

УДК 57.084.1; 57.083.3; 599.821.2

## Определение параметров адаптивного клеточного иммунитета у обыкновенных мармозет (*Callithrix jacchus*)

И. В. Гордейчук<sup>1,2,3\*</sup>, А. И. Тухватулин<sup>2</sup>, С. П. Петков<sup>4</sup>, М. А. Абакумов<sup>5,6</sup>, С. А. Гуляев<sup>1</sup>,  
Н. М. Тухватулина<sup>2</sup>, Т. В. Гуляева<sup>1</sup>, М. И. Михайлов<sup>7,8</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>2</sup>, М. Г. Исагулянц<sup>1,2,9</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, 108819, Россия, Москва, поселение Московский, пос. Института полиомиелита, 8, стр. 1

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова Минздрава России, 119146, Россия, Москва, Большая Пироговская ул., 19, стр. 1

<sup>4</sup>Каролинский институт, 171 77, Швеция, Стокгольм

<sup>5</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>6</sup>Национальный исследовательский технологический университет МИСиС (МИСиС), 119049, Россия, Москва, Ленинский просп., 4

<sup>7</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, 125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

<sup>8</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А

<sup>9</sup>Рижский университет им. Страдыня, LV-1007, Латвия, Рига

\*E-mail: lab.gord@gmail.com

Поступила в редакцию 13.12.2017

Принята к печати 28.08.2018

**РЕФЕРАТ** Обыкновенные мармозеты (*Callithrix jacchus*) – игрунковые обезьяны Нового Света, широко используются в биомедицинских исследованиях. Нами представлены оптимизированные протоколы оценки параметров адаптивного клеточного иммунитета мармозет, включая оценку субпопуляционного состава лимфоцитов и определение основных маркеров созревания и активации Т- и В-клеток методом проточной цитометрии с использованием панели флуоресцентно меченных антител. Образцы цельной крови восьми мармозет окрашивали флуоресцентно мечеными моноклональными антителами к популяционным маркерам (CD45, CD3, CD20, CD4, CD8) и маркерам созревания и активации лимфоцитов (CD69, CD62L, CD45RO, CD107a и CD27) и анализировали методом проточной цитометрии. Популяция CD45<sup>+</sup> клеток включала 22.7 ± 5.5% CD3<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> клеток и 67.6 ± 6.3% CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup> клеток. Популяция CD3<sup>+</sup> клеток состояла из 55.7 ± 5.5% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> и 34.3 ± 3.7% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Маркеры активации и созревания лимфоцитов выявлены в соответствующих популяциях в следующих пропорциях: CD62L на 54.0 ± 10.7% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и 74.4 ± 12.1% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD69 на 2.7 ± 1.2% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и 1.2 ± 0.5% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD45RO на 1.6 ± 0.6% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и 1.8 ± 0.7% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD107a на 0.7 ± 0.5% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и 0.5 ± 0.3% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD27 на 94.6 ± 2.1% CD3<sup>+</sup> и 8.9 ± 3.9% CD20<sup>+</sup> клеток. Доля CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток у самок и самцов значительно различалась (1.9 ± 0.5% у самок и 1.1 ± 0.2% у самцов;  $p < 0.05$ ). Доля CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> клеток значительно коррелировала с возрастом животных ( $r = 0.923$ ,  $p < 0.005$ ). Определены базовые параметры адаптивного клеточного иммунитета, характерные для интактных мармозет, не имеющих маркеров системной иммунной активации. Знание этих параметров и проведение описанных процедур необходимы для оценки изменений иммунного статуса мармозет под воздействием профилактических и терапевтических иммунобиологических препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** адаптивный клеточный ответ, обыкновенные мармозеты, проточная цитометрия, *Callithrix jacchus*.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CD – кластер дифференцировки; ФМО – контроль флуоресценции минус один; FSC – прямое светорассеяние; HEPA – воздушный фильтр с высокоэффективным удалением частиц; HLA – человеческие лейкоцитарные антигены;  $M \pm \sigma$  – среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение; ME – международная единица; MHC – главный комплекс гистосовместимости; SSC – боковое светорассеяние.

## ВВЕДЕНИЕ

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*, мармозеты) – маленькие приматы Нового Света, все чаще применяемые для моделирования патологических состояний человека, включая инфекционные, неврологические и онкологические заболевания [1, 2]. В силу высокой восприимчивости к инфекционным болезням человека мармозеты представляют собой уникальную приматную модель для изучения вирусных, протозойных, бактериальных и прионных заболеваний [3] и служат идеальной платформой для доклинических исследований эффективности и безопасности новых вакцин и иммуномодулирующих препаратов [4]. Значимыми преимуществами использования мармозет в биомедицинских исследованиях являются их малый размер, эволюционная близость к человеку, относительная простота содержания, а также быстрое половое созревание и небольшая средняя продолжительность жизни, что позволяет обеспечить высокую скорость увеличения и уменьшения численности колонии в соответствии с экспериментальной необходимостью [3].

Эволюционная близость мармозет к человеку позволяет применять в работе с ними аналитические методики, успешно используемые при работе с биологическими материалами, полученными от человека. В то же время во многих биологических аспектах мармозеты имеют значимые отличия от других видов нечеловекообразных приматов [5]. Иммунологически мармозеты, как и другие игрунковые, представляют собой исключение из общего правила стабильности локусов MHC класса I [6, 7]. Каждый род игрунковых обезьян (*Callitrichidae*) обладает своим собственным набором генов MHC класса I и не имеет локусов, сравнимых с MHC класса I (HLA-A, -B и -C) человека. Локусы MHC класса I мармозет обладают ограниченной изменчивостью при относительно высокой частоте смены поколений, что приводит к низкому уровню или полному отсутствию различий иммунного ответа на инфекционные патогены и опухолевые антигены у отдельных представителей данного вида [5]. Изменчивость локусов MHC класса II также весьма ограничена [8]. Совокупность упомянутых факторов делает мармозет очень восприимчивыми к вирусным заболеваниям [9–11], в частности, к вызванным онкогенными вирусами инфекциям, приводящим к формированию спонтанных опухолей [12–15]. Ранние работы, выявившие повышенную восприимчивость мармозет к онкогенным вирусам, нашли подтверждение в экспериментах по их заражению

вирусами саркомы и лимфотропными герпесвирусами [16–18]. Сходные спонтанные новообразования наблюдаются у человека при лимфоме Беркитта и назофарингеальной карциноме, что делает мармозет ценной моделью для тестирования соответствующих противовирусных препаратов и иммунотерапевтических средств, включая профилактические и терапевтические вакцины против онкогенных вирусов человека. В силу низкого уровня изменчивости иммунного ответа между отдельными животными такие исследования дают высоковоспроизводимые результаты, несмотря на аутбредную природу экспериментальных групп.

Оценка эффективности иммунотерапевтических средств, уровня поствакцинального иммунного ответа, а также безопасности применяемых иммунобиологических препаратов требует тщательного описания иммунного статуса экспериментальных животных в норме и при активации. Один из основных применяемых с этой целью методов – проточная цитометрия с использованием моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным антигенам. Несмотря на высокую гомологию маркерных молекул клеточных популяций человека и нечеловекообразных обезьян, показано, что ряд клонов коммерчески доступных антител против CD антигенов человека не реагирует с соответствующими антигенами мармозет [19–21].

В результате нашей работы определен перечень клонов антител, способных эффективно связываться с CD антигенами мармозет, также методом проточной цитометрии идентифицированы параметры иммунного статуса не иммунизированных («интактных») животных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия содержания и ухода за животными соответствовали положениям Европарламента и Директивы Европейского совета по защите животных, используемых в научных целях (2010/63/EU), а также Руководству Национальных институтов здравоохранения США по использованию и уходу за лабораторными животными. Животных содержали попарно в клетках из прутьев (размер клетки 80 × 55 × 130 см) с деревянными спальными ящиками и ветвями для лазания. Мочу и фекалии удаляли ежедневно путем замены лотков. Комнатную температуру и относительную влажность поддерживали на уровне  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  и 60–80% соответственно. Автоматическая система контроля

освещения была установлена на 12-часовой цикл смены режимов день/ночь. Система вентиляции обеспечивала 8-кратный ежечасный воздухообмен с НЕРА-фильтрацией. Мармозеты получали видоспецифическую диету, не изменяющуюся по ходу эксперимента, и имели свободный круглосуточный доступ к воде. Качество воды и кормов контролировали на регулярной основе.

Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия). Исследование включало восемь животных (три самца и пять самок возрастом от 23 до 48 месяцев и весом 360–400 г), выведенных и содержавшихся в экспериментальной клинике игрунковых обезьян ФГБНУ ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. Эксперименты проводил специалист, прошедший курс обучения работе с нечеловеческими приматами (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция). Режим содержания животных во время проведения процедур не изменялся относительно стандарта. Ухудшений в состоянии здоровья животных в ходе двухнедельного эксперимента и в течение двух недель после его окончания не выявлено. Индивидуальную идентификацию животных производили с использованием подкожных радиочипов с уникальными 15-значными кодами (Globalvet, Москва, Россия). Идентификаторы в таблицах представляют собой последние четыре цифры кода радиочипа.

Образцы венозной крови объемом 2 мл были получены от восьми мармозет путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев объемом 2.5 мл с иглами 25G, в которые предварительно набирали 25 МЕ натрий-гепарина («Белмедпрепараты», Минск, Республика Беларусь) на 1 мл взятой крови. Аликвоты цельной крови объемом 50 мкл на один тест инкубировали в течение 30 мин при температуре 22°C с предварительно приготовленной смесью флуоресцентно меченных антител следующих клонов: PE mouse anti-marmoset CD45 (BioLegend, Сан-Диего, США; клон 6C9, кат. 250204); Alexa Fluor 700 mouse anti-human CD3 (BD, Нью-Джерси, США; клон SP34-2, кат. 557917); FITC mouse anti-human CD20 (Beckman Coulter, Бреа, США; клон H299; кат. 6602381); PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD4 (BD, клон L200, кат. 552838); PE anti-marmoset CD8 (BioLegend, клон 6F10, кат. 250304); APC mouse anti-human CD69 (BD, клон L78, кат. 654663); BV421 Mouse Anti-Human CD62L (BD, клон SK11, кат. 743207); PE/Cy7 anti-human CD45RO (BioLegend, клон UCHL1, кат. 304230); BV421 Mouse Anti-Human CD107a (BD, клон H4A3, кат. 562623); APC anti-human CD27 (BioLegend, клон M-T271, кат.

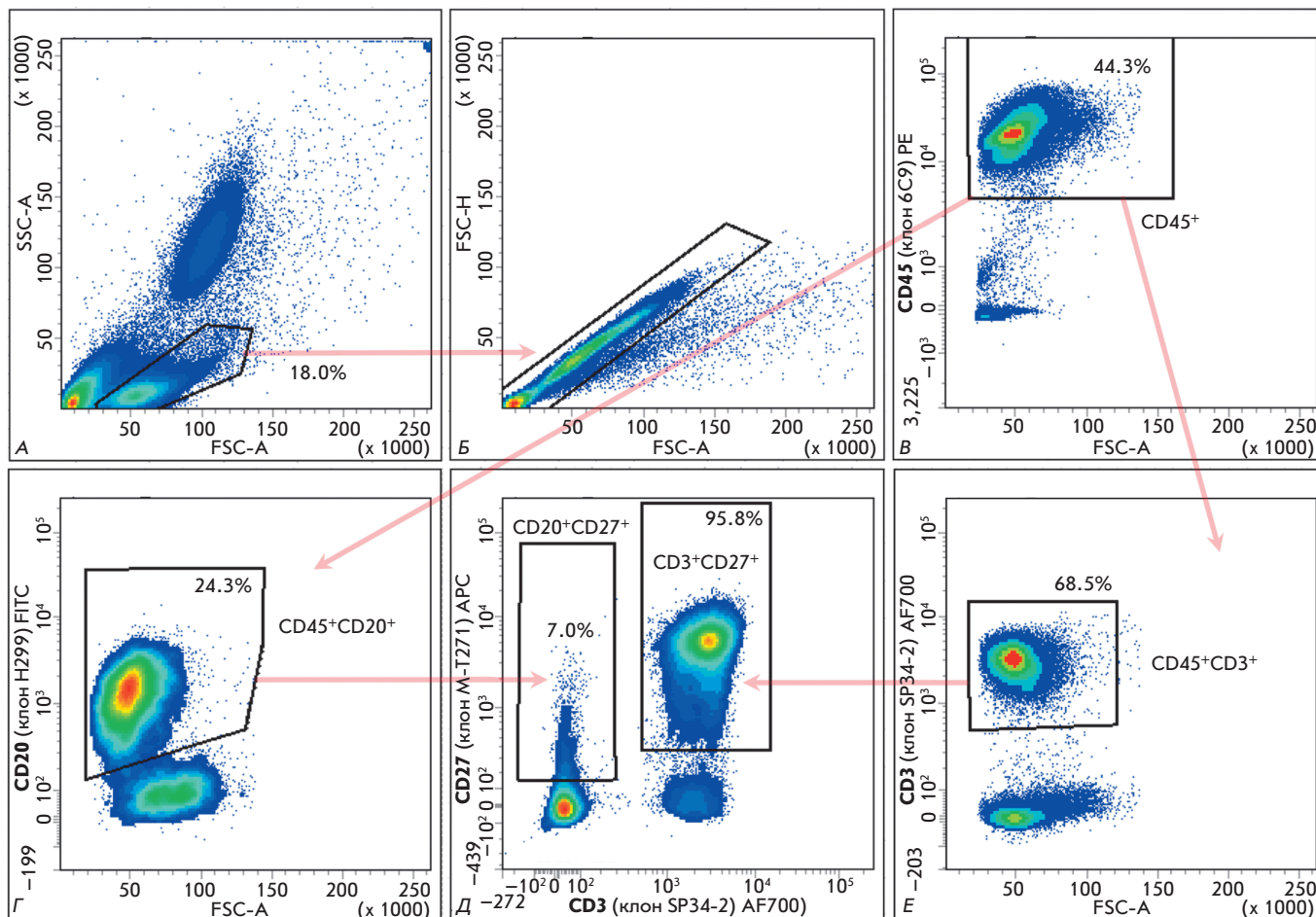
356409). После инкубации с указанными антителами образцы обрабатывали 1 мл буфера для лизиса эритроцитов (BioLegend, кат. 420301) в течение 15 мин при комнатной температуре и однократно отмывали путем центрифугирования в 1 мл фосфатно-солевого буфера при скорости 2000 g. Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSAria III (BD) в течение 30 мин после окрашивания. Реактивность каждого моноклонального антитела определяли как процент окрашенных клеток по сравнению с клетками, окрашенными всеми другими антителами, за исключением тестируемого (контроль флуоресценции минус один [ФМО]).

Статистический анализ проводили с использованием *t*-теста для нормально распределенных значений и непараметрических тестов ранговой корреляции Спирмена и теста Манна–Уитни, выполненных с помощью пакета программ статистической обработки STATISTICA AXA 10 (TIBCO Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

К настоящему времени опубликовано лишь несколько работ, рассматривающих применимость различных коммерчески доступных моноклональных антител для цитометрического анализа клеток мармозет [19–21]. В ходе данного исследования нами был отработан протокол определения иммунного статуса мармозет методом проточной цитометрии с многоцветной панелью флуоресцентно меченных антител к поверхностным антигенам основных субпопуляций лимфоцитов и к маркерам созревания и активации Т- и В-клеток. Используя данную методику, мы охарактеризовали иммунный статус интактных мармозет. В частности, определено процентное соотношение основных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) и уровень экспрессии этими клетками маркеров созревания и активации (CD27, CD62L, CD69, CD45RO, CD107a). Стратегия определения популяций и анализ результатов окрашивания представлены на *рис. 1* и *2* на примере одной мармозеты (ID 4540).

Доли клеток периферической крови мармозет, окрашиваемых рецепторспецифическими антителами, представлены в *таблице*. CD45<sup>+</sup> лейкоциты составляли 54.3 ± 11.8% от общего количества клеток после лизиса эритроцитов. CD45<sup>+</sup> популяция содержала 22.7 ± 5.5% В-клеток (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>) и 67.6 ± 6.3% Т-клеток (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>). Среди CD3<sup>+</sup> клеток 55.7 ± 5.5% составляли Т-хелперы (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), 34.3 ± 3.7% – цитотоксические Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). Соотношения популяций В- и Т-клеток мармозет, включая субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, соответствовали данным [20, 22],



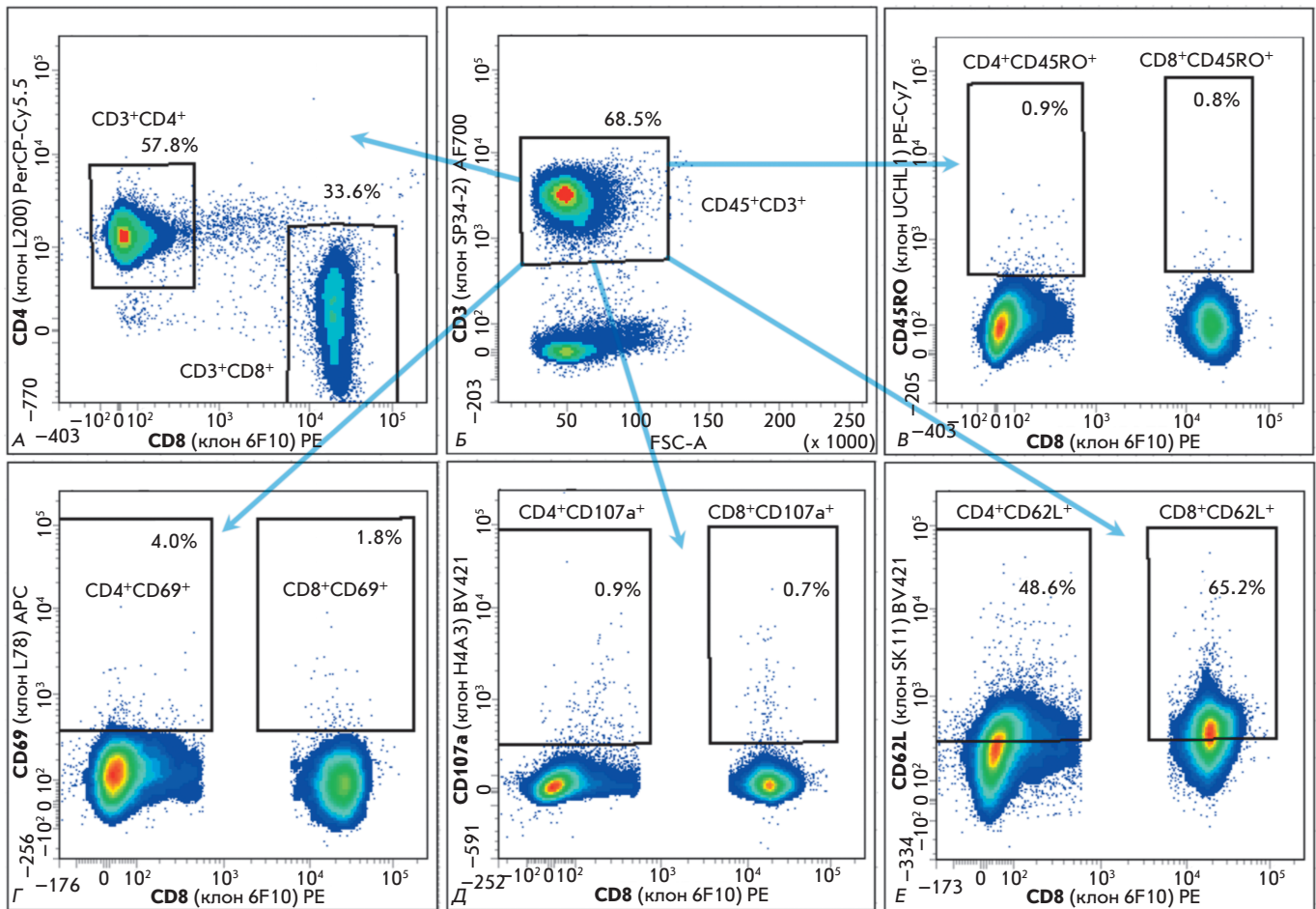
**Рис. 1.** Выделение популяций и результаты окрашивания популяций Т- и В-клеток интактных мармозет (ID 4540). Графики светорассеивания FSC-A/SSC-A (А) и исключения одиночных клеток (Б) использовали для выделения популяции CD45<sup>+</sup> лейкоцитов (В). Доли окрашенных CD45<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> (Г) и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (Е) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяции CD45<sup>+</sup>. Доли окрашенных клеток CD3<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (Д) представлены в соответствующих полях относительно популяций CD3<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> клеток соответственно. Реактивность каждого моноклонального антитела определяли как процент позитивно окрашенных клеток по сравнению с клетками, окрашенными всеми другими антителами, за исключением одного тестируемого (контроль ФМО). В каждом случае при цитометрии оценивали 150 000 событий

а также показателям, характерным для здоровых людей [23, 24].

Маркеры активации и созревания лимфоцитов были представлены в ранее упомянутых субпопуляциях клеток в следующих соотношениях: CD62L (L-селектин; сигнал хоуминга лимфоцитов, расщепляется в ходе активации клеток): на  $54.0 \pm 10.7\%$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и на  $74.4 \pm 12.1\%$  CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD69 (ранний маркер Т-клеточной активации): на  $2.7 \pm 1.2\%$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и  $1.2 \pm 0.5\%$  CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD45RO (активированные Т-клетки памяти): на  $1.6 \pm 0.6\%$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и  $1.8 \pm 0.7\%$  CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD107a (активированные Т-клетки): на  $0.7 \pm 0.5\%$  CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и  $0.5 \pm 0.3\%$  CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD27 (представитель суперсемейства ре-

цепторов фактора некроза опухолей-7 (TNFRSF7); В-клетки памяти, зрелые Т-клетки): на  $94.6 \pm 2.1\%$  Т-клеток (CD20<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>). Значения находились в пределах, описанных в недавно опубликованном исследовании распределения различных популяций и субпопуляций иммунных клеток, проведенном Neumann и соавт. [21].

В то же время мы обнаружили более низкое, в сравнении с [21], относительное количество В-клеток памяти CD45<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> ( $8.9 \pm 3.9\%$ ), что свидетельствует о низком уровне активации В-клеток. Мы объясняем эти наблюдения более молодым, чем в [21], средним возрастом мармозет, вошедших в наше исследование ( $29.3 \pm 8.0$  месяцев, таблица). Наряду с этим, доли субпопуляций Т-клеток CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>



**Рис. 2.** Результаты выявления маркеров созревания и активации у интактных мармозет (ID 4540). Доля окрашенных  $CD3^+CD4^+$  и  $CD3^+CD8^+$  (А) клеток представлена в соответствующих полях относительно популяции  $CD45^+CD3^+$  (Б) клеток. Доли окрашенных  $CD45RO^+$  (В),  $CD69^+$  (Г),  $CD107a^+$  (Д) и  $CD62L^+$  (Е) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяций  $CD3^+CD4^+$  и  $CD3^+CD8^+$  клеток. Реактивность каждого моноклонального антитела определяли как процент позитивно окрашенных клеток по сравнению с клетками, окрашенными всеми другими антителами, за исключением одного тестируемого (контроль ФМО). В каждом случае при цитометрии оценивали 150 000 событий

и  $CD62L^+CD8^+$  в нашей работе были ниже, чем в работе Yoshida и соавт. [25], что может указывать на активацию Т-клеток. Интересно, что доля активированных В-клеток  $CD20^+CD27^+$  коррелировала с долей неактивных Т-хелперов  $CD3^+CD4^+CD62L^+$ , но не цитотоксических Т-лимфоцитов  $CD3^+CD8^+CD62L^+$  ( $r = 0.902$ ;  $p = 0.006$ ; тест ранговой корреляции Спирмена). Других признаков системной иммунной активации выявлено не было.

Как состав субпопуляций лимфоцитов, так и уровни активации Т- и В-клеток были одинаковыми у самцов и самок. Единственное статистически значимое различие было выявлено в доле  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$  клеток ( $1.9 \pm 0.5\%$  у самок против  $1.1 \pm 0.2$  у самцов;  $t = 2.5658$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.0426$ ;  $t$ -тест).

Наблюдаемые доли  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$  клеток у самцов и самок находились в рамках значений, описанных для интактных животных [20].

Возраст мармозет, использованных в исследовании, был неоднородным, одно животное было значительно старше других (№ 3016, таблица). В этой связи мы проанализировали взаимосвязь между возрастом и оцениваемыми иммунными параметрами. Доля В-клеток памяти  $CD45^+CD20^+CD27^+$  достоверно коррелировала с возрастом животных ( $r = 0.923$ ,  $p = 0.0011$ ; тест ранговой корреляции Спирмена). Более того, статистически значимая корреляция наблюдалась и при исключении из анализа данных мармозеты № 3016 ( $r = 0.798$ ;  $p = 0.03$ ). Наблюдаемая корреляция подтверждает наше предположение

Доля окрашенных периферических клеток крови у интактных мармозет

Параметр	ID, параметр, %										Итого, M±σ, %
	Самки					Самцы					
	2996	2998	0519	3016	2997	M±σ	2994	4540	4520	M±σ	
Возраст, месяцы	29	29	23	48	25	30.8 ± 10.0	30.0	25.0	25.0	26.7 ± 2.9	29.3 ± 8.0
CD45 <sup>+</sup> *	67.5	64.5	62.3	43.5	43.2	56.2 ± 11.9	42.1	44.3	66.6	51.0 ± 13.6	54.3 ± 11.8
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD20 <sup>+</sup>	28.7	32.4	17.7	17.5	20.4	23.3 ± 6.8	22.3	24.3	18.4	21.7 ± 3.0	22.7 ± 5.5
CD45 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	8.3	11.8	5.9	17	7.9	10.2 ± 4.4	8.9	7.0	4.7	6.9 ± 2.1	8.9 ± 3.9
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD20 <sup>-</sup>	62.4	57.6	69.6	74.7	64.4	65.7 ± 6.6	66.5	68.5	76.9	70.6 ± 5.5	67.6 ± 6.3
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	93.9	93.2	96.2	98.4	93.2	95.0 ± 2.3	91.8	95.8	94.6	94.1 ± 2.1	94.6 ± 2.1
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	39.2	32.7	34.4	40	32.9	35.8 ± 3.5	33.2	33.6	28.5	31.8 ± 2.8	34.3 ± 3.7
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	72.7	81.2	89.3	86.7	51.8	76.3 ± 15.1	76.4	65.2	72.0	71.2 ± 5.6	74.4 ± 12.1
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	0.9	1.1	1.6	1.9	0.3	1.2 ± 0.6	1.2	1.8	1.0	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.5
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	2	2.4	1.8	1.8	0.8	1.8 ± 0.6	2.0	0.8	0.7	1.2 ± 0.7	1.8 ± 0.7
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	0.9	0.5	0.8	0.5	0	0.5 ± 0.4	0.2	0.7	0.2	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	49.9	57.7	51.2	49.7	57.8	53.3 ± 4.1	55.5	57.8	66.1	59.8 ± 5.6	55.7 ± 5.5
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	47.3	56	73.8	66	43	57.2 ± 12.8	49.1	48.6	47.8	48.5 ± 0.7	54.0 ± 10.7
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	1.1	2.3	3.8	4.2	1.7	2.6 ± 1.3	2.0	4.0	2.7	2.9 ± 1.0	2.7 ± 1.2
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	2	1.7	2.3	2.4	1.1	1.9 ± 0.5**	1.3	0.9	1.0	1.1 ± 0.2**	1.6 ± 0.6
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	1.2	0.6	1.5	0.9	0.2	0.9 ± 0.5	0.2	0.9	0.4	0.5 ± 0.4	0.7 ± 0.5

\*Среди популяции лимфоцитов, гейтированных на основе графика FSC-A/SSC-A при исключении неодинокных клеток.

\*\*Статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ).

о связи относительно низкой доли В-клеток памяти с молодым возрастом животных. Другие иммунологические параметры иммунного статуса мармозет не зависели от возраста ( $p > 0.05$ ).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В данной работе нами определены базовые параметры статуса иммунной системы мармозет различного пола и возраста, характерные для интактных животных и необходимые для регистрации изменений, возникающих при заболеваниях и в ходе испытаний иммунобиологических препаратов. В нашей работе доля CD45<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> клеток (В-клетки памяти) у молодых животных была ниже в сравнении с опубликованными данными [21], что указывает на более низкий уровень активации В-клеток. В дальнейшем мы планируем оценить значимость данных наблюдений на большем количестве животных раннего возраста. Других статистически значимых изменений в параметрах иммунного статуса и уровне экспрессии маркеров иммунной дифференцировки, помимо упомянутых, обнаружено не было, что позволяет использовать в подобных исследованиях мармозет в возрасте старше 2 лет и проводить иммунное тестирование в смешанных возрастных группах.

Доля субпопуляций CD62L-позитивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, установленная в данной работе, ниже значений, представленных Yoshida и соавт.

[25]. L-селектин (CD62L) обеспечивает вход Т-клеток в лимфатические узлы. Он занижен и у Т-клеток, мигрирующих внутри лимфатических узлов, тогда как при нахождении клеток в нелимфоидных органах уровень экспрессии CD62L остается неизменным [26]. Уровень экспрессии L-селектина на поверхности Т-клеток снижается в ходе их активации до 10% от исходного значения в течение нескольких минут [27]. Таким образом, снижение доли CD62L<sup>+</sup> Т-клеток может означать недавнюю или еще продолжающуюся активацию Т-клеток. Интересно, что экспрессия CD27<sup>+</sup> на В-клетках мармозет коррелировала с экспрессией L-селектина/CD62L CD4<sup>+</sup> Т-клетками ( $p < 0.01$ ), т.е. активация В-клеток ассоциировалась с отсутствием активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток (характеризующейся высоким уровнем CD62L). В более ранних работах была описана ассоциация между экспрессией поверхностных маркеров активации В-клеток памяти CD27 и CD21 [28]. Рецептор комплемента II типа CD21 представлен на большинстве зрелых В-клеток. Ранее было показано, что снижение уровня CD21 В-клетками происходит одновременно с расщеплением CD62L незрелыми лимфоцитами и клетками памяти, что приводит к миграции этих клеток к месту инфицирования [29]. При этом оба процесса регулируются одной и той же группой протеаз [29]. Эти данные проливают свет на механизм опосредованной CD21 взаимосвязи между экспрессией мар-

керо́в активации В-клеток памяти CD27 и Т-клеток CD62L. Корреляция между уровнем экспрессии CD27 В-клетками, свидетельствующим об их активации, и уровнем экспрессии CD62L CD4<sup>+</sup> Т-клетками, а точнее – обратная корреляция с деградацией CD62L, свидетельствующей об активации CD4 клеток, может отражать скоординированную регуляцию дифференцировки этих субпопуляций иммунных клеток у нечеловекообразных приматов.

В заключение нами установлены базовые параметры иммунного профиля, характерные для интактных мармозет, не имеющих маркеров системной иммунной активации. Базовая оценка этих параметров критически важна для регистрации изменений иммунного статуса мармозет вследствие применения иммунобиологических препаратов профилактического и терапевтического назначения. Представленные панели антител и методики гейтинга, позволяющие с высокой надежностью определить доли специфических

клеточных популяций и оценить их функциональный статус, могут использоваться для оценки эффективности новых иммунобиологических препаратов, включая вакцины против хронических вирусных инфекций и онкологических заболеваний. ●

*Исследование иммунного статуса мармозет поддержано грантом РНФ № 15-15-30039. Поддержание колонии игрунковых обезьян финансировалось из средств Государственного задания по теме № 209 ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Обучение персонала работе с нечеловекообразными приматами и сопутствующие расходы на мобильность покрывались грантами Шведского института TP 09272/2013 и PI 19806\_2016 (INNOVIMMUNE). Участие в работе Стефана Петкова поддержано грантом EU Horizon2020 проект VACTRAIN № 692293.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moi M.L., Ami Y., Muhammad Azami N.A., Shirai K., Yoksan S., Suzaki Y., Kitaura K., Lim C.K., Saijo M., Suzuki R., et al. // *J. Gen. Virol.* 2017. V. 98. № 12. P. 2955–2967.
- Orsi A., Rees D., Andreini I., Venturella S., Cinelli S., Oberto G. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2011. V. 59. № 1. P. 19–27.
- Carrion R., Patterson J.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2012. V. 2. № 3. P. 357–362.
- Arrand J.R. // *Immunotherapy and vaccination against Epstein-Barr virus-associated cancer. Cancer vaccines / Eds Stern P., Carroll M., Beverley P. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2000. P. 174–194.*
- Abbott D.H., Barnett D.K., Colman R.J., Yamamoto M.E., Schultz-Darken N.J. // *Comp. Med.* 2003. V. 53. № 4. P. 339–350.
- Cadavid L.F., Shufflebotham C., Ruiz F.J., Yeager M., Hughes A.L., Watkins D.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 26. P. 14536–14541.
- van der Wiel M.K., Otting N., de Groot N.G., Doxiadis G.G.M., Bontrop R.E. // *Immunogenetics.* 2013. V. 65. № 12. P. 841–849.
- Antunes S.G., de Groot N.G., Brok H., Doxiadis G., Menezes A.A., Otting N., Bontrop R.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 20. P. 11745–11750.
- Gough A.W., Barsoum N.J., Gracon S.I., Mitchell L., Sturgess J.M. // *Lab. Anim. Sci.* 1982. V. 32. № 1. P. 87–90.
- Mätz-Rensing K., Jentsch K.D., Rensing S., Langenhuyzen S., Verschoor E., Niphuis H., Kaup F.J. // *Vet. Pathol.* 2003. V. 40. № 4. P. 405–411.
- Moi M.L., Takasaki T., Omatsu T., Nakamura S., Katakai Y., Ami Y., Suzaki Y., Saijo M., Akari H., Kurane I. // *J. Gen. Virol.* 2014. V. 95. № 3. P. 591–600.
- McIntosh G.H., Giesecke R., Wilson D.F., Goss A.N. // *Vet. Pathol.* 1985. V. 22. № 1. P. 86–88.
- Haworth R., Jones S., Sanchez-Morgado J., Pilling A. // *Vet. Rec.* 2003. V. 153. № 11. P. 332–333.
- Zöller M., Mätz-Rensing K., Fahrion A., Kaup F.-J. // *Vet. Pathol.* 2008. V. 45. № 1. P. 80–84.
- Miller A.D., Kramer J.A., Lin K.C., Knight H., Martinot A., Mansfield K.G. // *Vet. Pathol.* 2010. V. 47. № 5. P. 969–976.
- Laufs R., Steinke H., Gisela S., Petzold D. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1974. V. 53. № 1. P. 195–199.
- Wolfe L.G., Deinhardt F. // *Primates Med.* 1978. V. 10. № 1. P. 96–118.
- Wright J., Falk L.A., Wolfe L.G., Ogden J., Deinhardt F. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1977. V. 59. № 5. P. 1475–1478.
- Neubert R., Foerster M., Nogueira A.C., Helge H. // *Life Sci.* 1995. V. 58. № 4. P. 317–324.
- Brok H.P.M., Hornby R.J., Griffiths G.D., Scott L.A.M., Hart B.A. // *Cytometry.* 2001. V. 45. № 4. P. 294–303.
- Neumann B., Shi T., Gan L.L., Klippert A., Daskalaki M., Stolte-Leeb N., Stahl-Hennig C. // *J. Med. Primatol.* 2016. V. 45. № 3. P. 139–146.
- Nelson M., Loveday M. // *J. Immunol. Res.* 2014. ID 913632. P. 1–8.
- Reichert T., DeBruyère M., Deneys V., Tötterman T., Lydyard P., Yuksel F., Chapel H., Jewell D., Van Hove L., Linden J., et al. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1991. V. 60. № 2. P. 190–208.
- Chng W.J., Tan G.B., Kuperan P. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004. V. 11. № 1. P. 168–173.
- Yoshida T., Omatsu T., Saito A., Katakai Y., Iwasaki Y., Kurosawa T., Hamano M., Higashino A., Nakamura S., Takasaki T., et al. // *Arch. Virol.* 2013. V. 158. № 6. P. 1209–1220.
- Klinger A., Gebert A., Bieber K., Kalies K., Ager A., Bell E.B., Westermann J. // *Int. Immunol.* 2009. V. 21. № 4. P. 443–455.
- Galkina E., Tanousis K., Preece G., Tolaini M., Kioussis D., Florey O., Haskard D.O., Tedder T.F., Ager A. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 198. № 9. P. 1323–1335.
- Das A., Xu H., Wang X., Yau C.L., Veazey R.S., Pahar B. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 1. e16524.
- Sengstake S., Boneberg E.-M., Illges H. // *Int. Immunol.* 2006. V. 18. № 7. P. 1171–1178.