

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-41-46

УДК 612.017.1

Г.В. Борисевич, С.Л. Кириллова, О.Н. Сидорова, В.Н. Лебедев, А.А. Петров, А.В. Овчинников,
И.В. Шатохина, Т.Е. Сизикова, В.Е. Сазонов, Е.С. Мухачева, С.В. Борисевич

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТочНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА МАКАК-РЕЗУСОВ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад,
Российская Федерация

Цель. Выбор показателей популяций лимфоцитов макак-резусов, определенных методом проточной цитометрии, для оценки изменений клеточной составляющей их иммунного статуса. **Материалы и методы.** Использовали кровь 11 здоровых самцов макак-резусов возрастом 2,0–2,5 года, массой 2,5–3,0 кг. Обезьян обследовали одновременно в каждый из 7 месяцев наблюдения (с мая по ноябрь). Иммунофенотипирование проводили на цитофлуориметре FC500 с использованием моноклональных антител Affymetrix eBioscience. Дифференцированы следующие показатели клеточной составляющей иммунного статуса: Т-лимфоциты общие (фенотип CD2+CD20-); В-лимфоциты общие (фенотип CD2-CD20+); натуральные киллеры (фенотип CD2+CD56+); Т-хелперы (фенотип CD2+CD4+); цитотоксические Т-лимфоциты (фенотип CD2+CD8+); дубль-позитивные Т-лимфоциты (фенотип CD4+CD8+) и Т-лимфоциты, позитивные по антигенам CD2 и CD20 (фенотип CD2+CD20+). **Результаты и об- суждение.** Статистический анализ полученных результатов выявил отсутствие влияния фактора времени исследования на указанные показатели. Для оценки изменений клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов возможно использовать показатели, отличающиеся меньшей вариабельностью: Т- и В-лимфоциты общие, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты и Т-лимфоциты, имеющие фенотип (CD2+CD20+). Использование CD56 в качестве маркера натуральных киллеров макак-резусов нецелесообразно из-за его низкой экспрессии и малочисленности популяции, несущей данный маркер. Результаты исследований могут стать основой нормативных показателей субпопуляционного состава клеток иммунной системы макак-резусов, что позволит исследовать инфицированных животных при оценке качества лечебных препаратов в отношении опасных и особо опасных инфекций.

Ключевые слова: лимфоциты, макаки-резусы, проточная цитометрия, клеточная составляющая иммунного статуса.

Корреспондирующий автор: Борисевич Галина Валентиновна, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Сидорова О.Н., Лебедев В.Н., Петров А.А., Овчинников А.В., Шатохина И.В., Сизикова Т.Е., Сазонов В.Е., Мухачева Е.С., Борисевич С.В. Анализ показателей клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:41–46. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-41-46

Поступила 06.08.20. Принята к публ. 01.09.20.

G.V. Borisevich, S.L. Kirillova, O.N. Sidorova, V.N. Lebedev, A.A. Petrov, A.V. Ovchinnikov,
I.V. Shatokhina, T.E. Sizikova, V.E. Sazonov, E.S. Mukhacheva, S.V. Borisevich

Analysis of Cellular Component Indicators of Immune Status of Rhesus Macaques

“48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

Abstract. Objective. Selection of indicators of lymphocyte populations in rhesus macaques determined by flow cytometry to evaluate variations of cellular constituent of their immune status. **Materials and methods.** Blood of 11 healthy rhesus macaque males, 2,0–2,5 years old, weighing 2,5–3,0 kg, was used. Monkeys were examined simultaneously in each of 7 months of observation (since May till November). Immunophenotyping was conducted by FC500 cytofluorimeter using Affymetrix eBioscience monoclonal antibodies. The following cellular constituent indicators of immune status were differentiated: total T lymphocytes (phenotype CD2+CD20-); total B lymphocytes (phenotype CD2-CD20+); natural killer cells (phenotype CD2+CD56+); T helper cells (phenotype CD2+CD4+); cytotoxic T lymphocytes (phenotype CD2+CD8+); double-positive T lymphocytes (phenotype CD4+CD8+) and T lymphocytes positive by antigens CD2 and CD20 (phenotype CD2+CD20+). **Results and discussion.** Statistical analysis of the obtained results revealed the absence of the effect of research time factor on the stated indicators. To assess changes in the cellular constituent of immune status of rhesus macaques, it is possible to use indicators that are less variable: total T and B lymphocytes, T helper cells, cytotoxic T lymphocytes and T lymphocytes with phenotype (CD2+CD20+). The use of CD56 as a marker of natural killer cells of rhesus macaques is impractical due to its low expression and a small size of the population bearing this marker. The research results may form the basis of the normative indicators of the subpopulation cell composition of immune system in rhesus macaques, which will allow the study of infected animals when assessing the quality of medical products in relation to dangerous and particularly dangerous infections.

Key words: lymphocytes, rhesus macaques, flow cytometry, cellular component of the immune status.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Galina V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Borisevich G.V., Kirillova S.L., Sidorova O.N., Lebedev V.N., Petrov A.A., Ovchinnikov A.V., Shatokhina I.V., Sizikova T.E., Sazonov V.E., Mukhacheva E.S., Borisevich S.V. Analysis of Cellular Component Indicators of Immune Status of Rhesus Macaques. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 4:41–46. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-41-46

Received 06.08.20. Accepted 01.09.20.

Borisevich G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0843-9427>

Kirillova S.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1245-9225>

Sidorova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0297-5579>

Lebedev V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Petrov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Ovchinnikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2309-3572>

Shatokhina I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9503-5120>

Sizikova T.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Макака-резус (*Macaca mulatta*), вследствие большого биологического сходства (филогенетической близости) с человеком, является экспериментальной моделью для изучения многих опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Результаты исследований, полученные на приматах данного вида, возможно экстраполировать для людей с минимальной коррекцией.

Субпопуляционный состав (фенотип) лимфоцитов является важным диагностическим признаком, позволяющим судить о течении иммунных процессов [1]. В формировании протективного иммунитета к возбудителям ряда вирусных и бактериальных заболеваний ключевую роль играет именно клеточный иммунитет [2, 3]. Оценку иммунного статуса и его клеточной составляющей человека, зараженного возбудителем опасной или особо опасной инфекции, а также животных, являющихся экспериментальными моделями для изучения инфекционных заболеваний, можно проводить методом проточной цитометрии [1, 4, 5].

Для объективной регистрации комплекса изменений, происходящих в системе иммунитета модельных животных, необходимо формирование массива референсных значений фонового иммунного статуса, полученных единообразно на одном оборудовании с использованием одинаковых реагентов и тактик гейтирования, с учетом имеющихся возможностей приборно-реактивной базы.

Целью исследования стал выбор показателей популяций лимфоцитов макак-резусов, определенных методом проточной цитометрии, которые можно использовать для оценки изменений клеточной составляющей иммунного статуса указанных лабораторных животных.

Материалы и методы

В экспериментах использовали 11 здоровых самцов макак-резусов возрастом 2,0–2,5 года, массой 2,5–3,0 кг, доставленных из питомника г. Сочи, которых содержали в виварии ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Уход за животными осуществляли в соответствии с руководством [6] и Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными...». Обезьян обследовали одновременно в каждый из семи месяцев наблюдения (с мая по ноябрь).

Венозную кровь приматов, полученную утром натошак пункцией периферической вены, собирали в вакуумные пробирки с напылением K_3 ЭДТА. Иммунофенотипирование проводили в день взятия

крови на цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США), оснащенном аргоновым (синим) лазером с длиной волны излучения 488 нм с программным обеспечением СХР, версия 2.2. Методология иммунофенотипирования лимфоцитов обезьян существенно не отличается от той, что используется для человека [7], поэтому составление цитометрических панелей, распределение антител по каналам флуоресценции, настройку протоколов анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией и принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [8]. В каждой пробе исследовали не менее 5000 лимфоцитов.

Для выявления популяций лимфоцитов крови обезьян применяли две панели моноклональных антител (МКАт): CD8-FITC/CD4-PE/CD2-PECy7 и CD56-FITC/CD20-PECy5.5/CD2-PC7. Для установления границ между отрицательными и положительными событиями при использовании антитела CD56-FITC, имеющего низкий уровень экспрессии на лимфоцитах макак-резусов ($CD56^{dim}$), использовали соответствующий изотипический контроль IgG1-FITC (кат. № 11-4714, Affymetrix eBioscience, США). Для проверки корректности настройки компенсации применяли «FMO-подход» (Fluorescence-Minus-One, флуоресценция минус один).

Были подобраны перекрестно реагирующие с антигенами лимфоцитов макак-резусов клоны мышиных античеловеческих МКАт, конъюгированные с флуорохромами (все антитела производства Affymetrix eBioscience, США): CD8-FITC (клон RPA-T8, кат. № 11-0088), CD4-PE (клон OKT4, кат. № 12-0048), CD2-PE Cy7 (клон RPA-2.10, кат. № 25-0029), CD56-FITC (клон TULY56, кат. № 11-0566), CD20-PE Cy5.5 (клон 2H7, кат. № 35-0209). В пробирки с предварительно внесенными МКАт помещали 70 мкл крови. Содержимое пробирок перемешивали в течение 1 с на автоматическом встряхивателе типа Vortex, далее инкубировали 20 мин в темном месте при комнатной температуре, потом переносили в станцию пробоподготовки TQ-Prep (Beckman Coulter, США) для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов с использованием набора реагентов ImmunoPrep (Beckman Coulter, кат. № 7546999, США).

Лимфоциты выделяли на гистограммах на основании параметров малоуглового и бокового светорассеяния. С использованием перечисленных МКАт были дифференцированы следующие показатели клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов: Т-лимфоциты общие (Т) (фенотип CD2+CD20-); В-лимфоциты общие (В) (фенотип

CD2-CD20+); натуральные киллеры (NK) (фенотип CD2^{+(dim)}CD56^{+(dim)}); Т-хелперы (HELP) (фенотип CD2+CD4+); цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) (фенотип CD2+CD8+); дубль-позитивные Т-лимфоциты (DP) (фенотип CD2+CD4+CD8+) и Т-лимфоциты, позитивные по антигенам CD2 и CD20 (фенотип CD2+CD20+). Цитотоксические лимфоциты дифференцировали от натуральных киллеров, имеющих фенотип (CD2+CD8+), по более выраженной экспрессии маркеров (bright (яркий) у CTL-лимфоцитов против dim (тусклый) у NK).

Анализ показателей клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов проводили средствами MS Excel с использованием общеизвестных статистических методов и критериев. За уровень статистической значимости принята величина, равная 0,05.

Результаты и обсуждение

Для каждой популяции лимфоцитов (далее – показатель), исследованной у каждого животного, рассчитали следующие статистические параметры: среднюю величину (X_{cp}); медиану (Me); нижнюю и верхнюю границы доверительного интервала медианы; коэффициент асимметрии (As) и эксцесса (Ex); значения t-критерия Стьюдента для коэффициента асимметрии (t_{As}) и эксцесса (t_{Ex}); коэффициент вариации (K_v). Указанные параметры представлены в таблице.

Средняя арифметическая величина каждого показателя находится в диапазоне значений от нижней до верхней границ доверительного интервала медианы. Близость значений медианы и средней арифметической величины характерна для симметричных распределений, в том числе для нормального распределения [9].

Проверку гипотезы о нормальном распределении исследованных показателей проводили с использованием общепринятых критериев: коэффициента асимметрии (As) и эксцесса (Ex).

Средние квадратичные отклонения σ_{As} и σ_{Ex} выборочных значений асимметрии (As) и эксцесса (Ex) рассчитывали по следующим формулам с учетом объема выборки N , равного 77:

$$\sigma_{As} = \sqrt{\frac{6}{N+3}}, \quad \sigma_{Ex} = \sqrt{\frac{24}{N+5}}.$$

Нулевая гипотеза (предположение о нормальном распределении выборки) отвергалась, если

$$t_{As} = \frac{As}{\sigma_{As}} \geq 3, \quad \text{или} \quad t_{Ex} = \frac{Ex}{\sigma_{Ex}} \geq 3 \quad [9].$$

В соответствии с указанным правилом критериям нормального распределения удовлетворяют показатели Т- и В-лимфоцитов общих, Т-лимфоцитов-хелперов и Т-лимфоцитов-цитотоксических, а также Т-лимфоцитов, позитивных по антигенам CD2 и CD20.

Такие показатели, как натуральные киллеры, имеющие фенотип (CD2+CD56+), и дубль-позитивные Т-лимфоциты, отличаются существенной вариабельностью: коэффициент K_v , характеризующий ошибку метода измерения, для указанных показателей в 2–3 раза выше, чем для остальных исследованных показателей иммунного статуса. Поэтому отклонение их значений от нормального распределения можно объяснить недостаточным объемом выборки для данной точности измерений. Сравнение средних значений одноименных показателей в различные сроки наблюдения с использованием t-критерия Стьюдента выявило отсутствие достоверных различий между ними, что позволяет объединить в одну выборку данные, соответствующие одноименным показателям в различные сроки наблюдения.

В настоящее время для идентификации Т- и В-клеток у обезьян, как и у человека, используют в основном комбинацию линейно-специфических маркеров Т-лимфоцитов (CD3) и В-лимфоцитов (CD19) или комбинацию CD3 и CD20, а для идентификации Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов используют комбинацию CD3, CD4 и CD8 маркеров [1]. Данные по содержанию общих Т- и В-лимфоцитов макак-резусов, полученные с использованием комбинации маркеров CD2 и CD20, согласуются с результатами иммунофенотипирования при использовании маркеров CD3 и CD19 или CD3 и CD20. Данные по содержанию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов макак-резусов, полученные с использованием комбинации маркеров CD2, CD4 и CD8, согласуются с результатами, полученными с использованием комбинации маркеров CD3, CD4 и CD8 [7, 10].

Следует отметить, что в проведенном исследовании у макак-резусов идентифицированы также малые популяции лимфоцитов: Т-лимфоциты, имеющие фенотип (CD2+CD20+), натуральные киллеры, имеющие фенотип (CD2+CD56+), и дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD2+CD4+CD8+).

Применение антител к антигенам CD2 и CD20 позволило, наряду с определением основных популяций, идентифицировать малоизученную субпопуляцию Т-лимфоцитов, положительных по указанным антигенам. Хотя CD20 первоначально был отнесен к В-клеточным маркерам, небольшая популяция Т-клеток человека тоже экспрессирует этот антиген, причем В-клетки экспрессируют CD20 в высокой плотности, а Т-клетки – в низкой [11]. У макак-резусов популяция Т-лимфоцитов, имеющих фенотип (CD2+CD20+), составила (2,0±0,1) % от лимфоцитов периферической крови (см. таблицу), что достаточно близко к величине соответствующего показателя у человека (2,4±1,5 %) [11].

Человеческие NK-клетки традиционно определяются как имеющие фенотип (CD3-CD(16+56+)) [1]. Маркер CD56, как и CD16, является линейно-специфичным маркером натуральных киллеров человека. По интенсивности экспрессии (плотности на

Результаты оценки показателей клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов
Results of indicator assessment of cellular component of immune status in rhesus macaques

Статистические параметры Statistical parameters	Показатель (популяция лимфоцитов, фенотип) Indicator (lymphocyte population, phenotype)						
	T CD2 ⁺ CD20 ⁻	B CD2 ⁻ CD20 ⁺	NK CD2 ⁺ CD56 ⁺	HELP CD2 ⁺ CD4 ⁺	CTL CD2 ⁺ CD8 ⁺	DP CD2 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	T CD2 ⁺ CD20 ⁺
Средняя арифметическая величина (X_{cp}) Arithmetic mean value (X_{cp})	71,1	25,5	0,6	32,3	29,4	1,0	2,0
Медиана (Me) Median (Me)	69,7	24,2	0,5	31,1	28,7	0,9	1,9
Нижняя граница доверительного интервала медианы Lower limit of the median confidence interval	69,1	22,9	0,4	28,7	26,5	0,9	1,9
Верхняя граница доверительного интервала медианы Upper limit of the median confidence interval	73,5	26,6	0,6	34,3	30,4	1,1	2,0
Коэффициент асимметрии (A_s) Skewness ratio (A_s)	-0,22	0,28	1,17	0,34	0,46	1,19	0,41
Критерий Стьюдента t_{As} Student's test t_{As}	-0,80	1,02	4,27	1,25	1,66	4,34	1,51
Экспесс (Ex) Kurtosis (Ex)	-0,79	-0,94	1,41	-0,53	0,18	2,77	-0,04
Критерий Стьюдента t_{Ex} Student's test t_{Ex}	1,47	1,74	2,6	1,00	0,33	5,11	0,07
Коэффициент вариации (K_v) Coefficient of variation (K_v)	8,7	23,0	74,0	22,9	23,6	51,9	27,4

Примечания:

1. Показатели клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов, кроме DP, рассчитывали как процент от общей популяции лимфоцитов.
2. Показатель DP рассчитывали как процент от популяции Т-лимфоцитов.
3. Количество измерений N каждого показателя равно 77.

Notes:

1. Indicators of the cellular component of the immune status of rhesus macaques, except DP, were calculated as a percentage of the total population of lymphocytes.
2. DP was calculated as a percentage of the T-lymphocyte population.
3. The number of metering N of each indicator is equal to 77.

поверхности клетки) маркера CD56 натуральные киллеры человека можно разделить на два подмножества: CD56^{bright} (яркие) и CD56^{dim} (тусклые), которые составляют соответственно 0,7 и 10 % от общей популяции лимфоцитов [12]. В популяции CD56^{dim} натуральных киллеров 79 % клеток имеют на своей поверхности молекулу CD2 [13]. Относительно роли CD56 как маркера NK-клеток у нечеловекообразных приматов в литературе существуют противоречия: в некоторых источниках говорится, что молекула CD56 экспрессируется лимфоцитами макак-резусов, в других эта информация опровергается [14].

В выполненном исследовании популяция натуральных киллеров макак-резусов, несущих маркер CD56, относится к подмножеству CD56^{dim} и составляет 0,6 % от лимфоцитов (см. таблицу), что значительно меньше аналогичной популяции у человека. Таким образом, CD56 не подходит в качестве маркера натуральных киллеров макаки-резуса.

Сообщения о циркулирующих в периферической крови человека дважды положительных Т-клетках, которые составляли от 1 до 3 % от общей популяции Т-лимфоцитов, были опубликованы еще в 80-х годах прошлого века, но из-за нетрадиционного фенотипа и редкости у человека и мышей большинство имму-

нологов до сих пор игнорируют экстратимические (CD4+CD8+) Т-лимфоциты [15]. Данная популяция является редко исследуемой, в ее пуле существует значительная гетерогенность, функция подмножеств дубль-позитивных Т-лимфоцитов остается спорной, сообщения о них противоречивы и немногочисленны. В результате изучения связей DP-Т-лимфоцитов с инволюцией тимуса у яванских макак зафиксировано, что у шестилетних животных в крови находится от 1 до 10 % этих клеток и их процентное содержание резко возрастает начиная с семи лет, параллельно с инволюцией тимуса [16].

В выполненном исследовании установлено, что в крови двухлетних самцов макак-резусов DP-Т-лимфоциты составляют 1 % от популяции Т-лимфоцитов (см. таблицу). Данные о зависящем от возраста и пола содержании DP-Т-лимфоцитов в крови людей и макак-резусов в опубликованных источниках отсутствуют, поэтому делать какие-либо сравнения не представляется возможным.

Достоверность влияния времени наблюдения (месяца года) на показатели клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов исследовали методом однофакторного дисперсионного анализа [9]. Для этого рассчитывали критерий Фишера,

представляющий собой отношение межгрупповой дисперсии к внутригрупповой дисперсии. Для указанных степеней свободы рассчитанные величины критерия Фишера всех показателей существенно меньше соответствующего табличного значения для уровня значимости, равного 0,05 [9].

В качестве оценки силы влияния фактора (времени исследования) использовали критерий η^2 – соотношение межгрупповой суммы квадратов к общей сумме квадратов отклонений. В качестве критерия достоверности силы влияния η^2 использовали критерий $m\eta^2$, который вычисляли по следующей формуле:

$$m\eta^2 = (1 - \eta^2) \times \frac{a - 1}{N - a},$$

где a – число градаций исследуемого фактора (времени исследования); N – количество измерений показателя за каждый месяц [9].

Нулевая гипотеза отвергалась, то есть влияние фактора времени на исследуемый показатель считали существенным, если соотношение $\eta^2/m\eta^2$ было больше или равно табличному значению критерия Фишера для уровня значимости, равного 0,05 [9].

Результаты расчетов подтверждают вывод об отсутствии существенного влияния фактора времени исследования на показатели клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов.

Аналогичным образом с использованием дисперсионного анализа дана оценка достоверности различия показателей между особями. Выявлено, что показатели различаются у разных животных вне зависимости от времени анализа.

Таким образом, методом проточной цитометрии с использованием маркеров CD2, CD4, CD8, CD20 и CD56 определены показатели основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови макак-резусов. Выявлена существенная вариабельность показателей между особями по сравнению с их изменениями у каждого животного в различные периоды времени. Данные по содержанию Т- и В-лимфоцитов макак-резусов, полученные с использованием комбинации маркеров CD2 и CD20, согласуются с результатами иммунофенотипирования при использовании комбинаций маркеров CD3 и CD19 или CD3 и CD20. Данные по содержанию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, полученные с использованием комбинации маркеров CD2, CD4 и CD8, согласуются с результатами при использовании комбинации маркеров CD3, CD4 и CD8. Идентифицированы малые популяции лимфоцитов периферической крови макак-резусов, такие как Т-лимфоциты (CD2+CD20+), натуральные киллеры (CD2+(dim)CD56+(dim)) и дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD2+CD4+CD8+).

По результатам статистического анализа можно сделать вывод об отсутствии влияния фактора времени исследования на показатели лимфоцитов макак-резусов. Для оценки изменений клеточной составляющей иммунного статуса можно использовать

показатели общих Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов, имеющих фенотип (CD2+CD20+), отличающиеся меньшей вариабельностью. Показатели дубль-позитивных Т-лимфоцитов могут быть использованы для оценки изменений клеточной составляющей иммунного статуса макак-резусов, если при увеличении числа подопытных животных будет достигнуто снижение ошибки метода измерения. Использование CD56 в качестве маркера натуральных киллеров макаки-резуса нецелесообразно из-за его низкой экспрессии и малочисленности популяции, несущей данный маркер.

Поскольку исследование проводили с использованием крови здоровых особей, результаты могут стать основой нормативных показателей субпопуляционного состава клеток иммунной системы животных данного вида, что позволит исследовать инфицированных животных при оценке качества лечебных препаратов в отношении особо опасных и опасных инфекций.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Хаитов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы. Учебное пособие. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 280 с.
2. Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., Fehling S.K., Strecker T., Becker S., Altfeld M., Sow A., Lohse A., Muñoz-Fontela C., Addo M.M. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2):287–92. DOI: 10.1093/infdis/jiw508.
3. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2015; 3:62–8. DOI:10.14427/jipai.2015.3.62.
4. Cimini E., Viola D., Cabeza-Cabrerizo M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., Bordon V., Casetti R., Turchi F., Martini F., Bore J.A., Koundouno F.R., Duraffour S., Michel J., Holm T., Zekeng E.G., Cowley L., Garcia Dorival I., Doerrbecker J., Hetzelt N., Baum J.H.J., Portmann J., Wölfel R., Gabriel M., Miranda O., Diaz G., Diaz J.E., Fleites Y.A., Piñeiro C.A., Castro C.M., Koivogui L., Magassouba N., Diallo B., Ruibal P., Oestereich L., Wozniak D.M., Lüdtkke A., Becker-Ziaja B., Capobianchi M.R., Ippolito G., Carroll M.W., Günther S., Di Caro A., Muñoz-Fontela C., Agrati C. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(5):e0005645. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005645.
5. Sullivan N.J., Hensley L., Asiedu C., Geisbert T.W., Stanley D., Johnson J., Honko A., Olinger G., Bailey M., Geisbert J.B., Reimann K.A., Bao S., Rao S., Roederer M., Jahrling P.B., Koup R.A., Nabel G.J. CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat. Med.* 2011; 17(9):1128–31. DOI: 10.1038/nm.2447.
6. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В., редакторы. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Москва: Профиль; 2010. 358 с.
7. Xia H.-J., Zhang G.-H., Wang R.-R., Zheng Y.-T. The influence of age and sex on the cell counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in Chinese rhesus macaques. *Cell. Mol. Immunol.* 2009; 6(6):433–40. DOI: 10.1038/cmi.2009.55.
8. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов». *Российский иммунологический журнал*. 2014; 4:974–92.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа; 1990. 352 с.
10. Игнатова И.Е., Агба В.З. Показатели клеточного звена иммунитета у приматов. *Бюллетень экспериментальной био-*

логии и медицины. 2010; 149(1):93–6. DOI: 10.1007/s10517-010-0882-7.

11. Hultin L.E., Hausner M.A., Hultin P.M., Giorgi J.V. CD20 (pan B-cell) antigen is expressed at a low level on a population of human T lymphocytes. *Cytometry*. 1993; 14(2):196–204. DOI: 10.1002/cyto.990140212.

12. Chidrawar S.M., Khan N., Chan Y.L., Nayak L., Moss P.A. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56^{bright} NK cells. *Immun. Ageing*. 2006; 3:10. DOI: 10.1186/1742-4933-3-10.

13. Sedlmayr P., Schallhammer L., Hammer A., Wilders-Truschig M., Wintersteiger R., Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56^{dim+} and CD56^{bright+} natural killer cell subpopulations. *Arch. Allergy Immunol.* 1996; 110(4):308–13. DOI: 10.1159/000237321.

14. Webster R.L., Johnson R.P. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology*. 2005; 115(2):206–14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02147.x.

15. Overgaard N.H., Jung J.W., Steptoe R.J., Wells J.W. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97(1):31–8. DOI: 10.1189/jlb.1RU0814-382.

16. Lee W.W., Nam K.H., Terao K., Akari H., Yoshikawa Y. Age-related increase of peripheral CD4+CD8+ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys: longitudinal study in relation to thymic involution. *Immunology*. 2003; 109(2):217–25. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2003.01646.x.

References

1. Khaitov R.M. [Immunology: Structure and Functions of the Immune System]. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. 280 p.

2. Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., Fehling S.K., Strecker T., Becker S., Altfeld M., Sow A., Lohse A., Muñoz-Fontela C., Addo M.M. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2):287–92. DOI: 10.1093/infdis/jiw508.

3. Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbato A.A., Kravchenko T.B., Tyurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. [Assessment of specific humoral and cellular immunity in people who are vaccinated against plague on a regular basis]. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya [Immunopathology, Allergology, Infectology]*. 2015; 3:62–8. DOI: 10.14427/jipai.2015.3.62.

4. Cimini E., Viola D., Cabeza-Cabrero M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., Bordoni V., Casetti R., Turchi F., Martini F., Bore J.A., Koundouno F.R., Duraffour S., Michel J., Holm T., Zekeng E.G., Cowley L., Garcia Dorival I., Doerrbecker J., Hetzelt N., Baum J.H.J., Portmann J., Wölfel R., Gabriel M., Miranda O., Diaz G., Diaz J.E., Fleites Y.A., Piñeiro C.A., Castro C.M., Koivogui L., Magassouba N., Diallo B., Ruibal P., Oestereich L., Wozniak D.M., Lüdtkke A., Becker-Ziaja B., Capobianchi M.R., Ippolito G., Carroll M.W., Günther S., Di Caro A., Muñoz-Fontela C., Agrati C. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(5):e0005645. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005645.

5. Sullivan N.J., Hensley L., Asiedu C., Geisbert T.W., Stanley D., Johnson J., Honko A., Olinger G., Bailey M., Geisbert J.B., Reimann K.A., Bao S., Rao S., Roederer M., Jahrling P.B., Koup R.A., Nabel G.J. CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat. Med.* 2011; 17(9):1128–31. DOI: 10.1038/nm.2447.

6. Karkishchenko N.N., Grachev S.V., editors. [Guidelines on Laboratory Animals and Alternative Models in Biomedical Technologies]. Moscow: "Profile"; 2010. 358 p.

7. Xia H.-J., Zhang G.-H., Wang R.-R., Zheng Y.-T. The influence of age and sex on the cell counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in Chinese rhesus macaques. *Cell. Mol. Immunol.* 2009; 6(6):433–40. DOI: 10.1038/cmi.2009.55.

8. Khaidukov S.V., Baidun L.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A. [Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometers-analyzers"]. *Rossiyskiy Immunologicheskyy Zhurnal [Russian Journal of Immunology]*. 2014; 4:974–92.

9. Lakin G.F. [Biometrics. Study guide for Biol. spec. universities]. 4th ed., revised and expanded. M.: "Higher school"; 1990. 352 p.

10. Ignatova I.E., Agrba V.Z. [Indicators of cellular element of immunity system in primates]. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny [Bulletin of experimental biology and medicine]*. 2010; 149(1):93–6. DOI: 10.1007/s10517-010-0882-7.

11. Hultin L.E., Hausner M.A., Hultin P.M., Giorgi J.V. CD20 (pan B-cell) antigen is expressed at a low level on a population of human T lymphocytes. *Cytometry*. 1993; 14(2):196–204. DOI: 10.1002/cyto.990140212.

12. Chidrawar S.M., Khan N., Chan Y.L., Nayak L., Moss P.A. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56^{bright} NK cells. *Immun. Ageing*. 2006; 3:10. DOI: 10.1186/1742-4933-3-10.

13. Sedlmayr P., Schallhammer L., Hammer A., Wilders-Truschig M., Wintersteiger R., Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56^{dim+} and CD56^{bright+} natural killer cell subpopulations. *Arch. Allergy Immunol.* 1996; 110(4):308–13. DOI: 10.1159/000237321.

14. Webster R.L., Johnson R.P. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology*. 2005; 115(2):206–14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02147.x.

15. Overgaard N.H., Jung J.W., Steptoe R.J., Wells J.W. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97(1):31–8. DOI: 10.1189/jlb.1RU0814-382.

16. Lee W.W., Nam K.H., Terao K., Akari H., Yoshikawa Y. Age-related increase of peripheral CD4+CD8+ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys: longitudinal study in relation to thymic involution. *Immunology*. 2003; 109(2):217–25. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2003.01646.x.

Authors:

Borisevich G.V., Kirillova S.L., Sidorova O.N., Lebedev V.N., Petrov A.A., Ovchinnikov A.V., Shatokhina I.V., Sizikova T.E., Sazonov V.E., Mukhacheva E.S., Borisevich S.V. "48th Central Research Institute" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation. Sergiev Possad-6, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Об авторах:

Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Сидорова О.Н., Лебедев В.Н., Петров А.А., Овчинников А.В., Шатохина И.В., Сизикова Т.Е., Сазонов В.Е., Мухачева Е.С., Борисевич С.В. «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.