

# ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. Часть 2

С.В. Хайдуков<sup>1, 2</sup>, А.В. Зурочка<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии РОСЗДРАВА, Москва

<sup>3</sup> Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

**Резюме.** Используя различные методические подходы и широкий спектр реагентов, проточная цитометрия позволяет оценивать количественный и качественный состав популяций и субпопуляций клеток иммунной системы. К инфекциям, для диагностики которых метод проточной цитометрии стал незаменим, относится синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызываемый вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Традиционно при ВИЧ-инфекции иммунологи рассматривают стандартную модель оценки иммунной дисфункции на основании классических маркеров Т-клеток (CD3, CD4, CD8). В то же время исследователи в меньшей степени уделяют внимание другим популяциям и субпопуляциям лимфоцитов, к которым, в первую очередь, относятся  $\gamma\delta$ -,  $\alpha\beta$ - и CD38<sup>+</sup> Т-клетки. Количественная оценка этих параметров у пациентов с ВИЧ и СПИД дает возможность по новому взглянуть на патогенез ВИЧ-инфекции и прогноз ее течения.

*Ключевые слова:* проточная цитометрия, СПИД, CD38, ВИЧ, TcR,  $\gamma\delta$ -Т-клетки,  $\alpha\beta$ -Т-клетки.

## OPPORTUNITIES OF FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES. Part 2

Khaidukov S.V., Zurochka A.V.

**Abstract.** Flow cytometry allows estimating quantitative and qualitative structure of populations and subpopulations of immune system cells by using various methodical approaches and a wide spectrum of reagents. For diagnostics the Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) caused by a Human Immunodeficiency Virus (HIV) the flow cytometry became irreplaceable. Traditionally, immunologists examine standard model of an estimation of immune dysfunction on the basis of classical markers of T-cells (CD3, CD4, CD8) at the HIV-infection. But researchers pay less attention to other populations and subpopulations of lymphocytes, such as  $\gamma\delta$ -,  $\alpha\beta$ - and CD38<sup>+</sup> T-cells. The quantitative estimation of these parameters from a HIV and AIDS patients enables to see pathogenesis a HIV infection and the prediction of its development from another side. (*Infekc. immun.*, 2011, vol. 1, N 2, p. 113–120)

*Key words:* flow cytometry, AIDS, CD38, HIV, TcR,  $\gamma\delta$ -T-cells,  $\alpha\beta$ -T-cells.

За последние десятилетия метод проточной цитометрии занял ведущие позиции в диагностике различных нарушений функционирования иммунной системы в клинико-лабораторной практике. Значительно расширилась инструментальная база, возросли возможности метода, позволяющие охарактери-

зовать не только качественные и количественные параметры основных популяций иммунокомпетентных клеток, но и их более тонкую субпопуляционную организацию.

С помощью проточной цитометрии стало возможным оценивать функциональные свойства популяций и субпопуляций клеток

поступила в редакцию 03.03.2011  
принята к печати 14.03.2011

© Хайдуков С.В.,  
Зурочка А.В., 2011

### Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич,  
д.б.н., зав. лабораторией физиологии  
и патологии иммунной системы  
ФГУ Федеральный Научно-Клинический  
Центр детской гематологии, онкологии  
и иммунологии РОСЗДРАВА

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,  
ФГУ ФНКЦ детской гематологии,  
онкологии и иммунологии РОСЗДРАВА.  
Тел.: 8 985 923-41-62.  
E-mail: khsv@mail.ibch.ru;  
khsergey54@mail.ru

иммунной системы за счет использования различных методик и широкого спектра реагентов. Это, в свою очередь, позволило проводить диагностику не только дисфункции иммунной системы, но и различных заболеваний, в том числе инфекционных.

Данная статья является продолжением серии обзоров, посвященных прикладным аспектам применения проточной цитометрии для исследования процессов, происходящих с клетками иммунной системы в результате попадания микробов в организм, и диагностики различных инфекционных патологий [4].

## Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД)

К инфекциям, для диагностики которых метод проточной цитометрии стал незаменим, относится синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызываемый вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В иммунопатогенезе ВИЧ-инфекции главную роль играет прямое и не прямое цитопатогенное действие вируса ВИЧ на Т-лимфоциты, особенно на CD4<sup>+</sup> лимфоциты. ВИЧ имеет повышенный тропизм к Т-лимфоцитам и другим клеткам, содержащим корцепторы, имеющие структурное подобие с CD4 (Т-хелперы, моноциты, макрофаги). Это обусловлено чрезвычайно высоким аффинитетом gp120 вириона к корцептору CD4, расположенному на поверхности CD4<sup>+</sup> лимфоцитов.

Пересмотренная система классификации CDC (Centers for Disease Control and Prevention) для ВИЧ-инфицированных подростков и взрослых базируются на абсолютном количестве CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Эта система представлена в виде трех уровней, основанных на абсолютном количестве CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитов в единице объема периферической крови (1. > 500/мкл; 2. 200–499/мкл; 3. < 200/мкл) [19]. Следует отметить, что данный параметр, как правило, определяют при помощи проточной цитофлюориметрии в одно- или двухплатформенной системе анализа. В первом случае, данные получают непосредственно при помощи проточного цитометра с использованием специальных реагентов (микросфер). Во втором этот параметр является расчетным. Результаты гематологического анализа вводят в программу сбора данных цитометра и на выходе получают значение абсолютного количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в единице объема [37].

Важность определения абсолютного числа CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов была быстро включена в клинический и лабораторный контроль за

ВИЧ-инфицированными пациентами, однако оценка других субпопуляций Т-лимфоцитов, которые могли бы в большей степени оценить иммунологический статус ВИЧ-инфицированных индивидуумов, все еще ограничивается только исследовательскими протоколами.

Были хорошо изучены качественные и количественные изменения субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, связанные с таким маркером развития заболевания у ВИЧ-инфицированных людей, как прогрессивная инверсия отношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> [17]. Установлено, что увеличение с течением времени абсолютного числа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов коррелирует с уменьшением вирусной нагрузки.

Кроме того, было описано увеличение экспрессии маркеров активации клеток CD38 и HLA-DR на CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах у ВИЧ-инфицированных людей, у которых наблюдали прогрессию заболевания [27].

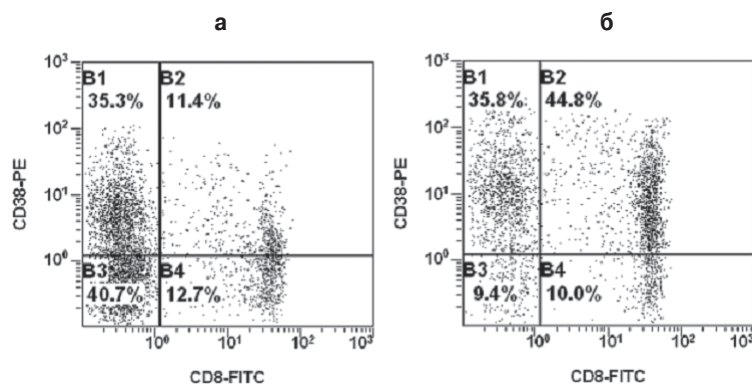
На рис. 1 представлена оценка CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> активированных Т-лимфоцитов, окрашенных моноклональными антителами против CD8 и CD38. В первом случае (рис. 1а) у пациента вирусная нагрузка не определялась, а во втором случае (рис. 1б) была достаточно низкой в связи с антиретровирусной терапией [3].

Следует отметить, что было зарегистрировано уменьшение субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в течение антиретровирусной терапии [7], причем уменьшалась и экспрессия CD38 на CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах [11].

Традиционно при ВИЧ-инфекции иммунологи рассматривают стандартную модель оценки иммунной дисфункции на основании классических маркеров Т-клеток (CD3, CD4, CD8), позволяющих определить уровень относительного и абсолютного количества Т-хелперов, Т-цитотоксических и общих Т-лимфоцитов. При этом исследователи в меньшей степени уделяют внимание другим популяциям и субпопуляциям лимфоцитов, к которым, в первую очередь, относятся  $\gamma\delta$ - и  $\alpha\beta$ -Т-клетки. Однако оценка этих параметров у пациентов с ВИЧ и СПИД дает возможность по-новому взглянуть на патогенез ВИЧ-инфекции и прогноз ее течения.

Примерно 91,4–98,4% Т-клеток представляют собой вариант  $\alpha\beta$ -ТсR, и обозначаются как  $\alpha\beta$ -Т-клетки. Остальные 1,6–8,9% Т-клеток несут на своей поверхности  $\gamma\delta$ -ТсR и обозначаются как  $\gamma\delta$ -Т-клетки.

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 экс-



**Рисунок 1. Двухпараметрические гистограммы распределения лимфоцитов, полученные в результате многоцветного анализа периферической крови пациента с хроническим носительством ВИЧ**

прессорируют молекулы CD8. Напротив, большая часть  $\gamma\delta$ -Т-клеток в тканях экспрессирует CD8. Кроме молекулы CD8  $\gamma\delta$ -Т-клетки на своей поверхности могут экспрессировать CD56 [20, 22], CD94 [8], CD161 [8]. Также было показано, что цитостатическую активность  $\gamma\delta$ -Т-клеток возможно стимулировать через CD122 ( $\beta$ -цепь рецептора IL-2) [20].

$\gamma\delta$ -Т-лимфоциты впервые были описаны в середине 1980-х гг. [12, 51] как гетерогенная субпопуляция Т-клеток с Т-клеточным рецептором, состоящим из  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей ( $\gamma\delta$ -ТсR).

Роль  $\gamma\delta$ -Т-клеток в иммунных процессах при различных заболеваниях и их взаимодействие с другими клетками организма до сих пор остаются до конца не выясненными. Но уже накопилось достаточно информации, которая доказывает важность существования подобной популяции клеток.

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 [42, 43, 44, 45].

Данная субпопуляция выполняет целый ряд важных функций.  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут усиливать иммунный ответ, производя большие количества интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), фактора некроза опухолей- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и хемокины [14, 35, 41]. Кроме этого, они имеют эффекторную (цитотоксическую) активность [16] с участием механизмов апоптоза [10, 15].

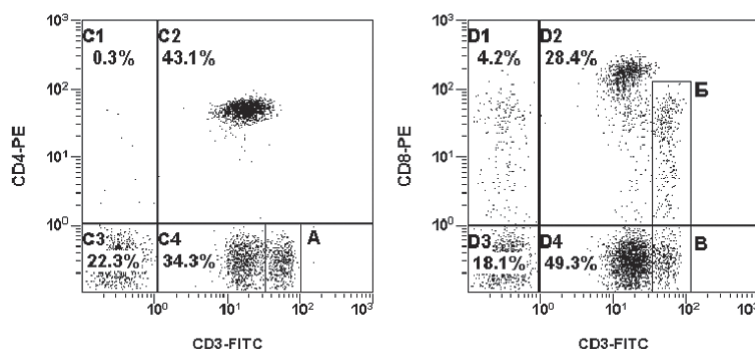
С эволюционной точки зрения,  $\gamma\delta$ -Т-клетки занимают уникальное место между высокоспецифичными  $\alpha\beta$ -Т-клетками и врожденной иммунной системой для выполнения защиты организма от патогенов. Экспериментальные данные показали, что роль  $\gamma\delta$ -Т-клеток была весьма существенна в устойчивости организма против целого ряда

микробов. Так, функциональную значимость  $\gamma\delta$ -Т-клеток отмечали в устойчивости к *Mycobacterium*, *Borellia*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* [14, 26, 40, 41] и вирусам [32, 53], включая ВИЧ [24, 30, 48, 54]. Кроме того,  $\gamma\delta$ -Т-клетки играют существенную роль и в противоопухолевом ответе [13, 18, 21, 25, 28]. В частности, было описано значительное увеличение этих клеток у пациентов с лимфомой [18].  $\gamma\delta$ -Т-клетки также вовлечены в восстановление эпителия и гомеостаз [9, 29, 34].

С другой стороны,  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть вовлечены в некоторые иммунопатологии типа диабета [31], аутоиммунных расстройств [23, 50, 56], болезни Бехчета [55], а также при астме [39, 52].

Приведенные выше факты свидетельствуют в пользу того, что для более полной характеристики Т-клеток пациента анализ следует проводить не только по таким специфическим и безусловно важным при ВИЧ-инфекции маркерам как CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, но и по наличию субпопуляций  $\alpha\beta$ -Т-клеток и  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Важность определения последних очевидна при ВИЧ-инфекции, сопровождающейся длительной персистенцией антигена в организме на фоне депрессии Т-клеточного звена иммунной системы, для контроля эффективности терапии, прогноза развития и течения заболевания. Эти данные были подтверждены [1].

Цитометрический анализ с комбинацией моноклональных антител CD3/CD4/CD8/CD45 дает не только основную информацию о наличии Т-клеток и их основных субпопуляций, но и позволяет выявить возможную неоднородность распределения CD3 молекул (рис. 2). В этом случае необходимо проверить контрольную сумму CD3 позитивных клеток (сум-



**Рисунок 2.** 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

ма  $CD4^+$  и  $CD8^+$  должна равняться общему количеству  $CD3^+$ ). В случае, если контрольная сумма не совпадает с общим количеством  $CD3^+$  лимфоцитов, следует проверить субпопуляционный состав Т-клеток на наличие  $\alpha\beta$ -TcR и  $\gamma\delta$ -TcR.

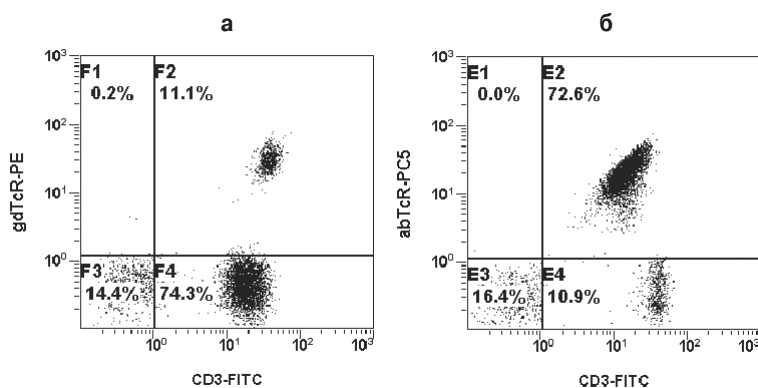
Данный этап необходим, так как большинство  $\gamma\delta$ -Т-клеток, циркулирующих в периферической крови, «дважды отрицательны». Другая их особенность заключается в том, что они имеют более высокую плотность экспрессии молекулы CD3 на своей поверхности ( $CD3^{bright}$ , рис. 2). На рис. 2 изображено достаточно часто встречающееся распределение  $CD3^+$  лимфоцитов при бактериальных и вирусных инфекциях, первичных и вторичных иммунодефицитах. Как видно из рис. 2, 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 зоне В  $CD3^{bright}CD8^-$ .

Все эти признаки характерны для  $\gamma\delta$ -Т-клеток [33].

Чтобы выявить  $\gamma\delta$ - и  $\alpha\beta$ -Т-клетки, как правило, используют следующую комбинацию моноклональных антител  $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/ $CD3^+$ / $CD45$  [5].

На рис. 3 представлены гистограммы распределения Т-клеток, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови пациента с хроническим носительством вируса Эпштейна–Барр. На рис. 3а в квадранте F2 находятся  $\gamma\delta$ -Т-клетки, на рис. 3б 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



**Рисунок 3.** Двухпараметрические гистограммы распределения Т-клеток, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови пациента с хроническим носительством вируса Эпштейна–Барр



следует использовать многоцветный анализ и следующие комбинации моноклональных антител: CD3/CD4/CD8/CD45 и  $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/CD3/CD45 [5].

Исследование уровня  $\gamma\delta$ -Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов в зависимости от количества Т-лимфоцитов и уровня Т-хелперов выявило ряд закономерностей. Было показано, что во всех исследуемых группах наблюдалось падение общего числа Т-лимфоцитов и снижение уровня не только Т-хелперов, но и цитотоксических Т-лимфоцитов. Это приводило к падению соотношения CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (за счет более глубокого угнетения Т-хелперов) и истощению всех субпопуляций Т-лимфоцитов, что коррелировало со стадией заболевания.

Все это также указывало на отсутствие активности Т-клеточного звена иммунной системы в ответ на рост как количества, так и длительности персистенции антигена в организме. Помимо этого, снижение CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток у ВИЧ-инфицированных лиц находится в тесной взаимосвязи с падением количества Т-клеток, несущих  $\gamma\delta$ -TcR рецептор. В данном случае наблюдается положительная корреляция между уровнем  $\gamma\delta$ -Т-клеток и уровнем CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Это указывает на формирование нарушения не только зависящего от главного комплекса гистосовместимости (МНС), но также и независимого от МНС ответа на антиген [35]. Механизмы количественного и качественного истощения субпопуляции  $\gamma\delta$ -Т клеток неизвестны, частично потому, что эти клетки не несут рецептор CD4 и, следовательно, должны быть устойчивы к ВИЧ. Помимо этого, в течение ВИЧ-инфекции происходит ослабление функциональных способностей  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, что может влиять на прогрессирование заболевания [1, 47].

С другой стороны, недостаточно изучена роль  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов и изменения, происходящие внутри данной популяции при ВИЧ-инфекции в зависимости от уровня антигенной нагрузки [2].

Нарастание антигенной нагрузки на организм характеризуется снижением общего числа лейкоцитов, которое сопровождается падением абсолютного количества гранулоцитов, а также относительного и абсолютного уровней лимфоцитов. Со стороны основных субпопуляций Т-клеток выявленные изменения, в первую очередь, параметров CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, более выражены у больных с высокой вирусной нагрузкой (ВН). В свою очередь, внутри популяции Т-клеток происходит

значительное снижение абсолютного и относительного числа CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Напротив, абсолютный уровень CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов повышается и, как следствие этого, происходит более чем двукратное снижение соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Данный факт свидетельствует о формировании дисбаланса в иммунной системе у ВИЧ-инфицированных больных в группе с высокой ВН. Это связано с перераспределением внутри популяции Т-клеток в сторону повышения относительного количества цитотоксических лимфоцитов за счет падения относительного уровня Т-хелперов и дважды негативной субпопуляции Т-лимфоцитов при массивной антигенной атаке.

Помимо этого, на фоне депрессии Т-клеточного звена иммунной системы наблюдается истощение популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (дважды негативной популяции Т-клеток). Уровень  $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляющий у здоровых лиц 3–6% всех CD3<sup>+</sup> клеток крови, при ВИЧ-инфекции падает [38, 49]. По всей видимости, это играет немаловажную роль в снижении силы иммунного ответа вплоть до его полного отсутствия против целого ряда микроорганизмов и приводит к оппортунистическим инфекциям у ВИЧ-инфицированных.

Взаимосвязь между  $\gamma\delta$ -Т-клетками, CD4 Т-клетками и вирусной нагрузкой остается противоречивой [46]. Поскольку  $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты не могут быть непосредственным объектом ВИЧ-инфекции вследствие отсутствия у них рецептора CD4, была выдвинута гипотеза косвенных механизмов их участия в процессе прогрессирования заболевания [36]. Таким образом, с одной стороны CD4<sup>+</sup> Т-клетки, безусловно, играют важную роль в заболевании ВИЧ-инфекцией, а их уменьшение в количестве и нарушение их функций, наряду с угнетением Th1 иммунного ответа, могут быть одной из причин угнетения  $\gamma\delta$ -Т-клеток. С другой стороны, существенная и непрерывная антигенная нагрузка ВИЧ может нарушать дифференцировку данной субпопуляции Т-лимфоцитов. Тем не менее, эти механизмы не являются взаимоисключающими, могут сосуществовать и иметь синергетический эффект.

Предложенные подходы для анализа субпопуляций лимфоцитов при ВИЧ-инфекции также могут быть использованы и при любых других инфекционных заболеваниях, имеющих сходные механизмы иммунного ответа (цитомегаловирусная инфекция, инфекционный мононуклеоз, герпетические заболевания, гепатиты и т.д.) [6].

## Список литературы

1. Зурочка А.В., Гаврилова Т.В., Шестакова Е.В., Квятковская С.В., Миркина Т.В., Черешнев В.А. Оценка зависимости уровня  $\gamma\delta$ -Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов от уровня  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов // *Мед. иммунол.* — 2010. — Т. 12, № 4–5. — С. 425–428.
2. Зурочка А.В., Гаврилова Т.В., Шестакова Е.В., Квятковская С.В., Распопина И.В., Черешнев В.А. Оценка уровня  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов у больных ВИЧ-инфекцией в зависимости от вирусной нагрузки // *Росс. иммунолог. журн.* — 2010. — Т. 4 (13), № 1. — С. 77–82.
3. Ситдыкова Ю.Р., Серебровская Л.В., Кравченко А.В. Мониторинг иммунного статуса при ВИЧ-инфекции: дополнительные маркеры и их клиническое значение // *Эпидемиол. и инфекц. болезни.* — 2008. — № 3 — С. 61–64.
4. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Возможности проточной цитофлуориметрии в диагностике инфекционных заболеваний. Часть 1 // *Инфекц. иммунол.* — 2011. — Т. 1, № 1. — С. 59–66.
5. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. — Челябинск: Изд-во «Челябинская государственная медицинская академия», 2008. — 195 с.
6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Многоцветный цитометрический анализ. Идентификация Т-клеток и их субпопуляций по экспрессии  $\alpha\beta$ -TCR и  $\gamma\delta$ -TCR // *Мед. иммунол.* — 2008. — Т. 10, № 2–3. — С. 115–124.
7. Autran B., Carcelain G., Li T.S., Blanc C., Mathez D., Tubiana R., Katlama C., Debre P., Leibowitch J. Positive effects of combined antiretroviral therapy on  $CD4^+$  homeostasis and function in advanced HIV disease // *Science.* — 1997. — Vol. 277. — P. 112–116.
8. 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.
9. 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.
10. Boullier S., Dadaglio G., Lafeuillade A. V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and INF-gamma production but are not selected in lymph nodes // *J. Immunol.* — 1997. — Vol. 159. — P. 3629–3667.
11. Bouscarat F., Levacher M., Landman R., Muffat-Joly M., Girard P.-M., Saimot A.G., Brun-Vézinet F., Sinet M. Changes in blood  $CD8^+$  lymphocyte activation status and plasma HIV RNA levels during antiretroviral therapy // *AIDS.* — 1998. — Vol. 12 — P. 1267–1273.
12. Brenner M.B., McLean J., Dialynas D.P., Strominger J.L., Smith J.A., Owen F.L., Seidman J.G., Ip S., Rosen F., Krangel M.S. Identification of a putative second T-cell receptor // *Nature.* — 1986. — Vol. 322, N 6075. — P. 145–149.
13. 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.
14. Chen Z.W., Letvin N.L. Adaptive immune response of  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells: a new paradigm // *Trends Immunol.* — 2003. — Vol. 24. — P. 213–219.
15. Dechanet J., Merville P., Lim A. Implication of  $\gamma\delta$  T cells in human immune response to cytomegalovirus // *J. Clin. Invest.* — 1999. — Vol. 103. — P. 1437–1449.
16. Dieli F., Troye-Blomberg M., Ivanyi J., Fournié 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  $\gamma 9/V\delta 2$  T lymphocytes // *J. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 184. — P. 1082–1085.
17. Ferbas J. Perspectives on the role of CD8 and factors and cytotoxic T lymphocytes during HIV infection // *AIDS Res. Hum. Retrov.* — 1998. — Vol. 14. — P. 153–160.
18. Ferrarini M., Ferrero E., Dagna L., Poggi A., Zocch M.R. Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer // *Trends Immunol.* — 2002. — Vol. 23. — P. 14–18.
19. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults // *JAMA.* — 1993. — Vol. 269, N 6. — P. 729–730.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Kabelitz D., Wesch D. Role of gamma delta T-lymphocytes in HIV infection // *Eur. J. Med. Res.* — 2001. — Vol. 6. — P. 169–174.
  25. 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. — 167. — P. 5092–5098.
  26. 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.
  27. Kestens L., Vanham G., Gigase P., Young G., Hannel I., Vanlangendonck F., Hulstaert F. Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection // *AIDS.* — 1992. — Vol. 6 — P. 793–797.
  28. 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.
  29. Komano H., Fujiurat Y., Kawaguch 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.
  30. Kosub D.A., Lehrman G., Milush J.M. Gamma/delta T-cell functional responses differ after pathogenic human immunodeficiency virus and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82. — P. 1155–1165.
  31. 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.
  32. Lafarge X., Merville P., Cazin M.C., Bergé 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.
  33. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells // *Cytometry.* — 2004. — Vol. 61, N 1. — P. 45–53.
  34. 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.
  35. 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.
  36. Li H., Peng H., Ma P., Pauza D., Shao Y. Association between Vγ2Vδ2 T cells and disease progression after infection with closely-related viral strains of HIV in China // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 46 — P. 1466–1472.
  37. Mandy F.F., Nicholson J.K., McDougal J.S. CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4<sup>+</sup> T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention // *MMWR Recomm Rep.* — 2003. — Vol. 52 (RR02). — P. 1–13.
  38. Martini F., Urso R., Gioia C. Gammadelta T-cell anergy in human immunodeficiency virus-infected persons with opportunistic infections and recovery after highly active antiretroviral therapy // *Immunology.* — 2000. — Vol. 100. — P. 481–486.
  39. 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.
  40. Mogue 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.
  41. 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.
  42. 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 γδ-T cells // *Immunity.* — 1995. — Vol. 3. — P. 495–507.
  43. 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 γδ-T cells // *Microbes. Infect.* — 1999. — Vol. 1. — P. 175–186.
  44. Morita C.T., Mariuzza R.A., Brenner M.B. Antigen recognition by human γδ-T cells: pattern recognition by the adaptive immune system // *Springer. Semin. Immunopathol.* — 2000. — Vol. 22. — P. 191–217.
  45. Morita C.T., Tanaka Y., Bloom B.R., Brenner M.B. Direct presentation of non-peptide prenyl pyrophosphate antigens to human γδ-T cells // *Res. Immunol.* — 1996. — Vol. 147. — P. 347–353.

46. Nunnari G. Do  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells influence HIV disease progression? // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 46. — P. 1473–1475.
47. Pawelec G., Sayers T., Busch F. Regulation of normal myelopoiesis and chronic myelogenous leukemia cell proliferation through a non-cytotoxic mechanism by a  $\gamma\delta$  cell clone // *M. Immunol. Lett.* — 1989. — Vol. 22. — P. 199–204.
48. 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.
49. Poles M.A., Barsoum S., Yu W. Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 10456–10467.
50. Robak E., Blonski J.Z., Bartkowiak J., Niewiadomska H., Sysa-Jedrzejowska A., Robak T. Circulating TCR gammadelta cells in the patients with systemic lupus erythema tosus // *Mediators Inflamm.* — 1999. — Vol. 8. — P. 305–312.
51. Saito T., Hochstenbach F., Marusic-Galesic S., Kruisbeek A.M., Brenner M., Germain R.N. Surface expression of only gamma delta and/or alpha beta T cell receptor heterodimers by cells with four (alpha, beta, gamma, delta) functional receptor chains // *J. Exp. Med.* — 1988. — Vol. 168, N 3. — P. 1003–1020.
52. Schramm C.M., Puddington L., Yiamouyiannis 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.
53. 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.
54. 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<sup>+</sup> T cells, and their cytotoxic potential correlates with viral load // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 1848–1855.
55. 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.
56. Yin Z., Craft J. Gamma delta T cells in autoimmunity // *Springer Semin. Immunopathol.* — 2000. — Vol. 22. — P. 311–320.