревьями с применением кросс-валидации. В результате получали значения AUC (Area under curve – площадь под кривой ошибок - показатель качества модели) и FI (Feature importance – средний показатель значимости гена или транскрипта для модели классификации). В качестве маркеров отбирали гены и транскрипты на основании значений показателей  $AUC > 0,75$ ,  $q < 0,05$ , FI и FC – превышающих эмпирически

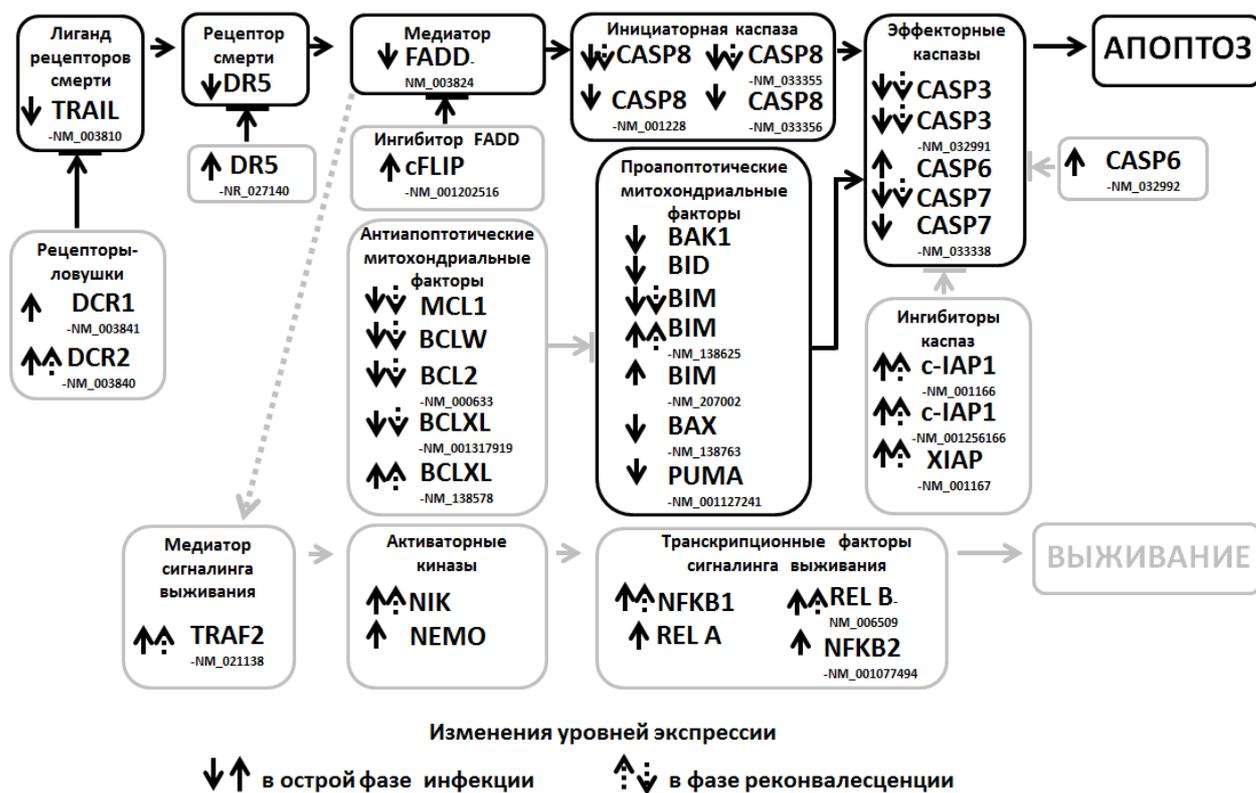
определенный квантиль распределения для каждой пары групп сравнения. Из полученного перечня кандидатных маркеров путем логического исключения отбирали те гены и транскрипты, уровни экспрессии которых изменялись при тяжелой ВЭБ инфекции и не изменялись при ВЭБ инфекции средней тяжести.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

На первом этапе исследования нами был проведен анализ процентного содержания живых, апоптотических и погибших лейкоцитов в образцах крови детей в острой фазе ВЭБ инфекции (независимо от тяжести течения), в острой фазе ВГЧ-6 инфекции и здоровых доноров. В острой фазе ВЭБ инфекции было выявлено статистически значимое повышение содержания живых лейкоцитов, а также снижение содержания апоптотических и погибших клеток. При ВГЧ-6 инфекции, наоборот, статистически значимо повышалось содержание апоптотирующих лейкоцитов. Разнонаправленное изменение количества иммунокомпетентных клеток в состоянии апоптоза при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции подтверждается в литературных данных. Так, показано, что геном ВЭБ кодирует ряд факторов, ингибирующих развитие апоптоза в инфицированных клетках (Floettmann J.E. et al., 1997; Fu Q. et al., 2013). Также известно, что ВГЧ-6 может усиливать чувствительность различных иммунокомпетентных клеток (в частности Т-клеток) к апоптозу в условиях *in vitro* и *in vivo* (Dagna L. et al., 2013; Flamand L. et al., 1995; Gupta S. et al., 2009; Ichimi R. et al., 1999; Inoue Y. et al., 1997; Yasukawa M. et al., 1998). Тем не менее, молекулярные механизмы апоптоза и выживания при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции остаются во многом неизученными.

На следующем этапе исследования нами был проведен анализ уровней экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах пациентов в острой фазе ВЭБ (независимо от тяжести заболевания) и ВГЧ-6 инфекции и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами.

В острой фазе ВЭБ инфекции было выявлено повышение уровней экспрессии генов и транскриптов с антиапоптотическими функциями - DR5/TNFRSF10B-NR\_027140, DCR1/TNFRSF10C-NM\_003841, DCR2/TNFRSF10D-NM\_003840, cFLIP/CFLAR-NM\_001202516, BclXL/BCL2L1-NM\_138578, CASP6-NM\_032992, cIAP-1/BIRC2-NM\_001166, cIAP-1/BIRC2-NM\_001256166, XIAP-NM\_001167 и снижение уровней экспрессии генов и транскриптов с проапоптотическими функциями - TRAIL/TNFSF10-NM\_003810, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, CASP-8 CASP8-NM\_001228, CASP8-NM\_033355, CASP8-NM\_033356, BAK1, BID, BIM/BCL2L11, BAX-NM\_138763, PUMA/BBC3-NM\_001127241, CASP3, CASP3-NM\_032991, CASP7, CASP7-NM\_033338 (рис. 1).



**Рисунок 1 - Изменения уровней экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в острой фазе ВЭБ инфекции и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами**

Кроме этого отмечалось снижение уровней экспрессии единичных антиапоптотических генов и транскриптов (MCL1, BCLW/BCL2L2, BCL2-NM\_000633, BCL-XL/BCL2L1-NM\_001317919), и повышение - проапоптотических генов и транскриптов (BIM/BCL2L1-NM\_138625, BIM/BCL2L1-NM\_207002, CASP6) (рис. 1). В целом, полученные данные могут свидетельствовать о повышении устойчивости иммунокомпетентных клеток к апоптозу в острой фазе ВЭБ инфекции.

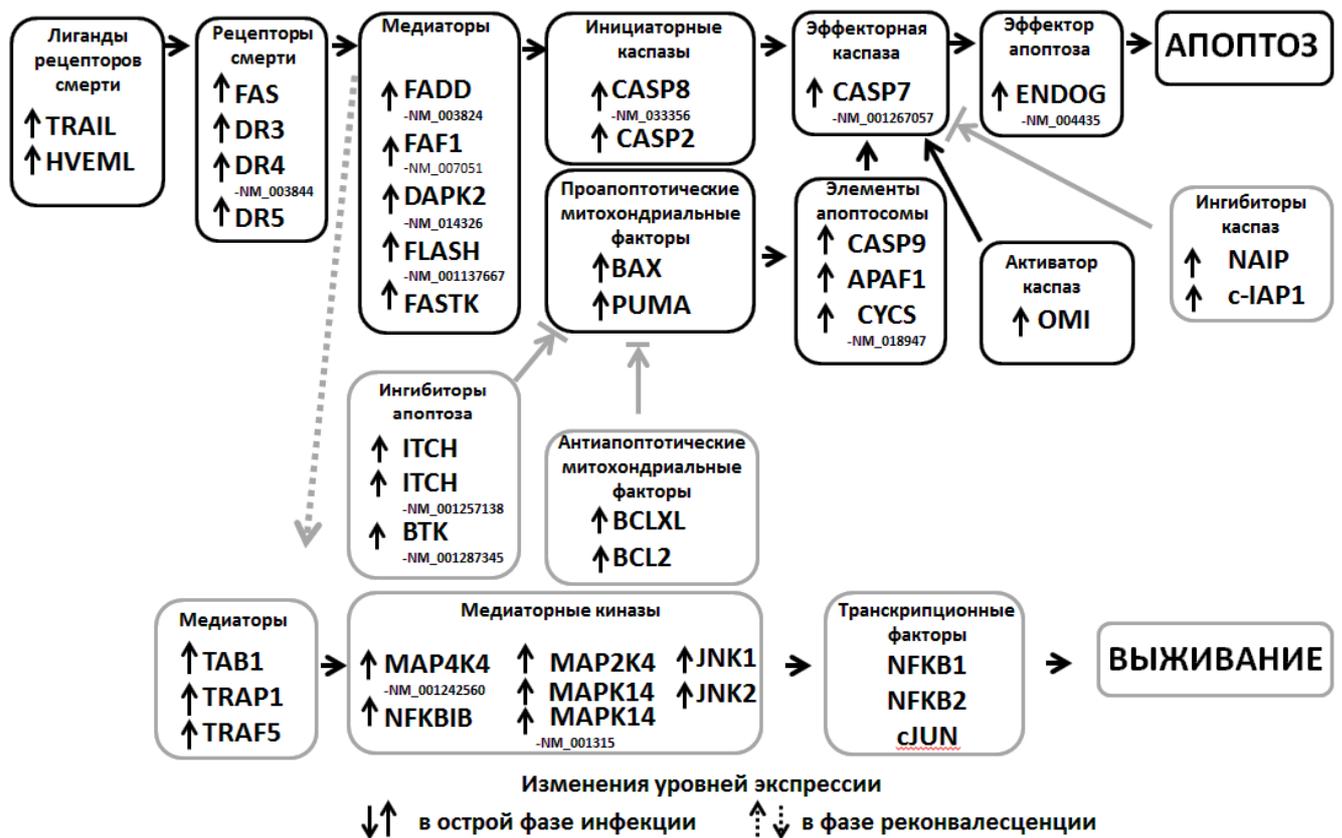
Из выявленных нами элементов апоптоза в литературе описаны следующие элементы, модуляция которых происходит в ходе ВЭБ инфекции - cFLIP/CFLAR, CASP8 (Tepper C.G. et al., 1999), PUMA/BBC3 (Choy E.Y.-W. et al., 2008), BIM/BCL2L1 (Paschos K. et al., 2009), BCL-XL/BCL2L1, MCL1, BID (Fu Q. et al., 2013; Kohlhof H. et al., 2009), CASP3 (Harold C. et al., 2016). Значительная часть сведений об изменении экспрессии генов и транскриптов участников сигнальных путей апоптоза при ВЭБ инфекции получена нами впервые. Данные гены и транскрипты относятся к различным функциональным группам в рамках апоптотического сигналинга - элементам внешнего пути апоптоза, митохондриального апоптоза, эффекторной фазы апоптоза и регуляторным молекулам. Таким образом, можно предположить, что модуляция апоптоза в ходе ВЭБ инфекции происходит на всех уровнях реализации сигнального

каскада. При этом баланс уровней экспрессии генов и транскриптов смещался в сторону антиапоптотических факторов, что может выражаться в снижении чувствительности иммунокомпетентных клеток к апоптозу и снижении количества апоптотирующих клеток, как нами было показано на первом этапе исследования.

Также в острой фазе ВЭБ инфекции нами было выявлено повышение уровней экспрессии ряда генов и транскриптов NFκB – опосредованного сигналинга выживания (TRAF2-NM\_021138, NIK/MAP3K14, NEMO/IKBKG, p50/NFκB1, p65/RELA, RELB-NM\_006509 и NFκB2-NM\_001077494) (рис. 1), что также может свидетельствовать о повышении устойчивости иммунокомпетентных клеток к апоптозу. ВЭБ-ассоциированная активация NFκB-опосредованного сигнального пути выживания, в том числе с участием факторов RELA и RELB (Nandakumar A. et al., 2017), а также NFκB и TRAF2 (Chung G.T.-Y. et al., 2013, Devergne O. et al., 1996, Schneider F. et al., 2008, Song, Y.-J., 2010) подтверждается данными литературы.

Отметим, что в фазе реконвалесценции после ВЭБ инфекции уровни экспрессии некоторых факторов (DCR2/TNFRSF10D-NM\_003840, CASP-8, CASP8-NM\_033355, CASP3, CASP3-NM\_032991, CASP7, cIAP-1/BIRC2-NM\_001166, cIAP-1/BIRC2-NM\_001256166, XIAP-NM\_001167, TRAF2-NM\_021138, NIK/MAP3K14, p50/NFκB1, RELB-NM\_006509) (рис. 1) оставались альтерированными, что может указывать на длительность этапа восстановления динамического баланса факторов, регулирующих сигнальные пути апоптоза и выживания после ВЭБ инфекции.

В острой фазе ВГЧ-6 инфекции наблюдалась другая картина экспрессии исследуемых генов и транскриптов по сравнению со здоровыми донорами. Было выявлено повышение уровней экспрессии проапоптотических факторов - TRAIL/TNFSF10, HVEM-L/TNFSF14, FAS, DR3/TNFRSF25, DR4/TNFRSF10A-NM\_003844, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, FAF1-NM\_007051, DAPK2-NM\_014326, FLASH/CASP8AP2-NM\_001137667, CASP8-NM\_033356, CASP2, FASTK, BAX, PUMA/BBC3, OMI/HTRA2, APAF1, CASP-9, CYCS-NM\_018947, CASP7-NM\_001267057, ENDOG-NM\_004435, а также немногих антиапоптотических генов и транскриптов - BCL-2, BCLXL/BCL2L1, ITCH, ITCH-NM\_001257138, cIAP-1/BIRC2 и NAIP/BIRC-1 (рис.2). Полученные данные могут свидетельствовать об активации апоптотического сигналинга при острой ВГЧ-6 инфекции. В литературе имеется мало данных относительно участников и факторов сигнальных путей апоптоза при ВГЧ-6 инфекции. По данным литературы известно об активации некоторых элементов митохондриального апоптоза (BAX, BCL-2, CYCS), а также каспаз (CASP3, CASP8, CASP9) (Gu B. et al., 2011; Gupta S. et al., 2009; Li L. et al., 2010).

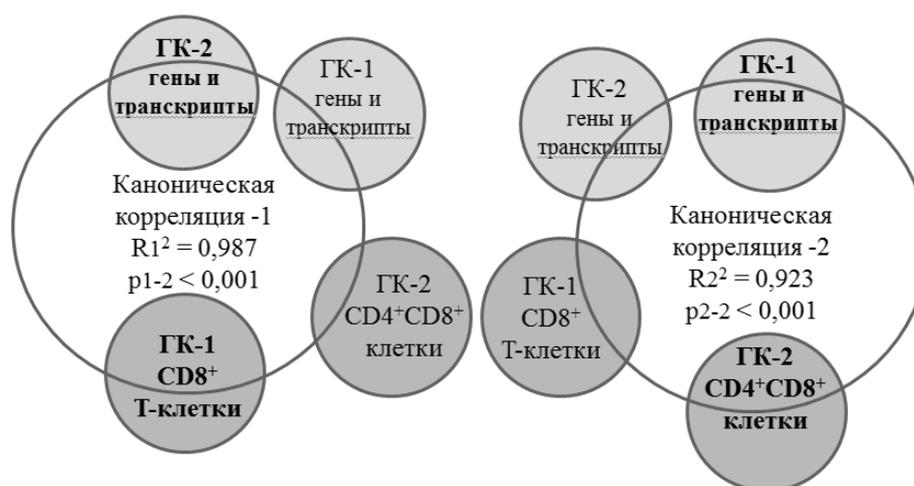


**Рисунок 2 - Изменения уровней экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в острой фазе ВГЧ-6 инфекции и в фазе реконвалесценции по сравнению со здоровыми донорами**

Сведения об изменении уровней экспрессии других генов и транскриптов, кодирующих основные элементы сигнального каскада внешнего пути апоптоза, митохондриального пути апоптоза и эффекторной фазы апоптоза при острой ВГЧ-6 инфекции, получены нами впервые и детально уточняют высказанное другими исследователями предположение о ВГЧ-6 - индуцированной активации апоптоза клеток. В то же время в острой фазе ВГЧ-6 инфекции выявлялось повышение уровней экспрессии ряда генов и транскриптов NFκB- и JNK-опосредованных сигнальных путей выживания (для NFκB сигналинга - BTK-NM\_001287345, TRAF-1, TRAF-5, NFKBIB, для JNK сигналинга - TAB1 MAP4K4-NM\_001242560, MAP2K4, MAPK14, MAPK14-NM\_001315, JNK1/MAPK8, JNK2/MAPK9), но при этом экспрессия генов и транскриптов эффекторных элементов данных сигнальных путей (NFκB1 и NFκB2 для NFκB сигналинга, cJUN для JNK сигналинга) оставалась неизменной по сравнению со здоровыми донорами, что может свидетельствовать об отсутствии выраженного вклада ВГЧ-6 в реализацию данных сигнальных путей, а, следовательно, воздействия ВГЧ-6 на пролиферацию иммунокомпетентных клеток (рис. 2).

Отметим, что в фазе реконвалесценции после ВГЧ-6 инфекции уровни экспрессии большинства генов и транскриптов нормализовались, что может указывать на более легкое восстановление динамического баланса факторов, регулирующих сигнальные пути апоптоза и выживания после ВГЧ-6 инфекции по сравнению с ВЭБ инфекцией.

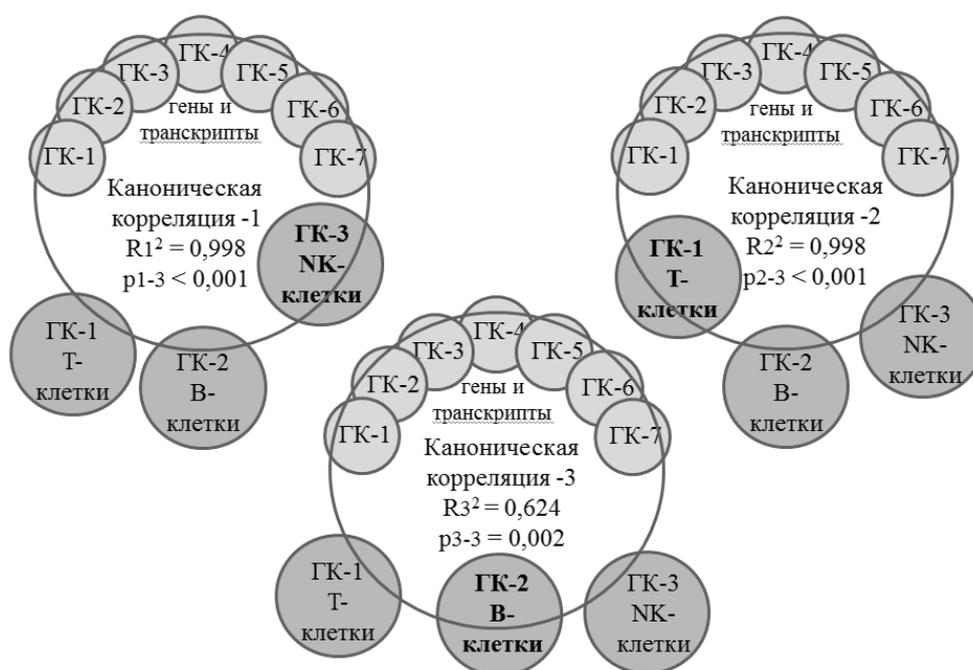
На следующем этапе исследования нами был проведен анализ взаимосвязей между уровнями экспрессии генов и транскриптов и количественным содержанием субпопуляций лимфоцитов в группах: острая фаза ВЭБ инфекции (независимо от тяжести течения), острая фаза ВГЧ-6 инфекции и здоровые доноры. В анализе использовались те гены и транскрипты, изменение которых было значимым в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции, как было выявлено на предыдущем этапе работы. В ходе редукции для каждого набора данных (уровней экспрессии генов и транскриптов и содержания лимфоцитов) в группах исследования и у здоровых доноров были получены синтетические переменные - главные компоненты. В каждой группе в структуру главных компонент значения переменных экспрессии всех генов и транскриптов вносили сопоставимый вклад, то есть выделенные главные компоненты характеризовали экспрессию всего набора генов и транскриптов. В структуру главных компонент значения переменных содержания субпопуляций лимфоцитов вносили сопоставимый вклад только в группе здоровых доноров. Для острой фазы ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции в каждую главную компоненту вносило больший вклад содержание различных субпопуляций лимфоцитов: цитотоксических и дубль-позитивных Т-клеток для ВЭБ - и НК-, Т- и В- клеток для ВГЧ-6 инфекции. Полученные нами главные компоненты использовались для проведения канонического корреляционного анализа в исследуемых группах. Для ВЭБ инфекции выявили две канонических корреляции с высокой значимостью (рис.3).



**Рисунок 3 - Взаимосвязи уровней экспрессии генов и транскриптов и количественного содержания субпопуляций лимфоцитов в острой фазе ВЭБ инфекции. Площадь ГК отражает их вклад в каноническую корреляцию**

Вклад главных компонент в выявленные корреляции был неравнозначным. Канонические переменные уровней экспрессии генов и транскриптов для первой и второй корреляций были сформированы преимущественно ГК-2 и ГК-1, соответственно (рис. 3). Канонические переменные содержания лимфоцитов были сформированы преимущественно ГК-1 и ГК-2 с наибольшим вкладом содержания цитотоксических Т-клеток и дубль-позитивных Т-клеток, соответственно (рис.3). У здоровых доноров статистически значимых взаимосвязей между изучаемыми параметрами выявлено не было.

Для ВГЧ-6 инфекции выявили три канонические корреляции с высокой значимостью (рис. 4).



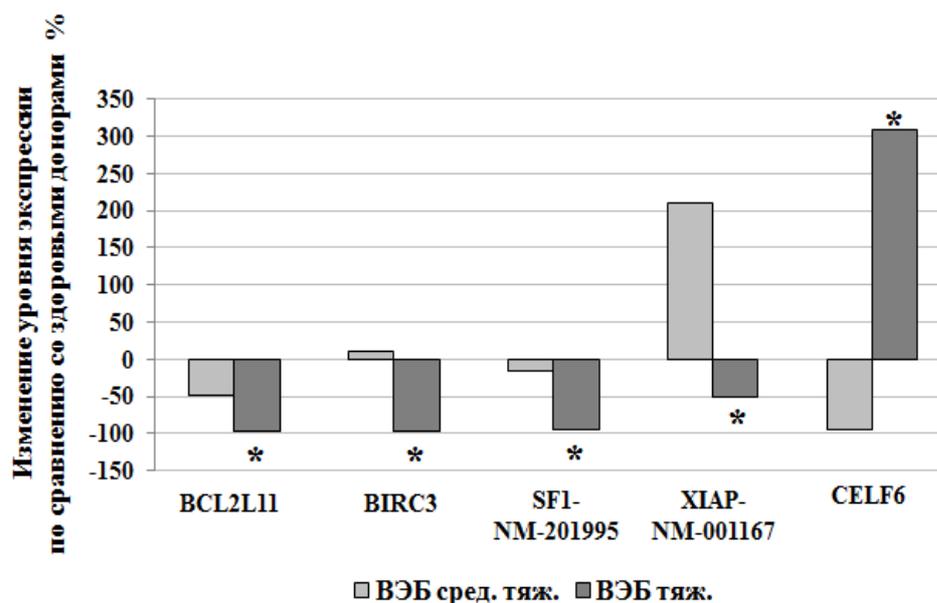
**Рисунок 4 - Взаимосвязи уровней экспрессии генов и транскриптов и количественного содержания субпопуляций лимфоцитов в острой фазе ВГЧ-6 инфекции. Площадь ГК отражает их вклад в каноническую корреляцию**

Канонические переменные уровней экспрессии генов и транскриптов были сформированы с приблизительно равнозначным участием всех семи ГК. Канонические переменные содержания субпопуляций лимфоцитов были сформированы с неравнозначным участием ГК. Основной вклад в переменную для первой корреляции внесла ГК-3 с наибольшим вкладом содержания НК-клеток, а в переменные для второй и третьей корреляций – ГК-1 и ГК-2 с наибольшим вкладом содержания Т- и В-клеток, соответственно. У здоровых доноров статистически значимые взаимосвязи не детектировались.

Таким образом, нами было показано, что уровни экспрессии генов и транскриптов, изменение которых было значимо в острой фазе изучаемых инфекций, взаимосвязаны с содержанием субпопуляций иммунокомпетентных клеток: для ВЭБ инфекции – с большим вкладом цитотоксических и дубль-позитивных Т-клеток, для ВГЧ-6 инфекции – НК-клеток, Т- и В- клеток. У здоровых доноров данные корреляции не выявлялись.

Полученные результаты отражают специфическое для ВЭБ и ВГЧ-6 влияние уровней экспрессии генов и транскриптов на содержание различных субпопуляций лимфоцитов в ходе иммунного ответа. Детальное раскрытие механизмов и функциональный результат этих взаимодействий является важной задачей дальнейших исследований.

На следующем этапе исследования нами был проведен поиск молекулярно-генетических маркеров тяжелого течения ВЭБ инфекции в лейкоцитах крови. Для этого были проанализированы данные об уровнях экспрессии всех изучаемых генов и транскриптов в трех комбинациях групп – тяжелая ВЭБ инфекция/здоровые доноры, ВЭБ инфекция средней тяжести/здоровые доноры и тяжелая ВЭБ инфекция/ВЭБ инфекция средней тяжести. В результате были построены три модели классификации и выбраны кандидатные гены и транскрипты для разделения групп в парах. Из полученного перечня кандидатных маркеров путем логического исключения были выбраны те гены и транскрипты, уровни экспрессии которых изменялись при тяжелой ВЭБ инфекции и не изменялись при ВЭБ инфекции средней тяжести (BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6) (рис. 5).



**Рисунок 5 - Изменения уровней экспрессии генов и транскриптов при среднетяжелой и тяжелой формах течения ВЭБ инфекции по сравнению со здоровыми донорами. \* – статистически значимые изменения (p<0,05)**

Таким образом, нами были выявлены молекулярно-генетические маркеры, изменение экспрессии которых в лейкоцитах крови по сравнению со здоровыми донорами было характерно только для тяжелой ВЭБ инфекции и не выявлялось при ВЭБ инфекции средней тяжести. Изменение уровней экспрессии данных молекул может иметь важные функциональные и клинически значимые последствия. Так, по данным литературы показано, что ВЭБ-кодируемые белки EBNA3A и EBNA3C могут ингибировать экспрессию про-апоптотического гена BIM/BCL2L11, снижая чувствительность инфицированных клеток к апоптозу (Wood C.D. et al., 2016). Известно, что ВЭБ-кодируемая РНК miR-BHRF1-2 ингибирует экспрессию гена IAP-2/BIRC3 в инфицированных клетках (Skinner C.M. et al., 2017), что сопровождается индукцией экспрессии NF-κB-зависимых генов и усилением пролиферации клеток (Asslaber D. et al., 2018). Также показано, что снижение экспрессии гена XIAP приводит к развитию аномального ответа на ВЭБ инфекцию и усилению апоптоза ВЭБ-специфических иммунных клеток. (Rigaud S. et al., 2006; Lopez-Granados E. A. et al., 2014; Worth A.J.J. et al., 2016). Из других маркеров тяжелой формы ВЭБ инфекции ген CELF6 и транскрипт SF1-NM\_201995, являются факторами сплайсинга, которые регулируют экспрессию многих генов (Филатова Е.Н. и др., 2018).

Таким образом, выявленные нами маркерные гены и транскрипты являются перспективными для разработки специфических методов прогноза рисков развития тяжелой формы течения ВЭБ инфекции и в качестве мишеней для средств таргетной терапии данного заболевания.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Разработанные в ходе исследования подходы к анализу экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания с помощью ДНК микрочипов могут использоваться для поиска молекулярно-генетических маркеров для оценки риска тяжелого течения заболеваний разного генеза.

### **Выводы**

1. Показано, что в острой фазе ВЭБ инфекции по сравнению со здоровыми донорами в лейкоцитах крови повышаются уровни экспрессии антиапоптотических генов и транскриптов сигнальных путей апоптоза (DR5/TNFRSF10B-NR\_027140, DCR1/TNFRSF10C-NM\_003841, DCR2/TNFRSF10D-NM\_003840, CASP6-NM\_032992, cIAP-1/BIRC2-NM\_001166, cIAP-1/BIRC2-NM\_001256166) и выживания (NIK/MAP3K14, NEMO/IKBKG), при этом снижаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10-NM\_003810, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, BAK1, BAX-NM\_138763, CASP7, CASP7-NM\_033338).

2. Выявлено, что в острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами в лейкоцитах крови повышаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов

(TRAIL/TNFSF10, HVEM-L/TNFSF14, FAS, DR3/TNFRSF25, DR4/TNFRSF10A-NM\_003844 и DR5/TNFRSF10B, FADD-NM\_003824, FAF1-NM\_007051, DAPK2-NM\_014326, FLASH/CASP8AP2-NM\_001137667, CASP8-NM\_033356, CASP2, FASTK, BAX, PUMA/BBC3, OMI/HTRA2, APAF1, CASP-9, CYCS-NM\_018947, CASP7-NM\_001267057, ENDOG-NM\_004435), антиапоптотических генов и транскриптов (BCLXL/BCL2L1, ITCH, ITCH-NM\_001257138, BTK-NM\_001287345), а также генов и транскриптов сигналинга выживания (TRAF-1, TRAF-5, TAB1, MAP4K4-NM\_001242560, MAP2K4, MAPK14, MAPK14-NM\_001315, JNK1/MAPK8, JNK2/MAPK9).

3. Установлено, что в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции существуют взаимосвязи между уровнями экспрессии генов и транскриптов и содержанием цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов, дубль-позитивных Т-клеток, В-клеток и НК-клеток.

4. Выявлен набор молекулярно-генетических маркеров BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6, уровни экспрессии которых специфически изменяются в лейкоцитах крови при тяжелой форме течения ВЭБ инфекции.

#### **Практические рекомендации**

Выявленные в ходе исследования молекулярно-генетические маркеры BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM\_201995, XIAP-NM\_001167, CELF6 являются кандидатными молекулами, на основе которых можно разработать новые методы оценки риска развития тяжелых форм ВЭБ инфекции.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Сахарнов, Н.А. Анализ экспрессии мРНК основных участников сигналинга апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом / Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Князев Д.И., Преснякова Н.Б. // **Инфекция и иммунитет.** — 2019. — Т.9, № 5-6. — С. 723–734.

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

3. Филатова, Е.Н. Определение молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-мононуклеоза / Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Уткин О. В., Кулова Е.А. // **Инфекция и иммунитет.**—2020.—Т.10, № 4.— С.707–716.

4. Цветкова, В.Д. Определение уровня экспрессии мРНК сплайсированных вариантов DR3 в крови при инфекционном мононуклеозе / Цветкова В.Д., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Уткин О.В., Неумоина Н.В., Бруснигина Н.Ф.// **Медицинская иммунология.**— 2016.— Т. 18, № 2.— С. 139–150.

5. Князев, Д.И. Особенности сплайсинг-ориентированных ДНК-микрочипов и их применение в биомедицинских исследованиях / Князев Д.И., Старикова В.Д., Уткин О.В., Солнцев Л.А., Сахарнов Н.А., Ефимов Е.И. // Современные технологии в медицине.— 2015.— Т. 7. № 4.— С. 162–173.
6. Солнцев, Л.А. Стратегия подбора зондов для изучения совокупности мРНК участников рецептор-опосредованного сигналинга апоптоза / Солнцев Л.А., Старикова В.Д., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Уткин О.В. // Молекулярная биология.—2015.—Т. 49. № 3.— С. 515–524.
7. Filatova, E.N. Changes in mRNA expression of members of TGFB1-associated pathways in human leukocytes during EBV infection / Filatova E.N., Sakharnov N.A., Knyazev D.I., Utkin O.V.// Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.— 2019. —Vol. 66. № 2. — P. 247–254.
8. Филатова, Е.Н. Молекулярные маркеры ВЭБ- и ВГЧ6-ассоциированного мононуклеоза/ Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Цыбусова Т.Н., Уткин О.В. // Современные технологии в медицине.— 2019.—Т. 11, № 3.— С. 7–14.
9. Сахарнов, Н.А. Особенности регуляции апоптоза клеток, инфицированных цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна-Барр / Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Князев Д.И., Филатова Е.Н., Цветкова В.Д. // Успехи современной биологии.— 2017.— Т. 137. № 4.— С. 387-397.
10. Князев, Д.И. Экспрессия мРНК участников Fas-зависимого сигналинга при ВЭБ-инфекционном мононуклеозе / Князев Д.И., Сахарнов Н.А., Солнцев Л.А., Уткин О.В. // Журнал инфектологии.— 2016.— Т. 8, № S3.— С. 76–77.
11. Сахарнов, Н.А. Особенности экспрессии мРНК генов сигнальных путей Fas-опосредованного апоптоза при инфекционном мононуклеозе у детей до и после лечения / Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Солнцев Л.А., Кулова Е.А., Уткин О.В. // Журнал инфектологии.— 2017.— Т. 9, № S4-2. — С. 102–103.
12. Уткин, О.В. Разработка дизайна биочипа для дифференциальной детекции сплайсированных вариантов мРНК "рецепторов смерти" человека при герпесвирусной инфекции / Уткин О.В., Князев Д.И., Солнцев Л.А., Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Старикова В.Д., Преснякова Н.Б., Анисенкова Е.В. // Инфекция и иммунитет.— 2014.— Т. 4, № 1.— С. 96.
13. Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Князев Д.И., Преснякова Н.Б. Биомаркеры риска развития осложнений инфекционного мононуклеоза, ассоциированного с вирусом Эпштейна-Барр. Патент на изобретение RU 2720110 С1, 24.04.2020. Заявка № 2019122517 от 15.07.2019.

14. Уткин О.В., Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А. Способ прогнозирования тяжести течения ВЭБ-ассоциированного инфекционного мононуклеоза. Патент на изобретение 2732010 С1, 10.09.2020. Заявка № 2020110429 от 11.03.2020.

15. Уткин О.В., Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А. Способ диагностики тяжёлой формы течения ВЭБ-ассоциированного инфекционного мононуклеоза. Патент на изобретение 2732012 С1, 10.09.2020. Заявка № 2020110430 от 11.03.2020.

16. Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Уткин О.В. Способ поиска молекулярных маркеров патологического процесса для дифференциальной диагностики, мониторинга и таргетной терапии. Патент на изобретение RU 2709815 С1, 23.12.2019. Заявка № 2019114846 от 14.05.2019.