

ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЗАИМОСВЯЗИ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СТАТУСА ЗДОРОВОГО НОВОРОЖДЕННОГО И ЕГО МАТЕРИ

С.А. Сельков¹, Л.И. Королева¹, А.В. Тишков², В.Б. Аникин³,
Н.Н. Хромов-Борисов⁴

¹ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский институт информатики и автоматизации РАН, Санкт-Петербург

³ ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

⁴ ГОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Росздрава, Санкт-Петербург

Резюме. Проведен анализ IFN статуса у здоровых доношенных новорожденных детей и их матерей с привлечением современных методов статистической обработки. Установлено, что IFN статус у здоровых новорожденных отличается от такового у матерей более высоким содержанием IFNs и усиленной индуцированной продукцией IFN α/β и IFN γ . Выявлена статистически значимая взаимосвязь между показателями IFN статуса у новорожденных и их матерей. Полученные данные важны для оценки неспецифической резистентности в системе мать–новорожденный.

Ключевые слова: интерфероновый статус, новорожденный, мать, статистический анализ.

APPLICATION OF MODERN STATISTICAL METHODS TO ASSESS THE INTERACTION OF THE INTERFERON STATUS OF FULL-TERM NEONATAL INFANT AND HIS MOTHER

Selkov S.A., Koroleva L.I., Tishkov A.V., Anikin V.B., Khromov-Borisov N.N.

Abstract. The analysis of the IFN-status of healthy full-term neonatal infants and their healthy mothers with modern statistical methods was conducted. It was established that the IFN status of healthy full-term neonatal infants differs from the same of their mothers with higher occurrence of IFNs and strengthened induced production of IFN α/β and IFN γ . The statistically significant interaction between indicators of the IFN status of newborns and their mothers has been revealed. The obtained data is important for assessment of nonspecific resistance in system mother–newborn. (*Infekc. immun.*, 2011, vol. 1, N 4, p. 331–340)

Key words: interferon status, neonatal infants, mother, statistical analysis.

Введение

Проведенные в последние годы многочисленные исследования свидетельствуют об успешном применении интерферонов (IFN) или их индукторов в терапии беременных женщин с хламидиозом и вирусной инфекцией, а также

у новорожденных детей с внутриутробной инфекцией, в том числе вызванной хламидиями и герпесвирусами [1, 3, 8, 10, 12, 14, 18, 19, 22]. Однако остается еще немало вопросов, связанных с показаниями к применению IFN в перинатальной практике. Недостаточно изучена

поступила в редакцию 26.05.2011
принята к печати 28.06.2011

Адрес для переписки:

Королева Людмила Илларионовна,
к.м.н., старший научный сотрудник
отделения физиологии и патологии
новорожденных детей с группой
реанимации и интенсивной терапии
недоношенных детей НИИАГ им. Д.О. Отта

199034, Санкт-Петербург, Менделеевская
линия, 3, НИИАГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН.
Тел./факс: (812) 323-75-45.
E-mail: KorolevaLI2011@yandex.ru

© Сельков С.А. и соавт., 2011

взаимосвязь функционального состояния системы IFN у здоровых доношенных детей и их здоровых матерей. Между тем, данные такого сравнительного анализа могут быть использованы в качестве объективных критериев для оценки физиологической и иммунологической реактивности в системе мать—новорожденный, а также при решении вопроса о целесообразности назначения IFN в случае инфекционно-воспалительных заболеваний у доношенных новорожденных детей.

Продукция IFN является важнейшей составляющей механизма врожденного иммунитета и играет одну из ведущих ролей в противовирусном и провоспалительном каскаде цитокинов. К настоящему времени известно, что интерфероны — обширная группа белков, синтезируемых различными клетками в процессе защитной реакции на чужеродные агенты (вирусы, бактерии, антигенное или митогенное воздействие) и способных неспецифически подавлять внутриклеточные этапы репродукции широкого круга микроорганизмов — вирусов, бактерий, простейших, хламидий, риккетсий и др. Кроме того, IFN проявляют иммуномодулирующую и антипролиферативную активность, что позволяет отнести их к полифункциональным биорегуляторам широкого спектра действия [7].

Функциональное состояние системы IFN оценивается с помощью интерферонового статуса (IFN статуса) по следующим показателям: содержанию сывороточного IFN, уровню продукции IFN α/β и IFN γ клетками крови человека *in vitro* при стимуляции их вирусами и/или митогенами [13]. При этом характеристика IFN статуса очень важна для оценки неспецифической резистентности, поскольку максимально приближена к ситуации *in vivo*. В то же время, следует признать трудности стандартизации этого метода, что требует новых подходов к статистической обработке данных.

Использование адекватных статистических методов обработки результатов исследований является одним из самых «болезненных» вопросов в биологии и медицине. В отличие от физических и химических явлений для биологических процессов описательный уровень анализа до настоящего времени остается одним из ведущих. Применение стандартных методов статистической обработки (как параметрических, так и непараметрических) нередко создает предпосылки для малообоснованных «научных спекуляций», когда исследователи подгоняют научные результаты под очевидную, с их точки зрения, идею. В то же время, в ряде случаев и не вызывающие сомнения с точки зрения биологических закономерностей процессы никак не укладываются в «статистические рамки». Все это требует

разработки для биологических исследований особых методов статистики, которые с одной стороны, были бы, несомненно, объективны, а с другой стороны учитывали нестандартный характер биологических объектов и процессов. Итогом полученных в процессе современных методов статистической обработки результатов должна стать максимальная объективизация данных экспериментального и клинического характера.

Цель исследования — выявление закономерностей взаимосвязи показателей интерферонового статуса у здоровых доношенных новорожденных детей и их здоровых матерей с привлечением современных методов статистической обработки.

Материалы и методы

Обследованы 20 здоровых доношенных новорожденных детей и их здоровых матерей. Дети родились на 38—41 неделе беременности, которая протекала без осложнений. Роды и послеродовый период у всех матерей также протекали без каких-либо осложнений. Три ребенка родились путем операции кесарева сечения, предпринятой в связи с миопией высокой степени, остальные — через естественные родовые пути. Оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни была 8 баллов. Масса новорожденных варьировала в пределах от 2750 до 4300 г (в среднем 3346 ± 104 г), длина — от 48 до 55 см (в среднем $51 \pm 0,5$ см). У всех обследованных детей наблюдалось физиологическое течение ранней неонатальной адаптации. Максимальная потеря массы тела на 2—4 день жизни составила в среднем $6 \pm 0,4\%$, у 12 детей (60%) ее восстановление произошло к 5—6 дням жизни, остальные дети были выписаны домой с положительной динамикой веса.

Для определения IFN статуса была использована методика Г.А. Кондратьевой и соавт. в модификации, предложенной В.Б. Аникиным и Р.Ю. Ариненко [19]. Показатели, необходимые для оценки IFN статуса, включали в себя: содержание сывороточного интерферона (IFNs), количественное определение способности лейкоцитов крови продуцировать IFN α/β и IFN γ в ответ на специфическое индуцирующее воздействие *in vitro*. Для этого производилась инкубация цельной крови пациента в присутствии специфического индуктора: вируса болезни Ньюкасла для IFN α/β и фитогемагглютинаина для IFN γ .

Основные принципы использования методики заключаются в том, что IFN обладает антивирусной активностью, проявляющейся в торможении репродукции вируса и, следовательно, в ингибировании его цитопатического действия (ЦПД), характеризующегося деструк-

цией монослоя специально подобранной линии клеток после их инкубации с вирусом. Торможение ЦПД можно охарактеризовать количественно, окрашивая клеточный монослой после инкубации с IFN-содержащими пробами и индикаторным вирусом. Количество абсорбированного клетками красителя обратно пропорционально степени развития ЦПД и прямо пропорционально содержанию IFN в исследуемых пробах. Количественное определение содержания IFN в пробе достигается количественным анализом интенсивности деструкции клеточного монослоя после преинкубации с IFN-содержащими пробами и инкубации с индикаторным вирусом.

После отбора образцы исследуемой крови инкубировали в культуральной среде с указанными выше специфическими природными индукторами. После 24 ч инкубации при 37°C отбирали пробы надосадочной жидкости для тестирования активности индуцированного IFN. Монослойную культуру клеток карциномы легкого человека L-41 (НИИ цитологии РАН, Россия) инкубировали с раститрованными IFN-содержащими пробами в микропланшетах (Linbro, США) в течение 24 ч в CO₂ инкубаторе при 37°C, после чего в микропланшеты вносили раствор индикаторного вируса (вируса ветряночного стоматита, штамм Индиана, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского) в количестве 100 ЦПД₅₀ (цитопатических доз, вызывающих гибель 50% клеток) и инкубировали в течение 18–20 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. После инкубации с вирусом микропланшеты окрашивали кристаллическим фиолетовым (Reanal, Венгрия) для визуализации результатов. Излишки красителя отмывали дистиллированной водой, микропланшеты высушивали, затем краситель, связавшийся с живыми клетками, экстрагировали 30% этанолом и микропланшеты фотометрировали на автоматическом фотометре «Multiscan» (Labsystems, Финляндия) для 96-луночных микропланшетов в режиме многократного сканирования лунок при длине волны 590 нм. Определяемое количество связавшегося красителя было прямо пропорционально содержанию IFN в определяемом образце. Данная зависимость была получена титрованием в аналогичных условиях стандартного референс-препарата нативного человеческого IFN α , полученного из ГИСК им. Л.А. Тарасевича, стандартизованного по удельной активности. Количественное содержание IFN в пробах определяли путем интерполяции результатов в пределах зависимости содержания IFN в пробах интенсивности деструкции клеточного монослоя. Все вычисления производили с использованием специально разработанной компьютерной программы.

Результаты анализа выражали в международных единицах (МЕ) активности IFN в 1 мл сыворотки крови или в 1 мл используемой системы индукции (МЕ/мл). Кровь для исследований у матерей брали из подкожной вены локтевого сгиба в количестве 3 мл на третьи сутки после родов. У детей кровь брали из поверхностных вен головы в количестве 3 мл также на третьи сутки после рождения.

Для статистического анализа полученных данных использованы методы прикладной статистики, адекватные решаемым задачам [5, 15]. Для вычислений использованы такие универсальные современные пакеты статистических программ, как коммерческая программа StatXact-8 [28], признанная эталоном точных непараметрических методов, некоммерческая отечественная AtteStat (версия 12.5) [4], а также специализированные программы. Так, для визуализации (графического представления) исходных данных и результатов их статистического описания использованы программы InStat+ (версия 3.036) и PAST (версия 2.08b) [24].

InStat+ позволяет на одном графике типа «короб с усами» (boxplot или box-and-whisker plot) представлять как исходные значения, наблюдаемые в анализируемых выборках, так и основные результаты их анализа: средние значения (M), медианы (Me), квартили (Q), доверительные интервалы (ДИ) для Me и выявлять резко выделяющиеся значения («выбросы»). С помощью программы PAST удобно строить гистограммы и нормальные вероятностные графики для визуализации согласия данных с нормальным (гауссовым) распределением.

В соответствии с международными рекомендациями [20] при проверке статистических гипотез мы ориентировались не только на P-значения, но и находили ДИ для изучаемых различий и оценивали так называемый «размер эффекта» (effect size) [26]. Для этого использована электронная таблица ESCI_JSMS.xls [32], которая позволяет на одном графике наглядно представить исходные значения для двух сравниваемых выборок, их средние значения, ДИ для средних и ДИ для разности средних ($\Delta = M_1 - M_2$). Как известно, ДИ для разности двух средних позволяет визуализировать проверку нулевой гипотезы об отсутствии различий между ними ($H_0: \Delta = 0$). Если $(1 - \alpha) \times 100\%$ -й ДИ для разности средних накрывает значение $\Delta = 0$, то у нас нет оснований сомневаться в нулевой гипотезе. Если же $(1 - \alpha) \times 100\%$ -й ДИ для разности средних не накрывает значение $\Delta = 0$, то у нас появляется основание сомневаться в нулевой гипотезе, и мы можем взять на себя смелость ее отклонить и принять альтернативную гипотезу о наличии различий ($H_0: \Delta \neq 0$), и придти к выводу, что наблюдаемое различие статистически значимо на выбранном уровне значимости α .

Кроме статистической значимости наблюдаемых эффектов клинически (практически) важным показателем является «размер эффекта» (effect size) [26]. Для его оценки использовали известный показатель d_c Коуэна (Cohen), который является стандартизированной величиной для разности двух средних. Существует вербальная шкала для интерпретации получаемых значений d_c : 0–0,5 — от ничтожного до слабого, 0,5–1,0 — от слабого до умеренного, 1,0–2,0 — от умеренного до сильного и 2,0–4,0 — от сильно до очень сильного [26].

Кроме традиционных показателей убедительности наблюдаемых эффектов, таких как Р-значение, был использован бейзов фактор (BF) [6, 29, 32]. Бейзов фактор признан более адекватным показателем при интерпретации результатов проверки статистических гипотез, нежели Р-значение. Он показывает, во сколько раз более правдоподобно получить наблюдаемое различие d (эффект) при условии, что верна нулевая гипотеза об отсутствии различий ($H_0: d = 0$), чем при условии, что верна альтернативная гипотеза о наличии эффекта ($H_1: d \neq 0$). Согласно наиболее распространенной шкале градаций BF в пользу альтернативной гипотезы H_1 против нулевой гипотезы H_0 значения BF от 1,0 до 0,33 трактуются как свидетельства, не заслуживающие внимания, от 0,33 до 0,10 — как умеренные, от 0,10 до 0,033 — сильные, от 0,033 до 0,010 — очень сильные, $BF < 0,01$ — как убедительные (в пользу H_1 против H_0). Для вычисления бейзова фактора BF_{SD} на основе t-критерия Сэвиджа–Дики использована программа SDtest [31].

Для оценки статистических взаимосвязей между показателями IFN статуса у новорожденных и их матерей использованы параметрический коэффициент линейной корреляции Пирсона r и непараметрический (ранговый) коэффициент корреляции Спирмена r_s [5]. Общеизвестна интерпретация для коэффициентов корреляции: 0–0,5 — корреляция от ничтожной до слабой; 0,5–0,7 — умеренная; 0,7–0,9 — сильная; 0,9–1 — очень сильная [5].

Для проверки гипотез о равенстве средних двух выборок в настоящей работе применен критерий Уэлча [30]. В отличие от критерия Стьюдента, он учитывает неравенство дисперсий, которое можно проверить F-критерием Фишера [15].

Результаты

Полученные данные о IFN статусе новорожденных и их матерей представлены в табл. 1 и на рис. 1 в виде графиков типа «короб с усами», которые позволяют визуализировать исходные данные и основные результаты их статистического описания.

ТАБЛИЦА 1. ИСХОДНЫЕ ДАННЫЕ О СОДЕРЖАНИИ IFNs И УРОВНЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ IFN α / β И IFN γ У ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ И ИХ МАТЕРЕЙ (МЕ/мл)

№ п/п	Cs	Ms	C γ	M γ	C α / β	M α / β
1	28	27	48	36	190	38
2	26	27	62	24	324	42
3	26	25	44	22	260	94
4	31	28	92	50	204	86
5	31	24	80	56	64	170
6	35	31	61	57	132	81
7	30	28	88	41	195	58
8	33	27	83	107	95	92
9	26	29	102	97	205	59
10	33	30	90	54	62	71
11	29	25	58	56	99	103
12	27	25	39	30	132	101
13	32	26	71	44	117	93
14	31	29	74	48	115	70
15	23	26	104	68	252	115
16	28	23	90	65	167	159
17	27		54		216	
18	29		86		152	
19	29		60		158	
20	29		72		86	

Примечание. Здесь, в табл. 3, 4 и на рис. 1: C (Child) — ребенок; M (Mother) — мать; интерфероны: IFNs, IFN α / β и IFN γ .

При выборе статистического критерия для сравнения такого рода данных возникает дилемма. С одной стороны, их можно рассматривать как связанные (парные) наблюдения и тогда за единицу наблюдения принимать пару мать–новорожденный и использовать для их сравнения парные (одновыборочные) статистические критерии. В то же время, после рождения ребенок и его мать суть два отдельных организма. Поэтому, если наблюдаемые значения в парах некоррелированы, то новорожденных и их матерей можно рассматривать по отдельности как две независимые выборки. Тогда их можно анализировать посредством двухвыборочных критериев, пригодных для сравнения двух независимых выборок. Более того, при этом не теряется информация о четырех последних новорожденных, у матерей которых не удалось изучить IFN статус.

В данном случае предварительный анализ показал, что по содержанию и уровню продукции каждого из трех типов исследованных IFN между парами мать–новорожденный корреляции статистически незначимы (табл. 3 и 4), и поэтому для их сравнения были использованы двухвыборочные критерии. При применении одновыборочных критериев к этим данным, как к парным, результаты (которые здесь не представлены) были практически сопоставимы.

Из рис. 1 видно, что среди данных об уровне продукции $IFN\alpha/\beta$ и $IFN\gamma$ у новорожденных и их матерей наблюдаются резко выделяющиеся значения («выбросы» за пределами «усов»). Данная диаграмма позволяет также заметить, что различия по содержанию IFNs у новорожденных и их матерей значительно меньше, чем по уровню продукции $IFN\alpha/\beta$ и $IFN\gamma$. Кроме того, что немало важно, варьирование уровня продукции $IFN\alpha/\beta$ у новорожденных явно выше, чем у их матерей.

Следующим шагом статистического анализа выборка была проверка согласия выборочных распределений с нормальным распределением. Известно, что нормальное (гауссово) распределение признака имеет место в том случае, если значения интересующего нас признака у большинства объектов близки к их среднему и с равной вероятностью отклоняются от него в большую или меньшую сторону [11]. В случае отсутствия статистически значимых отклонений от нормального распределения для дальнейшего анализа можно использовать параметрические методы.

Результаты, представленные на рис. 2 и 3, свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отклонений от нормального (гауссова) распределения для данных о содержании IFNs и уровне индуцированной продукции $IFN\gamma$ и $IFN\alpha/\beta$ в группах здоровых новорожденных и их матерей (все P-значения превышают традиционный уровень значимости $\alpha = 0,05$).

Поэтому для дальнейшего анализа этих данных были использованы традиционные параметрические методы статистики.

Результаты исследований IFN статуса показали, что у здоровых доношенных новорожденных отмечается более высокий уровень IFNs: $M = 29,2$ МЕ/мл (95% ДИ от 27,8 до 30,5), чем у их здоровых матерей — $M = 26,9$ МЕ/мл (95% ДИ от 26,9 до 28,1) (табл. 2). Различия по уровню IFNs у новорожденных и их матерей были статистически умеренно значимыми ($P = 0,012$). Преобразуя эту разность в стандартизированный размер эффекта по Коуэну мы получаем возможность интерпретировать его как «умеренный» ($d_c = 0,86$ с 95%-м ДИ от 0,20 до 1,51). Полученное значение бейзова фактора ($BF = 0,28$) также можно интерпретировать как умеренное свидетельство в пользу альтернативной гипотезы. Однако выявлено низкое значение соответствующей вероятности воспроизведения эффекта ($P_{\text{сrep}} = 0,66$) и неубедительные (накрывающие значение 0) 95%-е предсказательные интервалы (ПИ): для разности средних Δ (от $-0,2$ до 4,8) и для размера эффекта по Коуэну d_c (от $-0,1$ до 1,9). Это означает, что если повторить данное исследование в таком же объеме, то статистически значимый результат (на уровне значимости $\alpha = 0,05$) воспроизведется лишь с вероятностью 66%.

Из табл. 2 видно, что стимулированная продукция $IFN\gamma$ у доношенных новорожденных де-

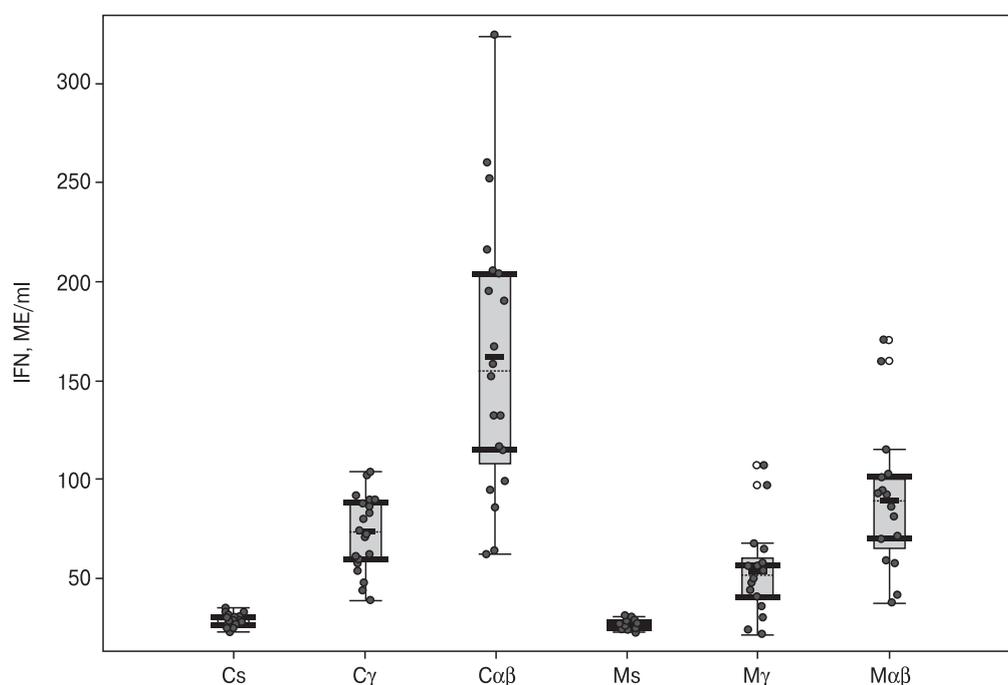


Рисунок 1. Диаграммы «короб с усами» для данных об IFN статусе у здоровых доношенных новорожденных и их здоровых матерей

Короткие горизонтальные жирные линии внутри «короба» — средние значения. Длинные горизонтальные жирные линии — границы 95%-х ДИ для медиан. Вертикальные отрезки под и над коробами — «усы», которые накрывают наибольшее и наименьшее наблюдаемые значения, укладываемые в три межквартильных интервала. За пределами «усов» находятся выделяющиеся значения («выбросы»), они помечены точками другого цвета справа.

тей ($M = 72,9$ с 95%-м ДИ от 64,0 до 81,8 МЕ/мл) также была выше таковой у их матерей ($M = 53,4$ с 95%-м ДИ от 41,0 до 65,8 МЕ/мл). Наблюдаемое различие статистически умеренно значимо, поскольку 95%-й ДИ (от 4,7 до 34,3 МЕ/мл) для разности средних ($\Delta = 19,5$ МЕ/мл) не накрывает значение 0 и $P = 0,011$. Кроме статистической значимости можно говорить об «умеренном» размере эффекта по Коуэну ($d_c = 0,92$ с 95% ДИ от 0,21 до 1,62) и умеренном значении бейзова фактора ($BF = 0,28$), свидетельствующего в пользу альтернативной гипотезы. Однако, как и в случае с IFNs, выявлены низкие значения соответствующей вероятности воспроизведения эффекта ($P_{\text{сrep}} = 0,67$) и неубедительные (накрывающие значение 0) ПИ для разности средних (от $-1,4$ до

40,4) и для стандартизированного размера эффекта по Коуэну (от $-0,06$ до 2,0). Это означает, что если повторить данное исследование в таком же объеме, то статистически значимый результат (на уровне значимости $\alpha = 0,05$) воспроизведется лишь с вероятностью 67%.

Наиболее существенными оказались различия между показателями индуцированной продукции IFN α/β у новорожденных и их матерей (табл. 2). Стимулированная продукция IFN α/β у новорожденных ($M = 161,3$ с 95%-м ДИ от 128,6 до 193,9 МЕ/мл) была почти в 2 раза выше, чем у их здоровых матерей ($M = 89,5$ с 95%-м ДИ от 70,0 до 108,9 МЕ/мл). Наблюдаемое различие следует признать статистически высокозначимым, поскольку 95%-й ДИ (от 16,3 до 108,7 МЕ/мл)

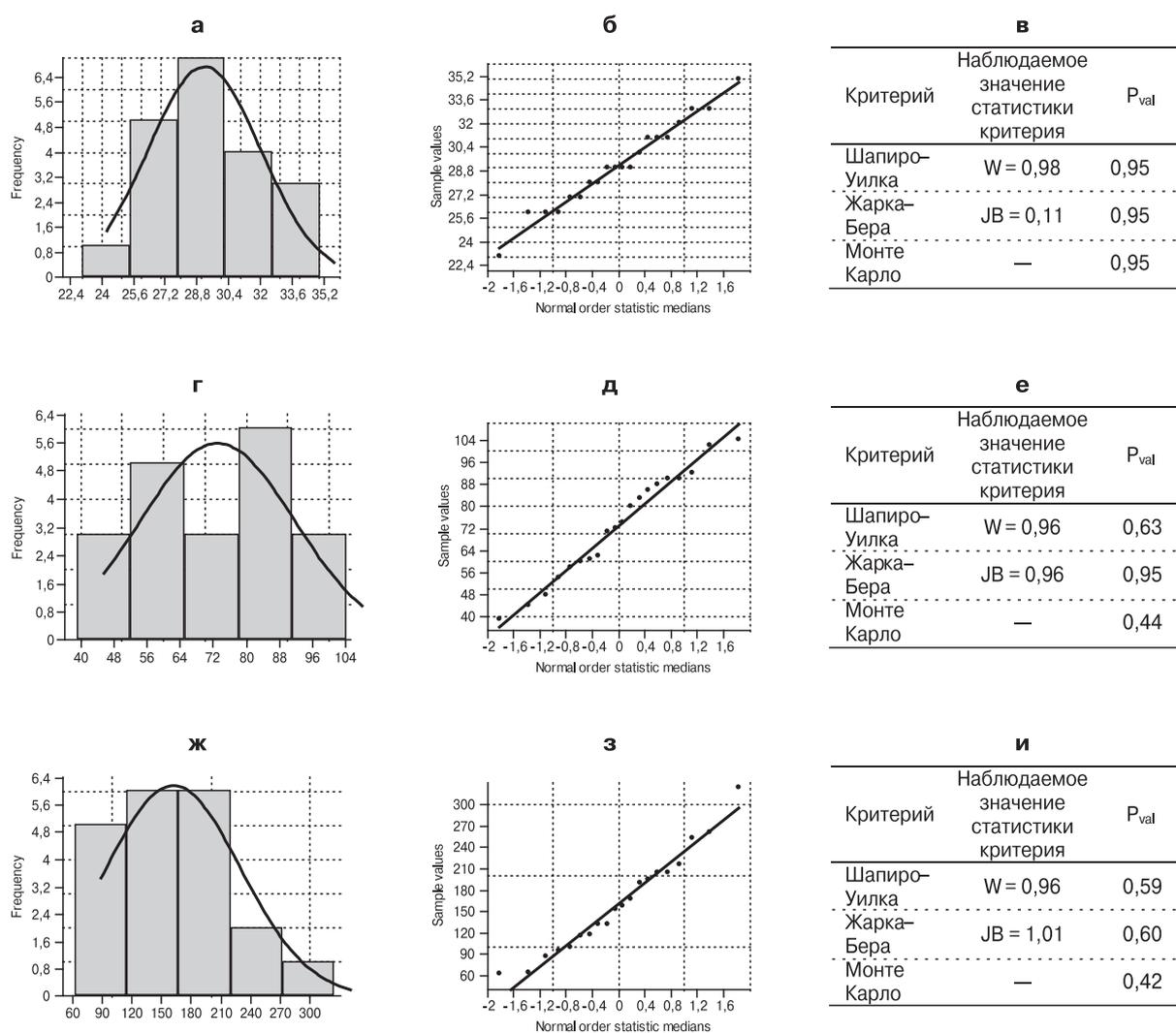


Рисунок 2. Проверка согласия данных об IFN статусе с нормальным (гауссовым) распределением в группе здоровых новорожденных ($n = 20$)

Примечание. Здесь и на рис. 3: первая строка: (а), (б) и (в) — данные об IFNs; вторая строка: (г), (д) и (е) — данные об IFN γ ; третья строка: (ж), (з) и (и) — данные об IFN α/β ; первый столбец — гистограммы выборочных распределений; сплошные кривые суть теоретически ожидаемые плотности нормального распределения; второй столбец — нормальные вероятностные графики: прямые линии суть теоретически ожидаемые функции распределения в нормальном вероятностном масштабе; точки суть экспериментальные значения в этом же масштабе; третий столбец — результаты проверки согласия с нормальным распределением с помощью трех критериев.

для разности средних ($\Delta = 71,8$ МЕ/мл) далеко отстоит от значения $\Delta = 0$, и $P = 0,00042$. Наблюдаемый стандартизированный размер эффекта по Коуэну ($d_c = 1,25$ с 95% ДИ от 0,55 до 1,94) в данном случае можно интерпретировать как «умеренно-сильный», а полученное значение бейзова фактора ($BF = 0,013$) — как сильное свидетельство в пользу альтернативной гипотезы. О важности выявленного различия свидетельствуют также высокая вероятность воспроизведения $P_{\text{rep}} = 0,90$ и тот факт, что 95%-й ПИ для разности средних Δ (от 16,3 до 127,3 МЕ/мл) и для стандартизированного размера эффекта по Коуэну d_c (от 0,3 от 2,4) не накрывают нулевое значение. Это означает, что при повторении исследования в таком же объеме с вероятностью 90% будет получен статистически значимый результат. Таким образом, обнаруженное почти двукратное превышение продукции $IFN\alpha/\beta$ у здоровых доношенных новорожденных по сравнению с их здоровыми матерями явно может иметь клиническое значение и, несомнен-

но, заслуживает дальнейшего осмысления и изучения.

Для поиска корреляционных связей между показателями IFN статуса как внутри, так и между группами детей и их матерей использовали два показателя: параметрический коэффициент линейной корреляции Пирсона r и непараметрический ранговый коэффициент корреляции Спирмена r_s . Результаты представлены в табл. 3 и 4, где жирным курсивом выделены статистически высоко значимые корреляции. Обнаружены два типа статистически высоко значимых зависимостей, как положительная, так и отрицательная. Причем они подтверждаются данными для обоих коэффициентов корреляции. Выявленную положительную корреляцию между продукцией $IFN\gamma$ у новорожденных и их матерей можно интерпретировать как умеренную. Коэффициент корреляции Пирсона составил $r = 0,65$ с 95%-м ДИ от 0,23 до 0,87 и $P = 0,0064$, а коэффициент корреляции Спирмена составил $r_s = 0,64$ с 95%-м ДИ от 0,22 до 0,86 и $P = 0,0071$.

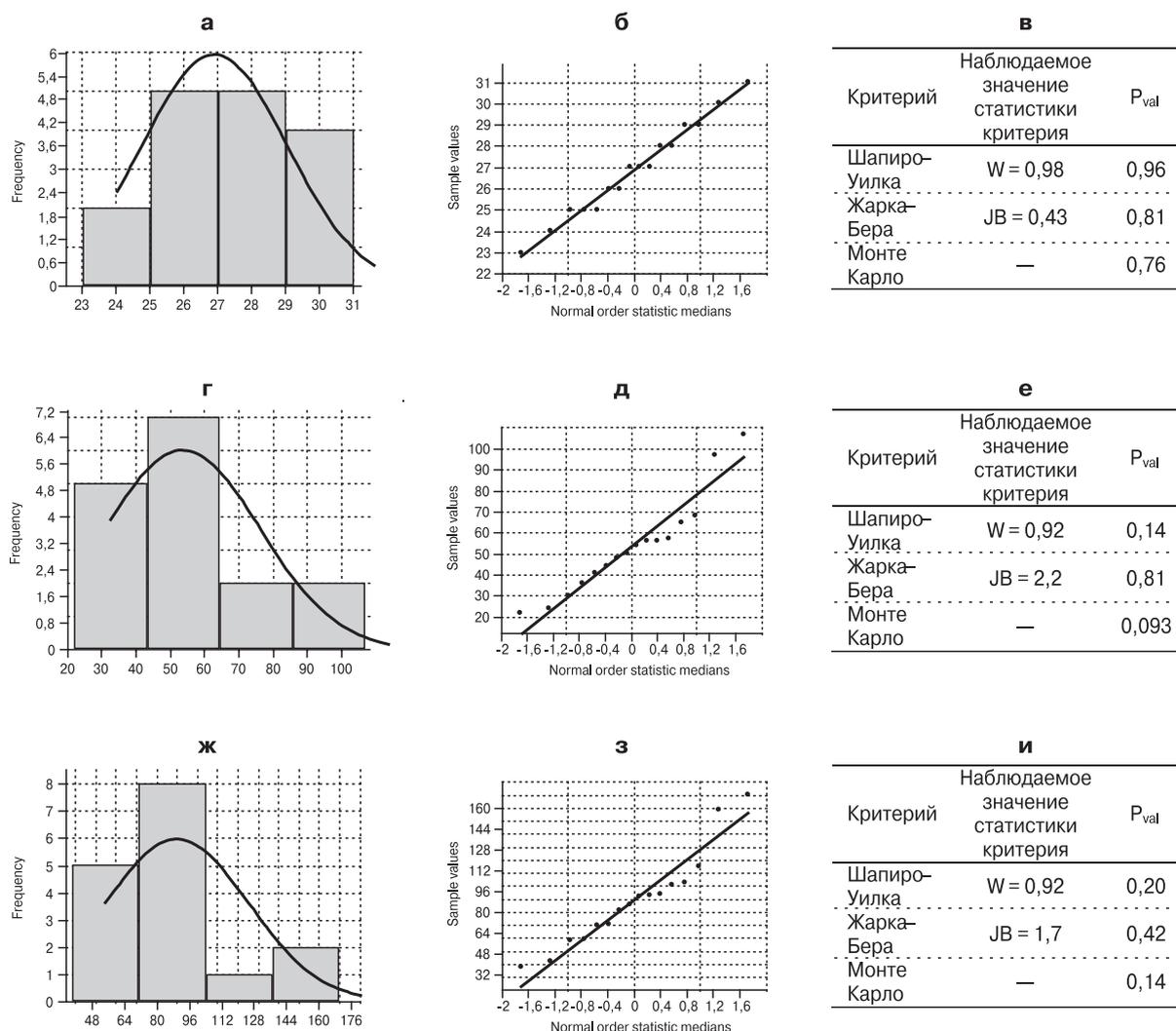


Рисунок 3. Проверка согласия данных об IFN статусе с нормальным (гауссовым) распределением в группе здоровых матерей (n = 16)

ТАБЛИЦА 2. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ IFN СТАТУСА У ЗДОРОВЫХ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ И ИХ МАТЕРЕЙ

Группы	Показатели	Сывороточный IFNs (МЕ/мл)	Продукция IFN <i>in vitro</i>	
			IFN γ (МЕ/мл)	IFN α/β (МЕ/мл)
Средние значения с 95%-ми ДИ				
Новорожденные	$n_1 = 20$	27,8 ^{29,2} _{30,5}	64,0 ^{72,9} _{81,8}	128,6 ^{161,3} _{193,9}
Матери	$n_2 = 16$	25,7 ^{26,9} _{28,1}	41,0 ^{53,4} _{65,8}	70,0 ^{89,5} _{108,9}
Дисперсии с 95%-ми ДИ и их сравнение				
Новорожденные		3,8 ^{8,6} _{13,3}	206,6 ^{364,8} _{523,1}	2114,8 ^{4860,6} _{7606,4}
Матери		2,8 ^{4,9} _{7,0}	226,3 ^{542,1} _{857,9}	583,8 ^{1330,1} _{2076,6}
F-критерий, P_{val}		0,28	0,41	0,014
Сравнение средних и проверка гипотез				
Критерий Уэлча*	t [v]	2,65 [v = 34]	2,70 [v = 29]	3,97 [v = 30]
	P_{val}	0,012	0,011	0,00042
BF_{SD}		0,28	0,28	0,013
Размеры эффекта с 95%-ми ДИ				
Разность средних, Δ с 95%-й ДИ		0,5 ^{2,3} _{4,1}	4,7 ^{19,5} _{34,3}	34,8 ^{71,8} _{108,7}
Стандартизированный размер эффекта по Коуэну, d_c с 95%-м ДИ		0,20 ^{0,86} _{1,51}	0,21 ^{0,92} _{1,62}	0,55 ^{1,25} _{1,94}
Статистические предсказания				
95%-й ПИ для разности средних Δ		[-0,2; 4,8]	[-1,4; 40,4]	[16,3; 127,3]
95%-й ПИ для d_c		[-0,1; 1,9]	[-0,06; 2,0]	[0,3; 2,4]
Вероятность воспроизведения при $\alpha = 0,05$, $P_{срп}$		0,66	0,67	0,90

Примечания: v — число степеней свободы для критерия Уэлча. В виде подстрочников слева и справа от точечных оценок параметров указаны нижняя и верхняя границы 95%-го ДИ. Жирным курсивом выделены наиболее убедительные различия.

Здесь и в табл. 3 жирным курсивом выделены статистически значимые значения t и соответствующие низкие P -значения. Для статистически значимых корреляций в подстрочниках слева и справа от точечных оценок коэффициентов корреляции указаны нижние и верхние границы 95%-х ДИ.

Отрицательная сильная корреляция обнаружена между содержанием IFNs и продукцией IFN α/β как у новорожденных, так и у их матерей. Она также подтверждается данными об обоих коэффициентах корреляции. Коэффициент корреляции Пирсона для новорожденных составил $r = -0,71$ с 95%-м ДИ от $-0,89$ до $-0,34$ и $P = 0,0019$, а коэффициент корреляции Спирмена составил $r_s = -0,75$ с 95%-м ДИ от $-0,94$ до $-0,34$ и $P = 0,0064$. Для матерей коэффициент корреляции Пирсона составил $r = -0,69$ с 95%-м ДИ от $-0,88$ до $-0,29$ и $P = 0,0034$, а коэффициент корреляции Спирмена составил $r_s = -0,74$ с 95%-м ДИ от $-0,90$ до $-0,38$ и $P = 0,00094$ (табл. 3 и 4).

Обсуждение

Таким образом, показатели IFN статуса периферической крови у доношенных новорожденных отличаются от таковых у матерей более высоким содержанием IFNs и усиленной способностью к продукции лейкоцитами

крови IFN α/β и IFN γ . Использованное нами гармоничное сочетание методов статистических доказательств и предсказаний позволило вычлнить среди выявленных статистически значимых различий и корреляций те, которые представляют наибольший клинический интерес. Наиболее важным следует признать обнаруженное почти 2-кратное превышение индукции IFN γ у новорожденных по сравнению с их матерями. Наблюдается также положительная умеренная корреляция между уровнем индукции IFN γ в парах новорожденный—мать. Наибольший интерес представляет обнаруженная сильная отрицательная корреляция между содержанием IFNs и индукцией IFN α/β . Создается впечатление, что между этими двумя показателями IFN статуса как у новорожденных, так и у их матерей существует взаимовлияние: при высоком содержании IFNs происходит снижение индукции IFN α/β и наоборот — при низком содержании IFNs сильнее стимулируется продукция IFN α/β .

Наши данные о высоком уровне IFNs у доношенных новорожденных в периферической крови согласуются с имеющимися в литературе сведениями. Так, в исследованиях В.В. Малиновской (1996) было показано, что в крови у здоровых новорожденных циркулирует значительное количество «раннего» IFN, отличающегося

ТАБЛИЦА 3. МАТРИЦА ПОПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ НА ОСНОВЕ КОЭФФИЦИЕНТА КОРРЕЛЯЦИИ ПИРСОНА r МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ IFN СТАТУСА КАК ВНУТРИ, ТАК И МЕЖДУ ГРУППАМИ ДЕТЕЙ И ИХ МАТЕРЕЙ

	C_s	$C_{\alpha/\beta}$	C_γ	M_s	$M_{\alpha/\beta}$	M_γ
C_s		0,0019	0,95	0,079	0,99	0,51
$C_{\alpha/\beta}$	-0,89	-0,71	0,92	0,85	0,16	0,22
C_γ	0,017	-0,027		0,45	0,51	0,0064
M_s	0,45	-0,053	0,20		0,0034	0,56
$M_{\alpha/\beta}$	0,0031	-0,37	0,18	-0,88	-0,69	0,46
M_γ	0,18	-0,32	0,23	0,65	0,16	0,20

Примечание: над диагональю представлены P-значения, под диагональю — наблюдаемые значения коэффициента корреляции Пирсона r .

ТАБЛИЦА 4. МАТРИЦА ПОПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ НА ОСНОВЕ КОЭФФИЦИЕНТА КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА r_s МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ IFN СТАТУСА КАК ВНУТРИ, ТАК И МЕЖДУ ГРУППАМИ ДЕТЕЙ И ИХ МАТЕРЕЙ

	C_s	$C_{\alpha/\beta}$	C_γ	M_s	$M_{\alpha/\beta}$	M_γ
C_s		0,00082	0,97	0,12	0,85	0,38
$C_{\alpha/\beta}$	-0,94	-0,75	0,79	0,97	0,31	0,24
C_γ	0,012	0,071		0,33	0,87	0,0071
M_s	0,41	-0,010	0,26		0,00094	0,68
$M_{\alpha/\beta}$	-0,052	-0,27	0,046	-0,90	-0,74	0,22
M_γ	0,24	-0,32	0,22	0,64	0,11	0,33

Примечание: над диагональю представлены P-значения, под диагональю — наблюдаемые значения коэффициента корреляции Спирмена r_s .

от такового у взрослых по физико-химическим и биологическим свойствам менее выраженными гидрофобными, антипролиферативными и антивирусными свойствами. «Ранний» IFN α имеет физиологическую направленность на рост и дифференциацию клеток плода. Выявлена связь между уровнем «раннего» IFN и морфологическим развитием плода [22]. Наибольшее количество «раннего» IFN определяется у глубоко недоношенных детей [16]. Следует отметить, что в течение всего гестационного периода IFN в сыворотке крови у здоровых беременных женщин отсутствует или выявляется в незначительных количествах [9], что указывает на возможность его продукции клетками развивающегося плода.

Известно, что в норме у здоровых небеременных женщин в сыворотке крови обнаруживаются небольшие количества IFN (4,4 МЕ/мл) [3]. Выявленные нами высокие уровни IFNs у матерей в раннем послеродовом периоде, по-видимому, являются следствием повышенной продукции IFN структурами фетоплацентарного комплекса. В пользу нашего предположения свидетельствуют данные литературы о высоком уровне эндогенного IFN в тканях плода, в плаценте, в амниотической жидкости с самых ранних сроков беременности [16] и значительное его повышение в крови у женщин накануне родов [23]. Что же касается продукции лейкоцитами крови IFN α/β и IFN γ , в ответ на индукцию, то у матерей она снижена, хотя в норме лейко-

циты крови взрослых людей отличаются выраженной способностью продуцировать IFN α/β и IFN γ в ответ на индукцию [19]. Полученные нами данные можно объяснить сохранением в первые дни после родов иммуносупрессорной направленности иммунитета, характерной для беременных женщин.

Согласно современным данным, клетки иммунной системы новорожденных способны к синтезу и секреции цитокинов в значительных количествах [2]. В этой связи, особый интерес представляют полученные нами данные о способности лейкоцитов крови здоровых новорожденных к повышенной продукции IFN γ , что важно, очевидно, для создания защитной реакции против инфекционных агентов. В пользу нашего заключения свидетельствуют данные Ly N. et al. (2007), согласно которым выраженная способность мононуклеаров пуповинной крови к продукции IFN γ предопределяет относительно редкую заболеваемость детей из общей популяции в течение первого года жизни. В то же время, повышенная способность лейкоцитов крови новорожденных продуцировать IFN α/β , вероятно, генетически обусловлена участием IFN в регуляции пролиферативных процессов на клеточном уровне [21].

Можно заключить, что состояние системы интерферона новорожденного и его матери обнаруживает тесную связь, природа которой требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Абаева З.Р. Влияние Виферона на иммунитет новорожденных детей от матерей, инфицированных цитомегаловирусом и вирусом простого герпеса: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2001. — 25 с.
2. Александрова Ю.В. О системе цитокинов // Педиатрия. — 2007. — Т. 86, № 3. — С. 124–128.
3. Борисова А.В. Оптимизация тактики ведения женщин с привычным невынашиванием беременности и хронической вирусной инфекцией с учетом интерферонового статуса: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1998. — 16 с.
4. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. — СПб.: БХВ-Петербург, 2004. — 512 с.
5. Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. Биометрия. Учебное пособие. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 282 с.
6. Гудман С.Н. На пути к доказательной биостатистике. Часть 2: байесовский критерий // Междунар. журн. мед. практики. — 2002. — № 2. — С. 5–14.
7. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 356 с.
8. Заплатников А.Л. Клинико-патогенетическое обоснование иммунотерапии и иммунопрофилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у детей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2003. — 48 с.
9. Заставна Д.В. Иммуногенетические факторы реализации генетически обусловленной патологии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 2004. — 36 с.
10. Зилькарнеев Р.Ш. Лечение хламидиоза у беременных сочетанием рекомбинантного альфа-2-интерферона с комплексным иммуноглобулиновым препаратом: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1997. — 18 с.
11. Качество клинических лабораторных исследований. Новые горизонты и ориентиры / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: АОЗТ «Аналитика», 2002. — 304 с.
12. Кешишян Е.С., Малиновская В.В., Дементьева Г.М. и др. Состояние системы интерферона у новорожденных детей в норме и при инфекционной патологии // Современные подходы в лечении некоторых актуальных инфекций в педиатрической и акушерской практике: сб. метод. рекомендаций и пособий для врачей; под ред. Н.В. Скрипченко. — СПб., 1999. — С. 44–48.
13. Киселев О.И., Мазуров В.И., Малиновская В.В. и др. Определение интерферонового статуса как метод оценки иммунореактивности при различных формах патологии: пособие для врачей / Под ред. О.И. Киселева. — СПб., 2002. — 25 с.
14. Кравченко Л.В. Состояние иммунной системы у детей первых месяцев жизни с герпесвирусной инфекцией // Педиатрия. — 2008. — Т. 87, № 1. — С. 53–58.
15. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов. — М.: Практическая медицина, 2011. — 480 с.
16. Малиновская В.В. Возрастные особенности системы интерферона: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. — М., 1986. — 85 с.
17. Малиновская В.В. Особенности системы интерферона в онтогенезе // Система интерферона в норме и при патологии; под ред. Ф.И. Ершова. — М.: Медицина, 1996. — С. 117–135.
18. Малиновская В.В., Деленян Н.В., Ариненко Р.Ю., Мешкова Е.Н. Виферон. Комплексный противовирусный и иммуномодулирующий препарат для детей и взрослых. Руководство для врачей. — М.: Изд-во «ИНКО-ГНК», 2005. — 64 с.
19. Манухин И.Б., Совдагарова Ю.Э. Оптимизация тактики лечения беременных с рецидивирующей герпетической инфекцией и клинико-иммунологическая характеристика новорожденных // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2003. — Т. 2, № 1. — С. 36–39.
20. Международный комитет редакторов медицинских журналов: единые требования к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы: правила написания и редактирования материалов // Междунар. журн. мед. практики. — 2005. — № 5. — С. 10–23.
21. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. — М.: Медицина, 1981. — 271 с.
22. Тареева Т.Г. Перинатальные аспекты смешанной урогенитальной инфекции (патогенез, прогнозирование, профилактика): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2000. — 38 с.
23. Федотова А.В. Профилактика и прогнозирование внутриутробной инфекции плода у беременных, страдающих урогенитальными и бронхолегочными заболеваниями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1998. — 22 с.
24. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontologia Electronica. — 2001. — Vol. 4, N 1. — P. 9.
25. Hopkins W.G. Linear models and effect magnitudes for research, clinical and practical applications // Sportscience. — 2010. — Vol. 14. — P. 49–57.
26. Kraemer H.C., Kupfer D.J. Size of treatment effects and their importance to clinical research and practice // Biol. Psychiat. — 2006. — Vol. 59. — P.990–996.
27. Ly N.P., Rifas-Shiman S.L., Litonjua A.A., Tzianabos A.O., Schaub B., Ruiz-Pérez B., Tantisira K.G., Finn P.W., Gillman M.W., Weiss S.T., Gold D.R. Cord blood cytokines and acute lower respiratory illnesses in the first year of life // Pediatrics. — 2007. — Vol. 119, N 1. — P. 171–178.
28. Mehta C.P. StatXact: A statistical package for exact nonparametric inference // Amer. Statistician. — 1991. — Vol. 45, N 1. — P. 74–75.
29. Rouder J.N., Speckman P.L., Sun D., Morey R.D. Bayesian t-tests for accepting and rejecting the null hypothesis // Psychon. Bull. Rev. — 2009. — Vol. 16, N 2. — P. 225–237.
30. Welch B.L. The generalization of Student's problem when several different population variances are involved // Biometrika. — 1947. — Vol. 34. — P. 28–35.
31. Wetzels R., Raaijmakers J.G.W., Jakab E., Wagenmakers E.-J. How to quantify support for and against the null hypothesis: a flexible WinBUGS implementation of a default Bayesian t test // Psychon. Bull. Rev. — 2009. — Vol. 16, N 4. — P. 752–760.
32. Wolfe R., Cumming G. Communicating the uncertainty in research findings: Confidence intervals // J. Sci. Med. Sport. — 2004. — Vol. 7. — P. 138–143.