УДК 614.78-053.4:57.021

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗАГРЯЗНЕНИЙ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА НА ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Маковецкая А.К., Коганова З.И., Бударина О.В., Лебедева Н.В., Ингель Ф.И., Демина Н.Н.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России, Москва, e-mail: lkhripach@mail.ru

За последнее десятилетие появилось достаточно много исследований по оценке возможностей неинвазивной клинико-лабораторной диагностики с использованием проб смешанной слюны. Данное гигиеническое исследование было предпринято с целью оценить информативность ряда биохимических и иммунологических показателей слюны как возможных маркеров влияния загрязнения атмосферного воздуха на состояние организма детей дошкольного возраста. Всего было обследовано 112 детей (53 мальчика и 59 девочек) из шести детских садов, расположенных на расстояниях 1,7–5,9 км от комплекса предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции. В бесклеточной слюнной жидкости обследованных детей измеряли интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ), содержание секреторного IgA (sIgA), интерлейкина-8 (ИЛ-8), мочевой кислоты (МК), активность α-амилазы и лизосомального фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (NAG). Не было найдено достоверных различий изучаемых показателей между мальчиками и девочками объединенной выборки детей (p от 0,18 до 0,93). Наиболее чувствительным маркером загрязнения атмосферного воздуха в данном обследовании оказалась интенсивность ЛЗХЛ слюны детей ($R = –0,572$; $p = 6,4*10^{-11}$), связанная с расстояниями до промплощадки достоверным регрессионным уравнением $y = –0,173*x + 6,982$. Достоверные коэффициенты корреляции с расстояниями между детским садом и промплощадкой были найдены также для активности NAG ($R = – 0,287$; $p = 0,004$) и содержания в слюне ИЛ-8 ($R = –0,280$; $p = 0,003$). Остальные три показателя (активность α-амилазы, содержание sIgA и МК) не имели достоверной связи с уровнями экспозиции детей промышленными выбросами. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее чувствительными маркерами слюнной жидкости при изучении влияния загрязнения атмосферного воздуха на здоровье детей являются показатели, отражающие функциональную активность фагоцитов слюны.

Ключевые слова: загрязнение атмосферного воздуха, дети, смешанная слюна, люминол-зависимая хемилюминесценция, секреторный IgA, интерлейкин-8, N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза, зависимости «экспозиция – эффект»

ADAPTIVE CHANGES OF BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL MARKERS IN MIXED SALIVA OF PRESCHOOL CHILDREN EXPOSED TO AIR POLLUTANTS

Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., Makovetskaya A.K., Koganova Z.I., Budarina O.V., Lebedeva N.V., Ingel F.I., Demina N.N.

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, e-mail: lkhripach@mail.ru

Over the last decade there was a lot of research carried out to evaluate the possibilities of clinical diagnostics using saliva samples. This hygienic study was undertaken to compare the information content of some biochemical and immunological parameters of saliva as possible markers of the influence of air pollution on the health of preschool-aged children. A total of 112 children (53 boys and 59 girls) were examined in 6 kindergartens located at distances of 1.7 – 5.9 km from the complex of enterprises for processing of agricultural products. Next markers were measured in cell-free salivary fluid of the children: the intensity of luminol-enchanced chemiluminescence (CL); secretory IgA (sIgA), interleukin-8 (IL-8) and uric acid (UA) contents; α-amylase and lyzosomal N-acethyl-β-D-glucosaminidase activities. No significant differences were found in the studied parameters between boys and girls of the whole children cohort. The intensity of CL was found to be the most sensitive marker of air polution ($R = –0,572$; $p = 6,4*10^{-11}$) and had significant regression equation ($y = –0,173*x + 6,982$) with the distances between kindergardens and industrial area. Significant correlation coefficients with the distances between kindergardens and emission source were found also for NAG activity ($R = – 0,287$; $p = 0,004$) and IL-8 content ($R = –0,280$; $p = 0,003$). The rest three markers (α-amylase activity, sIgA and UA contents) hadn't significant associations with levels of industrial exposition. The data obtained permit to suppose that the most sensitive non-invasive indicators of the influence of air pollution onto children organisms are the markers, concerned with functional activity of salivary phagocytes.

Keywords: outdoor air pollution, children, mixed saliva, luminol-enchanced chemiluminescence, secretory IgA, interleukin-8, N-acethyl-β-D-glucosaminidase, exposition-response relationships

За последнее десятилетие появилось достаточно много исследований по оценке возможностей неинвазивной клинико-лабораторной диагностики с использованием проб свободно вытекающей смешанной слюны. Основное количество таких исследований относится к областям стоматологии, онкологии полости

рта и близлежащих тканей, кардиологии, нейробиологии, психологии и спортивной медицины. Перечень маркеров, определявшихся в слюне отдельными авторами или рядом авторов, достаточно широк и включает иммуноглобулины, цитокины, тканеспецифические антигены, противомикробные и ауто-антитела, половые и стрессорные гормоны, низкомолекулярные метаболиты и ферменты слюны (α-амилаза, липаза, пероксидаза, калликреин и т.д.) [1–3].

В гигиенических исследованиях, особенно при обследовании детского населения, организационные и этические преимущества неинвазивных методов клинико-лабораторной диагностики очевидны. На текущий момент несомненным фаворитом неинвазивных гигиенических обследований населения является содержание в слюне секреторного иммуноглобулина А (sIgA) [3, 4]; кроме того, в них часто используются показатели оксидантного равновесия слюнной жидкости и содержания в ней лизосомальных ферментов [5, 6], поскольку аналогичные инвазивные маркеры входят в систему биохимических показателей при постановке санитарно-токсикологических опытов на животных. Такие распространенные в клинических исследованиях маркеры, как содержание в слюне провоспалительных цитокинов, применяются редко, хотя слюна содержит на удивление высокие концентрации некоторых цитокинов – в частности, содержание интерлейкинов ИЛ-1α и ИЛ-8 в слюнной жидкости на 2 порядка выше их содержания в сыворотке крови [7].

В данной статье представлены результаты неинвазивного гигиенического обследования детей 5–6 лет, посещающих дошкольные детские учреждения на территории небольшого города одного из агропромышленных регионов России. В городе находится несколько предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции и производству соответствующей тары, сосредоточенных в основном на промплощадке, примыкающей к городской территории с северной стороны. Это обеспечивает достаточно простую модель распределения выбросов в атмосферный воздух, в которой в качестве оценок экспозиции детей можно в первом приближении использовать расстояния между соответствующим детским садом и промплощадкой.

Для проведения исследования были выбраны следующие маркеры, определявшиеся в бесклеточной слюнной жидкости детей: показатели местного иммунитета – содержание в слюне sIgA и интерлейкина-8 (ИЛ-8); показатели окислительного стресса – интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции слюны (ЛЗХЛ) и содержание в ней мочевой кислоты (МК, катаболического антиоксиданта); активность лизосомального фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (NAG, маркер функциональной активности нейтрофилов слюны); активность α-амилазы слюны (один из маркеров психологического стресса [8]). Последний маркер был включен в систему показателей из-за того, что часть выбросов изучавшихся предприятий представлена веществами, обладающими достаточно выраженным запахом, с наличием соответствующих жалоб населения.

Цель исследования: на основании анализа зависимостей «экспозиция – эффект» оценить информативность используемых биохимических и иммунологических показателей смешанной слюны как маркеров влияния загрязнения атмосферного воздуха на состояние организма детей дошкольного возраста.

Материалы и методы исследования

Для оценки экспозиции детей загрязнениями атмосферного воздуха использовались расстояния между соответствующим детским садом и промплощадкой, полученные с помощью электронных карт Google Maps. Всего было обследовано 112 детей (53 мальчика и 59 девочек) из шести детских садов, расположенных на расстояниях 1,7–5,9 км от источника выбросов. На проведение обследования каждого ребенка имеется информированное согласие его родителей.

В пробах свободновытекающей смешанной слюны обследованных детей, после отделения взвешенных клеток центрифугированием, измеряли содержание sIgA, ИЛ-8, мочевой кислоты и активность α-амилазы с помощью тест-наборов ЗАО Вектор-Бест (каталожные номера А-8668, А-8762, В-8098 и В-8059 соответственно). Интенсивность ЛЗХЛ слюны определяли в среде инкубации, содержавшей 140 мМ Na-фосфатного буфера, 50 мкМ натриевой соли люминола, 50 мкл/мл слюны и 59 мМ перекиси водорода; результаты выражали в виде десятичных логарифмов светосуммы сигнала за первую минуту после добавления перекиси водорода [9]. Активность NAG определяли по скорости отщепления *n*-нитрофенола от модельного субстрата 4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида (Sigma N9376) в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,2 [10].

Математический анализ полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica for Windows v. 7.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Практически все маркеры, кроме нормализованных логарифмической трансформацией значений интенсивности ЛЗХЛ слюны [9], имели распределения, отличаю-

щиеся от нормального по критериям Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка – скошенные влево (α-амилаза, sIgA, ИЛ-8) или более острые, с коэффициентами эксцесса 5,7 (NAG) и 19,7 (МК). Поэтому среднегрупповые значения изучаемых показателей представлены в таблице в виде медиан и межквартильных размахов, а математическая обработка данных проводилась с использованием непараметрических методов – теста Манна – Уитни для оценки достоверности межгрупповых различий и рангового корреляционного анализа Спирмена.

Не было найдено достоверных различий изучаемых показателей между мальчиками и девочками объединенной выборки детей (p от 0,18 до 0,93), в связи с чем в дальнейшем анализе переменная «пол ребенка» не учитывалась. Как показано в таблице, наиболее чувствительным маркером загрязнения атмосферного воздуха в данном обследовании оказалась интенсивность ЛЗХЛ слюны детей ($R = –0,572$; $p = 6,4*10^{-11}$), связанная с уровнями экспозиции достоверным регрессионным уравнением $y = –0,173*x + 6,982$ (рис. 1).

Более низкие, но достоверные коэффициенты корреляции с расстоянием между детским садом и промплощадкой были найдены для активности NAG ($R = –0,287$; $p = 0,004$) и содержания в слюне ИЛ-8 ($R = –0,280$; $p = 0,003$); в последнем случае – несмотря на нарушение монотонности изменения среднегрупповых значений в ближайшей к промплощадке точке А (рис. 2), где снижение медианы сочеталось с увеличением положения верхнего квартиля. Остальные три показателя (активность α-амилазы, содержание sIgA и МК) в данном обследовании не имели достоверной связи с расстоянием между детским садом и промплощадкой.

Таким образом, по мере приближения места проживания ребенка к промплощадке наблюдались достоверные изменения тех показателей, которые имеют отношение к функциональной активности фагоцитов слюны. В частности, интенсивность ЛЗХЛ слюны, индуцированной перекисью водорода, в основном определяется суммарной активностью пероксидаз, секретируемых примерно поровну клетками слюнных желез (лактопероксидаза) и взвешенными в слюне нейтрофилами (миелопероксидаза) [11, 12]. Источником лизосомальных ферментов в бесклеточной фракции слюны также являются активированные нейтрофилы [13]. ИЛ-8 вырабатывается клетками слизистой оболочки полости рта и подлежащей соединительной ткани (эпителиоцитами, эндотелиоцитами и макрофагами), но является химическим сигналом (хемоаттрактантом) для выхода из кровеносных сосудов и локального накопления нейтрофилов. Следовательно, полученные нами данные означают, что увеличение локальной концентрации и/или функциональной активности взвешенных в слюне нейтрофилов является одним из самых ранних признаков реакции организма детей на загрязнение атмосферного воздуха, опережающим изменения со стороны секреторного иммунитета.

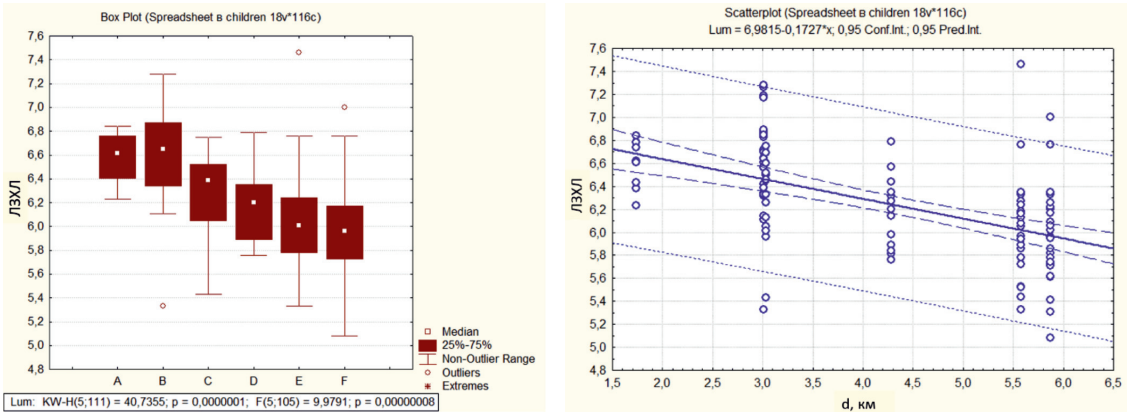

*Рис. 1. Зависимость интенсивности ЛЗХЛ слюны детей от расстояния между детским садом и промплощадкой. Слева: среднегрупповые значения, отсортированные в порядке увеличения расстояния до промплощадки (достоверности различий см. в таблице). Справа: достоверная регрессионная связь между индивидуальными значениями ЛЗХЛ слюны детей (n = 112) и расстояниями между детским садом и промплощадкой (y = – 0,173*x + 6,982; R = –0,524; p = 0,000000004)*

Влияние расстояния от источника выбросов на изучавшиеся биохимические и иммунологические показатели в пробах смешанной слюны обследованных детей

Д/сады	d, км	n, чел.	Среднегрупповые значения показателей #					
			sIgA, мкг/мл	ИЛ-8, пг/мл	ЛЗХЛ, lg имп/мин	МК, мкМ	NAG, Ед/мл	α-амилаза, Ед/л
A	1,74 (ЮЗ)	8	92 [20; 246]	286 [142; 1150]	6,62 [6,40; 6,76] p = 0,00007*	95 [71; 113]	12,9 [8,0; 16,6] p = 0,025*	25800 [22450; 29350]
B	3,01 (ЮЗ)	24	130 [93; 209]	534 [136; 904] p = 0,005 *	6,65 [6,34; 6,87] p = $4,3x10^{-7}$ *	82 [47; 123]	8,9 [6,6; 12,2] p = 0,045*	43800 [17500; 64000]
C	3,03 (ЮВ)	14	116 [78; 234]	420 [206; 800] p = 0,02 *	6,39 [6,05; 6,52] p = 0,007 *	80 [60; 136]	9,4 [7,5; 15,9] p = 0,049 *	34850 [29400; 52700]
D	4,28 (ЮВ)	13	100 [47; 138]	364 [102; 564]	6,20 [5,89; 6,35]	85 [72; 106]	8,2 [5,6; 13,3]	43400 [28300; 64100]
E	5,58 (ЮЗ)	25	100 [72; 146]	238 [127; 618]	6,01 [5,78; 6,24]	128 [96; 175]	8,0 [5,6; 12,2]	30500 [16200; 47100]
F	5,87 (ЮВ)	28	113 [65; 183]	215 [118; 448]	5,99 [5,73; 6,19]	100 [65; 158]	5,6 [3,3; 10,8]	38900 [13900; 88100]
Полная выборка			Коэффициенты корреляции Спирмена ##					
A–F	1,74–5,87	112	R = –0,056; p = 0,56	R = –0,280; p = 0,003 *	R = –0,572; p = $6,4x10^{-11}$ *	R = 0,177; p = 0,062	R = –0,287; p = 0,004 *	R = 0,016; P = 0,87

Примечания: # приведены в виде Me [Q1;Q3], где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили; достоверность межгрупповых различий с наиболее удаленным от промплощадки детским садом (F) определяли двусторонним тестом Манна – Уитни. ## между индивидуальными значениями изучавшихся показателей в полной выборке детей (n = 112) и расстояниями до промплощадки.

Обозначения: (A – F) – условные обозначения детских садов; d – расстояние между детским садом и промплощадкой (в скобках направление от источника выбросов); n – количество обследованных детей.

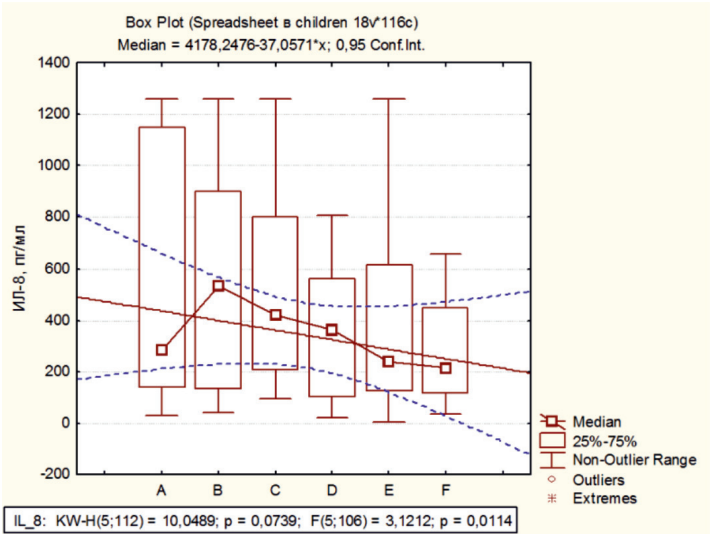

Рис. 2. Содержание ИЛ-8 (пг/мл) в слюне детей из шести обследованных детских садов, отсортированных в порядке увеличения расстояния до промплощадки (см. табл.)

В этой связи интересно, что часть использованных в данном обследовании маркеров – а именно содержание в слюне sIgA, активность NAG и интенсивность ЛЗХЛ слюны – мы применяли ранее при обследовании московских детей того же возраста, посещавших дошкольные детские учреждения в пяти районах Москвы с разной нагрузкой автомагистралей [14, 15]. Для всех вышеперечисленных показателей, определявшихся в слюне московских детей, были выявлены достоверные корреляционные связи с уровнями загрязнения атмосферного воздуха, в том числе и для содержания в слюне sIgA ($R = –0,243$; $p = 9*10^{-9}$; $n = 547$). Таким образом, два показателя, отражающих функциональную активность фагоцитов слюны (интенсивность ЛЗХЛ слюны и активность NAG) обладали воспроизводимыми маркерными качествами по способности отражать уровень загрязнения атмосферного воздуха автотранспортом или агропромышленными предприятиями. Реакция со стороны гуморального иммунитета, по-видимому, не является ранней или зависит от химического состава загрязнений атмосферного воздуха и сопутствующих факторов.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее чувствительными маркерами слюнной жидкости при изучении влияния загрязнения атмосферного воздуха на здоровье детей являются показатели, отражающие функциональную активность взвешенных в слюне фагоцитов.

Список литературы

1. Roi A., Rusu L.C., Roi C.I., Luca R.E., Boia S., Munteanu R.I. A new approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules. Disease Markers. 2019. № 4. P. 1–11.

2. Пальцев М.А., Сараев Г.Б., Бунин В.А., Белушкина Н.Н., Поправка Е.С., Линькова Н.С., Козлов К.Л., Седова Е.В., Мурсалов С.У., Кветной И.М. Слюна как биологический объект для неинвазивной молекулярной диагностики сердечно-сосудистых заболеваний // Молекулярная медицина. 2018. № 16 (5). С. 3–8.

3. Duramad P., Holland N.T. Biomarkers of immunotoxicity for environmental and public health research // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2011. № 8 (5). P. 1388–1401.

4. Бударина О.В., Мольков Ю.Н., Пономарева О.Ю., Ульянова А.В. Иммунологические методы оценки здоровья при воздействии загрязнения атмосферного воздуха // Гигиена и санитария. 2014. № 93 (2). С. 31–33.

5. Акайзина А.Э. Информативность интегральных показателей свободнорадикального окисления и летучих жирных кислот слюны для оценки воздействия загрязняющих веществ питьевой воды на здоровье детей // Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых и специалистов. 2016. С. 12–17.

6. Коленчукова О.А., Долгушина Е.Н., Рюпина А.А., Кратасюк В.А., Медведева Н.Н. Антиоксидантный статус как маркер здоровья студентов в период интенсивной умственнной нагрузки // Гигиена и санитария. 2018. № 97 (4). С. 332–336.

7. Byrne M.L., O'Brien-Simpson N.M., Reynolds E.C., Walsh K.A., Laughton K., Waloszek J. M., Woods M.J., Trinder J., Allen N. Acute phase protein and cytokine levels in serum and saliva: a comparison of detectable levels and correlations in a depressed and healthy adolescent sample. Brain, Behavior and Immunity. 2013. № 34. P. 164–175.

8. Tananska V.T. Salivary α-amylase and chromogranin A in anxiety-related research. Folia Medica. 2014. № 56 (4). P. 233–236.

9. Хрипач Л.В. Применение свободнорадикальных методов для оценки влияния полихлорированных диоксинов

и фуранов на состояние здоровья населения // Гигиена и санитария. 2002. № 2. С. 72–76.

10. Punithavathi V.R., Prince P.S. Pretreatment with a combination of quercetin and α-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. Life Sciences. 2010. № 86. P. 178–184.

11. Thomas E.L., Jefferson M.M., Joyner R.E., Cook G.S., King C.C. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva. Journal of Dental Research. 1994. № 73 (2). P. 544–555.

12. Acquier A.B., De Couto Pita A.K., Busch L., Sanchez G.A. Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. Redox Report. 2017. № 22 (3). P. 119–126.

13. Ramamurthy J., Jayakumar N.D., Varghese S. Comparison of salivary beta-glucuronidase activity in chronic periodontitis patients with and without Diabetes Mellitus. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014. № 8 (6). ZC19-ZC21.

14. Хрипач Л.В. Оксидантный статус организма и его роль в чувствительности генома к повреждающим факторам окружающей среды: дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2003. 303 с.

15. Беляева Н.Н., Мухамбетова Л.Х., Петрова И.В., Хрипач Л.В., Шамарин А.А., Юрченко В.В., Журков В.С. Медико-биологические критерии оценки влияния загрязнения окружающей среды на здоровье населения // Гигиена и санитария. 2003. № 6. С. 77–79.