

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



## Оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии после экспериментального инфицирования вирусом Эбола (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*)

Борисевич Г.В.<sup>1</sup>, Кириллова С.Л.<sup>1</sup>, Шатохина И.В.<sup>1</sup>, Лебедев В.Н.<sup>1</sup>, Шагарова Н.В.<sup>1</sup>, Сыромятникова С.И.<sup>1</sup>, Андрус А.Ф.<sup>1</sup>, Ковальчук Е.А.<sup>1</sup>, Кириллов В.Б.<sup>1</sup>, Беспалов М.Л.<sup>2</sup>, Петров А.А.<sup>1</sup>, Ковальчук А.В.<sup>1</sup>, Пантюхов В.Б.<sup>1</sup>, Кутаев Д.А.<sup>1</sup>, Борисевич С.В.<sup>1</sup>, Кузнецов С.Л.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад-6, Россия;

<sup>2</sup>ООО «МедисКоМ», 127254, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Управление начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооружённых Сил Министерства обороны Российской Федерации, 119160, Москва, Россия

**Введение.** Возникающие в последнее десятилетие вспышки болезни, вызываемой вирусом Эбола (ВЭ) (БВВЭ), определяют необходимость изучения патогенеза этой нозологической формы, формирования специфического иммунитета, а также создания эффективных средств профилактики и лечения. Все звенья борьбы с распространением заболевания невозможны без экспериментального моделирования инфекции на чувствительных к ней лабораторных животных, которыми для БВВЭ являются макаки резусы.

**Цель исследования** – оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии (цитофлуориметрии) (ПЦ) после экспериментального инфицирования ВЭ.

**Материал и методы.** Самцов макаков резусов внутримышечно инфицировали ВЭ, штамм Заир, в дозе 15 LD<sub>50</sub> (доза возбудителя, вызывающая гибель 50% инфицированных животных). С использованием метода ПЦ определены уровни 18 популяций/субпопуляций лимфоцитов периферической крови животных до экспериментального инфицирования возбудителем и в терминальной стадии заболевания.

**Результаты и обсуждение.** Выявлено достоверное изменение после инфицирования уровня популяций/субпопуляций лимфоцитов, указывающее на сочетание активации и супрессии иммунной системы при БВВЭ. Увеличение содержания отмечено для Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие маркёры ранней активации. Снижение количества показано для Т-лимфоцитов и дубль-позитивных Т-лимфоцитов с экспрессией соответствующих маркёров поздней активации, а также натуральных киллеров, экспрессирующих CD8 (статистическая значимость оценивалась величиной  $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Впервые в Российской Федерации методом ПЦ проведено сравнение характеристик клеточного иммунитета макаков резусов до и после экспериментального инфицирования ВЭ. Информация по динамике изменений популяций лимфоцитов может иметь диагностическую значимость в ходе изучения патологического процесса при инфицировании данным возбудителем, контроле эффективности терапии, прогнозе возникновения и течения заболевания, а также его исхода.

**Ключевые слова:** вирус Эбола; макаки резусы; лимфоциты; проточная цитометрия

**Для цитирования:** Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Шагарова Н.В., Сыромятникова С.И., Андрус А.Ф., Ковальчук Е.А., Кириллов В.Б., Беспалов М.Л., Петров А.А., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л. Оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии после экспериментального инфицирования вирусом Эбола (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 289-298. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

**Для корреспонденции:** Борисевич Галина Валентиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела, «48 Центральный научно-исследовательский институт» («48 ЦНИИ») Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@mil.ru)

**Участие авторов:** Борисевич Г.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, написание текста; Кириллова С.Л. – статистическая обработка данных, написание текста; Шатохина И.В. – работа с животными; Лебедев В.Н. – статистическая обработка данных, редактирование статьи; Шагарова Н.В. – работа с животными; Сыромятникова С.И. – работа с животными; Андрус А.Ф. – работа с животными; Ковальчук Е.В. – сбор и обработка материалов; Кириллов В.Б. – статистическая обработка данных; Беспалов М.Л. – сбор и обработка материала; Петров А.А. – написание текста; Ковальчук А.В. – работа с животными; Пантюхов В.Б. – редактирование статьи; Кутаев Д.А. – концепция и дизайн исследования; Борисевич С.В. – редактирование статьи; Кузнецов С.Л. – редактирование статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук, заведующему лабораторией иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» И.В. Кудрявцеву (Санкт-Петербург) за консультативно-методическую помощь при проведении работ по проточной цитометрии.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Протокол № 2 от 29 мая 2020 г.).

Поступила 06.04.2021

Принята к печати 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

## ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

## Flow cytometry evaluation of the rhesus monkey cellular immunity following the Zaire ebolavirus (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) experimental infection

Galina V. Borisevich<sup>1</sup>, Svetlana L. Kirillova<sup>1</sup>, Irina V. Shatokhina<sup>1</sup>, Vitaly N. Lebedev<sup>1</sup>, Natalia V. Shagarova<sup>1</sup>, Svetlana I. Syromyatnikova<sup>1</sup>, Alexandr F. Andrus<sup>1</sup>, Elena A. Koval'chuk<sup>1</sup>, Vladimir B. Kirillov<sup>1</sup>, Mikhail L. Bepalov<sup>2</sup>, Alexandr A. Petrov<sup>1</sup>, Aleksey V. Koval'chuk<sup>1</sup>, Vladimir B. Pantyukhov<sup>1</sup>, Dmitry A. Kutayev<sup>1</sup>, Sergey V. Borisevich<sup>1</sup>, Sergey L. Kuznetsov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad-6, Russia;

<sup>2</sup>LLC «MedisCoM», 127254, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Directorate of the Chief of the Radiation, Chemical, and Biological Defence Troops of the Armed Forces of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 119160, Moscow, Russia

**Introduction.** The outbreaks of the Zaire ebolavirus (ZE) disease (ZED) that have arisen in the last decade determine the need to study the infection pathogenesis, the formation of specific immunity forming as well as the development of effective preventive and therapeutic means. All stages of fight against the ZED spread require the experimental infection in sensitive laboratory animals, which are rhesus monkeys in case of this disease.

The **aim** of the study is to evaluate the rhesus monkey cellular immunity following the ZE experimental infection by the means of flow cytometry (cytofluorimetry).

**Material and methods.** Male rhesus monkeys were intramuscularly infected by the dose of 15 LD<sub>50</sub> (dose of the pathogen that causes 50% mortality of infected animals) of the ZE, the Zaire strain (ZEBOV). Levels of 18 peripheral blood lymphocyte populations of the animals before the ZE experimental infection and at the terminal stage of the disease were assessed using flow cytometry.

**Results and discussion.** The certain changes in the levels of the lymphocyte populations were observed following infection, indicating simultaneous activation and suppression of the immune system during ZED. The increase in content was observed for T-lymphocytes, T-helper and cytotoxic T-lymphocytes expressing the corresponding markers of early activation. The decrease was recorded for T-lymphocytes and double-positive T-lymphocytes expressing corresponding markers of late activation, as well as natural killer cells expressing CD8 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** For the first time in the Russian Federation, the rhesus monkey cellular immunity before and after the ZE experimental infection was assessed using flow cytometry.

**Key words:** *Ebola virus; rhesus monkeys; lymphocytes; flow cytometry*

**For citation:** Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Shagarova N.V., Syromyatnikova S.I., Andrus A.F., Koval'chuk E.A., Kirillov V.B., Bepalov M.L., Petrov A.A., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kutayev D.A., Borisevich S.V., Kuznetsov S.L. Flow cytometry evaluation of the rhesus monkey cellular immunity following the Zaire ebolavirus (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) experimental infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 289-298 (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

**For correspondence:** Galina V. Borisevich, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher of the Department, FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad-6, Russia. E-mail: 48cnii@mil.ru

**Information about the authors:**

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

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

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

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

Shagarova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-9523-8676>  
Syromyatnikova S.I., <https://orcid.org/0000-0002-1490-9448>  
Andrus A.F., <https://orcid.org/0000-0002-7430-9401>  
Koval'chuk E.A., <https://orcid.org/0000-0002-7279-196x>  
Kirillov V.B., <https://orcid.org/0000-0003-2916-0668>  
Bespalov M.L., <https://orcid.org/0000-0003-3220-6153>  
Petrov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>  
Koval'chuk A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9681-9891>  
Pantukhov V.B., <https://orcid.org/0000-0002-1313-2059>  
Kutayev D.A., <https://orcid.org/0000-0001-9009-4909>  
Borisevich S.V., <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>  
Kuznetsov S.L., <https://orcid.org/0000-0003-2705-8774>

**Contribution:** Borisevich G.V. – research concept and design, collection and processing of the materials, writing of the text; Kirillova S.L. – statistical processing, writing of the text; Shatokhina I.V. – working with animals, writing of the text; Lebedev V.N. – statistical processing, editing of the article; Shagarova N.V. – working with animals; Syromyatnikova S.I. – working with animals; Andrus A.F. – working with animals; Koval'chuk E.A. – collection and processing of the materials; Kirillov V.B. – statistical processing; Bespalov M.L. – collection and processing of the materials; Petrov A.A. – writing of the text; Koval'chuk A.V. – working with animals; Pantukhov V.B. – editing of the article; Kutayev D.A. – research concept and design; Borisevich S.V. – editing of the article; Kuznetsov S.L. – editing of the article.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

**Acknowledgments.** The authors express their gratitude to I.V. Kudryavtsev, Ph.D. (Biol.), Head of the Laboratory of Immunoregulation of the Immunology Department, FSBSI «Institute of Experimental Medicine» (Saint Petersburg), for consultative and methodical aid during the fulfillment of flow cytometry works.

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

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» (FSBI «48 CSR») of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Protocol No. 2 dated May 29, 2020).

Received 06 April 2021  
Accepted 14 July 2021  
Published 31 August 2021

## Введение

Вспышки болезни, вызываемой вирусом Эбола (ВЭ) (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) (БВВЭ), возникающие в последнее десятилетие [1], определяют необходимость изучения патогенеза данной нозологической формы, формирования специфического иммунитета, а также разработки действенных средств профилактики и лечения [2]. Одно из перспективных направлений в современной инфекционной иммунологии – определение роли наиболее значимых поверхностных антигенов, экспрессируемых на иммунокомпетентных клетках, в реализации иммунного ответа при инфекционных заболеваниях [3]. К настоящему времени доказано, что именно клеточный иммунитет играет ключевую роль в патогенезе БВВЭ и формировании протективной иммунной защиты по отношению к ВЭ [4–7]. Для создания эффективных медицинских средств необходимым этапом является экспериментальное моделирование инфекции на чувствительных к ней лабораторных животных, которыми для БВВЭ являются низшие приматы (*Primates: Strepsirrhini*), в т.ч. макаки резусы (*Macaca mulatta, Macaca rhesus*). [8]. В связи с этим оценка клеточного иммунитета представителей этого вида с использованием метода проточной цитометрии (ПЦ) после экспериментального инфицирования ВЭ представляет собой в настоящее время актуальную задачу.

В процессе изучения характеристик Т-клеточного иммунного ответа на внедрение инфекционного агента у человека в дополнение к оценке основных популяций лимфоцитов [9] определяется также экспрессия маркеров ранней (CD25) и поздней активации (антигены главного комплекса гистосовместимости (major

histocompatibility complex, МНС) II класса HLA-DR) на субпопуляциях Т-лимфоцитов [10]. При исследовании крови инфицированных ВЭ обезьян ввиду схожести кроветворной и иммунной систем человека и макака резуса [11], а также с учётом возможностей приборно-реагентной базы можно придерживаться этого же перечня.

Целью настоящей работы являлась оценка методом (ПЦ) клеточного иммунитета макаков резусов после экспериментального инфицирования ВЭ.

## Материал и методы

**Животные.** В опытах использовали 6 здоровых самцов макаков резусов в возрасте 2,0–2,5 года массой 2,5–3,0 кг, доставленных из питомника Адлерского приматологического центра (г. Сочи) и прошедших месячную акклиматизацию с ежедневным измерением ректальной температуры, осмотром кожных покровов и слизистых оболочек. Эксперименты на животных проводили в соответствии с ГОСТ 33218-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами) и Федеральным законом РФ «Об ответственном обращении с животными» (№ 498-ФЗ от 27.12.2018).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Протокол № 2 от 29.05.2020 г.).

**Вывод.** Культура ВЭ, штамм Заир, прошедшего 4 пассажа через печень павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), с биологической активностью  $2,1 \times 10^5$  Ig БОЕ/мл (БОЕ – бляшкообразующая единица),  $3,0 \times 10^7$  LD<sub>50</sub>/мл (LD<sub>50</sub> – доза возбудителя, вызывающая гибель 50% инфицированных животных), получена из Специализированной коллекции эталонных культур штаммов вирусов – возбудителей геморрагических лихорадок I группы патогенности, депонированной в коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Работы с вирусом проводили в соответствии с требованиями Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Обезьян инфицировали внутримышечно в дозе 15 LD<sub>50</sub>. Для сбора образцов крови животных анестезировали путём внутримышечного введения золептила (тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид) из расчёта 4–6 мг препарата на 1 кг массы тела. Биологическую активность возбудителя в пробах крови определяли титрованием на культуре клеток GMK-АН-1(Д) по методу негативных колоний [12].

После введения инфекционного агента, начиная с 3–5 сут, у обезьян развивалась типичная картина БВВЭ, проявлявшаяся геморрагической сыпью, кровотечениями, отказом от пищи, снижением двигательной активности. Гибель наступала на 7–10 сут после инфицирования.

#### Проточно-цитометрический анализ

С целью выявления популяций лимфоцитов периферической крови обезьян применяли 3 панели конъюгированных с флуорохромами мышинных античеловеческих моноклональных антител (МКАТ), перекрёстно реагирующих с антигенами лимфоцитов макаков резусов: CD16-FITC/CD19-PE/CD3-PE-Cy7, CD25-FITC/CD4-PE/HLA-DR-ECD/CD8-PC5/ CD3-PE-Cy7 и CD25-FITC/CD4-PE/CD127-PE-Cy5/CD3-PE-Cy7.

Поскольку процедура иммунофенотипирования лимфоцитов обезьян идентична используемой для человека [13], составление цитометрических панелей и настраивание протоколов анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией [14] и принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [15].

Использовали следующие МКАТ, входящие в состав цитометрических панелей: Affymetrix eBioscience («ThermoFisher Scientific», США) (CD25-FITC, кат. № 11-0257; CD4-PE, кат. № 12-0048; CD127-PE-Cy5, кат. № 15-1278); Beckman Coulter (США) (CD8-PC5, кат. № A07758; HLA-DR-ECD, кат. № IM3636); Becton Dickinson (США) (CD3-PE-Cy7, кат. № 557749); Novus (США) (CD19-PE, кат. № 6602868); Serotec (США) (CD16-FITC, кат. № MCA1569F). Рабочие объёмы МКАТ определяли путём титрования, рассчитывая для каждого разведения индекс окрашивания (stain index) [16]. При использовании антител против маркёров CD25, CD127 и HLA-DR для настраивания протоколов анализа применяли соответствующие изотипические контроли Affymetrix eBioscience

(IgG2b-FITC, кат. № 11-4732; IgG1-PE-Cy5, кат. № 15-4714) и Beckman Coulter (IgG1-ECD, кат. № A07797). Корректность компенсации проверяли с использованием FMO-подхода (Fluorescence-Minus-One, флуоресценция минус один) [17].

Для проточно-цитометрического анализа забор крови у животных проводили в «чистой» зоне за 1 сут до инфицирования (с целью определения фоновых показателей) и в «заразной» зоне при заключительной (терминальной) стадии заболевания. Из пробирки с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (КЗ-ЭДТА) отбирали по 50 мкл крови в 3 цитометрические пробирки с предварительно внесёнными антителами. После 15-минутной инкубации в темноте при комнатной температуре (18–24 °С) для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов в пробирки вносили реагент OptiLyse C («Beckman Coulter»), кат. № 11895, в объёме 250 мкл. Входящий в состав реагента формальдегид (CH<sub>2</sub>O) (1,5%) обеспечивал инактивацию вирусосодержащего материала. Реакционную смесь повторно инкубировали в темноте при комнатной температуре 15 мин, затем добавляли 250 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Концентрация формальдегида в пробе на этой стадии составляла 0,75%. Каждый этап внесения реагентов в пробирки сопровождали перемешиванием на лабораторной мешалке типа вортекс в течение 1 с. После добавления буфера пробирки на 1 ч помещали в передаточный шлюз для обработки аэрозолем 10% пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) из расчёта 10 мл на 1 м<sup>3</sup> объёма камеры в целях безопасной передачи из «заразной» зоны в «чистую». Далее образцы дважды отмывали в PBS, центрифугируя по 5 мин при 400 g, после чего клетки ресуспендировали для анализа в 200 мкл фиксирующего буфера, содержащего 0,1% формальдегида. Иммунофенотипирование осуществляли на цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter»), оснащённом аргоновым лазером с длиной волны излучения 488 нм с программным обеспечением СХР, версия 2.3. В каждой пробе анализировали не менее 10 000 лимфоцитов.

Показатели анализировали с использованием порядковых (непараметрических) статистических методов – критерия знаков и критерия Уайта средствами Microsoft Office Excel 2016. За уровень статистической значимости принимали величину  $p < 0,05$  [18].

#### Результаты

Поскольку в ряде случаев изменения уровней основных популяций лимфоцитов оказываются недостаточно информативными, дополнительно были исследованы малые популяции/субпопуляции лимфоцитов и пулы активированных клеток [10]. С использованием 3 цитометрических панелей определены уровни 18 популяций лимфоцитов периферической крови (в процентном выражении для соответствующих популяций/субпопуляций) у 6 макаков резусов до экспериментального инфицирования ВЭ и в терминальной стадии заболевания. Средние значения ( $X_{cp}$ ) содержания лимфоцитов для каждого животного до и после инфицирования рассчитаны по результатам 3 измерений (табл. 1).

**Таблица 1. Средние значения уровней лимфоцитов до и после экспериментального инфицирования обезьян вирусом Эбола**  
**Table 1. Average values of the lymphocytes counts before and after the experimental infection of monkeys with Zaire ebolavirus**

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов для обезьян №№ 1–6 до и после инфицирования ( $X_{cp}$ )* Average values of the lymphocytes counts before and after infection of monkeys Nos. 1–6 ( $X_{average}$ )*											
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4		№ 5		№ 6	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after
Т-лимфоциты общие (CD3+CD19–) <sup>1</sup> T-lymphocytes, total (CD3+CD19–) <sup>1</sup>	61,7	61,9	52,6	51,1	67,7	45,5	57,7	43,8	68,8	35,4	63,1	58,5
В-лимфоциты общие (CD3–CD19+) <sup>1</sup> B-lymphocytes, total (CD3–CD19+) <sup>1</sup>	21,2	27,0	40,4	34,6	27,0	33,7	20,9	13,4	10,4	5,8	26,1	22,2
Натуральные киллеры (CD3–CD16+) <sup>1</sup> Natural killer cells (CD3–CD16+) <sup>1</sup>	13,5	0,6	5,4	0,6	3,5	1,6	17,7	4,3	18,6	8,6	7,1	8,4
Т-NK клетки (CD3+CD16+) <sup>1</sup> T-NK cells (CD3+CD16+) <sup>1</sup>	2,2	0,2	0,1	0,3	2,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2
Натуральные киллеры, экспрессирующие CD8 (CD3–CD8+) <sup>1</sup> Natural killer cells expressing CD8 (CD3–CD8+) <sup>1</sup>	16,5	4,1	3,6	4,0	9,8	9,5	15,4	2,9	21,1	8,3	6,2	5,0
Т-хелперы (CD3+CD4+) <sup>2</sup> T-helper cells (CD3+CD4+) <sup>2</sup>	33,6	57,0	50,4	45,0	46,5	39,4	54,3	41,9	43,3	49,0	53,1	41,4
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+) <sup>2</sup> Cytotoxic T-lymphocytes (CD3+CD8+) <sup>2</sup>	60,2	37,0	42,8	44,1	42,9	50,4	39,5	46,3	52,9	44,7	37,6	47,1
Дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD3+CD4+CD8+) <sup>2</sup> Double-positive T-lymphocytes (CD3+CD4+CD8+) <sup>2</sup>	3,3	2,7	2,0	2,3	6,9	4,5	2,1	1,4	2,8	4,0	6,8	9,7
Дубль-негативные Т-лимфоциты (CD3+CD4–CD8–) <sup>2</sup> Double-negative T-lymphocytes (CD3+CD4–CD8–) <sup>2</sup>	2,4	3,2	4,2	8,3	3,1	5,5	3,4	10,3	1,0	2,4	2,0	1,7
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD25+) <sup>2</sup> T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD25+) <sup>2</sup>	2,3	6,4	3,1	4,1	2,6	6,9	5,2	7,7	3,4	6,9	6,7	7,7
Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD25+HLA-DR–) <sup>3</sup> T-helper cells expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD25+HLA-DR–) <sup>3</sup>	4,7	8,9	3,9	9,6	4,2	8,5	6,6	17,2	5,1	9,3	7,8	10,9
Т-регуляторные клетки (CD3+CD4+CD25+CD127–) <sup>3</sup> T-regulatory cells (CD3+CD4+CD25+CD127–) <sup>3</sup>	3,7	6,9	5,3	6,7	4,0	7,5	5,0	10,8	3,7	6,1	8,1	7,5
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD8+CD25+HLA-DR–) <sup>4</sup> Cytotoxic T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD8+CD25+HLA-DR–) <sup>4</sup>	0,1	2,8	0,2	1,5	0,1	0,9	0,2	3,4	0,1	1,5	0,4	0,6
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR–) <sup>5</sup> Double-positive T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR–) <sup>5</sup>	2,4	24,6	8,7	30,8	1,6	5,0	15,0	44,2	7,7	15,0	8,0	6,3
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4–CD8–CD25+HLA-DR–) <sup>6</sup> Double-negative T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4–CD8–CD25+HLA-DR–) <sup>6</sup>	1,0	1,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,4	4,3	1,9	5,7	1,6	3,2

Продолжение табл. 1 см. на стр. 293.

Продолжение табл. 1.

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов для обезьян №№ 1–6 до и после инфицирования ( $X_{cp}$ )* Average values of the lymphocytes counts before and after infection of monkeys Nos. 1–6 ( $X_{average}$ )*											
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4		№ 5		№ 6	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+HLA-DR+) <sup>2</sup> T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+HLA-DR+) <sup>2</sup>	8,1	0,4	3,6	1,0	2,2	0,5	2,1	1,0	1,2	0,1	5,7	0,8
Т-хелперы, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD25–HLA-DR+) <sup>3</sup> T-helper cells expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD25–HLA-DR+) <sup>3</sup>	5,9	0,1	9,5	0,2	4,8	0,1	3,1	0,5	6,1	3,5	16,9	10,7
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD8+CD25–HLA-DR+) <sup>4</sup> Cytotoxic T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD8+CD25–HLA-DR+) <sup>4</sup>	5,1	5,2	7,7	3,5	13,9	5,9	1,8	0,4	5,4	6,4	9,2	2,1
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD8+CD25–HLA-DR+) <sup>5</sup> Double-positive T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25–HLA-DR+) <sup>5</sup>	6,8	0,5	5,9	4,4	2,2	0,5	3,2	0,2	2,7	0,1	8,7	0,6
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4–CD8–CD25–HLA-DR+) <sup>6</sup> Double-negative T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4–CD8–CD25–HLA-DR+) <sup>6</sup>	30,1	24,1	9,6	7,1	12,9	6,5	6,1	2,9	3,5	1,6	22,1	29,1
Время жизни после инфицирования до гибели, сут Life time after infection until death, days	9		9		7		7		8		10	
Активность возбудителя в пробах крови, Ig БОЕ/мл Activity of the pathogen in blood samples, Ig PFU/ml	7,2		6,7		7,8		7,1		7,3		6,9	

**Примечание.** \*Средние значения ( $X_{cp}$ ) уровня лимфоцитов для каждого животного до и после инфицирования рассчитывали по результатам 3 измерений. Данные представлены в виде процентов от общего количества: 1 – лимфоцитов, 2 – Т-лимфоцитов, 3 – Т-хелперов, 4 – цитотоксических Т-лимфоцитов, 5 – дубль-позитивных Т-лимфоцитов, 6 – дубль-негативных Т-лимфоцитов; БОЕ – бляшкообразующая единица.

**Note.** \*Average values ( $X_{average}$ ) of the lymphocytes counts before and after the infection calculated after three measurement results for every animal. Data are shown as percentage of the total amount: 1, lymphocytes; 2, T-lymphocytes; 3, T-helpers; 4, cytotoxic T-lymphocytes; 5, double-positive T-lymphocytes; 6, double-negative T-lymphocytes; PFU, plaque-forming units.

Значительная вариабельность исследуемых показателей и малочисленность выборки не позволили использовать методы параметрической статистики, поэтому статистическую обработку результатов эксперимента провели с использованием порядковых (непараметрических) статистических методов – критерия знаков и критерия Уайта (табл. 2) [18].

У каждого из 6 животных (№№ 1–6) после инфицирования выявлено уменьшение уровней следующих популяций/субпопуляций:

- Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации;
- Т-хелперов, экспрессирующих маркер поздней активации;
- дубль-позитивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации;

– натуральных киллеров (NK), экспрессирующих CD8.

В противоположность этому отмечено повышение содержания:

- Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации;
- Т-хелперов, экспрессирующих маркер ранней активации;
- дубль-негативных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации;
- цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации.

В соответствии с критерием знаков можно считать достоверным влияние инфицирования на изменение (рост или уменьшение) значений перечисленных показателей ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2. Статистические характеристики уровня лимфоцитов макаков резусов до и после экспериментального инфицирования вирусом Эбола**

**Table 2. Statistical characteristics of lymphocytes level of the rhesus monkeys before and after the Zaire ebolavirus experimental infection**

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов и их коэффициенты вариации в группе из 6 животных* Average values of the lymphocytes counts and its variation coefficients in the group of 6 animals*				Различия показателей по критерию** Differences between indicators by test**	
	до инфицирования		после инфицирования			
	$X_{cp}$ $X_{average}$	Коэффициент вариации The coefficient of variation	$X_{cp}$ $X_{average}$	Коэффициент вариации The coefficient of variation	знаков signs	Уайта White
Т-лимфоциты общие (CD3+CD19-) <sup>1</sup> T-lymphocytes, total (CD3+CD19-) <sup>1</sup>	61,9	9,9	49,4	19,8	—	—
В-лимфоциты общие (CD3-CD19+) <sup>1</sup> B-lymphocytes, total (CD3-CD19+) <sup>1</sup>	24,3	40,3	22,8	50,0	—	—
Натуральные киллеры (CD3-CD16+) <sup>1</sup> Natural killer cells (CD3-CD16+) <sup>1</sup>	11,0	59,1	4,0	92,5	—	—
Т-NK клетки (CD3+CD16+) <sup>1</sup> T-NK cells (CD3+CD16+) <sup>1</sup>	0,8	125,0	0,2	50,0	—	—
Натуральные киллеры, экспрессирующие CD8 (CD3-CD8+) <sup>1</sup> Natural killer cells expressing CD8 (CD3-CD8+) <sup>1</sup>	12,1	55,4	5,6	46,4	↓	—
Т-хелперы (CD3+CD4+) <sup>2</sup> T-helper cells (CD3+CD4+) <sup>2</sup>	46,9	16,4	45,6	14,3	—	—
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+) <sup>2</sup> Cytotoxic T-lymphocytes (CD3+CD8+) <sup>2</sup>	46,0	18,9	44,9	10,0	—	—
Дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD3+CD4+CD8+) <sup>2</sup> Double-positive T-lymphocytes (CD3+CD4+CD8+) <sup>2</sup>	4,0	57,5	4,1	73,2	—	—
Дубль-негативные Т-лимфоциты (CD3+CD4-CD8-) <sup>2</sup> Double-negative T-lymphocytes (CD3+CD4-CD8-) <sup>2</sup>	2,7	40,7	5,2	67,3	—	—
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD25+) <sup>2</sup> T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD25+) <sup>2</sup>	3,9	43,6	6,6	19,7	↑	↑
Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD25+HLA-DR-) <sup>3</sup> T-helper cells expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD25+HLA-DR-) <sup>3</sup>	5,4	27,8	10,7	30,8	↑	↑
Т-регуляторные клетки (CD3+CD4+CD25+CD127-) <sup>3</sup> T-regulatory cells (CD3+CD4+CD25+CD127-) <sup>3</sup>	5,0	34,0	7,6	22,4	—	—
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD8+CD25+HLA-DR-) <sup>4</sup> Cytotoxic T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD8+CD25+HLA-DR-) <sup>4</sup>	0,2	50,0	1,8	61,1	↑	↑
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR-) <sup>5</sup> Double-positive T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR-) <sup>5</sup>	7,2	68,1	21,0	72,4	—	—
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4-CD8-CD25+HLA-DR-) <sup>6</sup> Double-negative T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4-CD8-CD25+HLA-DR-) <sup>6</sup>	0,9	88,9	2,5	92,0	↑	—
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+HLA-DR+) <sup>2</sup> T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+HLA-DR+) <sup>2</sup>	3,8	68,4	0,6	66,7	↓	↓
Т-хелперы, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD25-HLA-DR+) <sup>3</sup> T-helper cells expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD25-HLA-DR+) <sup>3</sup>	7,7	64,9	2,5	168,0	↓	—

Продолжение табл. 2 см. на стр. 296.

Продолжение табл. 2.

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов и их коэффициенты вариации в группе из 6 животных* Average values of the lymphocytes counts and its variation coefficients in the group of 6 animals*				Различия показателей по критерию** Differences between indicators by test**	
	до инфицирования		после инфицирования		знаков signs	Уайта White
	$X_{\text{cp}}$ $X_{\text{average}}$	Коэффициент вариации The coefficient of variation	$X_{\text{cp}}$ $X_{\text{average}}$	Коэффициент вариации The coefficient of variation		
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD8+CD25-HLA-DR+) <sup>4</sup> Cytotoxic T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD8+CD25-HLA-DR+) <sup>4</sup>	7,2	56,9	3,9	59,0	—	—
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD8+CD25-HLA-DR+) <sup>5</sup> Double-positive T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25-HLA-DR+) <sup>5</sup>	4,9	53,1	1,1	154,5	↓	↓
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4-CD8-CD25-HLA-DR+) <sup>6</sup> Double-negative T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4-CD8-CD25-HLA-DR+) <sup>6</sup>	14,1	72,3	11,9	98,3	—	—

**Примечание.** \*Средние значения ( $X_{\text{cp}}$ ) уровней лимфоцитов для каждого животного до и после инфицирования рассчитывали по результатам 3 измерений. Данные представлены в виде процентов от общего количества: 1 – лимфоцитов, 2 – Т-лимфоцитов, 3 – Т-хелперов, 4 – цитотоксических Т-лимфоцитов, 5 – дубль-позитивных Т-лимфоцитов, 6 – дубль-негативных Т-лимфоцитов;

\*\*↑ или ↓ – рост или снижение значения показателя после инфицирования; «—» – отсутствие различий между значениями показателя до и после инфицирования.

**Note.** \*Average measures ( $X_{\text{average}}$ ) of the lymphocytes levels before and after the infection calculated after three measurement results for every animal. Data are shown as percentage of the total amount: 1, lymphocytes; 2, T-lymphocytes; 3, T-helpers; 4, cytotoxic T-lymphocytes; 5, double-positive T-lymphocytes; 6, double-negative T-lymphocytes;

\*\*↑, or ↓ mean the increase or decrease of the index value following the infection; «—» means the absence of differences between the index values before and after the infection.

Использование критерия Уайта выявило достоверное снижение средних значений уровней Т-лимфоцитов и дубль-позитивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие маркёры поздней активации. Выявлен достоверный рост уровня Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов с экспрессией соответствующих маркёров ранней активации.

Для 5 популяций лимфоцитов выявлены достоверные различия как по критерию знаков, так и по критерию Уайта. К ним относятся:

- Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации;
- Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации;
- цитотоксические лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации;
- Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации;
- дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации ( $p < 0,05$ ).

Указанный факт свидетельствует о выраженном количественном изменении показателей иммунного статуса моделей в результате инфицирования.

### Обсуждение

В настоящее время ввиду отсутствия условий для проведения исследований при соответствующем

уровне биологической защиты количество доступных публикаций, отражающих иммунный ответ на введение ВЭ (в особенности с применением метода ПЦ), весьма ограничено.

Высокий показатель летальности при БВВЭ указывает на то, что иммунная система во многих случаях не может подавлять репликацию возбудителя. При изучении экспериментально вызванной ВЭ инфекции у яванских макаков (*Macaca fascicularis*) выявлен массовый лимфоцитарный апоптоз, проявляющийся снижением экспрессии маркёров CD4 и CD8 и увеличением экспрессии апоптотического фактора CD95 на Т-клетках. Также отмечено уменьшение популяции CD8low-лимфоцитов, состоящих в основном из НК-клеток. В то же время количество CD20+ В-лимфоцитов за время болезни существенно не изменялось [19].

Пациенты, погибшие во время вспышки БВВЭ (штамм Судан) в Уганде в 2000 г., имели сниженный уровень общих (common) Т-лимфоцитов, а также CD8+ и активированных (HLA-DR+) CD8+ популяций Т-клеток, в то время как у переживших заболевание отмечены обратные показатели [20].

В результате изучения коллекции из 56 образцов крови 42 умерших и 14 выживших больных БВВЭ, полученной во время 5 вспышек, произошедших с 1996 по 2003 г. в Габоне и Республике Конго, обнаружено, что летальный исход связан с аберрантными врождёнными иммун-



ными ответами и с глобальным подавлением адаптивного иммунитета. Отклонения во врождённом иммунитете характеризовались цитокиновым штормом, гиперсекрецией многочисленных провоспалительных медиаторов и характерным отсутствием противовирусного интерферона IFN $\alpha$ 2. Иммуносупрессия заключалась в наличии крайне низких уровней продуцируемых Т-лимфоцитами циркулирующих цитокинов и массивной потере периферических CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  лимфоцитов, вероятно, через Fas/FasL-опосредованный апоптоз, который проявлялся увеличением экспрессии апоптотического фактора CD95 на Т-клетках [4].

Далее, исследования клеточного и гуморального иммунного ответа 4 человек с установленным диагнозом БВВЭ, проходивших лечение в госпитале при Университете Эмори (Атланта, Соединённые Штаты Америки (США)), выявили повышенное количество плазмобластов и активированных CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клеток у всех пациентов по сравнению с неинфицированным контингентом (30–60% CD8 $^{+}$  Т-лимфоцитов экспрессировали маркёры активации CD38 и HLA-DR). На основании полученных данных сформулированы две модели, объясняющие неспособность иммунной системы контролировать ВЭ (ЕВОВ) при летальных инфекциях. Модель 1 (ЕВОВ-супрессия) отражает значительное подавление иммунных реакций в результате инфицирования, что предотвращает развитие эффективного иммунного ответа макроорганизма. Сущностью модели 2 является предположение о том, что ключевыми для исхода инфекции являются время и кинетика репликации возбудителя и иммунного ответа, поскольку последний, будучи поздним или незавершившимся, не способен подавлять репликационный процесс, что ведёт к летальному исходу. Напротив, ранний иммунный ответ уменьшает репликацию патогена и приводит к выздоровлению [21].

Опубликован отчёт об изучении методом ПЦ динамики содержания лимфоцитов у выжившего после БВВЭ пациента, получавшего только поддерживающую терапию. Образцы крови были отобраны на 37 и 46 сут после болезни. Доля активированных (CD8 $^{+}$ CD38 $^{+}$ HLA-DR $^{+}$ ) Т-клеток составила 68%, что существенно превышало аналогичные показатели контрольной группы, которые колебались в пределах 4–12%. Популяция регуляторных Т-клеток (CD4 $^{+}$ CD25 $^{hi}$ CD127 $^{low}$ ) была количественно сопоставима с таковой в контрольной группе. Таким образом, активация системы иммунитета способствовала подавлению репликации возбудителя и выздоровлению [5].

В исследованиях NK- и  $\gamma\delta$ T-клеток у 19 пациентов с БВВЭ независимо от клинического исхода зафиксировано низкое содержание последних, которые массово экспрессировали маркёр апоптоза CD95. У пациентов с фатальной инфекцией отмечена меньшая доля NK-клеток по сравнению с выжившими [22].

Полученные в нашей работе результаты по анализу клеточного иммунитета макаков резусов после экспериментального инфицирования ВЭ, представленные в табл. 1 и 2, практически полностью согласуются с опубликованными ранее сведениями и подтверждают

сочетание активации и супрессии иммунной системы при БВВЭ [21]. Достоверное повышение в большинстве субпопуляций Т-лимфоцитов экспрессии CD25 свидетельствует об активации системы иммунитета при воздействии ВЭ (ЕВОВ). Увеличение у 5 из 6 особей уровня Т-регуляторных клеток также указывает на иммунологическую гиперактивность. Зарегистрировано повышение содержания активированных цитотоксических лимфоцитов в 9 раз (против 2 раз для Т-хелперов), что подтверждает ведущую роль CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ -лимфоцитов в противовирусном ответе [7].

Подтверждённые в выполненных экспериментах значимое уменьшение популяции экспрессирующих CD8 NK-клеток, обладающих литическими функциями [23], а также снижение популяции натуральных киллеров у всех обезьян, кроме одной, указывает на подавление реакции врождённого иммунитета. Результаты опытов позволяют также сделать вывод об иммуносупрессивном действии ВЭ, поскольку у 4 из 6 приматов произошло сокращение популяций Т- и В-лимфоцитов, а также Т-хелперов; кроме того, достоверно уменьшились популяции/субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих маркёры поздней активации.

### Заключение

В данной работе впервые в Российской Федерации проведена оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом ПЦ после экспериментального инфицирования ВЭ. Полученная информация по динамике изменений популяций и субпопуляций лимфоцитов может быть диагностически значимой при изучении патологического процесса при инфицировании вирусом Эбола, контроле эффективности терапии, прогнозе возникновения, течения и исхода заболевания.

### ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Ebola virus disease Democratic Republic of Congo: external situation report 98/ 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332654> (accessed 16 August 2021).
2. Cenciarelli O., Gabbarini V., Pietropaoli S., Malizia A., Tamburrino A., Ludovicic G.M., et al. Viral bioterrorism: learning the lesson of Ebola virus in West Africa 2013–2015. *Virus. Res.* 2015; 210(12): 318–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.002>
3. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5): 347–54. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099>
4. Wauquier N., Becquart P., Padilla C., Baize S., Leroy E.M. Human fatal Zaire Ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(10): e837. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000837>
5. Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., et al. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2): 287–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw508>
6. Wilson J.A., Hart M.K. Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J. Virol.* 2001; 75(6): 2660–4. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2660-2664.2001>
7. Warfield K.L., Olinger G.G. Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 984241. <https://doi.org/10.1155/2011/984241e>
8. Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(1-2): 12–7. <https://doi.org/10.1242/dmm.000471>
9. Хантов Р.М. *Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019.
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тоголян А.А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови

- человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). *Медицинская иммунология*. 2009; 11(2-3): 227–38. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238>.
11. Лапин Б.А. К вопросу об использовании в медицинских экспериментах лабораторных приматов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2010; (2): 3–6.
  12. Пшеничных В.А., Махлай А.А., Михайлов В.В. Исследования с вирусами Марбург, Ласса и Эбола. *Вопросы вирусологии*. 1993; 38(2): 54–9.
  13. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 119(1-2): 21–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.011>
  14. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов». *Российский иммунологический журнал*. 2014; (4): 974–92. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
  15. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлюориметрического анализа. *Медицинская иммунология*. 2015; 17(1): 19–26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
  16. Telford W.G., Babin S.A., Khorev S.V., Rowe S.H. Green fiber lasers: an alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry A*. 2009; 75(12): 1031–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20790>
  17. Hammerbeck C., Goetz C., Bonnevier J. Primary and secondary antibodies and flow cytometry controls. In: *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Cham: Springer; 2018: 75–103. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6)
  18. Лакин Г.Ф. *Биометрия: Учебное пособие*. М.: Высшая школа; 1990.
  19. Reed D.S., Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B., Geisbert T.W. Depletion of Peripheral Blood T Lymphocytes and NK Cells During the Course of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Viral. Immunol.* 2004; 17(3): 390–400. <https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.390>
  20. Sanchez A., Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J. Virol.* 2004; 78(190): 10370–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10370-10377.2004>
  21. McElroy A.K., Akondy R.S., Davisc C.W., Ellebedyc A.H., Mehtae A.K., Krafc C.S., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *PNAS*. 2015; 112(15): 4719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502619112>
  22. Cimini E.C., Viola D., Cabeza-Cabrerizo M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., et al. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Trop. Dis.* 2017; 11(5): e0005645. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005645>
  23. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005; 116(3): 354–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x>
  6. Wilson J.A., Hart M.K. Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J. Virol.* 2001; 75(6): 2660–4. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2660-2664.2001>
  7. Warfield K.L., Olinger G.G. Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 984241. <https://doi.org/10.1155/2011/984241e>
  8. Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(1-2): 12–7. <https://doi.org/10.1242/dmm.000471>
  9. Khaitov R.M. *Immunology: Structure and Function of Immune System [Immunologiya: struktura i funktsii immunnogo sistema: uchebnoe posobie]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2019. (in Russian)
  10. Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A., Chereshev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry [Osnovnye i malye populatsii limfotsitov perifericheskoy krovi cheloveka i ikh normativnye znacheniya (metodom mnogotsvetnogo tsitometricheskogo analiza)]. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11(2-3): 227–38. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238> (in Russian)
  11. Lapin B.A. On the question of use of laboratory primates in medical experiments [K voprosu ob ispol'zovanii v meditsinskikh eksperimentakh laboratornykh primatov]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2010; (2): 3–6. (in Russian)
  12. Pshenichnov V.A., Makhlay A.A., Mikhaylov V.V. Research with the Marburg, Lassa and Ebola viruses [Issledovaniya s virusami Marburg, Lassa i Ebola]. *Voprosy virusologii*. 1993; 38(2): 54–9. (in Russian)
  13. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 119(1-2): 21–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.011>
  14. Khaydukov S.V., Baydun L.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardized technique: «Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry» [Standartizovannaya tekhnologiya «Issledovanie subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoy krovi s primeneniem protochnykh tsitofluorimetrov-analizatorov»]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2014; (4): 974–92. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268> (in Russian)
  15. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring [Opyt izmereniya parametrov immunnogo statusa s ispol'zovaniem shestitsvetnogo tsitofluorimetriceskogo analiza]. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17(1): 19–26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26> (in Russian)
  16. Telford W.G., Babin S.A., Khorev S.V., Rowe S.H. Green fiber lasers: an alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry A*. 2009; 75(12): 1031–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20790>
  17. Hammerbeck C., Goetz C., Bonnevier J. Primary and secondary antibodies and flow cytometry controls. In: *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Cham: Springer; 2018: 75–103. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6)
  18. Lakin G.F. *Biometrics: Textbook [Biometriya: Uchebnoe posobie]*. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. (in Russian)
  19. Reed D.S., Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B., Geisbert T.W. Depletion of Peripheral Blood T Lymphocytes and NK Cells During the Course of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Viral. Immunol.* 2004; 17(3): 390–400. <https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.390>
  20. Sanchez A., Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J. Virol.* 2004; 78(190): 10370–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10370-10377.2004>
  21. McElroy A.K., Akondy R.S., Davisc C.W., Ellebedyc A.H., Mehtae A.K., Krafc C.S., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *PNAS*. 2015; 112(15): 4719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502619112>
  22. Cimini E.C., Viola D., Cabeza-Cabrerizo M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., et al. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Trop. Dis.* 2017; 11(5): e0005645. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005645>
  23. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005; 116(3): 354–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x>

## REFERENCES

1. WHO. Ebola virus disease Democratic Republic of Congo: external situation report 98/ 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332654> (accessed 16 August 2021).
2. Cenciarelli O., Gabbarini V., Pietropaoli S., Malizia A., Tamburrinic A., Ludovicic G.M., et al. Viral bioterrorism: learning the lesson of Ebola virus in West Africa 2013–2015. *Virus. Res.* 2015; 210(12): 318–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.002>
3. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5): 347–54. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099>
4. Wauquier N., Becquart P., Padilla C., Baize S., Leroy E.M. Human fatal Zaire Ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(10): e837. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000837>
5. Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., et al. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2): 287–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw508>
20. Sanchez A., Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J. Virol.* 2004; 78(190): 10370–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10370-10377.2004>
21. McElroy A.K., Akondy R.S., Davisc C.W., Ellebedyc A.H., Mehtae A.K., Krafc C.S., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *PNAS*. 2015; 112(15): 4719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502619112>
22. Cimini E.C., Viola D., Cabeza-Cabrerizo M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., et al. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Trop. Dis.* 2017; 11(5): e0005645. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005645>
23. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005; 116(3): 354–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x>