

МНОГОЦВЕТНЫЙ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ Т-КЛЕТОК И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ПО ЭКСПРЕССИИ $\alpha\beta$ -TCR И $\gamma\delta$ -TCR

Хайдуков С.В.¹, Зурочка А.В.², Черешнев В.А.³

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

² ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Росздрава, г. Челябинск

³ Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, г. Екатеринбург

Резюме. Т-лимфоциты играют важную роль в элиминации опухолевых клеток в реакциях трансплантат против хозяина и хозяин против трансплантата, гиперчувствительности замедленного типа и других реакциях организма, направленных на поддержание гомеостаза. Помимо молекул CD3 антиген-специфический Т-клеточный рецептор является другим пан-Т-клеточным маркером. Существует два отличных типа TcR — $\alpha\beta$ -TcR и $\gamma\delta$ -TcR, которые различаются в онтогенезе и функциональных свойствах. $\gamma\delta$ -Т-клетки играют значительную роль в защите организма от различных типов инфекций, и знание об их количественном составе должно быть неотъемлемой частью анализа иммунного статуса пациентов. Для этих целей следует использовать многоцветный анализ и следующие комбинации моноклональных антител: CD3/CD4/CD8/CD45 и $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/CD3/CD45. Применение многоцветного окрашивания и многоэтапного гейтирования позволяют провести многопараметрический анализ Т-клеток периферической крови с высокой точностью и достоверностью. Данный подход значительно облегчает интерпретацию полученных результатов и позволяет судить о функционировании иммунной системы больных при разнообразных патологических состояниях.

Ключевые слова: проточная цитометрия, Т-клетки, Т-клеточный рецептор, $\alpha\beta$ -TcR, $\gamma\delta$ -TcR.

Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshnev V.A.

MULTI-COLOUR CYTOMETRIC ANALYSIS. IDENTIFICATION OF T LYMPHOCYTES AND THEIR SUBSETS

Abstract. T-lymphocytes play an important role in elimination of tumor cells, in reactions of a transplant against graft and graft versus host disease, in slow-type hypersensitivity, and other reactions directed for maintenance of homeostasis. Along with CD3, an antigen-specific T-cellular receptor (TCR) is another common marker of T-cells. There are two types of TcR — $\alpha\beta$ -TcR and $\gamma\delta$ -TcR that differ in ontogenetic and functional properties. $\gamma\delta$ -T-cells play a significant role in protection of organism against various types of infections, and determination of their amounts should be an integral part of the analysis of patients' immune status. To these purposes, a multi-colour analysis should be used, applying the following combinations of monoclonal antibodies: CD3/CD4/CD8/CD45 and $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/

CD3/CD45. Multi-colour staining and multi-step gating allow of carrying out multiparametric analysis of peripheral blood with high accuracy and reliability. The proposed approach considerably facilitates interpretation of results obtained, and it allows of judging about immune system functioning in various pathological conditions. (*Med. Immunol., 2008, vol. 10, N 2-3, pp 115-124*)

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич

Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Тел.: (495) 336-02-55.

E-mail: khsv@mail.ibch.ru

Введение

Многие микроорганизмы являются внутриклеточными паразитами и, обитая внутри клеток организма-хозяина, недоступны для действующего начала гуморального иммунитета, т.е. антител. Облигатные внутриклеточные паразиты, в частности вирусы, способны размножаться только внутри клеток, используя репликационную систему клеток хозяина. Факультативные внутриклеточные микроорганизмы, такие как микобактерии и лейшмании, могут размножаться как в клетках, главным образом в макрофагах, так и вне клеток, но внутриклеточный способ существования для них более предпочтителен, поскольку обеспечивает защиту от факторов иммунной системы. Против данных микроорганизмов в организме действует особый механизм приобретенного иммунитета, а именно клеточный иммунитет. Он обеспечивается отдельной субпопуляцией лимфоцитов, получившей название Т-клетки. В отличие от В-клеток они дифференцируются в тимусе (Thymus), откуда и пошло их название. Т-лимфоциты специализируются на уничтожении клеток организма-хозяина, которые инфицированы размножающимися внутриклеточно возбудителями инфекции [1]. Т-лимфоциты играют важную роль в элиминации опухолевых клеток [43, 45], в реакциях трансплантат против хозяина [52, 60] и хозяин против трансплантата [25, 54], гиперчувствительности замедленного типа [39, 44] и других реакциях организма, направленных на поддержание гомеостаза.

Оценка как относительного, так и абсолютного количества Т-клеток и их основных субпопуляций получила широкое распространение в лабораторной практике. При фенотипировании лимфоцитов эти данные являются диагностически значимыми при различных патологических состояниях иммунной системы, включая первичные и вторичные иммунодефициты [2, 20, 41]. Динамика изменения субпопуляционного состава Т-клеток при некоторых патологиях представляет собой значительную ценность для контроля эффективности терапии, прогноза развития и течения заболевания.

Т-клетки и Т-клеточный рецептор

К маркерам, характеризующим линию Т-клеток, в первую очередь относится Т-клеточный рецептор (T-cell Receptor, TcR). Подобно В-лимфоцитам, Т-лимфоциты несут на своей поверхности специфический рецептор для распознавания антигена. Однако рецептор В-лимфоцитов представляет собой мембранос-

вязанный мономер Ig, а TcR является гетеродимером, состоящим из двух цепей с молекулярной массой 40-50 kDa, которые не являются продуктами генов иммуноглобулинов.

Существует два типа TcR, каждый из которых ассоциируется с разными типами Т-лимфоцитов. TcR1, состоящий из γ - и δ -цепей, появляется на ранних стадиях онтогенеза [3, 27]. TcR2 состоит из α - и β -цепей [61]. Каждая цепь образует два домена; один из них имеет относительно неизменную структуру, гомологичную характерной укладке цепи иммуноглобулинов [12], а другой обладает большей структурной изменчивостью, поскольку по своему строению напоминает вариабельные домены Ig (Fab-фрагмент).

Гены α - и β -цепей Т-клеточного рецептора организованы так же, как и гены иммуноглобулинов. Имеются также сегменты V, D и J и гены константных областей (C). Формирование иммунокомпетентных Т-клеток аналогично же сопровождается транслокацией фрагментов V, D и J с образованием непрерывной последовательности VDJ. Как и при синтезе иммуноглобулинов, образование мРНК предусматривает удаление интронов между VDJ и C.

Вариабельные области обеих цепей в эмбриональном наборе представлены 30-500 V-генами, 12-15 мини-генами D и 40-50 короткими J-сегментами. Гены константных областей представлены в виде одной копии. Случайное соединение внутри каждой группы генов любого V-гена с любым D, а затем J-сегментом приводит к возникновению около 5000 как α -, так и β -цепей. Спонтанная их ассоциация завершается образованием до 8 000 000 Т-лимфоцитов с различной специфичностью. Дополнительное разнообразие обеспечивается комбинациями V>D>J. Следует отметить, что уже выявлена специфичность отдельных вариантов V-сегмента TcR. Так, V β 17 является мишенью для суперантигена микоплазмы (MAS) и стафилококкового энтеротоксина В [21, 22], а V β 8 — для стафилококкового энтеротоксина Е [31]. Также было описано, что при инфицировании вирусом Эпштейна—Барр наблюдалась быстрая клональная пролиферация CD8⁺Т-клеток экспрессирующих TcR-V β 14 [63], хотя в норме TcR-V β 14 Т-клетки (рис. 1) составляют только 2-7% [62].

Примерно 81,4-98,4% Т-клеток представляют собой вариант $\alpha\beta$ -TcR, и обозначаются эти клетки как $\alpha\beta$ -Т-клетки. Остальные 1,6-8,9% Т-клеток несут на своей поверхности $\gamma\delta$ -TcR и обозначаются как $\gamma\delta$ -Т-клетки.

$\alpha\beta$ -Т-клетки подразделяются на две различные неперекрывающиеся субпопуляции. Клетки одной из них несут маркер CD4 и в основном

«помогают» в осуществлении иммунного ответа или «индуцируют» его. Данная субпопуляция получила название Т-хелперы. Т-клетки другой субпопуляции несут маркер CD8 и обладают преимущественно цитотоксической активностью.

Небольшая часть $\alpha\beta$ -Т-клеток не экспрессируют ни CD4, ни CD8. С другой стороны, большинство $\gamma\delta$ -Т-клеток, циркулирующих в периферической крови, также «дважды отрицательны». Однако некоторые из них все же экспрессируют молекулы CD8. Напротив, большая часть $\gamma\delta$ -Т-клеток в тканях экспрессируют CD8. Кроме молекулы CD8 $\gamma\delta$ -Т-клетки на своей поверхности могут экспрессировать CD56 [17, 26], CD94 [5], CD161 [5]. Также было продемонстрировано, что цитостатическую активность $\gamma\delta$ -Т-клеток возможно стимулировать через CD122 (β -цепь рецептора IL-2) [17].

$\gamma\delta$ -Т-клетки были изучены относительно недавно. Одной из особенностей $\gamma\delta$ -Т-клеток в отличие от $\alpha\beta$ -Т-клеток является то, что они распознают непептидные антигены, полученные из микробных патогенов, независимо от МНС [48, 49, 50, 51]. Данная субпопуляция клеток выполняет целый ряд важных функций, так они могут усиливать иммунный ответ, производя большие количества интерферона- γ (IFN γ), фактора некроза опухолей- α (TNF α) и хемокины [10, 38, 47]. Кроме этого, $\gamma\delta$ -Т-клетки имеют эффекторную (цитотоксическую) активность [14].

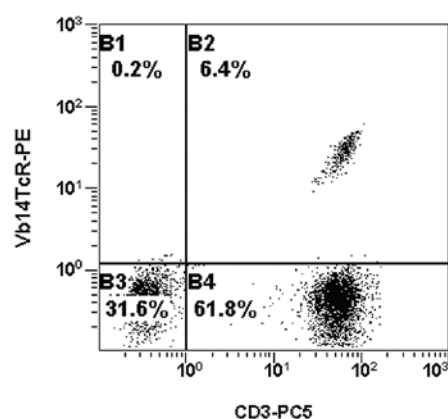


Рисунок 1. Двухпараметрические гистограммы распределения Т-клеток, экспрессирующих TcR-Vβ14. Квадрант B2 содержит клетки с фенотипом CD3⁺, TcR-Vβ14⁺

С эволюционной точки зрения, $\gamma\delta$ -Т-клетки занимают уникальное место между высокоспецифичными $\alpha\beta$ -Т-клетками и врожденной иммунной системой для выполнения защиты организма от патогенов. Экспериментальные данные показали, что роль $\gamma\delta$ -Т-клеток была весьма существенна в устойчивости организма против целого ряда микроорганизмов. Так, функциональную значимость $\gamma\delta$ -Т-клеток (табл. 1) отмечали в устойчивости к *Mycobacterium*, *Borellia*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* [10, 30, 46, 47]

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА $\gamma\delta$ -Т-КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И ПАТОЛОГИЯХ

Изменение относительного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток	Заболевание
Повышение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток	Вирусные инфекции:
	ВИЧ
	Цитомегаловирус
	Вирус Эпштейна–Барр
	Бактериальные инфекции:
	Туберкулез легких (<i>Mycobacterium</i>)
	Легионеллез (<i>Legionella</i>)
	Туляремия (<i>Francisella tularensis</i>)
	Сальмонеллез (<i>Salmonella</i>)
	Боррелиоз (болезнь Лайма) (<i>Borellia</i>)
	Атопический дерматит (у детей)
	Болезнь Корна
	Болезнь Бехчета
	Первичные иммунодефициты
Понижение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток	Атопический дерматит (у взрослых)
	Возрастное снижение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток

и вирусов [35, 58], включая ВИЧ [28, 53, 59]. Кроме того, $\gamma\delta$ -Т-клетки играют существенную роль и в противоопухолевом ответе [9, 15, 18, 29, 32], в частности было описано значительное увеличение этих клеток у пациентов с лимфомой [15]. $\gamma\delta$ -Т-клетки также вовлечены в восстановление эпителия и гомеостаз [7, 33, 36]. С другой стороны, $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть вовлечены в некоторые иммунопатологии типа диабета [34], аутоиммунные расстройства [26, 56, 65], болезнь Бехчета [64], а также астму [42, 57].

Содержание $\gamma\delta$ -Т-клеток в периферической крови может варьировать, в частности существуют половые и возрастные различия. Их количество увеличивается с момента рождения до половозрелости и в дальнейшем постепенно снижается. У женщин количество $\gamma\delta$ -Т-клеток несколько выше, и этот уровень сохраняется значительно дольше, чем у мужчин [8].

$\gamma\delta$ -Т-клетки обладают очень быстрой (начинающейся после 4-6 дней), высокой (в 200 раз) и длительной (> 7 месяцев) пролиферативной способностью в ответ на антиген [10]. Кроме того, в течение иммунного ответа антиген-специфические $\gamma\delta$ -Т-клетки могут составлять до 48-98% от общего количества циркулирующих $\gamma\delta$ -Т-клеток [10]. Таким образом, обнаружение увеличенной циркулирующей субпопуляции $\gamma\delta$ -Т-клеток может позволить сделать предложение о недавней или продолжающейся хронической стимуляции, особенно на слизистых оболочках или участках кожи. Эта информация позволяет клиницистам делать предположение о возможном медленно прогрессирующем инфекционном заболевании.

На клеточной поверхности $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -антиген-распознающие рецепторы Т-клеток располагаются непосредственно рядом с полипептидным комплексом, имеющим групповое название CD3. Это соседство и ассоциация с CD3 являются необходимым условием для экспрессии всего рецепторного комплекса на поверхности клеток.

Антиген CD3 представляет собой комплекс пяти инвариантных полипептидных цепей — γ , δ , ϵ , ζ и η , молекулярные массы которых составляют соответственно 25-28, 21, 20, 16 и 22 kDa. Полипептидная цепь ζ находится в CD3 комплексе как гомодимер, связанный дисульфидным мостиком, или как гетеродимер с η -цепью. Комплекс CD3 в свою очередь является частью значительно большего комплекса, который включает TcR. Этот комплекс экспрессируется зрелыми Т-клетками и тимоцитами. Активация Т-клеток может быть вызвана за счет взаимодействия TcR с антиген-представляющими клетками, несущими процессированный чужеродный антиген в комплексе

с антигенами МНС (главный комплекс гистосовместимости) I и II класса [13].

CD3 ζ -цепь, ассоциированная с комплексом CD3/TcR, экспрессируется не только на зрелых Т-клетках, но и на TcR-отрицательных тимоцитах [11]. CD3 ζ - и CD3 η -цепи являются альтернативного сплайсинга отдельного гена определяющего CD3 ζ/η . Этот ген играет существенную роль для внутритимической дифференцировки Т-клеток [40]. Фенотипические изменения, как известно, происходят в человеческом тимусе после колонизации его гемопоэтическими стволовыми клетками [23]. На 8 неделю беременности тимоциты человека имеют фенотип CD4⁺CD8⁺ и CD3 $\epsilon\delta\beta\zeta$ -положительные.

CD3 ζ -цепь экспрессируется также НК-клетками и большинством (< 90%) клонов клеток являющихся производными от децидуальных гранулярных лимфоцитов, которые CD3-отрицательны [19].

Приведенные выше факты свидетельствуют в пользу того, что для более полной характеристики Т-клеток пациента анализ следует проводить не только по такому линейно-специфическому маркеру как CD3, но и по наличию субпопуляций $\alpha\beta$ -Т-клеток и $\gamma\delta$ -Т-клеток. Важность определения последних становится очевидной для целого ряда заболеваний. В первую очередь к ним относятся такие заболевания, как ВИЧ-инфекция, вторичные и первичные иммунодефицитные состояния, сопровождающиеся длительной персистенцией микроорганизмов в организме человека на фоне депрессии Т-клеточного звена иммунной системы. И особенно важным становится определение $\gamma\delta$ -Т-клеток при оценке общего количества Т-клеток в тех случаях, когда от их количества зависит доза назначаемых препаратов (например, назначение антиретровирусной терапии ВИЧ-инфицированным пациентам).

Иммунотипирование $\alpha\beta$ -Т-клеток и $\gamma\delta$ -Т-клеток периферической крови

Количественный анализ Т-клеток является наиболее требуемым исследованием для иммунологического контроля состояний приобретенного иммунодефицита (СПИД), мониторинга как за пациентами после трансплантации костного мозга, так и эффективности иммунодепрессивной терапии. Стандартные протоколы иммунофенотипирования, использующие четыре цвета, позволяют проводить идентификацию субпопуляций Т-лимфоцитов в одном образце [55] (рис. 2). Этот анализ предоставляет исследователю намного больше информации, но до последнего времени она находилась вне зоны внимания клиницистов.

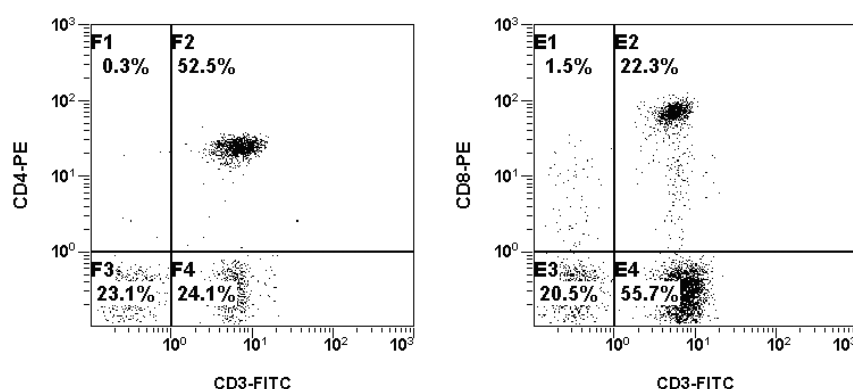


Рисунок 2. Двухпараметрические гистограммы распределения Т-клеток и их субпопуляций, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови с использованием комбинации моноклональных антител CD3/CD4/CD8/CD45. Анализ проводили с использованием гейтирования по CD45

Так, при использовании комбинации моноклональных антител CD3/CD4/CD8/CD45 при обычном анализе периферических Т-клеток достаточно часто наблюдается бимодальное распределение экспрессии CD3, которое предполагает наличие двух отличных субпопуляций Т-клеток (рис. 3А). Помимо молекул CD3 антиген-специфический Т-клеточный рецептор является другим пан-Т-клеточным маркером, который необходимо использовать при анализе пациентов с иммунологическими расстройствами. Как было описано выше, существует два отличных типа ТсR — $\alpha\beta$ -ТсR и $\gamma\delta$ -ТсR, которые различаются в онтогенезе и функциональных свойствах. В медицинской практике, как правило, внимание клиницистов сосредоточено, прежде всего, на $\alpha\beta$ -Т-клетках, которые составляют большую часть Т-лимфоцитов. Остаточные около 5% $\gamma\delta$ -Т-клеток, как правило, выпадают из зоны внимания клиницистов, и эти клетки рассматривали исключительно при исследова-

нии иммунитета слизистых оболочек [4, 6, 16] и в тимусе [24].

Однако, как было показано выше, $\gamma\delta$ -Т-клетки играют значительную роль в защите организма от различных типов инфекций, и знание об их количественном составе должно быть неотъемлемой частью анализа иммунного статуса пациентов.

Комбинация моноклональных антител CD3/CD4/CD8/CD45 дает не только основную информацию о наличии Т-клеток и их основных субпопуляций, но и позволяет обратить внимание на неоднородность распределения CD3-молекулы, если она есть (рис. 3). В этом случае необходимо проверить контрольную сумму CD3⁺ клеток (CD4⁺ + CD8⁺ должно равняться общему количеству CD3⁺). В случае если контрольная сумма не совпадает с общим количеством CD3⁺ лимфоцитов, следует проверить субпопуляционный состав Т-клеток на наличие $\alpha\beta$ -ТсR и $\gamma\delta$ -ТсR.

Данный этап необходим, так как большинство $\gamma\delta$ -Т-клеток, циркулирующих в периферической

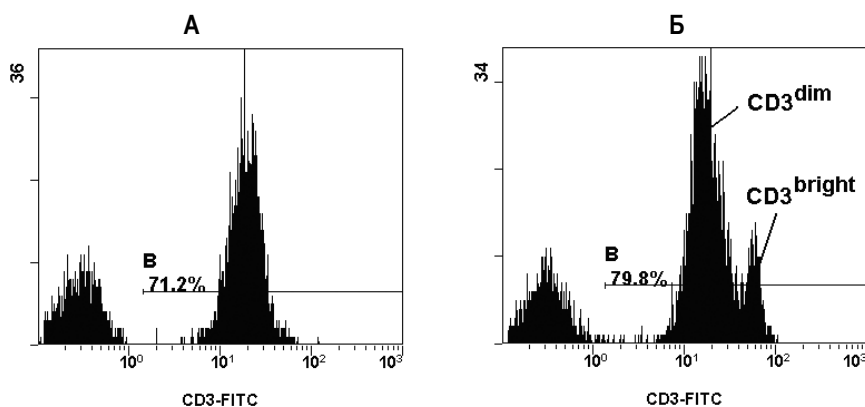


Рисунок 3. Однопараметрические гистограммы распределения Т-клеток по плотности CD3 на их поверхности. А – распределение CD3 позитивных Т-клеток у здорового донора. Б – распределение CD3 позитивных Т-клеток у пациента с вирусом Эпштейна-Барр

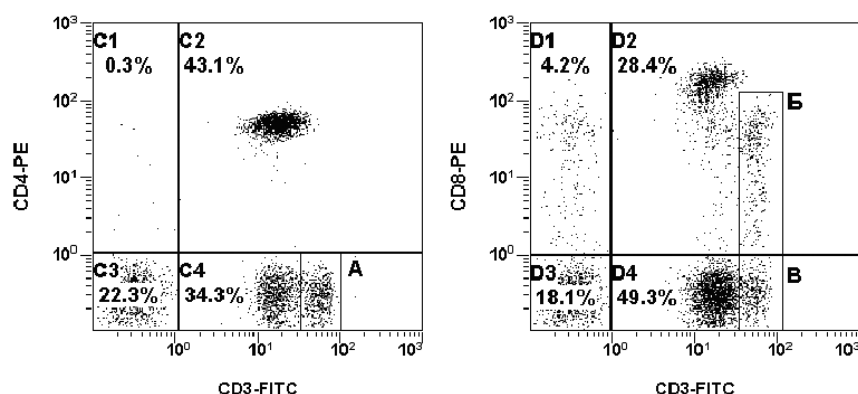


Рисунок 4. Двухпараметрические гистограммы распределения Т-клеток и их субпопуляций, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови пациента с хроническим носительством вируса Эпштейна–Барр. В зонах А, Б и В находятся $CD3^{bright}$ Т-клетки

крови «дважды отрицательны». Другая их особенность заключается в том, что они имеют более высокую плотность экспрессии молекулы CD3 на своей поверхности ($CD3^{bright}$, рис. 3). На рисунке 4 изображено достаточно часто встречающееся распределение $CD3^{+}$ лимфоцитов при бактериальных и вирусных инфекциях, первичных и вторичных иммунодефицитах. Как видно из рисунка 4, клетки, находящиеся в зонах А, Б и В, экспрессируют высокий уровень CD3. В свою очередь, клетки в зоне А имеют фенотип $CD3^{bright}CD4^{-}$, в зоне Б — $CD3^{bright}CD8^{dim}$ и в зоне В — $CD3^{bright}CD8^{-}$. Все эти признаки характерны для $\gamma\delta$ -Т-клеток [37].

Чтобы выявить $\gamma\delta$ - и $\alpha\beta$ -Т-клеток, как правило, используют следующую комбинацию моноклональных антител $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/CD3/CD45.

На рисунке 5 представлены гистограммы распределения Т-клеток, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови пациента с хроническим носительством вируса Эпштейна–Барр. На рисунке 5А в квадранте F2 находятся $\gamma\delta$ -Т-клетки, на рисунке 5Б в квадранте E2 — $\alpha\beta$ -Т-клетки.

Таким образом, все изложенное выше свидетельствует в пользу того, что для наиболее полной фенотипической характеристики Т-клеток необходимо проводить анализ не только линейно-специфичного маркера Т-клеток CD3, но и определять субпопуляционный состав Т-клеток по экспрессии Т-клеточного рецептора, а именно $\gamma\delta$ - и $\alpha\beta$ -TcR. Для этих целей следует использовать многоцветный анализ и следующие комбинации моноклональных ан-

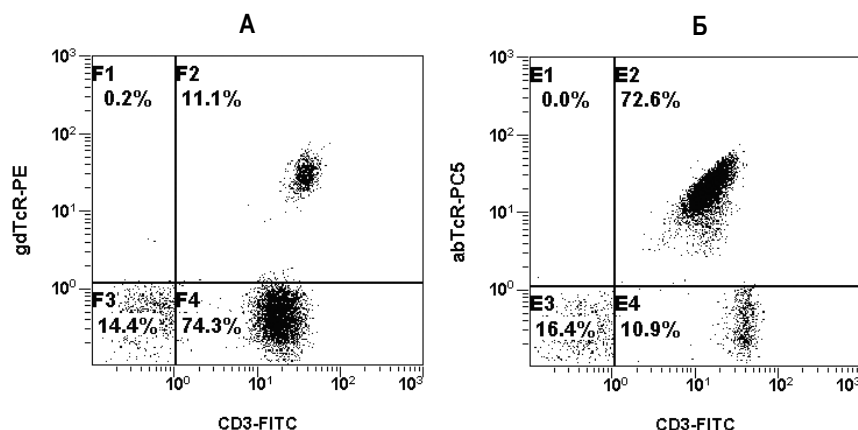


Рисунок 5. Двухпараметрические гистограммы распределения $\alpha\beta$ -TcR и $\gamma\delta$ -TcR на Т-клетках, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови пациента с хроническим носительством вируса Эпштейна–Барр

тител: CD3/CD4/CD8/CD45 и $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/CD3/CD45.

Более полная информация об экспрессии Т-клеточного рецептора в клинической практике значительно расширяет возможности для анализа состояния Т-клеточного звена иммунной системы не только с точки зрения адекватного выявления его дефектов, но и для правильного назначения химиотерапевтических препаратов, направленных на восстановление нормального функционирования защитных систем организма.

Список литературы

1. Робсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии // М.: Мир, 2006. — 320 с.
2. 1994 revised guidelines for the performance of CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infections // MMWR Recomm. Rep. — 1994. — Vol. 43, N RR-3. — P. 1-21.
3. Autran B., Triebel F., Katlama C., Rozenbaum W., Hercend T., Debre P. T cell receptor gamma/delta⁺ lymphocyte subsets during HIV infection // Clin. Exp. Immunol. — 1989. — Vol. 75, N 2. — P. 206-210.
4. Bagriacik E.U., Okabe M., Klein J.R. Origins of intestinal intraepithelial lymphocytes: direct evidence for a thymus-derived gamma delta T cell component // Immunol. Lett. — 2000. — Vol. 75. — P. 77-83.
5. Battistini L., Borsellino G., Sawicki G., Poccia F., Salvetti M., Ristori G., Brosnan C.F. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors // J. Immunol. — 1997. — Vol. 159, N 8. — P. 3723-3730.
6. Beagley K.W., Husband A.J. Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function // Crit. Rev. Immunol. — 1998. — Vol. 18. — P. 237-254.
7. Born W.K., Lahn M., Takeda K., Kanehiro A., O'Brien R.L., Gelfand E.W. Role of gammadelta T cells in protecting normal airway function // Respir. Res. — 2000. — Vol. 1. — P. 151-158.
8. Caccamo N., Dieli F., Wesch D., Jomaa H., Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells // J. Leukoc. Biol. — 2006. — Vol. 79, N 4. — P. 663-666.
9. Chen J., Niu H., He W., Ba D. Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes // Int. Arch. Allergy. Immunol. — 2001. — Vol. 125. — P. 256-263.
10. Chen Z.W., Letvin N.L. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm // Trends. Immunol. — 2003. — Vol. 24. — P. 213-219.
11. Davis M.M. T cell receptor gene diversity and selection // Annu. Rev. Biochem. — 1990. — Vol. 59. — P. 475-496.
12. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition // Nature. — 1988. — Vol. 334, N 6181. — P. 395-402.
13. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z., Lyons D., Hampl J., Arden B., Chien Y. Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptors // Annu. Rev. Immunol. — 1998. — Vol. 16. — P. 523-544.
14. Dieli F., Troye-Blomberg M., Ivanyi J., Fourni J.J., Krensky A.M., Bonneville M., Peyrat M.A., Caccamo N., Sireci G., Salerno A. Granulysin-independent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by gamma9/Vdelta2 T lymphocytes // J. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 184. — P. 1082-1085.
15. Ferrarini M., Ferrero E., Dagna L., Poggi A., Zocchi M.R. Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer // Trends. Immunol. — 2002. — Vol. 23. — P. 14-18.
16. Ferrick D.A., King D.P., Jackson K.A., Braun R.K., Tam S., Hyde D.M., Beaman B.L. Intraepithelial gamma delta T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers // Springer. Semin. Immunopathol. — 2000. — Vol. 22. — P. 283-296.
17. Fujimiya Y., Suzuki Y., Katakura R., Miyagi T., Yamaguchi T., Yoshimoto T., Ebina T. In vitro interleukin 12 activation of peripheral blood CD3(+) CD56(+) and CD3(+)CD56(-) gammadelta T cells from glioblastoma patients // Clin. Cancer. Res. — 1997. — Vol. 3, N 4. — P. 633-643.
18. Girardi M., Oppenheim D.E., Steele C.R., Lewis J.M., Glusac E., Filler R., Hobby P., Sutton B., Tigelaar R.E., Hayday A.C. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells // Science. — 2001. — Vol. 294. — P. 605-609.
19. Gudelj L., Deniz G., Rukavina D., Johnson P.M., Christmas S.E. Expression of functional molecules by human CD3⁻ decidual granular leukocyte clones // Immunology. — 1996. — Vol. 87, N 4. — P. 609-615.
20. Guidelines for the performance of CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection // MMWR Recomm. Rep. — 1992. — Vol. 41 (RR-8). — P. 1-17.
21. Hayball J.D., Lake R.A. Altered superantigenic ligands demonstrate the quantitative nature of T-cell activation // Immunol. Cell Biol. — 2000. — Vol. 78, N 6. — P. 623-632.

22. Hayball J.D., Lake R.A. Partial T cell activation with an altered superantigenic ligand // *Immunol. Cell Biol.* — 2000. — Vol. 78, N 1. — P. 13-19.
23. Haynes B.F., Heinly C.S. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment // *J. Exp. Med.* — 1995. — Vol. 181, N 4. — P. 1445-1458.
24. Helgeland L., Brandtzaeg P., Rolstad B., Vaage J.T. Sequential development of intraepithelial gamma delta and alpha beta T lymphocytes expressing CD8 alpha beta in neonatal rat intestine: requirement for the thymus // *Immunology.* — 1997. — Vol. 92. — P. 447-455.
25. Hummel S., Wilms D., Vitacolonna M., Zöller M. Donor T cell and host NK depletion improve the therapeutic efficacy of allogeneic bone marrow cell reconstitution in the nonmyeloablatively conditioned tumor-bearing host // *Leukoc. Biol.* — 2002. — Vol. 72, N 5. — P. 898-912.
26. Ichikawa Y., Shimizu H., Yoshida M., Takaya M., Arimori S. T cells bearing gamma/delta T cell receptor and their expression of activation antigen in peripheral blood from patients with Sjogren's syndrome // *Clin. Exp. Rheumatol.* — 1991. — Vol. 9. — P. 603-609.
27. Jarry A., Cerf-Bensussan N., Brousse N., Selz F., Guy-Grand D. Subsets of CD3⁺ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3⁻ lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood // *Eur. J. Immunol.* — 1990. — Vol. 20, N 5. — P. 1097-1103.
28. Kabelitz D., Wesch D. Role of gamma delta T-lymphocytes in HIV infection // *Eur. J. Med. Res.* — 2001. — Vol. 6. — P. 169-174.
29. Kato Y., Tanaka Y., Miyagawa F., Yamashita S., Minato N. Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 167, N 9. — P. 5092-5098.
30. Kawashima T., Norose Y., Watanabe Y., Enomoto Y., Narazaki H., Watari E., Tanaka S., Takahashi H., Yano I., Brenner M.B., Sugita M. Major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guerrin is mediated by CD1 molecules // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 170. — P. 5345-5348.
31. Kelsen J., Agnholt J., Hoffmann H.J., Kaltoft K., Dahlerup J.F. Increased expression of TCR Vbeta5.1 and 8 in mucosal T-cell lines cultured from patients with Crohn disease // *Scand. J. Gastroenterol.* — 2004. — Vol. 39, N 3. — P. 238-245.
32. Kobayashi H., Tanaka Y., Yagi J., Toma H., Uchiyama T. Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma // *Cancer. Immunol. Immunother.* — 2001. — Vol. 50. — P. 115-124.
33. Komano H., Fujiurat Y., Kawaguchi M., Matsumoto S., Hashimoto Y., Obana S., Mombaerts P., Tonegawa S., Yamamoto H., Itohara S., Nanno M., Ishikawa H. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 6147-6151.
34. Kretowski A., Mysliwiec J., Szelachowska M., Turowski D., Wysocka J., Kowalska I., Kinalska I. Gammadelta T-cells alterations in the peripheral blood of high risk diabetes type 1 subjects with subclinical pancreatic B-cells impairment // *Immunol. Lett.* — 1999. — Vol. 68. — P. 289-293.
35. Lafarge X., Merville P., Cazin M.C., Berg F., Potaux L., Moreau J.F., Déchanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role // *J. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 184. — P. 533-541.
36. Lahn M., Kanehiro A., Takeda K., Joetham A., Schwarze J., Köhler G., O'Brien R., Gelfand E.W., Born W. Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells // *Nat. Med.* — 1999. — Vol. 5. — P. 1150-1156.
37. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells // *Cytometry B Clin. Cytom.* — 2004. — Vol. 61, N 1. — P. 45-53.
38. Lehner T., Mitchell E., Bergmeier L., Singh M., Spallek R., Cranage M., Hall G., Dennis M., Villinger F., Wang Y. The role of gammadelta T cells in generating antiviral factors and beta-chemokines in protection against mucosal simian immunodeficiency virus infection // *Eur. J. Immunol.* — 2000. — Vol. 30. — P. 2245-2255.
39. Lesterhuis W.J., de Vries I.J., Schuurhuis D.H., Boullart A.C., Jacobs J.F., de Boer A.J., Scharenborg N.M., Brouwer H.M., van de Rakt M.W., Figdor C.G., Ruers T.J., Adema G.J., Punt C.J. Vaccination of colorectal cancer patients with CEA-loaded dendritic cells: antigen-specific T cell responses in DTH skin tests // *Ann. Oncol.* — 2006. — Vol. 17, N 6. — P. 974-980.
40. Malissen M., Gillet A., Rocha B., Trucy J., Vivier E., Boyer C., Köntgen F., Brun N., Mazza G., Spanopoulou E., Guy-Grand D., Malissen B. T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene // *EMBO J.* — 1993. — Vol. 12, N 11. — P. 4347-4355.
41. Mandy F.F., Nicholson J.K., McDougal J.S. Guidelines for performing single-platform absolute CD4⁺ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus // *MMWR Recomm. Rep.* — 2003. — Vol. 52, N RR-2. — P. 1-13.
42. McClanahan J., Fukushima P.I., Stetler-Stevenson M. Increased peripheral blood gamma delta T-cells in patients with lymphoid neoplasia: a diagnostic dilemma in flow cytometry // *Cytometry.* — 1999. — Vol. 38. — P. 280-285.

43. McMahan R.H., Slansky J.E. Mobilizing the low-avidity T cell repertoire to kill tumors // *Semin. Cancer. Biol.* — 2007. — Vol. 17, N 4. — P. 317-329.
44. Meth M.J., Sperber K.E. Phenotypic diversity in delayed drug hypersensitivity: an immunologic explanation // *Mt. Sinai. J. Med.* — 2006. — Vol. 73, N 5. — P. 769-776.
45. Milasienė V., Stratilaitovas E., Norkienė V. The importance of T-lymphocyte subsets on overall survival of colorectal and gastric cancer patients // *Medicina (Kaunas).* — 2007. — Vol. 43, N 7. — P. 548-554.
46. Mogues T., Goodrich M.E., Ryan L., LaCourse R., North R.J. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice // *J. Exp. Med.* — 2001. — Vol. 193. — P. 271-280.
47. Moore T.A., Moore B.B., Newstead M.W., Standiford T.J. Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella pneumoniae* // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — P. 2643-2650.
48. Morita C.T., Beckman E.M., Bukowski J.F., Tanaka Y., Band H., Bloom B.R., Golan D.E., Brenner M.B. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ -T cells // *Immunity.* — 1995. — Vol. 3. — P. 495-507.
49. Morita C.T., Lee H.K., Leslie D.S., Tanaka Y., Bukowski J.F., Märker-Hermann E. Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human $\gamma\delta$ -T cells // *Microbes. Infect.* — 1999. — Vol. 1. — P. 175-186.
50. Morita C.T., Mariuzza R.A., Brenner M.B. Antigen recognition by human $\gamma\delta$ -T cells: pattern recognition by the adaptive immune system // *Springer. Semin. Immunopathol.* — 2000. — Vol. 22. — P. 191-217.
51. Morita C.T., Tanaka Y., Bloom B.R., Brenner M.B. Direct presentation of non-peptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ -T cells // *Res. Immunol.* — 1996. — Vol. 147. — P. 347-353.
52. Paz Morante M., Briones J., Canto E., Sabzevari H., Martino R., Sierra J., Rodriguez-Sanchez J.L., Vidal S. Activation-associated phenotype of CD3 T cells in acute graft-versus-host disease // *Clin. Exp. Immunol.* — 2006. — Vol. 145, N 1. — P. 36-43.
53. Pellegrin J.L., Taupin J.L., Dupon M., Ragnaud J.M., Maugein J., Bonneville M., Moreau J.F. Gammadelta T cells increase with *Mycobacterium avium* complex infection but not with tuberculosis in AIDS patients // *Int. Immunol.* — 1999. — Vol. 11. — P. 1475-1478.
54. Ramos A., López-Hoyos M., Labrador M., González M., Rodríguez-Sánchez J.L., Merino J. Host H-2 haplotype modulates the induction of host-versus-graft disease after the induction of neonatal tolerance to H-2 alloantigens // *Int. J. Mol. Med.* — 1998. — Vol. 1, N 2. — P. 431-437.
55. Reimann K.A., O'Gorman M.R., Spritzler J., Wilkening C.L., Sabath D.E., Helm K., Campbell D.E. Multisite comparison of CD4 and CD8 T-lymphocyte counting by single-versus multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2000. — Vol. 7. — P. 344-351.
56. Robak E., Blonski J.Z., Bartkowiak J., Niewiadomska H., Sysa-Jedrzejowska A., Robak T. Circulating TCR gammadelta cells in the patients with systemic lupus erythematosus // *Mediators. Inflamm.* — 1999. — Vol. 8. — P. 305-312.
57. Schramm C.M., Puddington L., Yiamouyannis C.A., Lingenheld E.G., Whiteley H.E., Wolyniec W.W., Noonan T.C., Thrall R.S. Proinflammatory roles of T-cell receptor (TCR) gammadelta and TCRalphabeta lymphocytes in a murine model of asthma // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 22. — P. 218-225.
58. Selin L.K., Santolucito P.A., Pinto A.K., Szomolanyi-Tsuda E., Welsh R.M. Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166. — P. 6784-6794.
59. Sindhu S.T., Ahmad R., Morisset R., Ahmad A., Menezes J. Peripheral blood cytotoxic gammadelta T lymphocytes from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection and AIDS lyse uninfected CD4⁺ T cells, and their cytotoxic potential correlates with viral load // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 1848-1855.
60. Sun C.F., Hsieh Y.Y., Ngan K.W., Wang W.T. Search for immunomodulatory effects of blood transfusion in gastric cancer patients: flow cytometry of Th1/Th2 cells in peripheral blood // *Ann. Clin. Lab. Sci.* — 2001. — Vol. 31, N 2. — P. 171-178.
61. Trejdosiewicz L.K., Smart C.J., Oakes D.J., Howdle P.D., Malizia G., Campana D., Boylston A.W. Expression of T-cell receptors TcR1 (gamma/delta) and TcR2 (alpha/beta) in the human intestinal mucosa // *Immunology.* — 1989. — Vol. 68, N 1. — P. 7-12.
62. Van den Beemd R., Boor P.P., van Lochem E.G., Hop W.C., Langerak A.W., Wolvers-Tettero I.L., Hooijkaas H., van Dongen J.J. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls // *Cytometry.* — 2000. — Vol. 40, N 4. — P. 336-345.
63. Wada T., Kurokawa T., Toma T., Shibata F., Tone Y., Hashida Y., Kaya H., Yoshida T., Yachie A. Immunophenotypic analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-infected CD8(+) T cells in a patient with EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis // *Eur. J. Haematol.* — 2007. — Vol. 79, N 1. — P. 72-75.

64. Yamashita N., Kaneoka H., Kaneko S., Takeno M., Oneda K., Koizumi H., Kogure M., Inaba G., Sakane T. Role of gammadelta T lymphocytes in the development of Behçet's disease // Clin. Exp. Immunol. – 1997. – Vol. 107, N 2. – P. 241-247.

65. Yin Z., Craft J. Gamma delta T cells in autoimmunity // Springer Semin. Immunopathol. – 2000. – Vol. 22. – P. 311-320.

*поступила в редакцию 18.02.2008
принята к печати 25.02.2008*