

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. Часть 1

С.В. Хайдуков^{1,2}, А.В. Зурочка³

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

² ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии РОСЗДРАВА, Москва

³ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Резюме. Развитие современной медицинской науки требует более досконального и более глубокого подхода к диагностике заболеваний, и как следствие этого возникает необходимость в применении новых диагностических технологий. Проточная цитофлюориметрия является такой технологией. Использование современных достижений в области флуоресцентных красителей, развитие лазерных и компьютерных технологий, привели к широкому использованию данной технологии в медицинской практике. Не является исключением и инфекционная иммунология. Использование анализа продукции цитокинов при туберкулезе и изменение экспрессии HLA-DR на моноцитах и CD64 на гранулоцитах при сепсисе являются важными диагностическими признаками. Проточная цитофлюориметрия предлагает новые подходы к ранней и более быстрой диагностике нарушений иммунной системы при туберкулезе и сепсисе, позволяет более эффективно контролировать развитие этих патологий и оценить эффективность терапии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, туберкулез, CD27, сепсис, моноциты, нейтрофилы, CD64.

OPPORTUNITIES OF FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES. PART 1

Khaidukov S.V., Zurochka A.V.

Abstract. Development of a modern medical science demands more thorough and deeper approach to diagnostics of diseases. New diagnostic technologies for these investigations are necessary and flow cytometry is such technology. Modern achievements in the field of fluorescent dyes, development of laser and computer technologies, have led to wide use of the given technology in medical practice. Infectious immunology is not exception. Cytokines production analysis at tuberculosis, HLA-DR expression changes for monocytes and CD64 for granulocytes at sepsis are the important diagnostic attributes. Flow cytometry offers new approaches to early and faster diagnostics of infringements of immune system at tuberculosis and sepsis, allows supervising development of these pathologies more effectively and estimate efficiency of therapy. (*Infekciã i immunitet*, 2011, vol. 1, N 1, p. 59–66)

Key words: flow cytometry, tuberculosis, CD27, sepsis, monocytes, neutrophils, CD64.

Введение

Развитие современной медицинской науки требует более досконального и более глубокого подхода к диагностике заболеваний. Как следствие этого возникает необходимость в применении новых диагностических технологий. К разряду таковых относится проточная цитофлюориметрия. Это современная технология

быстрого измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. Две существенные особенности проточной цитофлюориметрии делают этот метод особенно ценным для клинических исследований. Во-первых, он позволяет охарактеризовать гетерогенные клеточные популяции по фенотипу входящих в них клеток. Во-вторых, дает возможность обнаружить и охарактеризовать редкие события, т.е. со-

поступила в редакцию 15.11.2010
принята к печати 19.11.2010

© 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

бытия, встречающиеся с частотой 10^{-5} – 10^{-7} . Использование современных достижений в области флуоресцентных красителей, развитие лазерных и компьютерных технологий, а также эффективное программное обеспечение привели к широкому использованию проточной цитометрии в медицинской практике [2, 3]. Не является исключением и инфекционная иммунология.

Данная статья является первой из серии обзоров, посвященных прикладным аспектам применения проточной цитофлуориметрии для исследования процессов, происходящих с клетками иммунной системы в результате попадания инфекции в организм, и диагностики различных инфекционных патологий.

Проточная цитофлуориметрия и туберкулез

В 60–70-е годы прошлого века сложилось мнение, что лекарственная терапия эффективно контролирует эпидемию туберкулеза (ТБ). Однако эта проблема, несмотря на усилия фармакологов и врачей, вновь стала в значительной мере неуправляемой. В 1993 году Всемирная организация здравоохранения вторично отметила, что ТБ является критическим фактором для здоровья населения планеты. Существуют бесспорные данные о возникновении штаммов ТБ, резистентных к лекарственным препаратам [13], обнаружена взаимосвязь между ВИЧ-1 и ТБ инфекциями, ведущая к новому заболеванию — ВИЧ-ТБ коинфекции [29, 45]. Все эти факторы выдвигают на первый план потребность в более быстрой и точной диагностике туберкулеза.

В настоящее время появились новые возможности для более значимых диагностических процедур как для ТБ, так и для ВИЧ-ТБ пациентов. Все эти тесты базируются на обнаружении цитокинов. Некоторые из них в настоящее время расценены Центром Контроля Заболеваний (CDC) как реальное продвижение в диагностике ТБ с момента первых экспериментов Коха по введению туберкулина [19].

Тесты на основе цитокинов хорошо обоснованы иммунологическими исследованиями. Действительно, PPD (Purified Protein Derivative) *Mycobacterium tuberculosis* был первым антигеном, использованным для документирования феномена антиген-специфической трансформации лимфоцитов *in vitro* в 3–5-дневных культурах [22]. Кроме этого PPD также генерирует мощный цитокиновый ответ. Следует отметить, что цитокиновый ответ возникает на ранних сроках, в пределах 8–16 часов, и поэтому может быть адаптирован для быстрой иммунодиагностики. Быстрое тестирование цитокинов стало доступным как диагностическое средство в трех различных форматах: ELISA, ELISpot и проточная цитофлуориметрия [10]. Однако ни ELISA, ни ELISpot не предоставляют

возможности локализовать клеточный источник цитокинов, тогда как проточная цитофлуориметрия визуализирует тип клеток-продуцентов, их количество и секретирующую способность.

Поскольку цитокины являются секретируемыми молекулами, необходимо заблокировать их выход из клетки, например, при помощи брифелдина (brefeldin). При этом цитокины остаются в цитоплазме и затем визуализируются флуоресцентно-мечеными моноклональными антителами методом проточной цитометрии [8, 9].

Этот подход весьма информативен, в отличие от других тестов на цитокины, поскольку существует возможность локализовать клетки продуценты и определить величину цитокинового ответа [8]. Это весьма важно, поскольку многие цитокины, типа интерферона- γ (IFN γ) и фактора некроза опухоли (TNF α), могут секретироваться разными клетками при различных типах инфекций. Так, ТБ инфекция запускает классическую реакцию гиперчувствительности замедленного типа за счет IFN γ , который секретируется CD4⁺ Т-лимфоцитами [44], в то время как при вирусной инфекции, основным источником IFN γ являются CD8⁺ Т-клетки [46].

Важную роль в процессе формирования гранулемы при ТБ играет TNF α , а основными продуцентами этого цитокина являются CD4⁺ Т-клетки. Но данный процесс возможен и за счет альвеолярных макрофагов, которые также могут продуцировать TNF α [16].

Так как ТБ является, прежде всего, легочным заболеванием, существует два оптимальных протокола для анализа клеток с использованием проточной цитометрии: идентификация CD4⁺IFN γ ⁺ клеток в крови или исследование CD4⁺ Т-клеток, полученных непосредственно из легких (в бронхоальвеолярном лаваже или слюне) [23, 50].

В настоящее время существуют предпосылки, чтобы идентификация CD4⁺IFN γ ⁺ клеток в крови стала более востребованной, но для этого необходимы дальнейшие исследования.

Данные исследования могут проводиться с разной степенью сложности как с использованием четырехцветного (CD45-CD3-CD4-IFN γ), трехцветного (CD3-CD4-IFN γ) анализа, так и самого простого анализа с 2-мя цветами (CD4-IFN γ). Следует отметить, что антитела против IFN γ в данной комбинации моноклональных антител могут быть заменены на другие, например антитела против TNF α .

Процесс исследования состоит из двух шагов — окрашивание мембранных антигенов CD45, CD4 и CD8 в суспензии, а затем пермеабиллизации и окрашивания цитоплазматических IFN γ или TNF α [9, 23, 44, 57]. При определении содержания внутриклеточных цитокинов в самой простой форме анализа (с использованием двух цветов) для первичного гейтинга выбирают CD4⁺ лимфоциты. Однако для диагностических целей более предпо-

чителен трехцветный анализ, а результаты могут быть представлены как % $IFN\gamma^+$ клеток в $CD4^+$ популяции (% $IFN\gamma^+/CD4^+$). В некоторых случаях возможна комбинация из двух цитокинов при анализе с четырьмя цветами ($CD3/CD4/IFN\gamma/TNF\alpha$) или включение некоторых других мембранных маркеров для последующей дискриминации субпопуляций, также продуцирующих цитокины. Все это обеспечивает более качественную оценку Т-клеточного ответа.

До контакта с антигеном Т-клетки экспрессируют на своей поверхности костимулирующий рецептор CD27, который подвержен понижающей регуляции в процессе формирования иммунологической памяти. Ранее было показано, что в легких ТБ инфицированных мышей преобладают CD27-негативные, $IFN\gamma$ секретирующие $CD4^+$ Т-клетки [39]. Поскольку $IFN\gamma$ играет важную роль в иммунном ответе против ТБ [14], CD27-негативные $CD4^+$ Т-клетки могут являться инструментом контроля над инфекцией. Таким образом, измерение экспрессии CD27 на PPD-реактивных $CD4^+$ Т-клетках человека является полезным и быстрым тестом для диагноза активного легочного туберкулеза (рис. 1). Преимуществом данного подхода является то, что анализ проводится на клетках крови с использованием трехцветной иммунофлуоресценции (комбинация моноклональных антител — $IFN\gamma$, CD4, CD27) и результаты могут быть получены менее чем за 24 часа [52].

Таким образом, проточная цитофлуориметрия на современном этапе развития технологий предлагает новые подходы к ранней и более быстрой диагностике нарушений иммунной системы при туберкулезе, позволяет более эффективно контролировать развитие данной патологии и оценить эффективность проводимых лечебных мероприятий.

Проточная цитофлуориметрия и сепсис

Временную иммунодепрессию часто связывают с патофизиологическими состояниями, такими как инфаркт миокарда, серьезными травмами или хирургическим вмешательством [33]. Иммунодепрессия в ее самой серьезной форме, иммунопаралич, может представлять значительную угрозу для жизни пациента [56]. Однако нет четкого диагностического критерия, способного указать на присутствие или отсутствие иммунодепрессии, заканчивающейся параличом иммунной системы, особенно тогда, когда клинические признаки развития такого инфекционного осложнения могут отсутствовать. Поэтому необходим некий лабораторный маркер, который может позволить на ранних стадиях диагностировать временную иммунодепрессию у пациентов с высоким риском возникновения инфекционных септических осложнений.

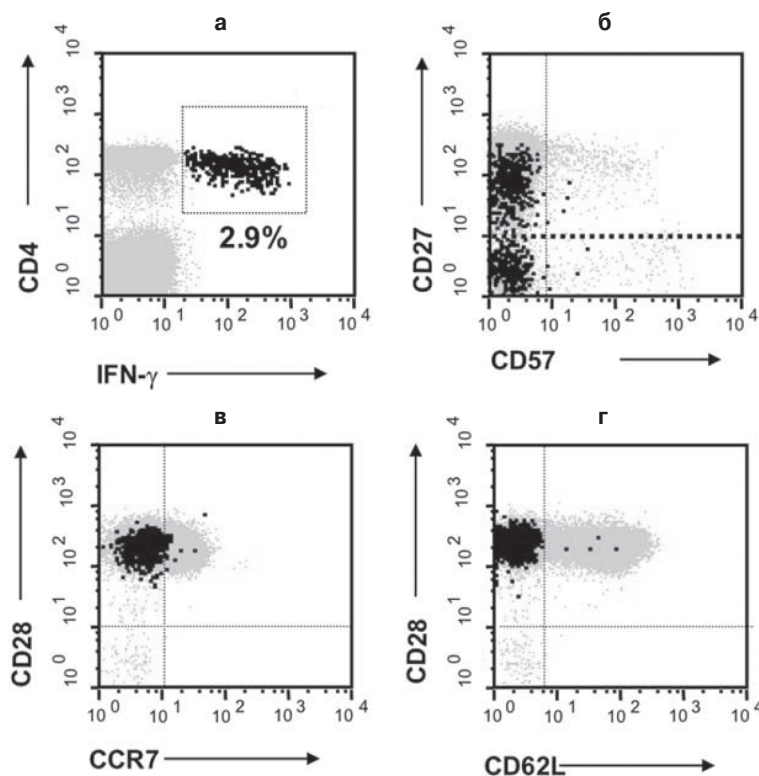


Рисунок 1. Распределение PPD-реактивных $CD4^+$ Т-клеток, выявленных при помощи классических маркеров для субпопуляций наивных и клеток памяти, у пациента с активной формой ТБ

Примечание. На всех гистограммах представлено распределение только $CD3^+$ Т-клеток. Продуцирующие $IFN\gamma$ PPD-реактивные $CD4^+$ Т-клетки, выделены черными точками (Streitz M. et al., 2007 [52]).

Достаточно часто нарушения активности моноцитов наблюдаются при септическом шоке. Исследования патогенеза септического шока все более и более сосредотачиваются на роли иммунной системы, поскольку изменения ее функций является главным фактором риска для развития серьезных инфекций у пациентов, которые подвергались хирургическому вмешательству. Так, многочисленные отклонения механизмов иммунной защиты возникают у критических пациентов в постоперационный период. К ним относятся понижение экспрессии моноцитами антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR), измененная активация Т-клеток, пониженный хемотаксис и фагоцитоз нейтрофилов. Данные нарушения были описаны также и при раневой инфекции и травмах [30, 38].

HLA-DR принадлежит к молекулам главного комплекса тканевой совместимости класса II (МНС класс II), ответственным за представление антигена Т-клеткам. Моноциты у здоровых индивидуумов экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR в высокой плотности и легко определяются при помощи метода проточной цитометрии. Однако моноциты с уменьшенной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антиген-представляющую функцию [58] и не обладают способностью продуцировать воспалительные медиаторы в ответ на соответствующие стимулы [47]. В свою очередь, уменьшение экспрессии HLA-DR на моноцитах коррелирует с увеличением риска инфекционных и других осложнений для пациентов с серьезной травмой [11] или серьезными ожогами [49]. Аналогичный эффект наблюдали при панкреатите [48], при осложнениях в сердечно-легочной хирургии [53], после трансплантации [21, 25, 35] и у пациентов после нейрохирургического удаления опухоли [4]. Значительное снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах может служить тестом для идентификации временной иммунодепрессии у пациентов, которая является весьма опасной в связи с возможностью инфекционных осложнений. Кроме всего перечисленного выше, уменьшение экспрессии HLA-DR на моноцитах коррелирует с клиническими результатами у пациентов с сепсисом [54, 56].

У пациентов с беспрецедентно быстрым восстановлением после серьезной травмы или операции уровень экспрессии HLA-DR на моноцитах падал в течение нескольких часов после травмы или операции, но восстанавливался до нормального уровня в течение недели. В случаях, когда развивалась инфекция, возвращение экспрессии HLA-DR к норме занимало 3 и более недель. С другой стороны, у пациентов с инфекцией и последующим сепсисом, приведшим к смерти, экспрессия HLA-DR резко снижа-

лась и никогда не возвращалась к нормальному уровню [20, 24].

Kawasaki T. с соавт. показали, что экспрессия HLA-DR на моноцитах и их ответ на LPS значительно снижены в результате хирургического стресса во время операции. Эти результаты могут частично объяснить ухудшение механизмов защиты пациента [30].

Некоторые авторы связывают процесс снижения экспрессии HLA-DR с усилением продукции IL-10, поскольку сыворотка пациентов с сепсисом снижает экспрессию HLA-DR, а моноклональные антитела к IL-10 блокируют этот эффект [15]. Активно влияют на снижение экспрессии HLA-DR антигенов и глюкокортикоиды [37].

Таким образом, снижение экспрессии моноцитами HLA-DR антигенов, которые играют критическую роль в представлении антигена Т-хелперам, является показателем развивающейся инфекции в постоперационный период [51], а диагностика HLA-DR в течение первых 2-х дней после операции может служить показателем для применения более раннего терапевтического вмешательства [11].

Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что пациенты с низкой экспрессией HLA-DR на моноцитах должны получать терапию с использованием иммуномодуляторов, таких как IFN γ [41], растворы, обогащенные глутамином [6], мурамилсодержащие гликопептиды [31] и т.д., чтобы стимулировать иммунную систему и в первую очередь моноциты.

Все перечисленное выше данные привели к тому, что была предложена методика для мониторинга септического состояния пациентов с открытыми травмами и в постоперационный период с использованием метода проточной цитометрии [12, 41].

Принцип оценки септического состояния заключается в измерении экспрессии HLA-DR антигенов на поверхности моноцитов в цельной периферической крови. Анализ проводят на двух окрашенных образцах, один из которых является контрольным. Для локализации моноцитов применяют CD14, который представляет собой рецептор эндотоксина (липополисахарид (LPS) [59]) и является одним из основных маркеров для моноцитов. Экспрессию HLA-DR измеряют в многопараметровом анализе и сравнивают с контрольным образцом, где вместо моноклональных антител к HLA-DR применяют неспецифические антитела того же изотипа.

Критерием оценки состояния пациента при сепсисе служит относительное количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, и благоприятным прогнозом считается, если количество позитивных клеток превышает 40% на 5-й день после госпитализации и проведения соответствующей терапии. Данный критерий

был получен экспериментальным путем на госпитализированных пациентах с септическим шоком. Было показано, что в течение 48 часов после госпитализации, экспрессия HLA-DR на моноцитах была значительно снижена у септических пациентов ($25\pm 4\%$) по сравнению со здоровыми донорами ($89\pm 1\%$). С другой стороны, сравнение экспрессии HLA-DR антигенов на моноцитах между выжившими пациентами и погибшими в последствии не выявила значительного различия в первые 48 часов после госпитализации. Однако экспрессия HLA-DR на моноцитах на 5-й день после госпитализации была более высокой ($> 40\%$) у оставшихся в живых пациентов, что свидетельствовало о восстановлении их иммунологического статуса [41].

Аналогичная картина наблюдалась у детей с постхирургическим сепсисом. Так у пациентов с диагнозом «сепсис» отмечалось существенное снижение экспрессии HLA-DR-антигенов в течение первых суток развития заболевания (рис. 2). Только к 10 суткам доля моноцитов, экспрессирующих молекулы HLA-DR, начинала переходить границу риска развития сепсиса (40%), несмотря на проводимую интенсивную терапию. При этом нужно отметить, что данный показатель оставался значительно ниже нормы (рис. 3 и 4) [1].

Все выше описанные исследования, как правило, проводили на взрослых пациентах или детях младшего возраста (2,5–4,8 лет), однако использование анализа экспрессии HLA-DR антигенов на моноцитах в диагностике ранней клинической инфекции и пневмонии у новорожденных не дали обнадеживающего результата [42].

Сепсис у новорожденных представляет собой глобальную проблему и вносит существенный вклад как в заболеваемость, так и в детскую смертность [5, 36]. Однако ранняя диагностика сепсиса у новорожденных весьма затруднена, но чрезвычайно важно произвести именно раннюю диагностику ввиду того, что незамедлительное проведение антибактериальной терапии дает наилучшие результаты. Идентификация бактерий при культивировании крови является стандартом и наиболее специфическим методом диагностики сепсиса у новорожденных, но это достаточно длительная процедура [17, 18].

Большинство фактов говорит о том, что в тех случаях, когда результаты культивирования крови не определяются как позитивные на 48-й час, эмпирическое применение антибиотиков может быть прекращено [27, 28]. Таким образом, возникает проблема ненужного использования антибиотикотерапии у новорожденных, что в свою очередь вызывает бактериальную резистентность [7]. Были предприняты попытки ранней диагностики сепсисного состояния у новорожденных с использованием профиля

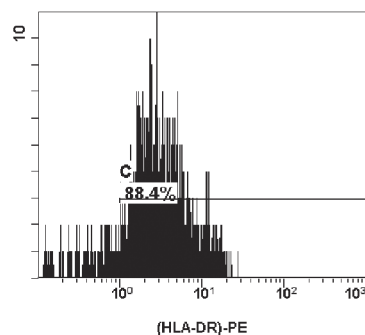


Рисунок 2. Пациент В., нормальная экспрессия молекул HLA-DR на моноцитах периферической крови. Анализ проводили по моноцитарному гейту

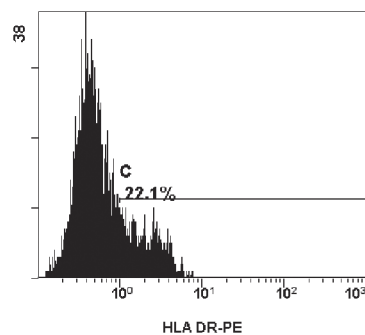


Рисунок 3. Больной С. Диагноз сепсис, вторые сутки от момента заболевания. Экспрессия молекул HLA-DR на моноцитах периферической крови. Анализ проводили по моноцитарному гейту

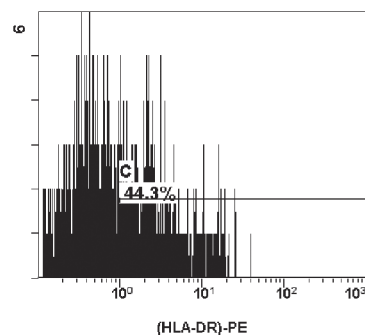


Рисунок 4. Больной С. Диагноз сепсис, десятые сутки от момента заболевания. Экспрессия молекул HLA-DR на моноцитах периферической крови. Анализ проводили по моноцитарному гейту

цитокинов [32, 55]. Но, несмотря на тот факт, что большинство цитокиновых маркеров имеет высокую ценность для отрицательного прогноза (то есть, для того, чтобы исключить сепсис) [40], они не были приняты для общего медицинского использования.

Совсем недавно внимание исследователей было направлено на антигены поверхности нейтрофилов как диагностические маркеры сепсиса [42]. Выбор остановился на поверхностном маркере нейтрофилов CD64, который является высокоаффинным Fc рецептором. Оказалось, что он быстро повышает свою экспрессию в течение инфекции и сепсиса, хотя в здоровом состоянии его плотность на поверхности нейтрофилов незначительна (< 2000 молекул на клетку). Процесс увеличения экспрессии CD64 является следствием действия медиаторов воспаления, таких как IFN γ (3–4 часа), G-CSF (4–6 часов) и IL-12. Это повышение экспрессии CD64 зависит от интенсивности стимула цитокинов и устойчиво в течение более чем 30 часов [26]. Кроме этого экспрессия CD64 на нейтрофилах не повышается:

- при терапии любыми препаратами (отличными от цитокинов);
- при беременности;
- при ограниченном повреждении ткани (миокардиальная ишемия, несложные хирургические вмешательства и травмы);
- при аутоиммунных расстройствах (ревматоидный артрит, СКВ).

Технологический прогресс в области проточной цитофлуориметрии позволил количественно определять экспрессию CD64 нейтрофилов быстро, с высокой точностью и, что особенно важно для новорожденных, на минимальных объемах крови [43].

Для этих целей компанией Trillium Diagnostics, LLC (США) был разработан набор реагентов Leuko64. Набор состоит из смеси моноклональных антител к CD64 и CD163, лизирующего агента и суспензии флуоресцентных микросфер. Микросферы используют для калибровки проточного цитофлуориметра и стандартизации анализа экспрессии CD64 и CD163 на лейкоцитах в крови человека.

CD163 — моноцит/макрофаг ассоциированный антиген был идентифицирован как рецептор гемоглобина [34]. Кроме удаления гемоглобина, он имеет также противовоспалительные свойства и играет важную роль в иммунорегуляции [60]. Предварительные исследования показали, что экспрессия CD163 на нейтрофилах и моноцитах повышается у новорожденных в критическом состоянии и у детей с сепсисом. Исходя из этого, CD163 также был использован в данной тест-системе.

Предложенная тест-система позволяет получить индексы CD64 и CD163, основанные на

отношении сигнала флуоресценции данных антигенов к сигналу флуоресценции стандартизированных микросфер. Однако из этих двух индексов предпочтение отдается CD64 для нейтрофилов, поскольку он превосходит по информативности и диагностической значимости все другие маркеры.

Заключение

Все приведенные выше факты свидетельствуют, что применение технологии проточной цитофлуориметрии является важным и эффективным подходом в ранней диагностике и борьбе с такими заболеваниями, как туберкулез и сепсис.

Список литературы

1. Зурочка А.В., Котляров А.Н., Кувайцев М.В., Квятковская С.В., Зурочка В.А., Рябова Л.В., Хайдуков С.В. Изменения Экспрессии HLA-DR-антигенов на моноцитах у детей и ее клиническая значимость при сепсисе // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10, № 4–5. — С. 379–388.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // Медицинская иммунология. — 2007. — Т. 9, № 4–5. — С. 373–378.
3. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа // Медицинская иммунология. — 2007. — Т. 9, № 6. — С. 569–574.
4. Asadullah K., Woiciechowsky C., Docke W.D., Egerer K., Koh W., Volgel S., Sterry W., Volk H.D. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection — immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy // Eur. J. Emerg. Med. — 1995. — Vol. 2. — P. 184–190.
5. Bizzarro M.J., Raskind C., Baltimore R.S., Gallagher P.G. Seventyfive years of neonatal sepsis at Yale: 1928–2003 // Pediatrics. — 2005. — Vol. 116. — P. 595–602.
6. Boelens P.G., Houdijk A.P., Fonk J.C., Nijveldt R.J., Ferwerda C.C., Von Blomberg-Van Der Flier B.M., Thijs L.G., Haarman H.J., Puyana J.C., Van Leeuwen P.A. Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients // J. Nutr. — 2002. — Vol. 132, N 9. — P. 2580–2586.
7. Clark R.H., Bloom B.T., Spitzer A.R., Gerstmann D.R. Empiric use of ampicillin and cefotaxime, compared with ampicillin and gentamicin, for neonates at risk for sepsis is associated with an increased risk of neonatal death // Pediatrics. — 2006. — Vol. 117. — P. 67–74.
8. Cohen G.B., Gandhi R.T., Davis D.M., Mandelboim O., Chen B.K., Strominger J.L., Baltimore D. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells // Immunity. — 1999. — Vol. 10. — P. 661–671.

9. Collins K.L., Chen B.K., Kalams S.A., Walker B.D., Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes // *Nature*. — 1998. — Vol. 391. — P. 397–401.
10. Daftary A., Padayatchi N., Padilla M. HIV testing and disclosure: a qualitative analysis of TB patients in South Africa // *AIDS Care*. — 2007. — Vol. 19. — P. 572–577.
11. Ditschkowski M., Kreuzfelder E., Rebmann V., Ferencik S., Majetschak M., Schmid E.N., Obertacke U., Hirche H., Schade U.F., Grosse-Wilde H. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma // *Ann. Surg.* — 1999. — Vol. 229, N 2. — P. 246–254.
12. Docke W.D., Hoflich C., Davis K.A., Rottgers K., Meisel C., Kiefer P., Weber S.U., Hedwig-Geissing M., Kreuzfelder E., Tschentscher P., Nebe T., Engel A., Monneret G., Spittler A., Schmolke K., Reinke P., Volk H.D., Kunz D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study // *Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 51, N 12. — P. 2341–2347.
13. Fine P.E., Rodrigues L.C. Modern vaccines. Mycobacterial diseases // *Lancet*. — 1990. — Vol. 335. — P. 1016–1020.
14. Flynn J.L., Chan J. Immunology of tuberculosis // *Annu. Rev. Immunol.* — 2001. — Vol. 19. — P. 93–129.
15. Fumeaux T., Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2002. — Vol. 166, N 11. — P. 1475–1482.
16. Garcia P., Llano M., de Heredia A.B., Willberg C.B., Caparrós E., Aparicio P., Braud V.M., López-Botet M. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E // *Eur. J. Immunol.* — 2002. — Vol. 32. — P. 936–944.
17. Gerdes J.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis // *Clin. Perinatol.* — 1991. — Vol. 18. — P. 361–381.
18. Gonzalez B.E., Mercado C.K., Johnson L., Brodsky N.L., Bhandari V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile // *J. Perinat. Med.* — 2003. — Vol. 31. — P. 60–68.
19. Grimsley C., Ober C. Population genetic studies of HLA-E: evidence for selection // *Hum. Immunol.* — 1997. — Vol. 52. — P. 33–40.
20. Guillou P.J. Biological variation in the development of sepsis after surgery or trauma // *Lancet*. — 1993. — Vol. 342. — P. 217–220.
21. Haveman J.W., Berg A.P. van den, Berk J.M. van den, Mesander G., Slooff M.J., Leij L.H. de, The T.H. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake // *Transpl. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 1, N 3. — P. 146–152.
22. Heinzl A.S., Grotzke J.E., Lines R.A., Lewinsohn D.A., McNabb A.L., Streblow D.N., Braud V.M., Grieser H.J., Belisle J.T., Lewinsohn D.M. HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8⁺ T cells // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196. — P. 1473–1481.
23. Hellberg S., Sjostrom M., Skagerberg B., Wold S. Peptide quantitative structure-activity relationships, a multivariate approach // *J. Med. Chem.* — 1987. — Vol. 30. — P. 1126–1135.
24. Hershman M.J., Cheadle W.G., Wellhausen S.R., Davidson P.F., Polk S.C. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient // *Br. J. Surg.* — 1990. — Vol. 77. — P. 204–207.
25. Hoffman J.A., Weinberg K.I., Azen C.G., Horn M.V., Dukes L., Starnes V.A., Woo M.S. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients // *Transpl. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 6. — P. 147–155.
26. Hoffmeyer F., Witte K., Schmidt R.E. The high-affinity FcγRI on PMN: regulation of expression and signal transduction // *Immunology*. — 1997. — Vol. 92. — P. 544–552.
27. Hurst M.K., Yoder B.A. Detection of bacteremia in young infants: is 48 hours adequate? // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 1995. — Vol. 14. — P. 711–713.
28. Jardine L., Davies M.W., Faoagali J. Incubation time required for neonatal blood cultures to become positive // *J. Paediatr. Child. Health.* — 2006. — Vol. 42. — P. 797–802.
29. Kaufmann S.H. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 6. — P. 699–704.
30. Kawasaki T., Ogata M., Kawasaki C., Tomihisa T., Okamoto K., Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery // *Anesth. Analg.* — 2001. — Vol. 92, N 5. — P. 1322–1326.
31. Khaidukov S.V., Komaleva R.L., Nesmeyanov V.A. N-acetylglucosamine-containing muramyl peptides directly affect macrophages // *Int. J. Immunopharmacol.* — 1995. — Vol. 17, N 11. — P. 903–911.
32. Khassawneh M., Hayajneh W.A., Kofahi H., Khader Y., Amarin Z., Daoud A. Diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6 and immunoglobulin M // *Scand. J. Immunol.* — 2007. — Vol. 65. — P. 171–175.
33. Kox W.J., Volk T., Kox S.N., Volk H.D. Immunomodulatory therapies in sepsis // *Int. Care. Med.* — 2000. — Vol. 26. — P. 124–128.
34. Kristiansen M., Gravarsen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor // *Nature*. — 2001. — Vol. 409, N 6817. — P. 198–201.
35. Kunz D., Pross M., Lippert H., König W., Manger T. Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6 and cellular immune status in the early phase after liver transplantation // *Transplant. Proc.* — 1998. — Vol. 30. — P. 23–24.
36. Lawn J.E., Wilczynska-Ketende K., Cousens S.N. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000 // *Int. J. Epidemiol.* — 2006. — Vol. 35. — P. 706–718.

37. Le Tulzo Y., Pangault C., Amiot L., Guilloux V., Tribut O., Arvieux C., Camus C., Fauchet R., Thomas R., Drénou B. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2004. — Vol. 169, N 10. — P. 1144–1151.
38. Lin R.Y., Astiz M.E., Saxon J.C., Rackow E.C. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression // *Chest.* — 1993. — Vol. 104, N 3. — P. 847–853.
39. Lyadova I.V., Oberdorf S., Kapina M.A., Apt A.S., Swain S.L., Sayles P.C. CD4 T cells producing IFN-gamma in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype // *Clin. Exp. Immunol.* — 2004. — Vol. 138. — P. 21–29.
40. Mehr S., Doyle L.W. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2000. — Vol. 19. — P. 879–887.
41. Monneret G., Elmenkouri N., Bohe J., Debard A.L., Gutowski M.C., Bienvenu J., Lepape A. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock // *Clin. Chem.* — 2002. — Vol. 48, N 9. — P. 1589–1592.
42. Ng P.C., Lam H.S. Diagnostic markers for neonatal sepsis // *Curr. Opin. Pediatr.* — 2006. — Vol. 18. — P. 125–131.
43. Ng P.C., Li G., Chui K.M., Chu W.C., Li K., Wong R.P., Fok T.F. Quantitative measurement of monocyte HLA-DR expression in the identification of early-onset neonatal infection // *Biol. Neonate.* — 2006. — Vol. 89, N 2. — P. 75–81.
44. Noursadeghi M., Katz D.R., Miller R.F. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS // *Lancet. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 6. — P. 794–804.
45. Ottenhoff T.H. Overcoming the global crisis: “yes, we can”, but also for TB ...? // *Eur. J. Immunol.* — 2009. — Vol. 39. — P. 2014–2020.
46. Pietra G., Romagnani C., Falco M., Vitale M., Castriconi R., Pende D., Millo E., Anfossi S., Biassoni R., Moretta L., Mingari M.C. The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition // *Eur. J. Immunol.* — 2001. — Vol. 31. — P. 3687–3693.
47. Pitton C., Fitting C., Deuren M. van, Meer J.W. van der, Cavaillon J.M. Different regulation of TNF- α and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1995. — Vol. 392. — P. 523–528.
48. Richter A., Nebe T., Wendl K., Schuster K., Klaebisch G., Quintel M., Lorenz D., Post S., Trede M. HLA-DR Expression in acute pancreatitis // *Eur. J. Surg.* — 1999. — Vol. 165. — P. 947–951.
49. Sachse C., Prigge M., Cramer G., Pallua N., Henkel E. Association between reduced human leukocyte antigen (HLA-DR) expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 1999. — Vol. 37. — P. 193–198.
50. Sandberg M., Eriksson L., Jonsson J., Sjostrom M., Wold S. New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. A multivariate characterization of 87 amino acids // *J. Med. Chem.* — 1998. — Vol. 41. — P. 2481–2491.
51. Spittler A., Winkler S., Gotzinger P., Oehler R., Willheim M., Tempfer C., Weigel G., Fugger R., Boltz-Nitulescu G., Roth E. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes // *Blood.* — 1995. — Vol. 86, N 4. — P. 1564–1569.
52. Streit M., Tesfa L., Yildirim V., Yahyazadeh A., Ulrichs T., Lenkei R., Quassem A., Liebetrau G., Nomura L., Maecker H., Volk H.D., Kern F. Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis // *PloS. One.* — 2007. — Vol. 2, N 1. — e735.
53. Strohmeyer J.C., Blume C., Meisel C., Doecke W.D., Hummel M., Hoeflich C., Thiele K., Unbehau A., Hetzer R., Volk H.D. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients // *Cytometry.* — 2003. — Vol. 53. — P. 54–62.
54. Tschaikowsky K., Hedwig-Geissing M., Schiele A., Bremer F., Schywalsky M., Schuttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients // *Crit. Care. Med.* — 2002. — Vol. 30. — P. 1015–1023.
55. Turner D., Hammerman C., Rudensky B., Schlesinger Y., Schimmel M.S. The role of procalcitonin as a predictor of nosocomial sepsis in preterm infants // *Acta. Paediatr.* — 2006. — Vol. 95. — P. 1571–1576.
56. Volk H.D., Lohmann T., Heym S., Golosubow A., Ruppe U., Reinke P. et al. Decrease of the proportion of HLA-DR-monocytes as prognostic parameter for the clinical outcome of septic disease // *Immunotherapeutic prospects of infectious diseases; Masihi K.N., Lange W., eds. — Heidelberg: Springer Verlag, 1990. — P. 297–301.*
57. Whittaker E., Kampmann B. Perinatal tuberculosis: new challenges in the diagnosis and treatment of tuberculosis in infants and the newborn // *Early. Hum. Dev.* — 2008. — Vol. 84. — P. 795–799.
58. Wolk K., Docke W.D., von Baehr R., Volk H.D., Sabat R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis // *Pathobiology.* — 1999. — Vol. 67. — P. 253–256.
59. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein // *Science.* — 1990. — Vol. 249, N 4975. — P. 1431–1433.
60. Zuwała-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease // *Acta. Biochim. Pol.* — 2006. — Vol. 53, N 2. — P. 257–268.