

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-53-60

УДК 616.98:578.834.1

Г.В. Борисевич¹, С.Л. Кириллова¹, И.В. Шатохина¹, В.Н. Лебедев¹, С.С. Соловьев²,
С.И. Сыромятникова¹, Н.В. Шагарова¹, Н.В. Боярская¹, Н.Г. Левкович¹, Д.А. Соляник¹, А.Ф. Андрус¹,
В.В. Рубцов¹, В.Т. Кротков¹, В.С. Кулиш¹, И.В. Суровяткина¹, В.Б. Кириллов¹, А.В. Ковальчук¹,
В.Б. Пантюхов¹, Д.А. Кутаев¹, С.В. Борисевич¹

Исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация; ²ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Клеточный иммунитет играет важную роль в патогенезе и формировании иммунной защиты по отношению к вирусу SARS-CoV-2. **Целью** работы являлось исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** Самцов макак-резусов интраназально инфицировали вирусом SARS-CoV-2, штамм Изолят В и штамм hCoV-19/Russia/SP48-1226/2020 (сокращенное название – У-2), в дозе 5,0 lg БОЕ. С использованием метода проточной цитометрии определены уровни 21 популяции/субпопуляции мононуклеарных клеток периферической крови животных до экспериментального инфицирования возбудителем и на 14-е сутки после инфицирования. РНК коронавируса SARS-CoV-2 определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Определение титра вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови животных определяли в реакции нейтрализации по подавлению негативных колоний. **Результаты и обсуждение.** При инфицировании культурой штамма Изолят В выявлено увеличение относительного содержания общих Т-лимфоцитов ($p < 0,2$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,1$), а также моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25 ($p < 0,2$). Снижение показано для общих В-лимфоцитов ($p < 0,2$) и Т-хелперов ($p < 0,1$). При инфицировании культурой штамма У-2 выявлено увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25 ($p < 0,2$). Таким образом, впервые в Российской Федерации методом проточной цитометрии проведено изучение клеточного иммунитета макак-резусов до и после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Полученная информация может быть использована для исследования патогенеза вызванной SARS-CoV-2 инфекции, течения и исхода заболевания, разработки стратегий вакцинации и лечения.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2, макаки-резусы, лимфоциты, моноциты, проточная цитометрия.

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

Для цитирования: Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Соловьев С.С., Сыромятникова С.И., Шагарова Н.В., Боярская Н.В., Левкович Н.Г., Соляник Д.А., Андрус А.Ф., Рубцов В.В., Кротков В.Т., Кулиш В.С., Суровяткина И.В., Кириллов В.Б., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. Исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:53–60. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-53-60

Поступила 14.05.2022. Отправлена на доработку 15.06.2022. Принята к публ. 18.07.2022.

G.V. Borisevich¹, S.L. Kirillova¹, I.V. Shatokhina¹, V.N. Lebedev¹, S.S. Solov'ev², S.I. Syromyatnikova¹,
N.V. Shagarova¹, N.V. Boyarskaya¹, N.G. Levkovich¹, D.A. Solyanik¹, A.F. Andrus¹, V.V. Rubtsov¹,
V.T. Krotkov¹, V.S. Kulish¹, I.V. Surovyatkina¹, V.B. Kirillov¹, A.V. Koval'chuk¹, V.B. Pantyukhov¹,
D.A. Kutaev¹, S.V. Borisevich¹

The Flow Cytometry Study of Cellular Immunity in Rhesus Monkeys after Experimental Infection with SARS-CoV-2 Virus

¹48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation;

²Scientific Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cellular immunity plays an important role in the pathogenesis and formation of protective immune defense against the SARS-CoV-2 virus. **The aim** of the work was to study the cellular immunity of rhesus monkeys applying flow cytometry after experimental infection with the SARS-CoV-2 virus. **Materials and methods.** Male rhesus monkeys were intranasally inoculated with the SARS-CoV-2 virus, Isolate B strain and hCoV-19/Russia/SP48-1226/2020 strain (abbreviated name U-2), at a dose of 5.0 lg PFU. Using flow cytometry, the levels of 21 populations/subpopulations of mononuclear cells in the peripheral blood of animals were determined before experimental infection with the pathogen and on day 14 after infection. SARS-CoV-2 coronavirus RNA was assessed using real-time polymerase chain reaction. Determination of the titer of virus-neutralizing antibodies to the SARS-CoV-2 virus in the blood sera of animals was conducted through neutralization test evaluating the ability to suppress negative colonies. **Results and discussion.** Infection with Isolate B strain culture has led to an increase in the relative content of total T-lymphocytes ($p < 0.2$), cytotoxic T-lymphocytes ($p < 0.1$), as well as monocytes expressing the early activation marker CD25 ($p < 0.2$). The decrease in levels has been observed for total B-lymphocytes ($p < 0.2$) and T-helper cells ($p < 0.1$). Infection with the U-2 strain culture revealed an increase in the relative content of monocytes expressing the early activation marker CD25 ($p < 0.2$). Thus, for the first time in the Russian Federation, flow cytometry was used to study the cellular immunity of rhesus monkeys

before and after experimental infection with the SARS-CoV-2 virus. The obtained information can be used for studying the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection, course, and outcome of the disease, and developing strategies for vaccination and treatment.

Key words: SARS-CoV-2-virus, rhesus monkeys, lymphocytes, monocytes, flow cytometry.

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

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

Citation: Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Solov'ev S.S., Syromyatnikova S.I., Shagarova N.V., Boyarskaya N.V., Levkovich N.G., Solyanik D.A., Andrus A.F., Rubtsov V.V., Krotkov V.T., Kulish V.S., Surovyatkina I.V., Kirillov V.B., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kутаев D.A., Borisevich S.V. The Flow Cytometry Study of Cellular Immunity in Rhesus Monkeys after Experimental Infection with SARS-CoV-2 Virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:53–60. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-53-60

Received 14.05.2022. Revised 15.06.2022. Accepted 18.07.2022.

Borisevich G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0843-9427>
 Kirillova S.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1245-9225>
 Shatokhina I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9503-5120>
 Lebedev V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>
 Solov'ev S.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4706-0476>
 Syromyatnikova S.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1490-9448>
 Shagarova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9523-8676>
 Boyarskaya N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0237-9790>
 Levkovich N.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2716-8455>
 Solyanik D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3134-5629>

Andrus A.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-9401>
 Rubtsov V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4387-0367>
 Krotkov V.T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>
 Kulish V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0763-0809>
 Surovyatkina I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7096-3580>
 Kirillov V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2916-0668>
 Koval'chuk A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9681-9891>
 Pantyukhov V.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1313-2059>
 Kутаев D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9009-4909>
 Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Одно из перспективных направлений в современной инфекционной иммунологии – определение роли наиболее значимых антигенов, экспрессируемых иммунокомпетентными клетками, в реализации иммунного ответа при инфекционных заболеваниях [1]. Поскольку в патогенезе и формировании иммунной защиты по отношению к вирусу SARS-CoV-2 клеточный иммунитет играет важную роль [2–4], его оценка после экспериментального инфицирования макак-резусов с использованием метода проточной цитометрии (ПЦ) представляет собой в настоящее время актуальную задачу.

В процессе изучения клеточного иммунного ответа на внедрение инфекционного агента у человека в дополнение к оценке основных популяций мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) (лимфоцитов и моноцитов) определяются малые субпопуляции лимфоцитов, а также экспрессия маркеров ранней (CD25) и поздней активации (антигены главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) II класса HLA-DR) на МКПК [5]. При исследовании крови инфицированных вирусом SARS-CoV-2 обезьян ввиду схожести кроветворной и иммунной систем человека и макаки-резуса [6] можно придерживаться этого же подхода.

Целью настоящей работы являлось исследование методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Животные. В опытах использовали 10 здоровых самцов макак-резусов массой 2,5–3,0 кг, доставленных из питомника Адлерского приматологического центра (г. Сочи) и прошедших акклиматизацию. Эксперименты проводили в соответствии с ГОСТ 33218-2014 и Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными». 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 от 20.05.2021 № 3).

У инфицированных животных измеряли температуру ректально и массу тела на 3-и, 6, 10 и 14-е сутки после инфицирования. Образцы венозной крови собирали утром натощак после анестезии путем внутримышечного введения золетила из расчета 4–6 мг препарата на 1 кг массы тела в пробирки с напылением K_3 -ЭДТА и пробирки с активатором свертывания.

РНК коронавируса SARS-CoV-2 в смывах из носа, носоглотки и ануса на 3-и и 6-е сутки после инфицирования, а также в пробах внутренних органов после гуманной эвтаназии животных на 14-е сутки определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [7]. В случае положительного результата в ПЦР-РВ определяли уровень накопления возбудителя в культуре клеток Vero C1008 по методу образования негативных колоний (НК) [8].

Вирус. Культуры вируса SARS-CoV-2: штамм Изолят В получен из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; штамм hCoV-19/Russia/SP48-1226/2020 (сокращенное название – У-2) выделен из носоглотки больного человека. Биологическая активность штаммов при титровании в культуре клеток Vero C1008 под агаровым покрытием составила $1,0 \cdot 10^6$ БОЕ·мл⁻¹ (БОЕ – бляшкообразующая единица) и $1,0 \cdot 10^7$ БОЕ·мл⁻¹ соответственно. Работы с вирусом проводили согласно требованиям СанПиН 3.3686-21. Культурой каждого штамма инфицировали по пять обезьян, вводя интраназально вирус в дозе 5,0 Ig БОЕ. Инфицирующая доза возбудителя обоснована опытом работы сотрудников 48 ЦНИИ [9].

Определение титра вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках

крови, полученных от обезьян перед инфицированием и через 14 суток после заражения, определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению НК, образованных вирусом SARS-CoV-2 в односуточном монослое культуры клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. РН ставили в варианте: постоянная доза вируса – разведения сыворотки крови [10].

Проточно-цитометрический анализ. С целью выявления популяций МКПК обезьян применяли две панели конъюгированных с флуорохромами мышиных античеловеческих моноклональных антител (МКАТ), перекрестно реагирующих с антигенами лимфоцитов макак-резусов: CD20-FITC/CD16-PE/CD8-PC5/CD3-PE-Cy7 и CD4-FITC/CD25-PE/HLA-DR-ECD/CD8-PC5/CD3-PE-Cy7.

Поскольку процедура иммунофенотипирования обезьян идентична используемой для человека [11], составление цитометрических панелей и настраивание протоколов анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией и принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [12].

Использовали следующие МКАТ, входящие в состав цитометрических панелей: Becton Dickinson (США) (CD3-PE-Cy7, кат. № 557749; CD4-FITC, кат. № 550628; CD20-FITC, кат. № 6604106; CD25-PE, кат. № 341010); Beckman Coulter (США) (CD8-PC5, кат. № A07758; CD16-PE, кат. № A07766; HLA-DR-ECD, кат. № IM3636). Рабочие объемы МКАТ определяли путем титрования, рассчитывая для каждого разведения индекс окрашивания. Корректность компенсации проверяли с использованием FMO-подхода (Fluorescence-Minus-One, флуоресценция минус один) [13].

Для ПЦ-анализа забор крови у животных проводили в чистой зоне за 1 сутки до инфицирования (с целью определения фоновых показателей) и в заразной зоне на 14-е сутки после инфицирования, что обусловлено средним сроком появления специфических антител. Из пробирки с K_3 -ЭДТА отбирали кровь в цитометрические пробирки с предварительно внесенными антителами. После инкубации в темноте при комнатной температуре для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов в пробирки вносили реагент OptiLyse C (Beckman Coulter), кат. № 11895. Входящий в состав реагента формальдегид обеспечивал инактивацию вирусосодержащего материала. Реакционную смесь повторно инкубировали в темноте при комнатной температуре, затем добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS). Каждый этап внесения реагентов в пробирки сопровождали перемешиванием на лабораторной мешалке типа вортекс. После добавления буфера пробирки помещали в передаточный шлюз для обработки аэрозолем 10 % пероксида водорода в целях безопасной передачи из заразной зоны в чистую. Далее образцы дважды отмывали в PBS, после чего клетки ресуспендировали для анализа в фиксирующем буфере, содержащем формальдегид.

Иммунофенотипирование осуществляли на цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter), оснащенном аргоновым лазером с программным обеспечением СХР, версия 2.3, анализируя в каждой пробе не менее 10000 лимфоцитов. Цитометрические данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Kaluza v.2.1. Показатели анализировали с использованием критериев Стьюдента и Уайта средствами Microsoft Office Excel 2016.

Результаты и обсуждение

С использованием двух цитометрических панелей определяли уровни 21 популяции МКПК (в процентном выражении для соответствующих популяций/субпопуляций) у 10 макак-резусов до экспериментального инфицирования вирусом SARS-CoV-2, штаммы Изолят В и У-2, и на 14-е сутки после инфицирования.

В результате инфицирования обезьян культурами штаммов Изолят В и У-2 у животных обеих групп респираторные явления и гибель не зафиксированы. Обезьяны демонстрировали умеренное снижение аппетита. Гипертермия отмечена у двух животных, инфицированных штаммом Изолят В, и четырех животных, инфицированных штаммом У-2 (у последних лихорадочное состояние продолжалось более длительное время). Мониторинг массы тела показал некоторое ее снижение у обезьян, инфицированных культурой штамма У-2, вероятно, из-за длительного лихорадочного состояния. В сыворотках крови животных обеих групп титр ВНА против вируса на 14-е сутки составлял менее 1:5. РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ не выявлена ни в одной из проб органов животных.

В группе обезьян, инфицированных культурой штамма Изолят В, генетический материал вируса обнаружили только в пробах из носоглотки и ануса от одного животного, у него же зафиксировали повышение температуры тела на 3-и и 6-е сутки. Биологическая активность вируса в смыве из ротоглотки составляла менее $1,34 \text{ lg БОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$. У всех животных зафиксировано уменьшение относительного содержания В-лимфоцитов, Т-хелперов, увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов и субпопуляций моноцитов, несущих маркеры ранней и поздней активации. У четырех животных из пяти увеличилось относительное содержание натуральных киллеров.

В группе обезьян, инфицированных культурой штамма У-2, РНК вируса обнаружили в пробах от трех особей. Уровень накопления вируса в высевах из носоглотки на 6, 10 и 14-е сутки не превышал $1,34 \text{ lg БОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$. Показатели клеточного иммунитета претерпели меньшие и разнонаправленные изменения в отличие от показателей животных, инфицированных культурой штамма Изолят В. Статистический анализ данных показателей клеточного иммунитета животных представлен в таблице.

Статистические характеристики показателей клеточного иммунитета у экспериментальных животных до и после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 (штаммы Изолят В и У-2)
 Statistical characteristics of indicators of cellular immunity in experimental animals before and after infection with the SARS-CoV-2 virus (Isolate В and U-2 strains)

Популяции и субпопуляции МКПК (фенотип) Populations and subpopulations of mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) (phenotype)	Содержание МКПК до и после инфицирования, $X_{\text{ср}} \pm \sigma$ PBMC content before and after infection, $X_{\text{average}} \pm \sigma$					Различия до и после инфицирования по критерию ... штаммом ... Differences before and after infection according to ... test with strain ...			
	Изолят В Isolate В		У-2 U-2		после after	до before	Изолят В Isolate В	У-2 U-2	Уайта White's
	до before	после after	до before	после after					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Т-лимфоциты общие (CD3 ⁺ CD20 ⁻) ¹ T-lymphocytes, total (CD3 ⁺ CD19 ⁻) ¹	44,76±3,48	50,12±8,14	37,75±7,85	41,28±6,07	-	-	↑	-	-
В-лимфоциты общие (CD3 ⁺ CD20 ⁺) ¹ B-lymphocytes, total (CD3 ⁺ CD19 ⁺) ¹	33,86±8,50	25,04±7,47	29,4±9,43	25,93±9,41	↓	-	↓	-	-
Натуральные киллеры (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹ Natural killer cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹	18,21±7,68	21,09±8,64	28,94±9,39	28,85±7,62	-	-	-	-	-
NKT-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹ NKT-cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺) ¹	0,48±0,48	0,99±1,12	1,01±1,52	1,02±1,08	-	-	-	-	-
Натуральные киллеры, экспрессирующие CD8 (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD8 ⁺) ² Natural killer cells expressing CD8 (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD8 ⁺) ²	78,88±19,6	80,37±13,95	89,61±4,76	90,2±3,25	-	-	-	-	-
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺) ³ T-helper cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺) ³	47,43±4,97	42,26±4,07	48,14±6,04	47,6±7,52	↓	-	↓	-	-
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺) ³ Cytotoxic T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺) ³	42,82±6,59	48,1±6,13	43,09±5,91	42,5±6,71	-	-	↑	-	-
Дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺) ³ Double-positive T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺) ³	3,55±1,37	3,9±1,96	3,81±0,60	4,03±1,69	-	-	-	-	-
Дубль-негативные Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻) ³ Double-negative T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻) ³	6,11±2,42	5,61±2,59	4,82±0,73	5,69±1,78	-	-	-	-	-
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD25 ⁺) ³ T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD25 ⁺) ³	5,69±1,48	4,92±1,39	5,99±1,78	6,36±1,60	-	-	-	-	-
Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁴ T-helper cells expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁴	8,17±2,20	7,84±1,82	8,86±1,89	8,79±0,75	-	-	-	-	-
Т-лимфоциты цитотоксические, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁵ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁻) ⁵	1,63±0,49	1,32±0,6	1,50±0,43	1,61±0,46	-	-	-	-	-

Окончание таблицы / Ending of table

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁶ Double-positive T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁶	12,70±6,03	9,80±6,49	9,46±6,03	7,73±6,00	-	-	-	-
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁷ Double-negative T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁷	0,46±0,15	0,85±0,92	0,50±0,21	0,74±0,49	-	-	-	-
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ HLA-DR) ³ T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ HLA-DR) ³	4,59±3,15	3,34±1,66	3,83±2,37	3,83±1,47	-	-	-	-
Т-хелперы, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁴ T-helper cells expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁴	1,5±1,23	0,93±0,72	1,57±0,55	1,26±0,77	-	-	-	-
Т-лимфоциты цитотоксические, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁵ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁵	4,85±3,86	3,37±2,62	8,49±7,87	5,17±3,11	-	-	-	-
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁶ Double-positive T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁶	4,37±3,07	4,45±3,43	7,44±4,60	5,06±3,00	-	-	-	-
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁷ Double-negative T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ HLA-DR) ⁷	45,27±21,66	40,00±17,2	36,52±21,39	38,07±18,30	-	-	-	-
Моноциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD25) ⁸ Monocytes expressing the early activation marker (CD25) ⁸	21,14±12,64	32,86±8,07	29,74±9,40	44,20±14,94	↑	↑	-	↑
Моноциты, экспрессирующие маркер поздней активации (HLA-DR) ⁸ Monocytes expressing the late activation marker (HLA-DR) ⁸	46,18±28,05	63,19±9,82	69,73±12,08	70,97±6,75	-	-	-	-

Прямые значения: данные по популяциям МКПК представлены в виде процентов от общего количества: 1 – лимфоциты, 2 – натуральных киллеров, 3 – Т-лимфоциты, 4 – Т-хелперов, 5 – цитотоксических Т-лимфоцитов, 6 – дубль-позитивных Т-лимфоцитов, 7 – дубль-негативных Т-лимфоцитов, 8 – моноцитов; «↑» или «↓» – рост или снижение значения показателя после инфицирования; «↔» – отсутствие различий между значениями показателя до и после инфицирования.

Note: data on populations of PBMC are shown as percentage of the total amount: 1 – lymphocytes, 2 – natural killers, 3 – T-lymphocytes, 4 – T-helpers, 5 – cytotoxic T-lymphocytes, 6 – double-positive T-lymphocytes, 7 – double-negative T-lymphocytes, 8 – monocytes; “↑” or “↓” – increase or decrease in the value of the indicator after infection; “↔” – no differences between the values of the indicator before and after infection.

Сравнение средних значений показателей МКПК до и после инфицирования с использованием Т-критерия в группе животных, инфицированных культурой штамма Изолят В, выявило отличие для В-лимфоцитов общих, Т-хелперов и моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации ($p < 0,2$). У животных, инфицированных культурой штамма У-2, выявлено отличие только для моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации ($p < 0,2$).

Дополнительно проведены расчеты с использованием непараметрического критерия Уайта. Показаны следующие результаты до и после инфицирования:

- штаммом Изолят В: выявлены различия показателей Т-лимфоцитов общих и В-лимфоцитов общих ($p < 0,2$), а также показателей Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,1$);

- штаммом У-2: различаются значения показателей только моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25 ($p < 0,1$).

Полученные данные свидетельствуют об отличиях в клинических и лабораторных проявлениях заболевания, возникшего у макак-резусов в результате инфицирования культурами различных штаммов вируса SARS-CoV-2. На 14-е сутки после инфицирования у животных, зараженных штаммом Изолят В, зафиксировано увеличение относительного содержания общих Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25; уменьшилось относительное содержание общих В-лимфоцитов и Т-хелперов. У большинства животных увеличилось относительное содержание натуральных киллеров. При этом практически полностью отсутствовали клиническая симптоматика и выделение вируса. Похожие реакции Т-лимфоцитов (более высокая функциональная активность CD8⁺ по сравнению с CD4⁺Т-клетками) описаны у пациентов с COVID-19 [14]. В группе, зараженной штаммом У-2, на фоне гипертермии и потери массы тела выделение возбудителя происходило у большинства животных, но зафиксировано достоверное изменение только одного показателя клеточного иммунитета (увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25).

Реакциями клеточного иммунитета под влиянием вируса можно объяснить более легкое протекание заболевания у животных, инфицированных культурой штамма Изолят В. Увеличение моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25, и натуральных киллеров свидетельствует об активации системы врожденного иммунитета, к которой относятся упомянутые клетки. Увеличение популяции общих Т-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов говорит о подключении адаптивного иммунитета, причем уменьшением относительного содержания Т-хелперов можно объяснить снижение В-лимфоцитов, на которые Т-хелперы должны оказывать активирующее действие; следствием угнетения

В-лимфоцитов является отсутствие выработки ими ВНА. По данным литературы, у людей, как и у животных, при легком течении COVID-19 также наблюдалась активация Т-клеточного звена иммунитета на фоне низкой продукции антител [15, 16].

Можно предположить, что штамм У-2 сильнее угнетает систему клеточного иммунитета, чем штамм Изолят В. Зафиксирован только признак активации системы врожденного иммунитета – увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25. Несрабатыванием системы Т-, а затем и В-клеточного иммунитета, проявляющимся отсутствием ВНА, можно объяснить более тяжелое протекание заболевания (температура, потеря массы тела) у животных, инфицированных культурой штамма У-2 [17]. В литературе описан вызываемый SARS-CoV-2 феномен лимфоцитарного истощения у инфицированных, обусловленный как прямой атакой коронавирусов на лимфоциты, так и индукцией апоптоза этих клеток [18, 19]. Таким образом, интерпретируя показатели клеточного иммунитета, можно анализировать патогенез инфекции и давать прогнозы в отношении исхода.

Для создания эффективных медицинских средств профилактики и лечения SARS-CoV-2-инфекции необходимым этапом является ее экспериментальное моделирование, в том числе на низших приматах (Primates: Strepsirrhini). Представители этого подотряда макаки-резусы (*Macaca mulatta*, *Macaca rhesus*) показали свою эффективность в качестве модели SARS-CoV-2-инфекции в ряде работ [20, 21].

Необходимо отметить, что в данном исследовании экспериментальная инфекция протекала у обезьян в легкой форме, что не совсем адекватно течению данного заболевания у человека, у которого COVID-19 может проходить в средней и тяжелой форме [22]. Также следует учитывать, что выраженность молекулярной мимикрии между белками вируса и хозяина для обезьян может отличаться от проявления данного феномена у человека [23]. Так, разнообразие генов белков МНС у этих животных шире, чем у людей [24]. Совпадение белковых последовательностей вируса и организма хозяина может существенно влиять на выраженность иммунного ответа и степень риска развития осложнений аутоиммунного характера, что особенно важно при разработке вакцин [25]. Многие особенности протекания инфекции у обоих видов еще предстоит определить, поэтому результаты следует интерпретировать осторожно.

Таким образом, впервые в Российской Федерации проведено изучение методом проточной цитометрии клеточного иммунитета макак-резусов после экспериментального инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2. Полученная информация может быть использована для исследования патогенеза SARS-CoV-2-инфекции, течения и исхода заболевания, а также разработки стратегий вакцинации и лечения.

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

Список литературы

1. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5):347–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099.
2. Chowdhury M.A., Hossain N., Kashem M.A., Shahid M.A., Alam A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health.* 2020; 13:1619–29. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.07.001.
3. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. A phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* 2020; 5:eabd2071. DOI: 10.1126/sciimmunol.abd2071.
4. Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К. Роль клеточного звена иммунитета в формировании иммунного ответа при коронавирусных инфекциях. *Медицинская иммунология.* 2021; 6:1229–38. DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-2302.
5. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). *Медицинская иммунология.* 2009; 2-3:227–38. DOI: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
6. Лапин Б.А. К вопросу об использовании в медицинских экспериментах лабораторных приматов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2010; 2:3–6.
7. Алексеев Я.И., Борисевич С.В., Варламов Д.А., Казанцев А.В., Карулина Н.В., Кириллов И.А., Кириллова С.Л., Кузубов А.В., Кутаев Д.А., Лебедев В.Н., Маноскин А.В., Мельников Д.Г., Павлиев Д.И., Петров А.А., Сизикова Т.Е., Хмуренко С.Н., Целиков Е.М., Чухрала О.В. Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, возбудителя нового коронавирного заболевания COVID-19, методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в реальном времени. Патент РФ № 2732608, опубл. 09.04.2020. Бюл. № 27.
8. Сыромятникова С.И., Писцов М.Н., Борисевич С.В., Хамитов Р.А., Марков В.И., Максимов В.П. Состав агарового покрытия для титрования методом негативных колоний коронавируса – возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома. Патент РФ № 2325436, опубл. 27.05.2008. Бюл. № 15.
9. Логинава С.Я., Щукина В.Н., Борисевич С.В., Сыромятникова С.И., Копылова Н.К., Борисевич Г.В., Андрощук И.А., Максимов В.А., Бондарев В.П. Разработка способа моделирования заболевания, вызываемого вирусом тяжелого острого респираторного синдрома, у лабораторных животных. *Молекулярная медицина.* 2009; 5:31–6.
10. Васильев Д.А., Луговцев В.Ю. Учебно-методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским занятиям по курсу вирусологии (часть вторая – серологические реакции). Ульяновск; 2005.
11. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD 1antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 1-2:21–6. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.06.011.
12. 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» (проект). *Медицинская иммунология.* 2012; 14(3):255–68. DOI: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
13. 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. P. 75–103. [Электронный ресурс]. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6 (дата обращения 10.12.2021).
14. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020; 4:424–32. DOI: 10.1002/jmv.25685.
15. Gallais F., Velay A., Nazon C., Wendling M.-J., Partisani M., Sibilia J., Candon S., Fafi-Kremer S. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 1:113–21. DOI: 10.3201/eid2701.203611.
16. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Berger M.M., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Meister T.L., Pfander S., Steinmann E., Dolf S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T., Babel N. Robust T cell response toward spike,

membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. *Cell Rep. Med.* 2020; 1:100092. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100092.

17. Sariol S., Perlman S. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity.* 2020; 2:248–63. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.
18. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., Wei Q., Zhang W., Hu J. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.* 2020; 4:553–9. DOI: 10.1007/s12185-020-02930-w.
19. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11:827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.
20. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostnsoski L.H., Chandrashekhar A., Liu J., Peter L., Atyeo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya E., Patel S., Pessaint L., van Ry A., Blade K., Yalley-Ogunro J., Cabus M., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Barouch D.H. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2021; 590:630–4. DOI: 10.1038/s41586-020-03041-6.
21. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Pessaint L., van Ry A., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A., Finnyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrookian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. SARS-CoV-2 infection protects against challenge in rhesus macaques. *Science.* 2020; 369:812–7. DOI: 10.1126/science.abc4776.
22. Shi S., Nie B., Chen X., Cai Q., Lin C., Zhao G., Zhang X. Clinical and laboratory characteristics of severe and non-severe patients with COVID-19: A retrospective cohort study in China. *Clin. Lab. Anal.* 2021; 1:e23692. DOI: 10.1002/clia.23692.
23. Петрова Н.В., Ганина К.К., Тарасов С.А. Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae; Betacoronavirus; Sarbecovirus). *Вопросы вирусологии.* 2021; 2:103–11. DOI: 10.36233/0507-4088-47.
24. Heijmans C.M.C., de Groot N.G., Bontrop R.E. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates. *Int. J. Immunogenet.* 2020; 3:243–60. DOI: 10.1111/iji.12490.
25. Nakayama E., Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections. *Front. Microbiol.* 2013; 4:267. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00267.

References

1. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5):347–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099.
2. Chowdhury M.A., Hossain N., Kashem M.A., Shahid M.A., Alam A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health.* 2020; 13:1619–29. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.07.001.
3. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. A phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* 2020; 5:eabd2071. DOI: 10.1126/sciimmunol.abd2071.
4. Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К. [Role of the cellular immunity in the formation of the immune response in case of coronavirus infections]. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology].* 2021; 23(6):1229–38. DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-2302.
5. Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Totoлян A.A., Cheresnev V.A. [Major and minor lymphocyte populations of human peripheral blood and their reference values, as assayed by multi-color cytometry] *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology].* 2009; 11(2-3):227–38. DOI: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
6. Lapin B.A. [Regarding the use of laboratory primates in medical experiments]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy].* 2010; (2):3–6.
7. Alexeev Ya.I., Borisevich S.V., Varlamov D.A., Kazantsev A.V., Karulina N.V., Kirillov I.A., Kirillova S.L., Kuzubov A.V., Kutaev D.A., Lebedev V.N., Manoskin A.V., Mel'nikov D.G., Paveliev D.I., Petrov A.A., Sizikova T.E., Khmurenko S.N.,

- Tselikov E.M., Chukhraya O.V. [A set of reagents for the detection of SARS-CoV-2 coronavirus RNA, pathological agent of new coronavirus disease COVID-19, using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR-RV-2019-nCoV)]. RF Patent No. 2732608, publ. 09 Apr 2020. Bull. No. 27.
8. Syromyatnikova S.I., Pistorov M.N., Borisevich S.V., Khamitov R.A., Markov V.I., Maksimov V.P. [The composition of the agar coating for titration by the method of negative colonies of coronavirus – the causative agent of severe acute respiratory syndrome]. RF Patent No. 2325436, publ. 27 May 2008. Bull. No. 15.
9. Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Borisevich S.V., Syromyatnikova S.I., Kopylova N.K., Borisevich G.V., Androshechuk I.A., Maksimov V.A., Bondarev V.P. [Development of a method for modeling the disease caused by the severe acute respiratory syndrome virus in laboratory animals]. *Molekulyarnaya Meditsina [Molecular Medicine]*. 2009; 5:31–6.
10. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu. [Educational and Methodological Materials for Preparing for Laboratory and Seminar Classes in Virology Course (Part two – Serological Reactions)]. Ulyanovsk; 2005.
11. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD 1antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 1-2:21–6. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.06.011.
12. Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolyan A.A. [Standardized technology “Study of subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorometers-analyzers”]. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2012; 14(3):255–68. DOI: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
13. 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: P. 75–103. (Cited 10 Dec 2021). [Internet]. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6.
14. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020; 4:424–32. DOI: 10.1002/jmv.25685.
15. Gallais F., Velay A., Nazon C., Wendling M.-J., Partisani M., Sibilia J., Candon S., Fafi-Kremer S. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 1:113–21. DOI: 10.3201/eid2701.203611.
16. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Berger M.M., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Meister T.L., Pfaender S., Steinmann E., Dolf S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T., Babel N. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. *Cell Rep. Med.* 2020; 1:100092. DOI: 10.1016/j.xcr.2020.100092.
17. Sariol S., Perlman S. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*. 2020; 2:248–63. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.
18. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., Wei Q., Zhang W., Hu J. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.* 2020; 4:553–9. DOI: 10.1007/s12185-020-02930-w.
19. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11:827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.
20. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekhar A., Liu J., Peter L., Ateyo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya F., Patel S., Pessaint L., van Ry A., Blade K., Yalley-Ogunro J., Cabus M., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Barouch D.H. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. 2021; 590:630–4. DOI: 10.1038/s41586-020-03041-6.
21. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Ateyo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Pessaint L., van Ry A., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A., Finneyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369:812–7. DOI: 10.1126/science.abc4776.
22. Shi S., Nie B., Chen X., Cai Q., Lin C., Zhao G., Zhang X. Clinical and laboratory characteristics of severe and non-severe patients with COVID-19: A retrospective cohort study in China. *Clin. Lab. Anal.* 2021; 1:e23692. DOI: 10.1002/jcla.23692.
23. Petrova N.V., Ganina K.K., Tarasov S.A. [Susceptibility of laboratory animals to SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) infection]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2021; 66(2):103–11. DOI: 10.36233/0507-4088-47.
24. Heijmans C.M.C., de Groot N.G., Bontrop R.E. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates. *Int. J. Immunogenet.* 2020; 3:243–60. DOI: 10.1111/iji.12490.
25. Nakayama E., Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections. *Front. Microbiol.* 2013; 4:267. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00267.

Authors:

Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Shagarova N.V., Boyarskaya N.V., Levkovich N.G., Solyanik D.A., Andrus A.F., Rubtsov V.V., Krotkov V.T., Kulish V.S., Surovyatkina I.V., Kirillov V.B., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kutaev D.A., Borisevich S.V. 48th Central Research Institute. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Possad-6, Moscow Region, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Solov'ev S.S. Scientific Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin. 24, Kashirskoe highway, Moscow, Russian Federation. E-mail: info@ronc.ru.

Об авторах:

Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Шагарова Н.В., Боярская Н.В., Левкович Н.Г., Соляник Д.А., Андрус А.Ф., Рубцов В.В., Кротков В.Т., Кулиш В.С., Суровяткина И.В., Кириллов В.Б., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт. Российская Федерация, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Соловьев С.С. Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина. Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24. E-mail: info@ronc.ru.