

РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ КЛИНИКО- ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Хайдуков С.В.¹, Зурочка А.В.²

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

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

Резюме. Целью данной статьи было ознакомить широкий круг специалистов с новыми разработками метода проточной цитометрии, нашедшими применение в медико-биологической практике для возможности последующего внедрения их в практическую работу. К ним можно отнести следующее: определение антиген-специфических клеток с использованием технологии тетрамеров, цитометрическое определение цитокинов в биологических жидкостях, определение чувствительности базофилов *in vitro* в ответ на действие аллергенов, определение по мембранным маркерам хелперов первого типа и Т-регуляторных клеток. Используя многопараметрический анализ, многоэтапное «гейтирование» и новые технологии, проточная цитометрия позволяет локализовать и отследить большинство процессов в результате развития иммунного ответа. Изучив его протекание, мы получаем возможность адекватно реагировать на все изменения, разрабатывать новые подходы к коррекции активности патологически измененных клеток и процессов, которые они определяют.

Ключевые слова: проточная цитометрия, тетрамеры, базофилы, цитокины, мультиплексный анализ.

Khaidukov S.V., Zurochka A.V.

EXPANSION OF OPPORTUNITIES OF THE FLOW CYTOMETRY METHOD FOR CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PRACTICE

Abstract. The purpose of this article was to make a broad audience of experts familiar to new developments in the method of flow cytometry that have found applications in medical and biologic studies, in order of their further implementation into everyday practice. These applications include the following approaches: detection of antigen-specific T-cells by using of tetramer technology, flow cytometric determination of cytokines in biological liquids, determination of *in vitro* sensitivity of basophilic granulocytes to allergen effects, detection of Th1 and T-reg cells by their cell surface markers. When using multi-parametric analysis, a multi-step gating and other new technologies, the flow cytometry technique allows of location and tracing the majority of processes occurring in development of immune response. When studying these dynamic events, we get an opportunity to react adequately to appropriate changes, and to develop new approaches to correct altered cellular activities, that they should determinate. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 5-12)

Проточная цитометрия как многопрофильная технология быстрого анализа все шире и шире входит в медико-биологическую практику. В свою

очередь, методологическая база проточной цитометрии продолжает интенсивно развиваться, и ее применение уже не ограничивается только определением мембранных маркеров, мониторингом иммунного статуса [10, 19, 36], диагностикой лейкозов и лимфопролиферативных заболеваний [1, 3, 28]. В последнее время появился целый ряд новых приложений данной технологии, которые, используя многоцветный анализ, получили широкое распространение и активно входят в практику медико-биологических исследований.

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.

К ним можно отнести следующее: определение антиген-специфических клеток с использованием технологии тетрамеров [31], цитометрическое определение цитокинов внутри клеток [12] и в биологических жидкостях [9], определение чувствительности базофилов *in vitro* в ответ на действие аллергенов [7] и многое другое.

Многopараметрический, многоцветный анализ позволяет не только определить наличие тех или иных маркеров популяции клеток в исследуемом образце, но и локализовать и полностью охарактеризовать отдельные субпопуляции. Это стало возможно за счет «гейтирования» (от английского «gate» – ворота), то есть за счет введения логических ограничений в протокол исследования. Под термином «гейтирование» мы понимаем зону анализа популяции клеток с заданными характеристиками. «Гейтирование» может быть многоступенчатым. Примером этого может служить анализ распределения CD38, CD62L, CD95 и HLA-DR маркеров на CD4⁺T-лимфоцитах, экспрессирующих рецепторы CD25 в разной плотности [4].

Целью данной статьи было ознакомить широкий круг специалистов с новыми разработками для возможности последующего внедрения их в практическую работу.

Технология тетрамеров. Антиген-специфические CD8⁺T-клетки играют существенную роль в устранении вирусных инфекций и клеток опухолей [15, 23]. Поэтому появление методов их детекции, с учетом наиболее полной характеристики этих клеток, позволяют наиболее точно расшифровать механизмы адаптивного (специфического) клеточного иммунного ответа [23]. Возможность локализовать и охарактеризовать антиген-специфические CD8⁺T-клетки стала возможна только в последнее время благодаря использованию тетрамеров. В основе этой технологии лежит создание тетрамеров главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, с помощью которых стала возможной визуализация антиген-специфических CD8⁺T-клеток [31].

Тетрамер МНС – это комплекс четырех молекул МНС, которые ассоциированы со специфическим пептидом и помечены флуоресцентным красителем. Аффинность взаимодействия молекул МНС с T-клеточным рецептором (TCR) невысока, поэтому необходима мультимеризация мономера в тетрамерную молекулу. Такой тетрамер значительно эффективнее взаимодействует с TCR на лимфоцитах и позволяет детектировать клетки, специфичные к данному комплексу пептида и молекул МНС. Для того, чтобы получить тетрамер, поступают следующим образом. Рекомбинантные мономерные молекулы МНС конъюгируют с биотином и ассоциируют

со специфическим пептидом. Данные комплексы объединяют в тетрамер за счет молекул стрептавидина, который имеет четыре активных центра. Так как стрептавидин до получения тетрамера мечен флуорохромом, то регистрируют именно его флуоресценцию.

Существенными недостатками использования технологии тетрамеров являются эпитопная специфичность и МНС-рестрикция. Для развития T-клеточного ответа требуется одновременное распознавание специфического пептида и молекулы МНС. Это означает, что T-клетка распознает антиген только в том случае, если он представлен МНС-молекулой соответствующего гаплотипа. Таким образом, необходимо знать МНС-фенотип пациента и выбирать тетрамеры, соответствующие его гаплотипу. С другой стороны, чтобы охватить всю интересующую популяцию индивидов, необходимо использовать панели разных тетрамеров в соответствии с частотой встречаемости разных аллелей МНС. Иными словами, если мы имеем дело с однородными национальными группами людей, то достаточно просто создать тетрамеры, специфичные практически для всей популяции. В свою очередь, если исследование проводится на многонациональной популяции, с большим количеством детей от смешанных браков, необходимо иметь широкую панель тетрамеров в соответствии с встречающимися в данной популяции аллелями МНС.

Применение технологии тетрамеров на лабораторных животных, в клинических исследованиях привело к значительному прогрессу в понимании основного механизма дифференцирования и формирования долговременной памяти CD8⁺T-клеток [23, 24, 46]. Такие исследования, несомненно, приведут к новой стратегии как минимум для иммунотерапии опухолей и окажут влияние на механизмы получения новых вакцин.

Не смотря на то, что технология МНС-тетрамеров широко использовалась в научных исследованиях для анализа фенотипа и функций CD8⁺T-клеток [31], в медицинской практике этому значительно препятствовали сложности получения тетрамеров [5] и дороговизна реагентов коммерческого происхождения. Однако позднее была разработана упрощенная процедура для подготовки тетрамеров [16] в случае исследования HCMV-специфических CD8⁺T-клеток [17, 47, 49].

Таким образом, на сегодняшний день созданы значительные предпосылки для внедрения технологии тетрамеров в широкую клиническую практику для количественной оценки антиген-специфических эффекторных цитотоксических клеток. Необходимость определения последних очень важна для назначения этиотропной тера-

пии (например, для прогноза и лечения HCMV-инфекции в трансплантологии, при патологии, связанной только с клеточными типами реакции иммунной системы и т.д.).

Мультиплексный анализ содержания цитокинов в биологических жидкостях и супернатантах клеточных культур методом проточной цитометрии. Мультиплексный анализ представляет собой метод, позволяющий в одном образце идентифицировать и количественно определить сразу несколько аналитов. Возможность проточной цитометрии различать индивидуальные микросферы на основе размера, интенсивности флуоресценции и/или длин волн флуоресценции позволяет проводить мультиплексные анализы. Использование микросфер, отличающихся по размерам, для мультиплексного анализа было описано для различных аналитов и в многочисленных публикациях [6, 25, 26]. Однако дискриминация микросфер по флуоресценции описана сравнительно недавно [14, 22].

В основе мультиплексного анализа лежит принцип, подобный ELISA. Микросферы с конъюгированными антителами к определенным цитокинам или каким-либо другим белкам добавляют к жидкости, содержащей исследуемые антигены. Происходит взаимодействие антиген-антитело. После этого добавляют вторые антитела, направленные против другого эпитопа данного антигена, связанные с биотином, и полученный комплекс проявляют конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин или каким-либо другим флуорохромом.

Таким образом, если взять два типа микросфер, различающихся как по размерам (4,4 мкм и 5,5 мкм), так и по интенсивности флуоресценции (каждый тип флуоросфер имеет 5 вариантов интенсивности флуоресценции в определенной области спектра), их можно разнести на разные гистограммы, отображающие частицы одного размера. В свою очередь, если каждый тип флуоросфер (различающихся одновременно по размерам и флуоресценции) несет антитела к определенному объекту, появляется возможность определить в одном образце наличие сразу 10 цитокинов или каких-либо других растворимых факторов. Значения интенсивности флуоресценции сравнивают с калибровкой и в результате получают концентрацию исследуемых аналитов в растворе [9]. Существует возможность значительно увеличить количество исследуемых аналитов при использовании данного подхода. Например, если взять сразу нескольких типов микросфер с разными диаметрами, то можно в одном образце одновременно определять до 100 видов различных белков.

Данные, полученные путем определения концентрации цитокинов в сыворотке на основе

микросфер, вполне сопоставимы с результатами, полученными с использованием ELISA [35].

Мультиплексный анализ с успехом был применен и к другим объектам, таким как β_2 -микроглобулин [6], ростовые факторы [29], существуют наборы для определения Th1/Th2-клеток и кардиоваскулярная панель (Bender MedSystems GmbH, Австрия) и т.д.

Реагенты для мультиплексного анализа производят целый ряд фирм, такие как Bender MedSystems GmbH (Австрия), Becton Dickinson (США), LINCO Research, Inc. (США), Bio-Rad Laboratories, Inc. (США), R&D Systems, Inc. (США), BioSource International, Inc. (США) и др.

Все это уже сегодня позволяет широко применять этот методический подход и значительно удешевить аналитическое определение различных субстратов в исследуемом материале (кровь, сыворотка крови, выделения человека и животных, супернатанты клеточных культур и т.д.). Мультиплексный анализ увеличивает скорость и точность исследования, а в некоторых случаях и повышает чувствительность методов за счет того, что проточная цитометрия обладает огромной производительностью. Таким образом, использование данного подхода позволит значительно расширить возможности лабораторной аналитики, особенно при массовых многоплановых (многопараметровых) обследованиях.

Определение Th2-клеток по мембранным маркерам. До последнего времени наличие Th1 и Th2-клеток определяли исключительно по продукции внутриклеточных цитокинов [11, 33, 37, 38], поскольку не было известно мембранных маркеров, характерных для каждого из этих типов Т-клеток. Однако в последнее время в результате поиска молекул, различающих Th1 от Th2-клеток, были получены антитела, которые взаимодействовали с Т-клетками, причем исключительно с Th2 [34]. Данная молекула относится к семейству рецепторов хемоаттрактантов и получила название CRTH2 (Chemoattractant Receptor TH2). Фенотип $CD4^+$ клеток, экспрессирующих данный маркер, представляет собой следующее сочетание $CD45RA-CD45R0^+CD25^+$. Они продуцируют IL-4 (а также IL-5 и IL-13), но не IFN γ . Таким образом, это антиген-активированные эффекторные Th-клетки. В последствии CRTH2 была обнаружена и на других типах клеток периферической крови, таких как базофилы, эозинофилы, активированные моноциты и на небольшом количестве $CD8^+$ Т-клеток. Моноклональные антитела против CRTH2 были изучены и класифицированы, а на 8-м рабочем совещании HLDA-8 (Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Аделаида, Австралия) отнесены к CD294 [51].

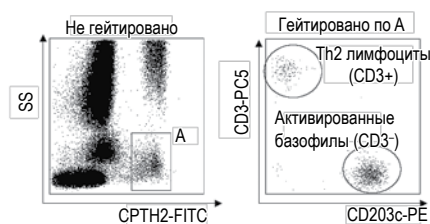


Рисунок 1. Локализация Th2-клеток с использованием моноклональных антител к CD294. Многопараметрический анализ клеток периферической крови с использованием CD3-PC5, CD203c-PE и CRTH2-FITC (Boumiza R. et al., Clin. and Mol. Allergy, 2005)

Используя многопараметрический анализ и CD294 (рис. 1), достаточно легко локализовать Th2-клетки, не прибегая к определению продукции внутриклеточных цитокинов [7].

CRTH2 был использован для локализации Th2-клеток в многоцветном цитометрическом анализе при атопическом дерматите [20] и аллергических заболеваниях [18].

Использование данного подхода позволит в клинической практике более точно определять преимущественную направленность регуляции иммунного ответа. Становится возможной диагностика не только при типичных состояниях, связанных с Th2-ответом (аллергия), но и, что очень важно, при комбинированных формах иммунопатологии (сочетание нескольких разнонаправленных процессов у одного пациента), а значит, появляется возможность адекватного назначения этиотропной и патогенетически обоснованной терапии [2].

Тест на аллергическую реакцию. Продолжительное время работы по локализации и анализу базофилов находились на крае интереса проточной цитометрии, что было связано с незначительным содержанием этих клеток в периферической крови (до 0,5%). Таким образом, определение их свойств не было рутинной задачей. В настоящее время этой проблематике уделяется большее внимание, о чем свидетельствует множество публикаций.

Существует целый ряд специфических параметров, которые можно измерить на базофилах. Это прежде всего мембранный IgE и экспрессия CD63 молекулы [7]. Анализ мембранного IgE представляет из себя достаточно сложную задачу ввиду значительных различий в его экспрессии у отдельных индивидуумов. В связи с этим, недавно описанные маркеры базофилов заняли важное положение среди используемых параметров для анализа аллергической реакции *in vitro* — это CD203c и CD294 (CRTH2).

Существенное место в процессе активации базофилов занимают такие антигены, как CD63⁺ и CD203c⁺. Они отличаются своей экспрессией

и местоположением в клетке. CD63⁺ находится внутри клеток на мембране гранул, которые содержат гистамин, лейкотриены и цитокины. После стимуляции аллергеном происходит дегрануляция клеток и CD63⁺ оказывается на поверхности базофилов. Напротив, CD203c является мембранным антигеном [8].

Моноклональные антитела к данному маркеру были описаны в 1999 году и кластеризованы на 7-й конференции HLDA в [30], таким образом, CD203c относится к достаточно новым антигенам.

Исследования показали, что экспрессия CD63 молекул в процессе активации базофилов аллергеном увеличивается на 100%, тогда как экспрессия CD203c рецепторов возрастает на 350%. Таким образом, определение CD203c рецептора является значительно лучшим маркером для анализа активации базофилов [7].

Как было описано выше, CD294 может экспрессироваться не только на Th2-клетках, но и на базофилах. Таким образом, если локализовать путем «гейтирования» зону мононуклеаров, то фенотип базофилов можно описать как CD294⁺CD3⁻, тогда как активированные базофилы будут иметь фенотип CD3⁻CD294⁺CD203c⁺ [7].

Таким образом, если активировать базофилы *in vitro*, то в многопараметрическом анализе можно увидеть изменение экспрессии молекулы CD203c⁺ на их мембране относительно контрольных образцов.

Для активации базофилов *in vitro*, как правило, используют агенты, активирующие максимальное количество базофилов это анти-IgE, анти-FcεRI или синтетический пептид FMLP (FormylMethionyl-LeucylPhenylalanine). В ходе же анализа в дальнейшем используют различные аллергены [32].

В настоящее время разработаны наборы, предназначенные для идентификации покоящихся и активированных базофилов (рис. 2). Они содержат все компоненты, необходимые для проведения анализа, за исключением аллергенов (исследователи, как правило, сами подбирают необходимый набор аллергенов, в зависимости от аллергоанамнеза пациента). В частности это «Allergenicity Kit» фирмы Beckman Coulter.

Использование данного подхода предоставило недоступную ранее возможность, определять наличие сенсибилизации к аллергенам (например, таким как лекарственные препараты), выявлять аллергические состояния не связанные со специфическим IgE-ответом, диагностировать и дифференцировать псевдоаллергические реакции и т.д.

Регуляторные Т-клетки. Последние годы большой интерес вызывают регуляторные Т-клетки (Treg). Этот интерес связан с тем, что Treg игра-

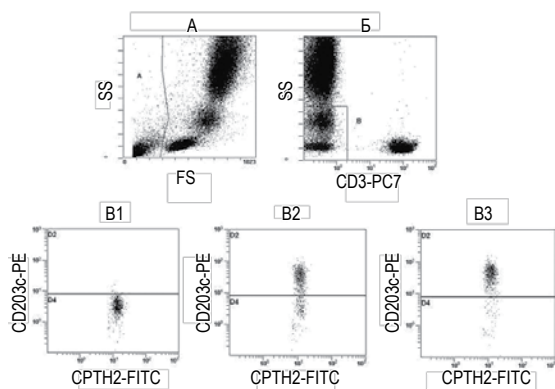


Рисунок 2. Алгоритм анализа активации базофилов

А – дискриминация дебриса из зоны анализа;
 Б – выбор зоны анализа, исключающей CD3 позитивные клетки;
 B1, B2, B3 – анализ экспрессии CPTH2 на базофилах
 (B1 – негативный контроль, B2 – позитивный контроль, B3 – аллерген)

ют важную роль в иммуносупрессии. Это имеет огромное значение в таких областях как: аутоиммунные заболевания, трансплантационная иммунология, противоопухолевый ответ и иммуногомеостаз. С одной стороны, Treg регулируют T-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, способствуют толерантности после трансплантации и предотвращают реакцию трансплантат против хозяина [39, 44, 45]. Но, с другой стороны, снижают противоопухолевый иммунитет и снижают иммунитет к инфекциям [43]. Таким образом, локализация и количественное определение Treg может быть важным как диагностическим, так и прогностическим признаком.

Treg клетки имеют следующий фенотип $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD45R0^+CD95^+$, однако наиболее важным их маркером является FOXP3 [13, 48]. Недавние исследования показали, что FOXP3, который кодирует фактор транскрипции скурфин (scurfín) и является главным регулирующим геном для развития и функционирования $CD4^+CD25^{high}$ регуляторных T-клеток [41]. В настоящее время, самым точным маркером для идентификации Treg клеток является как раз фактор транскрипции FOXP3. Однако идентификация этого маркера требует пермеабилитации клеток, что затрудняет работу по идентификации Treg.

Недавнее исследование продемонстрировали, что экспрессия CD127 на Treg клетках снижена или отсутствует [27]. В свою очередь, эксперименты *in vitro* показали, что экспрессия CD127 после активации T-клеток резко снижается [42]. CD127 представляет из себя α -цепь гетеродимерного рецептора IL-7, который состоит из CD127 и общей γ -цепи, которая представлена и у других рецепторов цитокинов (IL-2R, IL-4R, IL-9R, IL-15R, и IL-21R). CD127 экспрессируется на тимоцитах,

T- и B-предшественниках, зрелых T-клетках, моноцитах и некоторых других лимфоидных и миелоидных клетках. Показано, что IL-7R играет важную роль в пролиферации и дифференцировке зрелых T-клеток [21, 40, 50].

Таким образом, окончательный фенотип Treg клеток будет выглядеть следующим образом: $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim-to-neg}FOXP3^+$, и для их детектирования можно использовать данный фенотип Treg, без выявления FOXP3. Для более точной локализации Treg клеток предпочтительно использовать многоцветный анализ и многоэтапное «гейтирование» с использованием следующего набора моноклональных антител – CD3-FITC, CD4-PC7, CD25-PC5 и CD127-PE.

В заключение хотелось бы отметить, что клетки иммунной системы активно реагируют на все протекающие в организме процессы, такие как воспаление, стресс, аллергены, внешние раздражители и многое другое. Они приспосабливаются к воздействию окружающей их среды, отвечают на него изменением экспрессии молекул на мембране клеток. Таким образом, включается один из механизмов иммунорегуляции, т.е. модуляция экспрессии маркеров клеточной поверхности. Используя многопараметрический анализ, многоэтапное «гейтирование» и новые технологии, проточная цитометрия позволяет локализовать и отследить эти процессы, изучить их протекание, а значит адекватно на них реагировать, разрабатывать новые подходы к коррекции активности патологически измененных клеток и процессов, которые они определяют.

Список литературы

1. Зуева Е.Е. Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов // Российский Биомедицинский Журнал – 2003. – Том 4, СТ. 132 – С. 471-478.
2. Зурочка А.В., Биргер О.В., Бастрон А.С. Состояние иммунной системы у больных с комбинированными и сочетанными поражениями иммунной системы // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: Сб. тр. 5-го Конгресса РААКИ. – М., 2002. – С. 2-57.
3. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. – М.-Тверь: ООО «Издательство Триада», 2005. – 168 с.
4. Хайдуков С.В., Литвинов И.С. Изменение гомеостаза ионов кальция в $CD4^+$ T-лимфоцитах периферической крови человека в процессе дифференцировки *in vivo* // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 6. – С. 838-849.
5. Altman J.D., Moss P.A., Goulder P.J., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I.,

McMichael A.J., Davis M.M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes // *Science*. – 1996. – Vol. 274. – P. 94-96.

6. Bishop J.E., Davis K.A. A flow cytometric immunoassay for b2-microglobulin in whole blood // *J. Immunol. Meth.* – 1997. – Vol. 210. – P. 79-87.

7. Boumiza R., Debard A.-L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives // *Clin. Mol. Allergy*. – 2005. – Vol. 3, N 9. – P. 1-8.

8. Buhring H.-J., Simmons P.J., Pudney M., Muller R., Jarrossay D., van Aghthoven A., Willheim M., Brugger W., Valent P., Kanz L. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors // *Blood*. – 1999. – Vol. 94, N 7. – P. 2343-2356.

9. Camilla C., Mely L., Magnan A., Casano B., Prato S., Debono S., Montero F., Defoort J.P., Martin M., Fert V. Flow cytometric microsphere-based immunoassay: analysis of secreted cytokines in whole-blood samples from asthmatics // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2001. – Vol. 8, N 4. – P. 776-784.

10. Comans-Bitter W.M., de Groot R., van den Beemd R., Neijens H.J., Hop W.C., Groeneveld K., Hooijkaas H., van Dongen J.J. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations // *J. Pediatr.* – 1997. – Vol. 130, N 3. – P. 388-393.

11. Crucian B., Dunne P., Friedman H., Ragsdale R., Pross S., Widen R. Detection of altered T helper 1 and T helper 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis utilizing intracellular cytokine detection by flow cytometry and surface marker analysis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1996. – Vol. 3, N 4. – P. 411-416.

12. Duramad P., McMahon C.W., Hubbard A., Eskenazi B., Holland N.T. Flow cytometric detection of intracellular Th1/Th2 cytokines using whole blood: validation of immunologic biomarker for use in epidemiologic studies // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2004. – Vol. 13, N 9. – P. 1452-1458.

13. Fritzsching B., Oberle N., Eberhardt N., Quick S., Haas J., Wildemann B., Krammer P.H., Suri-Payer E. In contrast to effector T cells, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand – but not to TCR-mediated cell death // *Immunology*. – 2005. – Vol. 175, N 1. – P. 32-36.

14. Fulton R.J., McDade R.L., Smith P.L., Kienker L.J., Kettman J.R. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrics system // *Clin. Chem.* – 1997. – Vol. 43. – P. 1749-1756.

15. Harty J.T., Tvinnereim A.R., White D.W. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection // *Annu Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 18 – P. 275-230.

16. He X.H., Xu L.H., Liu Y. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 4180-4187.

17. He X.H., Zha Q.B., Liu Y., Xu L.H., Chi X.Y. High frequencies cytomegalovirus pp65(495-503)-specific CD8⁺ T cells in healthy young and elderly chinese donors: characterization of their phenotypes and TCRVβ usage // *J. Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 417-429.

18. Hsu S.C., Chen L.C., Kuo M.L., Huang J.L., Huang S.K. Novel SNPs in a candidate gene, CRTH2, for allergic diseases // *Genes Immun.* – 2002. – Vol. 3, N 2. – P. 114-116.

19. Ikinogullari A., Kendirli T., Dogu F., Egin Y., Reisli I., Cin S., Babacan E. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children // *Turk. J. Pediatr.* – 2004. – Vol. 46, N 2. – P. 125-130.

20. Iwasaki M., Nagata K., Takano S., Takahashi K., Ishii N., Ikezawa Z. Association of a new-type prostaglandin D2 receptor CRTH2 with circulating T helper 2 cells in patients with atopic dermatitis // *J. Invest. Dermatol.* – 2002. – Vol. 119, N 3. – P. 609-616.

21. Jaleco S., Swainson L., Dardalhon V., Burjanadze M., Kinet S., Taylor N. Homeostasis of naive and memory CD4⁺ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171, N 1. – P. 61-68.

22. Kettman J.R., Davies T., Chandler D., Oliver K.G., Fulton R.J. Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets // *Cytometry*. – 1998. – Vol. 33. – P. 234-243.

23. Klebanoff C.A., Gattinoni L., Restifo N.P. CD8⁺ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol. 211. – P. 214-224.

24. Lefrançois L., Marzo A. The descent of memory T-cell subsets // *Annu Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 618-623.

25. Lindmo T., Borner O., Ungelstad J., Nustad K. Immunometric assay by flow cytometry using mixtures of two particle types of different affinity // *J. Immunol. Methods*. – 1990. – Vol. 126. – P. 183-189.

26. Lisi P.J., Huang C.W., Hoffman R.A., Teipel J.W. A fluorescence immunoassay for soluble antigens employing flow cytometric detection // *Clin. Chem. Acta*. – 1982. – Vol. 120. – P. 171-179.

27. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St. Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1701-1711.

28. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow Cytometry clinical laboratory service // *Laboratory Hematology*. – 2004. – Vol. 10. – P. 102-108.
29. Maier R., Weger M., Haller-Schober E.M., El-Shabrawi Y., Theisl A., Barth A., Aigner R., Haas A. Application of multiplex cytometric bead array technology for the measurement of angiogenic factors in the vitreous // *Molecular Vision*. – 2006. – Vol. 12. – P. 1143-1147.
30. Mason D.Y., Andre P., Bensussan A., Buckley C., Civin C., Clark E., de Haas M., Goyert S., Hadam M., Hart D., Horejsi V., Meuer S., Morissey J., Schwartz-Albiez R., Shaw S., Simmons D., Ugucioni M., van der Schoot E., Viver E., Zola H. CD antigens 2001 // *Tissue Antigens*. – 2001. – Vol. 58, N 6. – P. 425-430.
31. Meidenbauer N., Hoffmann T.K., Donnenberg A.D. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC class I tetrameric complexes // *Methods*. – 2003. – Vol. 31. – P. 160-171.
32. Monneret G., Benoit Y., Debard A.-L., Gutowski M.C., Topenot I., Bienvenu J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs // *Clin. Immunol.* – 2002. – Vol. 102, N 2. – P. 192-199.
33. Murphy E., Shibuya K., Hosken N., Openshaw P., Maino V., Davis K., Murphy K., O'Garra A. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183, N 3. – P. 901-913.
34. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., Kemmotsu K., Imai T., Yoshie O., Abe H., Tada K., Nakamura M., Sugamura K., Takano S. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 1278-1286.
35. Ooi K.G., Galatowicz G., Towler H.M., Lightman S.L., Calder V.L. Multiplex cytokine detection versus ELISA for aqueous humor: IL-5, IL-10, and IFN γ profiles in uveitis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, N 1. – P. 272-277.
36. Perniola R., Lobreglio G., Rosatelli M.C., Pitotti E., Accogli E., De Rinaldis C. Immunophenotypic characterisation of peripheral blood lymphocytes in autoimmune polyglandular syndrome type 1: clinical study and review of the literature // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 18, N 2. – P. 155-164.
37. Picker L.J., Singh M.K., Zdraveski Z., Treer J.R., Waldrop S.L., Bergstresser P.R., Maino V.C. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry // *Blood*. – 1995. – Vol. 86, N 4. – P. 1408-1419.
38. Quint D.J., Bolton E.J., McNamee L.A., Solari R., Hissey P.H., Champion B.R., MacKenzie A.R., Zanders E.D. Functional and phenotypic analysis of human T-cell clones which stimulate IgE production in vitro // *Immunology*. – 1989. – Vol. 67, N 1. – P. 68-74.
39. Read S., Powrie F. CD4(+) regulatory T cells // *Curr. Opin. Immunol.* – 2001. – Vol. 13. – P. 644-649.
40. Ryan D.H., Nuccie B.L., Ritterman I., Liesveld J.L., Abboud C.N., Insel R.A. Expression of interleukin-7 receptor by lineage-negative human bone marrow progenitors with enhanced lymphoid proliferative potential and B-lineage differentiation capacity // *Blood*. – 1997. – Vol. 89, N 3. – P. 929-940.
41. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 40. – P. 37672-37679.
42. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., Solomon M., Selby W., Alexander S.I., Nanan R., Kelleher A., Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1693-1700.
43. Shevach E.M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers // *Nature Reviews Immunology*. – 2002. – Vol. 2 – P. 389-400.
44. Takahashi T., Sakaguchi S. The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance // *Int. Rev. Cytol.* – 2003. – Vol. 225 – P. 1-32.
45. Waldmann H., Graca L., Cobbold S., Adams E., Tone M., Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation // *Semin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, N 2. – P. 119-126.
46. Wherry E.J., Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 5535-5545.
47. Xu L., Zha Q., Sun H., Jia Q., Li F., He X. Preparation and Characterization of HLA-A*0201 Tetramer Loaded with IE-1316-324 Antigenic Peptide of Human Cytomegalovirus // *Cell. Mol. Immunol.* – 2006. – Vol. 3, N 5. – P. 367-371.
48. Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S., Kitawaki T., Hori S., Maeda M., Onodera M., Uchiyama T., Fujii S., Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells // *Int. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, N 11. – P. 1643-1656.
49. Yuan J., Latouche J.B., Hodges J., Houghton A.N., Heller G., Sadelain M., Riviere I., Young J.W. Langerhans-type dendritic cells genetically modified to express full-length antigen optimally stimulate

CTLs in a CD4-dependent manner // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, N 4. – P. 2357-2365.

50. Zaunders J.J., Dyer W.B., Munier M.L., Ip S., Liu J., Amyes E., Rawlinson W., De Rose R., Kent S.J., Sullivan J.S., Cooper D.A., Kelleher A.D. CD127⁺CCR5⁺CD38⁺⁺⁺ CD4⁺ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2⁺ memory CD4⁺ T cells // J. Virol. – 2006. – Vol. 80, N 20. – P. 10151-10161.

51. Zola H., Swart B., Nicholson I., Aasted B., Bensussan A., Boumsell L., Buckley C., Clark G.,

Drbal K., Engel P., Hart D., Horejsi V., Isacke C., Macardle P., Malavasi F., Mason D., Olive D., Saalmueller A., Schlossman S.F., Schwartz-Albiez R., Simmons P., Tedder T.F., Uguccioni M., Warren H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules // Blood. – 2005. – Vol. 106, N 9. – P. 3123-3126.

поступила в редакцию 30.05.2007

принята к печати 23.07.2007