

**СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ
ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА.
ПО МАТЕРИАЛАМ «МАССОВЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ОБСЛЕДОВАНИЙ»
1992-1993 ГГ. В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ**

Мусатов М.И.

E-mail: lugamus@yandex.ru

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Введение

В соответствии со существовавшей в СССР общесоюзной программой «здоровый человек» и активного участия в ней сообщества иммунологов была разработана методология массовых иммунологических обследований населения в условиях возможного неблагоприятного воздействия факторов природной и производственной среды [6]. В городах Иркутской области Ангарск, Междуреченск, Усолье-Сибирское находятся крупные промышленные предприятия химического, нефтехимического и иного профиля. Особенностью данного региона является то, что эти города компактны, расположены на небольшом удалении друг от друга (как районы крупного города) и в них практически отсутствует пространственное разделение промышленной и жилой зон. В силу этого неблагоприятные факторы производственной среды воздействуют как на работников предприятий, так и на население.

Институтом клинической иммунологии СО РАМН* выполнялся совместный проект (руководитель академик РАМН В. И. Коненков) с Региональным центром клинической иммунологии (РЦКИ) при Всесоюзном научном обществе иммунологов в г. Ангарске (руководитель проф. А. А. Михайленко) по проведению иммунологического скрининга среди здоровых и больных детей дошкольного возраста, посещавших детские дошкольные учреждения и находившихся под амбулаторно-диспансерным наблюдением. В соответствии с упомянутыми рекомендациями [6] было проведено обследование 244 детей иммунологическими методами I уровня. Результаты исследования были расценены руководителями проекта как отрицательные, то есть между основными группами сравнения «практически здоровые дети» — «часто и длительно болеющие дети», не было выявлено существенных отличий. В силу этого в 1992-1993 гг. было предпринято второе

* Названия организаций и ученые звания здесь и далее приведены в современном формате за исключением Всесоюзного научного общества иммунологов и его структур.

обследование 216 детей с использованием расширенного варианта методов II уровня. Был также получен отрицательный результат.

Некоторые итоги исследований были опубликованы только в виде тезисов в материалах I (1992) и II съездов (1999) иммунологов России [5, 8] и в материалах одной из международных конференций (1993) [11], но во всех трех случаях сообщались данные вторичного анализа, т.е. после выделения в основных выборках каких-либо подгрупп.

Вторичный анализ важен как инструмент формирования гипотез для будущих исследований, а в отношении основных результатов упомянутых исследований имеет место факт неопубликования отрицательных результатов.

Нежелание авторов публиковать результаты завершенных исследований с отрицательными результатами является серьезной проблемой в научной медицине, широко обсуждается (в том числе и в разделе Ш. А. «Единых требований к рукописям...» [7]), поскольку это приводит к систематическим ошибкам при мета-анализах и составлении систематических обзоров.

Этические аспекты и цель публикации. Автор считает возможным публикацию части результатов исследований 1992-1993 гг., выполненных, обработанных в соответствии с критериями исключения, оцененных статистически и оформленных в виде настоящей статьи им лично. По мнению автора, эти данные не потеряли своей актуальности и морально не устарели, поскольку получены с использованием моноклональных антител (МАТ).

Представленные результаты могут вызвать интерес специалистов в различных областях как клинической и экологической иммунологии, так и в педиатрии, поскольку вопросы возрастных нормативов иммуно-гематологических показателей в детском возрасте и их региональные особенности важны и в конечном счете должны формироваться как обобщение многих исследований. В этом смысле представленные данные могут иметь некоторую ценность, поскольку основная масса отечественных исследований в этой области в указанный период времени выполнена т.н. «розеточными» методами с неопределенными показателями качества.

Конфликт интересов. Отсутствует.

Отбор и описание участников исследования

Дизайн исследования. Одномоментное исследование, ретроспективный анализ.

Критерии включения. Обследовано 216 детей, посещавших дошкольные учреждения и находившихся под амбулаторно-диспансерным наблюдением в гг. Ангарск, Междуреченск и Усолье-Сибирское. Исследование проводилось в два этапа, в октябре 1992 г. и апреле 1993 г. Вся часть исследования, связанная с клиническим анализом и подбором исследуемых, организацией забора периферической крови, ее доставкой и определением содержания лейкоцитов была проведена сотрудниками РЦКИ. Все дети были сгруппированы в 4 группы согласно существовавшим в данный период амбулаторно-диспансерным принципам: I — практически здоровые дети; II — часто и длительно болеющие дети (ЧДБ); III — дети с хроническим заболеванием и IV — часто и длительно болеющие дети с хроническим заболеванием (ЧДБХ).

Было получено согласие родителей на участие детей в обследовании.

Все дети групп II-IV участвовали в представленном исследовании во время клинической ремиссии. Среди детей, включенных в анализ, распределение по полу и возрасту приведено в разделе «результаты».

Ослепление. Для повышения объективности исследования образцы крови доставлялись маркированными только условными номерами, информация о принадлежности к группе и другие сведения (включая фамилию и имя) была раскрыта после завершения лабораторного этапа.

Критерии исключения и источники систематических ошибок. При анализе результатов в настоящей работе была исключена группа IV детей из-за своей малочисленности (10 человек) и невозможности ее расширить на втором этапе исследования; из выборки детей II группы, обследовавшихся во время второго этапа исследования, было исключено 49 детей, включенных организаторами исследования повторно. Это, по мнению автора, являлось бы источником систематической ошибки, способной обусловить смещенность оценки основных групп сравнения. Данные по этой выборке приводятся как элемент вторичного анализа и не влияют на выводы по основным группам сравнения.

Материалы и методы исследования

Все лабораторные исследования проводились на базе РЦКИ г. Ангарска. Проведенные исследования можно охарактеризовать как «экспедиционные», поскольку основная часть необходимых материалов и оборудования были доставлены участниками исследования со стороны ИКИ СО АМН из г. Новосибирска.

Забор периферической (венозной) крови проводился натощак, в период с 8 до 9 часов местного времени. В качестве антикоагулянта использовался гепарин; перед предоставлением образцов крови для иммунологического исследования из них производился отбор небольшого количества крови для определения лейкоцитоза. Последнее проводилось сотрудниками РЦКИ с помощью автоматического кондуктометрического анализатора.

Перед выделением мононуклеарных клеток делались мазки цельной крови, которые после фиксации в метаноле хранились до последующего (в ИКИ СО РАМН) упрощенного дифференциального подсчета клеток: в окрашенных мазках определялось относительное содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов.

Выделение мононуклеарных клеток из цельной крови проводилось рутинным методом центрифугирования на градиенте фикола-верографина и 3-х отмываний в забуференном фосфатами физиологическом растворе, содержащем 0,5 % бычьего сывороточного альбумина. Для иммунофлуоресцентного (ИФ) анализа использовалась суспензия мононуклеарных клеток (1×10^6 /мл) в среде RPMI-1640 с 0,5 % бычьего сывороточного альбумина. Использование на данном этапе счетной камеры с сеткой Горяева для ИФ-анализа не критично, поскольку при подсчете определялись относительные значения.

Для одновременного выявления двух поверхностных белков лимфоцитов использовался модифицированный метод *Van Rood* [3]. Принцип метода состоит в иммобилизации клеток на стекле с помощью поли-*l*-лизина и последовательного использования двух мАТ. Маркирование одного из определяемых поверхностных белков (в нашем случае — HLA-DR) производится по обычной технологии метода непрямой иммунофлуоресценции. С помощью «второго» мАТ (комплемент-фиксирующего) при использовании подобранных его разведений и комплемента (пулированная сыворотка молодых кроликов) достигается комплемент-зависимое порирование клеток, но не их лизис. Такие клетки выявляются с помощью бромид этидия, не проникающего в неповрежденные клетки. Поскольку этидий обладает очень широким спектром возбуждения, его применение хорошо сочетается с использованием конъюгатов,

меченных изотиоцианатом флюоресцеина (ФИТЦ). Поэтому при использовании ФИТЦ-специфичной области возбуждения визуализируются как клетки, связавшие комплемент-фиксирующие антитела (диффузное малиново-красное окрашивание ядра), так и клетки, позитивные по антителам, выявляемым с помощью ФИТЦ-меченого конъюгата (характерное зелено-желтое окрашивание).

В качестве комплемент-фиксирующих антител использовались МАТ серии ЛТ (производство коллектива под руководством А. В. Филатова, НИИ иммунологии РАМН), специфичные к детерминантам CD3, CD4, CD8, CD22, а также поликлональный ФИТЦ-меченый конъюгат этого производителя. Для выявления мономорфной детерминанты HLA-DR использовались МАТ ИКО-1 (производство под руководством проф. А. Ю. Барышникова, ВОИЦ им. Н. Н. Блохина РАМН). Для субпопуляций Т-лимфоцитов экспрессия HLA-DR использовалась как маркер клеточной активации.

Конъюгат освобождался от микроагрегатов IgG сорбцией последних на мягко фиксированных формальдегидом в суспензии ксеноспленocyтaх [4].

Учет проводился с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-И2 при использовании штатного иммерсионного объектива для люминесцентных исследований $\times 90$ (применялась глицериновая иммерсия без покровного стекла) в сочетании с темнопольным фазовым контрастом. Доля позитивных клеток определялась на основании подсчета не менее чем из 200 лимфоцитов.

Уровень случайной погрешности исследования. Суммарная случайная погрешность (сCV) в настоящем исследовании оценивается параметрически как средняя из корня квадратного суммы квадратов значений случайной погрешности (коэффициентов вариации, CV) отдельных методов исследования.

Определение числа лейкоцитов в цельной крови кондуктометрическим методом — CV не более 2,5 %.

Определенная ранее в специальном слепом исследовании случайная погрешность в руках автора при определении доли позитивных клеток из 200 методом ИФ — CV = 3 %.

Ошибка в распознавании лимфоцит/моноцит в неокрашенных препаратах при использовании метода фазового контраста — не определена и приблизительно учтена при округлении значения сCv.

Случайная погрешность при дифференциальном подсчете клеток белой крови в окрашенном мазке принималась равной 10 % т.к. при дифференциальном подсчете из

100-200 клеток встречаемость выделяемых клеточных типов составляла примерно 30 % [10].

Таким образом, $cCV \sim \sqrt{2.5^2 + 3^2 + 10^2} / 3 = 3,58 \sim 4 \%$.

Методы статистического оценивания. Поскольку в начале процесса анализа для нескольких переменных метод Шапиро-Уилка показал статистически значимые отличия от нормального распределения, анализ всего массива данных проводился с использованием непараметрических критериев: Манна-Уитни для независимых групп (анализ основных групп данного исследования) и метода *U*-Вилкоксона для связанных групп (вторичный анализ для подгрупп часто болеющих детей, обследованных дважды). Данные везде представлены в виде средней (*M*) и одного среднеквадратического отклонения (*SD*). Для связанных групп дополнительно приведено отклонение средней в процентах от таковой в первом исследовании (табл. 2). При описании распределения обследованных групп детей по возрасту использованы значения максимального, минимально возраста и медиана. Для анализа применялась программа «*Statistica*» (*StatSoft, Inc.*) версии 4,3.

Результаты исследования и обсуждение

Средний возраст 56 здоровых детей, включенных в анализ, составлял 5,06 лет, *SD* = 1,28 лет; медиана 5, минимум 2 и максимум 7 лет. Мальчиков и девочек было 30 и 26 соответственно.

Средний возраст 89 часто и длительно болеющих детей, включенных в анализ, составлял 4,14 лет, *SD* = 1,03 лет; медиана 4, минимум 3 и максимум 7 лет. Мальчиков и девочек было 38 и 51 соответственно.

Средний возраст 22 детей с хроническими заболеваниями, включенных в анализ, составлял 5,1 лет, *SD* = 1,01 лет; медиана 5, минимум 3 и максимум 6 лет. Мальчиков и девочек было 9 и 13 соответственно.

Содержание лейкоцитов и основных субпопуляций лимфоцитов представлено в таблице 1.

Таблица 1. Содержание лейкоцитов и основных субпопуляций лимфоцитов (в мм^3) в периферической крови здоровых детей, ЧБД-детей и детей из группы ЧБДХ в виде средней арифметической (*M*) и одного среднеквадратического отклонения (*SD*)

Показатели	Здоровые дети		ЧБД-дети		ЧБДХ-дети	
	М	SD	М	SD	М	SD
Лейкоциты	5966	1351	6305	1403	6195	1266
Лимфоциты	2852	1211	3178	1188	2650	1023
Моноциты	364	399	315	266	290	256
Гранулоциты	2732	1300	3087	1403	3242	1230
CD3 ⁺	1714	521	1859	632	1932	745
CD3 ⁺ DR ⁺	205	93	188	88	345	194
CD4 ⁺	1300	349	1384	462	1345	567
CD4 ⁺ DR ⁺	146	57	161	60	155	50
CD8 ⁺	630	218	701	237	614	191
CD8 ⁺ DR ⁺	63	38	72	40	68	40
CD22 ⁺	485	201	496	236	453	240

При оценке соответствующих показателей в выделенных группах детей по критерию Манна-Уитни статистически значимых различий не выявлено. В то же время при повторном исследовании одних и тех же детей из ЧБД-категории с интервалом в 6 месяцев статистически значимые различия (по *U*-критерию Вилкоксона) выявлены в 8 из 11 показателей (табл. 2). В последнем столбце показано изменение (в процентах) среднего значения по сравнению с первым исследованием, отмеченное как ($\uparrow\downarrow$): символ «+» перед значением указывает на возрастание показателя, а «-» — на снижение.

Таблица 2. Содержание лейкоцитов и основных субпопуляций лимфоцитов (в мм³) в периферической крови 49 детей из группы ЧБД при повторном обследовании через 6 месяцев. Данные в виде средней арифметической (М), одного среднеквадратического отклонения (SD) и уровня альфа-ошибки при отклонения нулевой гипотезы (*p*).

Показатели	М	SD	<i>P</i>	$\uparrow\downarrow$
Лейкоциты	6453	1769	н.з.*	—
Лимфоциты	3206	1176	0,03	+ 17
Моноциты	331	256	н.з.	—
Гранулоциты	2837	1244	0,05	- 14
CD3 ⁺	1922	709	0,04	+ 17
CD3 ⁺ DR ⁺	243	101	0,013	+ 23
CD4 ⁺	1409	492	0,007	+ 22
CD4 ⁺ DR ⁺	181	55,6	н.з.	—

CD8 ⁺	534	311	0,009	- 24
CD8 ⁺ DR ⁺	95	41	0,03	+ 17
CD22 ⁺	540	259	0,012	+ 19

* н.з. — не значимо

Можно предположить сочетанное влияние трех факторов, обусловивших статистически значимые изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у ЧДБ-детей при повторном обследовании.

Во-первых, дети растут, а в возрасте 4-7 лет отмечается начало постепенного перехода гематологического статуса к взрослому типу, в частности, снижается содержание лимфоцитов и возрастает содержание нейтрофилов. [9, 10]. В данной группе детей наблюдается обратное явление и ранее мы предположили, что у ЧБД-детей отмечается отставание в созревании системы миелопоэза [5].

Во-вторых, дети этой группы не могли не получать лечения при рецидивах острых респираторных заболеваний, что могло отразиться на изучаемых показателях иммунитета.

В третьих, многими авторами показаны и изучены выраженные изменения в составе циркулирующих иммунокомпетентных клеток (ИКК) при сменах сезона года; влияние сезонности не могло не отразиться на представленных результатах. Например, абсолютное содержание В-лимфоцитов зимой и летом отличается более чем в 2 раза [2].

В целом приведенные показывают, что, как минимум, использовавшиеся методы анализа иммунного статуса способны «работать».

Обсуждение основных результатов, то есть почему не было выявлено статистически значимых отличий в основных группах сравнения не представляется простым. Можно предположить воздействие некоторого фактора или, скорее, сочетание нескольких факторов, нивелирующих различия между здоровыми и больными детьми.

Во-первых, это неблагоприятные факторы производственного характера, воздействующие на всех жителей данного региона. Если это влияние является выраженным и приводит к некоторым однотипным перестройкам в составе циркулирующего пула ИКК, тогда оно будет уравнивать возможные изменения в иммунном статусе как у разных категорий больных детей, так и у практически здоровых детей.

Во-вторых, нельзя исключить воздействия стресса при заборе венозной крови. Автор из личного опыта знает, как непросто уговорить ребенка 3-5 лет (а часто и старше)

добровольно сдать немного венозной крови для анализа. Когда в результате ребенок соглашается на эту процедуру, это не значит, что он не подвергался стрессу. Эти наблюдения из личного опыта подтверждаются фактом, который можно расценить как принятое в англоязычных публикациях «личное сообщение». В 1987 г. ИКИ СО РАМН совместно с Институтом клинической и экспериментальной медицины (ИКЭМ) СО РАМН проводил совместное исследование о взаимосвязях показателей иммунной и гормональной систем. Группу здоровых лиц представляли 100 абитуриентов медицинского института, зачисленных по результатам вступительных экзаменов. Пробы забранной венозной крови исследовались как сотрудниками ИКИ СО РАМН, так и ИКЭМ СО РАМН. По завершении набора группы здоровых лиц, зав. лабораторией эндокринологии ИКЭМ проф. Ю. П. Шорин заявил, что из данной группы он исключает 25 человек, так как у них в плазме определялись стрессовые уровни кортизола (т.е. выше физиологических на 2 порядка).

Несмотря на то, что сотрудники РЦКИ заверили, что как с родителями, так и с детьми, участвовавшими в исследовании была проведена соответствующая работа, которая должна сделать процедуру забора крови минимально стрессогенной, возможное влияние стресса при венопункции у детей все-таки исключить нельзя.

В-третьих, очень важными представляются результаты, полученные в свое время в коллективе под руководством академика РАМН А. Н. Чередеева и доложенные на II съезде иммунологов России: анализ большого массива клинико-иммунологических данных показал, что при наиболее выраженной клинической картине вторичной иммунологической недостаточности (ВИД) у пациентов, долгое время страдающих хроническими воспалительными заболеваниями, изменения иммунного статуса были минимальными либо не отличались от нормы и напротив, при незначительных клинических проявлениях ВИД регистрировались выраженные лабораторные признаки, считающиеся типичными признаками ВИД: снижение содержания CD3-лимфоцитов преимущественно за счет CD4-лимфоцитов, снижение за этот счет соотношения CD4/CD8 и т.д. [1].

С распадом СССР снизилась активность по «массовым иммунологическим обследованиям». Однако на широкую распространенность таких исследований показывала и доля сообщений по этой тематике среди тезисов докладов I Съезда иммунологов России (1992 г., 1038 тезисов докладов): 64 сообщали о результатах

скрининговых иммунологических исследований. Об отрицательных результатах было заявлено в 2 сообщениях, т.е. в 3 % соответствующих исследований.

Очевидно, что при подавляющем превалировании исследований с «положительным» результатом альтернативные результаты исследований в этой области воспринимались руководителями соответствующих проектов как «выскакивающие варианты» при статистическом анализе и поэтому не публиковались.

В тезисах докладов II съезда иммунологов России (1999 г., 332 тезисов докладов) о результатах положительных исследований массовых иммунологических скринингов заявили 9 исследований, об отрицательных — 2, что составило 18 %.

Выводы

В период 1992-1993 гг. при одномоментном обследовании детей возраста 2-7 лет, посещавших детские дошкольные учреждения в городах Иркутской области (Ангарск, Усолье-Сибирское и Междуреченск) и относящихся к разным амбулаторно-диспансерным группам (здоровые, часто и длительно болеющие, часто и длительно болеющие при наличии хронического заболевания) статистически значимых отличий в абсолютном содержании CD3-, CD4-, CD8-, CD22-позитивных лимфоцитов не выявлено. Значимых отличий также не было в абсолютном содержании CD3-, CD4-, CD8-лимфоцитов, экспрессировавших HLA-DR.

Благодарности. Автор искренне признателен сотрудникам РЦКИ в г. Ангарске, ответственным за клинический и организационный этапы данного исследования и сожалеет о невозможности принесения поименной благодарности в силу прекращения существования РЦКИ. Автор признателен руководителям проекта, в особенности академику РАМН В. И. Коненкову, принимавшему участие в подсчете лейкоцитарной формулы. Автор благодарит удачно сложившийся на время исследования «временный творческий коллектив» из сотрудников ИКИ СО РАМН, без самоотверженной работы которого была бы невозможной реализация данного проекта: научных сотрудников Е. Я. Шевела, Е. Ю. Ермолович, Д. М. Самарина и старшего лаборанта Г. М. Быханову.

Список литературы

1. Горлина И. К., Гуськов А. Р., Козлов И. Г., Чередеев А. Н. Несоответствие данных иммунологического анализа клиническим признакам вторичного иммунодефицита // *Russian J. of Immunol/* – 1999. – V. 4. – Suppl. 1. – P. 199.
2. Добродеева Л. К., Сулонова Г. А. Аутоантитела у практически здоровых людей // *Иммунология.* – 1990. – № 2. – С. 52-55.
3. Коненков В. И., Наумов Ю.Н., Мусатов М. И. и соавт. Уровень экспрессии продуктов генов HLA-комплекса на клетках периферической крови здоровых лиц и больных ревматоидным артритом // *Иммунология.* – 1986. – № 6. – С. 71-72.
4. Мусатов М. И. Метод удаления агрегированных глобулинов из конъюгатов / *Внедрение новых методов в практическое здравоохранение и научно-исследовательскую работу.* Новосибирск. – 1981. – С. 82-83.
5. Мусатов М. И., Михайленко А. А., Коненков В. И. О патогенезе вторичного иммунодефицита у «часто болеющих детей» // *Russian J. of Immunol/* – 1999. – V. 4. – Suppl. 1. – P. 291.
6. Орадовская В. И., Пинегин Б. В. К методике проведения массовых иммунологических обследований определенных контингентов населения в условиях воздействия антропогенных факторов // *Иммунология.* – 1990. – № 2. – С. 70-72.
7. Рекомендации по подготовке научных медицинских публикаций. Сборник статей и документов. Под ред. С. Е. Башинского, В. В. Власова. М.: Изд-во Медиа Сфера, 2006. – 464 с.
8. Сахно Л. В., Шевела Е. Я., Лыков А. П. и соавт. Показатели иммунного статуса у часто и длительно болеющих детей экологически неблагополучного региона (г. Ангарск) / Тезисы докладов. I съезд иммунологов России. Новосибирск. – 1992. – с. 422.
9. Стефании Д. В., Вельтищев Ю. Е. Клиническая иммунология и иммунопатология детского возраста / руководство для врачей. – М.: Медицина, 1996. – 384 с.
10. Годоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. 6-е русское издание. Изд-во «Медицина и физкультура», София, 1968. – 1064 с.
11. Konenkov V. I., Mikchailenko A.M., Musatov M. I., Kozlov V. A. Dynamics of CD3⁺, CD4⁺ and CD22⁺ lymphocyte numbers bearing the activation markers in children // 5th International Congress on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Boston. – 1993. – Abstr. book. – P. 368