

Активационно-индуцированный апоптоз лимфоцитов при хирургической инфекции у детей

Изучена пролиферативная активность лимфоцитов у детей при хирургической инфекции (ХИ) в реакции бластной трансформации, а также экспрессия Fas-рецептора на лимфоцитах с использованием реакции непрямой иммунофлюоресценции. Установлено, что при ХИ у детей имеет место снижение пролиферативной активности лимфоцитов и повышение экспрессии Fas-рецептора, особенно выраженное при сепсисе и остром гематогенном остеомиелите. Активационный апоптоз лимфоцитов может являться одним из патогенетических механизмов, приводящих к снижению функциональной активности лимфоцитов у детей с ХИ. Выявленные нарушения могут быть основой проведения индивидуальной иммунотерапии.

Ключевые слова: апоптоз, лимфоциты, дети, хирургическая инфекция.

М.М. Зафранская,
Ю.К. Абаев,
Н.П. Ерофеенко,
Ю.А. Сапожникова

Международный
экологический
университет им.
А.Д.Сахарова,
Белорусский
государственный
медицинский
университет

M.M. Zafranskaya, Yu.K. Abayev, N.P. Erofeenko, Yu. A. Sapozhnikova

Activate-inductive apoptosis of the lymphocytes in children with surgical infection

There were studied proliferative activity of the lymphocytes in children with surgical infection (SI) in reaction of the blast transformation and expression of FAS-receptor on the lymphocytes with the using reaction of indirect immunofluorescence. The proliferative activity of the lymphocytes were reduced and expression of FAS-receptor was rised on the lymphocytes in children with SI, particularly with sepsis and acute hematogenic osteomyelitis. The activate apoptosis of the lymphocytes may be one for pathogeny mechanisms reduction of the functional activity of lymphocytes in children with SI. The discovered disturbances may be bases for the individual immunotherapy.

Key words: apoptosis, lymphocytes, children, surgical infection.

Хирургическая инфекция (ХИ) занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваемости и летальности среди детского населения [1,17]. Известно, что течение ХИ сопряжено с иммунодепрессией, в том числе со снижением функциональной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови. Выраженность иммунной недостаточности во многом определяет особенности клинического течения и исход ХИ, поэтому изучение механизмов развития иммунодепрессии чрезвычайно важно для разработки эффективных методов лечения данной патологии [5,6,11,12,13].

Исследования последних лет значительно изменили представление о механизмах развития иммунодефицитных состояний (ИДС) [9,13,16]. Установлено, что иммунная недостаточность может быть следствием индукции анергии и апоптоза, как проявлений негативного исхода клеточной активации. Роль апоптоза в патогенезе иммунной недостаточности показана при некоторых первичных иммунодефицитах, старении.

воздействии радиации [2,3,20].

Причастность анергии и апоптоза к формированию иммунодепрессии при бактериальной инфекции гораздо менее изучена [10]. Способность суперантигенов грамположительных и грамотрицательных бактерий выступать в качестве индукторов апоптоза и анергии свидетельствует о возможной роли негативного ответа в патогенезе бактериальной инфекции [4,19]. Между тем, отсутствие целостного и четкого представления об иммунопатогенезе ХИ существенно затрудняет прогноз течения заболевания, обоснование целесообразности назначения и выбора иммунокорректоров в лечении данной патологии [7,8,].

В связи с этим, целесообразно изучение механизмов развития иммунодепрессии определяющих повышенную готовность лимфоцитов к апоптозу с целью последующей разработки методов коррекции иммунных дисфункций у детей с ХИ.

Материалы и методы

Исследованию подвергнуты 67 детей в возрасте от 1 недели до 15 лет находившиеся на лечении в Белорусском центре детской хирургии в 2001-2002 гг. с различными формами ХИ: абсцессы, флегмоны, фурункулез - 22; острый гематогенный остеомиелит - 25; хронический остеомиелит - 14; сепсис - 6. Распределение детей по возрасту: до 1 года – 19 (I группа), 1-6 лет – 16 (II группа), 7-15 лет – 32 (III группа). В качестве контрольной группы служили 35 здоровых детей, сопоставимых по возрасту. Исходным материалом для анализа служила гепаринизированная периферическая венозная кровь.

Функциональная активность Т- и В-лимфоцитов определялась культуральным методом по пролиферативному ответу в реакции бластной трансформации лимфоцитов с митогенами. Анализ проводился в стерильных условиях с использованием полной культуральной среды RPMI1640 (?Sigma?), включающей в себя NaHCO₃ 300мкг/мл; 0,04М 3%-ного р-ра L-глутамин; 0,02М NEPES (?Sigma?); 100мкг/мл гентамицина (Фармахим) и 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (БелНИИЭМ); рН 7,2-7,4. Для оценки пролиферативной активности использовали следующие митогены:

- фитогемагглютинин (ФГА ?Sigma- L9132) - в оптимальной 15мкг/мл и минимальной 2,5 мкг/мл концентрациях;
- Pokeweed mitogen (PWM -Sigma- L8777) - в концентрации 5 мкг/мл;
- липополисахарид (ЛПС -Sigma- L4524) - в концентрации 5 мкг/мл.

Клетки культивировали в течение 72 ч при 37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови производилась по включению в клетки 3H-тимидина, вводимого в культуру за 16 ч до окончания культивирования в дозе 1 мКи/лунку (37 кБк). После завершения культивирования клетки снимали с помощью харвестера на стекловолоконистые фильтры с дальнейшим помещением фильтров во флаконы со сцинтилляционной жидкостью. Уровень ?-излучения измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Wallac" (Финляндия). Результаты оценивали как индексы стимуляции (ИС) пролиферации по формуле: ИС = активность под действием митогенов/ исходная активность.

Оценка экспрессии Fas-рецептора на лимфоцитах проводилась с использованием реакции непрямой иммунофлюоресценции, основанной на использовании специфичности иммунологической реакции антиген-антитело и чувствительности флюоресцентной микроскопии [13]. Мононуклеарные клетки выделялись стандартным центрифугированием цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколл-верографина (?=1,077), доводились до концентрации 1 млн/мл

фиксировались на лунках предметного стекла с помощью 3%-ного глутарового альдегида и инкубировались во влажной камере 30 мин при температуре 37°C. После этого остатки взвеси удалялись и в лунки вносили МАТ к Fas – CD95 (Медбиоспектр) с последующей 30-минутной инкубацией во влажной камере при комнатной температуре. Затем стекла дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH=7,2-7,4 и вносили в лунки вторые антитела (Медбиоспектр), соединенные с флюорохромом (флюоресцеинизотиоцианатом - ФИТЦ). Инкубировали 30 мин при 40°C, четырежды отмывали в PBS. Оценка результатов производилась по специфическому свечению клеток в люминесцентном микроскопе. Подсчет проводился на 200 клетках, светящиеся клетки расценивались как несущие на своей поверхности Fas-рецептор (CD95).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере с помощью компьютерной программы Excel 97 и BIOSTAT. Стандартная обработка вариационных рядов включала подсчет средних арифметических величин (M) и ошибок средних (m). Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Различие считалось достоверным при $p < 0,05$.

Результаты исследования

При изучении пролиферативной активности лимфоцитов у детей с ХИ выявлено, что их среднее значение было ниже уровня нормативных показателей, полученных под действием всех используемых в работе тимусзависимых (ФГА, PWM) и тимуснезависимых (ЛПС) митогенов (табл. 1). Уровень экспрессии Fas-рецептора CD95+ на лимфоцитах больных оказался выше ($18,5 \pm 3,6\%$), чем в контрольной группе исследования ($7,7 \pm 2,1\%$) (рис. 1).

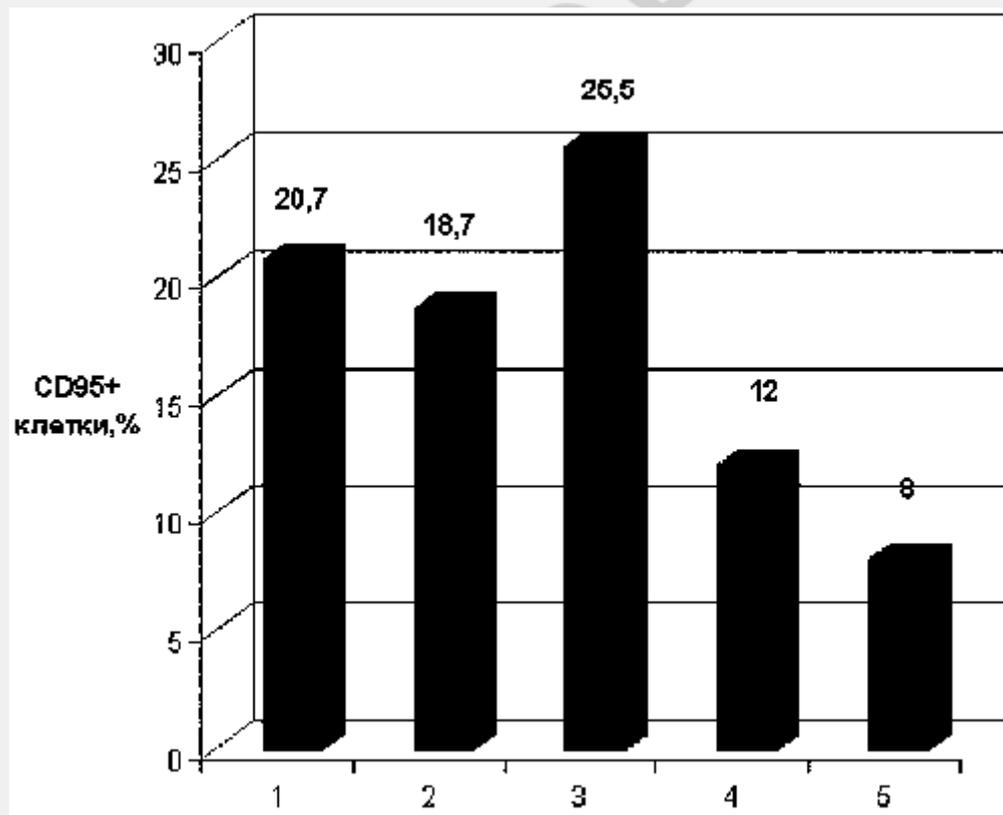


Рис. 1. Уровень экспрессии CD95 у детей с различными формами хирургической инфекции и у здоровых детей. 1 - острый гематогенный остеомиелит; 2 - хронический остеомиелит; 3 - сепсис; 4 - ХИ мягких тканей; 5 – здоровые дети.

Таблица 1

Показатели функциональной активности лимфоцитов у детей с хирургической инфекцией

Группы детей	Спонтанная пролиферация, ИМП/мин	ИС ФГА, 5 мкг/мл	ИС ФГА, 15 мкг/мл	ИС РВМ, 5 мкг/мл	ИС ЛПС, 5 мкг/мл
Больные	181,06±25,11	7,12±1,67*	24,05±5,64*	2,79±0,78	1,05±0,10
Здоровые	221,91±30,98	11,76±2,23	36,03±6,64	3,19±0,90	1,15±0,13

Примечание: - различия достоверны ($p < 0,05$).

Одной из причин развития ИДС у детей с ХИ может быть активационно-индуцированный апоптоз лимфоцитов, при котором наблюдается повышение экспрессии CD95 на активированных клетках, что обуславливает дальнейшее развитие запрограммированной клеточной гибели [10]. Индукторами апоптоза и анергии служат суперантигены возбудителей ХИ. При взаимодействии иммунокомпетентных клеток с суперантигенами отдельная Т-клетка может быть активирована к реализации позитивного (продукция цитокинов, пролиферация), либо негативного (активационно-индуцированный апоптоз, индукция анергии) ответа [18]. Существует мнение, что развитию анергии предшествует мощный ответ Т-клеток, реагирующих на суперантиген, после чего наблюдается гибель наиболее активных клеток, подвергающихся клональной делеции за счет апоптоза, а оставшиеся клетки становятся ареактивными. Считается, что клетки, находящиеся в состоянии анергии, лишены способности продуцировать ИЛ-2 и добавление экзогенного ИЛ-2 может предотвратить развитие ареактивности [3].

Данные, характеризующие степень пролиферативной активности лимфоцитов у детей с различными формами ХИ представлены в табл. 2. Достоверное снижение спонтанной пролиферации лимфоцитов установлено в группе детей с хроническим остеомиелитом ($p < 0,05$). Снижение данного показателя может быть обусловлено нарушением трансдукции активирующего сигнала при изменениях внутриклеточного метаболизма или нарушением лиганд-рецепторного взаимодействия, экспрессии адгезивных и костимулирующих молекул из-за недостаточности цитокиновой регуляции [15,18].

Таблица 2

Показатели функциональной активности лимфоцитов у детей с различными формами хирургической инфекции

Диагноз	Спонтанная пролиферация, ИМП/мин	ИС ФГА 5 мкг/мл	ИС ФГА 15 мкг/мл	ИС РWM 5 мкг/мл	ИС ЛПС 5 мкг/мл
Острый гематогенный остеомиелит	209,1±28,7	13,8±2,1	24,7±6,0	3,5±0,9	1,2±0,15
Хронический остеомиелит	170,1±18,1*	8,32±1,9	20,85±3,7*	1,9±0,5	0,8±0,07*
Сепсис	226±31,0	19,56±4,6	15,28±3,4*	5,56±1,8	0,76±0,06*
ХИ мягких тканей	176±23,5	5,9±1,2*	24,1±5,9*	1,9±0,6	1,17±0,16
Здоровые дети	221,91±23,9	11,76±2,2	36,03±6,6	3,19±0,9	1,15±0,13

Примечание: - различия достоверны ($p < 0,05$).

В группах больных с хроническим остеомиелитом и сепсисом наблюдалось достоверное снижение пролиферативной активности для митогенов, стимулирующих как Т-, так и В-лимфоциты. Кроме того, у всех детей с сепсисом пролиферативный ответ лимфоцитов на стимуляцию ФГА в оптимальной концентрации был ниже, чем на ФГА в минимальной концентрации (15,28±3,43 и 19,56±4,68 соответственно). При сепсисе возникает состояние прогрессирующего накопления медиаторов воспаления во внутренней среде организма больного. Нарастает уровень интерферона- γ , простагландинов и тромбоксанов, фактор некроза опухолей (ФНО), ИЛ-6 и другие провоспалительные цитокины содержатся в предельных количествах и этот высокий уровень сохраняется более 48 ч. В связи с этим нарушаются функции Т-лимфоцитов усиливается их запрограммированная гибель. Избыток некоторых медиаторов воспаления, например, PGE₂ на таком фоне тормозит продукцию ИЛ-2 с падением активности Т-лимфоцитов [5,6].

Данные, характеризующие уровень экспрессии CD95 на лимфоцитах пациентов с различными формами ХИ, представлены на рис. 1. Самые высокие значения наблюдались у септических больных, составляя 25,5±5,3%. При остром и хроническом остеомиелите экспрессия CD95 также была повышена и составляла 20,7±4,3% и 18,7±4,9% соответственно. Предполагается двойственная роль апоптоза в патогенезе ХИ, на раннем этапе он ограничивает развитие системной воспалительной реакции, а на позднем – способствует развитию иммуносупрессии и неблагоприятному исходу заболевания [10].

При сравнительном анализе показателей функциональной активности лимфоцитов у детей разных возрастных групп с ХИ отчетливо прослеживаются онтогенетические изменения функционирования иммунной системы (табл. 3).

Таблица 3

Показатели функциональной активности лимфоцитов у детей с хирургической инфекцией в зависимости от возраста

Возраст детей	Спонтанная пролиферация, имп/мин	ИС ФГА 5 мкг/мл	ИС ФГА 15 мкг/мл	ИС PWM 5 мкг/мл	ИС ЛПС 5 мкг/мл
До 1 года	200,8±34,7	23,6±2,0	35,4±7,5	5,4±1,9	1,2±0,14
1–6 лет	183,8±31,3	6,85±2,0*	21,8±5,1	2,4±0,5	1,2±0,14
7–15 лет	171,4±29,8	7,2±2,3*	18,9±4,3*	1,5±0,2*	1,04±0,11

Примечание: - различия достоверны ($p < 0,05$).

Исследованиями установлено, что для новорожденных и детей до 1 года характерны нормальные показатели пролиферации Т- и В-лимфоцитов. Лишь у 9% пациентов пролиферативная активность понижена, однако значения параметров не снижаются менее чем на 30% от нижней границы нормальных значений. Это позволяет сделать вывод о том, что в иммуногенезе ХИ у детей этой возрастной группы главную роль играет недостаточность функционирования неспецифических механизмов иммунного ответа. Известно, что нейтрофилы новорожденных детей характеризуются сниженными по сравнению с взрослыми функциональными характеристиками. К ним относятся хемотаксис, способность к изменению формы клетки, фагоцитоз, экспрессия CD11b-молекул, адгезия, киллинг бактерий и окислительный метаболизм. Также показано, что продукция ГМ-КСФ и экспрессия м-РНК к ГМ-КСФ достоверно ниже у новорожденных детей по сравнению со взрослыми [13].

У детей более старшего возраста выявлены нарушения специфического иммунного ответа. Так, в возрасте от 7 до 15 лет в 70% случаев снижен ответ на Т-клеточные митогены, тогда как у детей в возрасте от 1 до 6 лет – у 54%, что свидетельствует о ведущей роли нарушений факторов специфической защиты в патогенезе ХИ у детей данной возрастной группы.

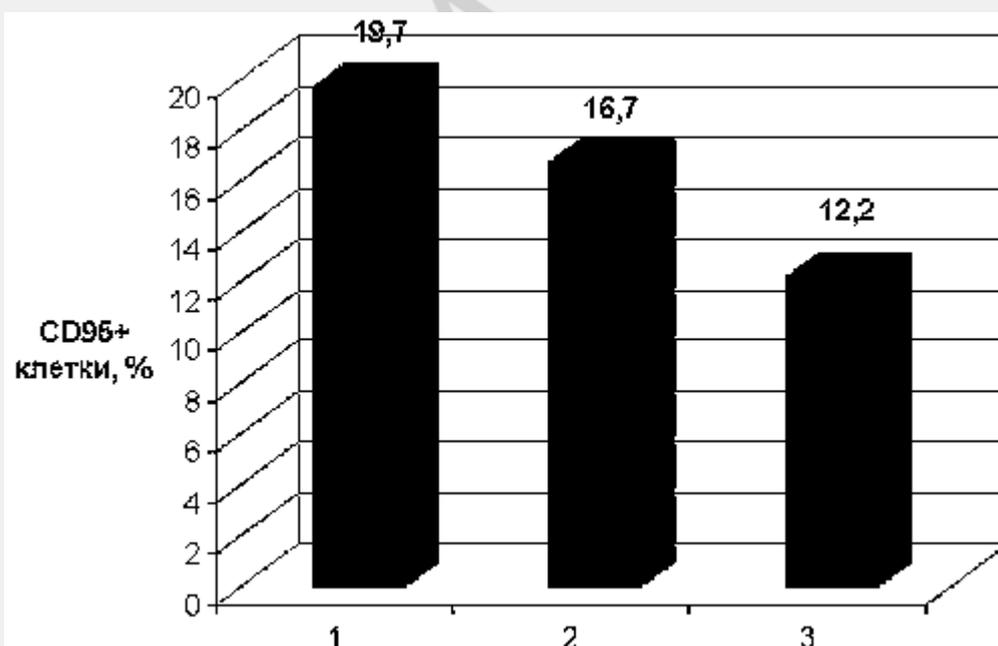


Рис. 2. Уровень экспрессии Fas-рецепторов при ХИ у детей различных возрастных групп. 1 – дети до 1 года; 2 – дети 1-6 лет; 3 – дети 7-15 лет

На рис. 2 представлены данные, характеризующие уровень экспрессии CD95 на

лимфоцитах пациентов различных возрастных групп. Самые высокие показатели наблюдаются у детей в возрасте до 1 года (19,7%), постепенно снижаясь до 16,7% и 12,2% у детей II и III групп соответственно. Обнаруженная повышенная готовность лимфоцитов к апоптозу у детей до 1 года объясняется неспособностью незрелых клеток иммунной системы адекватно реагировать на антигенную стимуляцию. В старшем возрасте в патогенез ИДС большой вклад, вероятно, вносит анергия зрелых клеток.

В клеточной популяции лимфоцитов у новорожденного ребенка преобладают незрелые формы. Для В-лимфоцитов характерен фенотип sIgMhi, sIgD в то время как большинство В-лимфоцитов взрослых имеет фенотип sIgMlo, sIgDhi. Связывание антигена с sIgM вызывает только анергию или ослабление иммунного ответа, поскольку sIgM не сопряжен с инозитолфосфолипидным путем трансдукции сигнала. Следовательно, взаимодействие через данный рецептор ведет к апоптозу незрелых В-лимфоцитов. Кроме того, В-лимфоциты новорожденных детей лишены второго сигнала при кооперации с неонатальными Т-клетками. Для Т-лимфоцитов новорожденных детей характерна крайне низкая экспрессия CD40-L, что снижает способность В-лимфоцитов к переключению классов иммуноглобулинов, следующему за связыванием CD40 - CD40L. Известно, что взаимодействие между этими двумя молекулами очень важно для активации и дифференцировки как В-, так и Т-лимфоцитов. Вследствие дефицита CD40-L могут быть нарушены и способность В-лимфоцитов к изотипическому переключению классов иммуноглобулинов, а также способность Т-клеток к дифференцировке в Th1. Более того, отсутствие взаимодействия CD40 - CD40L может приводить преимущественно непрофессиональному представлению антигенов Т-лимфоцитам, так как нарушается экспрессия В-7 молекул на антигенпрезентирующих клетках [15,18,20].

Заключение

Проведенными исследованиями установлено, что при ХИ в детском возрасте наблюдается глубокий комбинированный иммунодефицит В- и Т- систем иммунитета. Изучение лимфоцитарного звена иммунной системы показало, что в ответ на стимуляцию тимусзависимыми и тимуснезависимыми митогенами наблюдается снижение пролиферативной активности лимфоцитов. Механизмами, обуславливающими снижение пролиферативной активности и количество лимфоцитов при ХИ могут являться: повышенная чувствительность клеток к активационно-индуцированному апоптозу, изменение баланса продукции Тх1- и Тх2-цитокинов, нарушение рецепции или трансдукции ИЛ-2-опосредованного сигнала и угнетение функциональной активности моноцитов, что приводит к дефекту кооперативных взаимодействий Т-лимфоцитов с вспомогательными клетками, а также иммуносупрессорная активность сывороточных факторов.

Важным результатом проведенных исследований являются данные, указывающие на роль апоптоза и анергии лимфоцитов при ХИ, а именно - течение ХИ сопряжено с усилением активационного апоптоза лимфоцитов периферической крови, что подтверждается повышенной экспрессией на них Fas-рецептора, особенно выраженной у больных с тяжелыми формами ХИ. По-видимому, апоптоз и анергия иммунокомпетентных клеток при бактериальной инфекции, обусловленные действием суперантигенов бактерий, играют двойственную роль – с одной стороны, ограничивают системный воспалительный ответ, а с другой – способствуют формированию иммунодепрессии. Данный механизм может объяснить низкий пролиферативный ответ клеток на поликлональные митогены и диктует необходимость назначения иммунокорригирующей терапии, направленной на снижение чувствительности Т-клеток

к активационному апоптозу и выведения их из состояния анергии.

В большинстве случаев клиницисты не имеют важной информации о состоянии иммунной системы конкретного больного, в то время, как под одними и теми же клиническими проявлениями могут скрываться различные иммунологические нарушения требующие принципиально разных методов иммунокоррекции. Например, тяжесть состояния ребенка при ХИ может быть обусловлена в одном случае - дефицитом иммуноглобулинов, а в другом - дефектом цитотоксических реакций. В связи с этим, в первом случае хороший эффект окажет заместительная терапия иммуноглобулинами для внутривенного введения, а во втором - применение рекомбинантного ИЛ-2. Таким образом, при проведении иммунотерапии целесообразно учитывать возраст детей, нозологическую форму, длительность и тяжесть заболевания, вид возбудителя ХИ, индивидуальный иммунный статус и фазу иммунного ответа. Своевременно назначенная и патогенетически обоснованная иммунотерапия будет способствовать улучшению результатов лечения детей с ХИ.

Выводы

1. У детей с ХИ нарушение функциональной активности лимфоцитов периферической крови проявляется в виде снижения спонтанной и митоген-стимулированной пролиферации.
2. Наиболее выраженное снижение митогенной реактивности лимфоцитов чаще встречается у детей при сепсис и хроническом остеомиелите.
3. При всех формах ХИ у детей наблюдается повышенная экспрессия на лимфоцитах маркера апоптоза (Fas). Наибольшая готовность лимфоцитов периферической крови к активационно-индуцированному апоптозу выявлена у больных с сепсисом и острым гематогенным остеомиелитом.
4. Максимальная экспрессия на лимфоцитах маркера CD95 выявлена у детей 1 года жизни.
5. Активационный апоптоз лимфоцитов, реализуемый с вовлечением Fas/FasL, может являться одним из патогенетических механизмов, приводящих к снижению функциональной активности лимфоцитов у детей с различными формами ХИ.

Литература

1. Абаев Ю.К., Катько В.А., Зафранская М.М., Адарченко А.А. Хирургическая инфекция в детском возрасте: анализ и прогноз. //Белорусский медицинский журнал. - 2003. - № 2. - С.4-8.
2. Белушкина Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза //Архив патологии. – 2001. - Т.63, вып.1. – С.51-60.
3. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия (лекция). //Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - № 11. - С.25-32.
4. Воробьев А.А., Борисова Е.В., Моложавая О.С. и др. Иммуносупрессивное действие патогенных грамотрицательных бактерий. //Вестн. Российской АМН. - 2001. - № 2. - С.21-25.
5. Карсонова М.И., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Иммунокорректирующая терапия при хирургической инфекции. //Анналы хирургической гепатологии. – 1999. – Т.4, № 1. - С.88-96.
6. Лебедев В.Ф., Козлов В.К., Гаврилин С.В. Иммунопатогенез тяжелых ранений и травм: возможности иммунокоррекции. //Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 2002. - Т.161, № 4. – С.85-90.
7. Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуномодуляция: история, тенденции

развития, современное состояние и перспективы. //Иммунология. – 2002. – Т.23, № 3. – С.132-138.

8. Нестеренко В.Г. Иммунологические подходы в инфектологии. //Вестн. Российской АМН. – 2001. - № 11. –С.40-41.

9. Новиков Д.К. Противобактериальный иммунитет. //Иммунология. Аллергология Инфектология. – 2002. - № 2. – С.7-18.

10. Норкин М.Н., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний. //Мед. иммунология. – 2000. – Т.2. № 3. – С35-42.

11. Плигина Е.Г., Розинов В.М., Продеус А.П. и др. Иммунологические критерии прогнозирования развития гнойно-воспалительных осложнений у детей с множественными и сочетанными травмами опорно-двигательного аппарата. //Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2000. - № 2. – С.49-54.

12. Самсыгин С.А., Счастный С.А., Власенко В.В. и др. Иммунокоррекция в терапии хронического гематогенного остеомиелита длинных трубчатых костей у детей //Вестн. Российской АМН. – 1991. - № 12. – С.50-53.

13. Стефани С., Вельтищев А.А. Иммунология и иммунопатология детского возраста: Руководство. - М.: Медицина, 1996. - 384 с.

14. Хаитов Р.М. Пинегин Б.В. Иммунодефициты: диагностика и иммунотерапия //Лечащий врач. – 1999. - № 2-3. – С.63-69.

15. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекции. //Иммунология. - 2000. - № 1. - С.61-64.

16. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. //Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т.86, № 3. - С.252-267.

17. Цуман В.Г., Машков А.Е., Щербина В.И. и др. Нарушение системы антиинфекционной резистентности организма и их коррекция у детей с осложненными формами гнойно-септических заболеваний. //Детская хирургия. - 2000. - № 1. - С.16-20.

18. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа. //Иммунология. – 1999. - № 1. – с.17-24.

19. Leung D.Y.M., Huber B.T., Schlievert P.M. Superantigens: molecular biology, immunology and relevance to human disease. - New York, 1997. - 607 p.

20. Schmand J.F., Ayala A., Chaudry I.H. Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. //Critical Care Medicine. - 1994. – Vol.22, N 7. – P.1076-1083.