

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

Скрининг и пост-скрининг маркеров загрязнения атмосферного воздуха в пробах слюны детей дошкольного возраста

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, 119121, Москва

Введение. Неинвазивная диагностика с использованием проб смешанной слюны является перспективным направлением, которое требует дальнейших исследований. Данное двухэтапное исследование направлено на выявление достоверных биохимических и иммунологических маркеров влияния загрязнений атмосферного воздуха в пробах слюны детей дошкольного возраста.

Материал и методы. Пробы смешанной слюны были отобраны у 112 детей 5–7 лет из 6 детских садов, расположенных на расстояниях 1, 7–5, 9 км от комплекса предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции. На этапе скрининга в пробах слюны определяли интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ), содержание секреторного IgA (sIgA), ИЛ-8, мочевой кислоты, активность α -амилазы и лизосомального фермента N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (NAG); на этапе пост-скрининга – содержание ИЛ-1 β и ИЛ-6.

Результаты. Скрининг показал, что только те маркеры, которые можно рассматривать как косвенные признаки активации фагоцитов, связаны с уровнями экспозиции детей выбросами промзоны достоверными уравнениями: ЛЗХЛ ($y = 6,98 - 0,17x$; $r = 7,2 \cdot 10^{-9}$); ИЛ-8 ($y = 776,2 - 83,2x$; $p = 3 \cdot 10^{-4}$); NAG ($y = 13,94 - 0,93x$; $p = 0,037$). Чтобы проверить, не является ли это совпадение случайным, было подобрано еще 2 показателя в виде функциональной «вилки»: ИЛ-1 β (лейкоцитарный пироген) и ИЛ-6 (кофактор дифференцировки B-лимфоцитов). Методами регрессионного, корреляционного и кластерного анализа подтверждено, что все 4 «фагоцитарных» маркера достоверно увеличиваются по мере приближения детских садов к промзоне и образуют единый кластер, перешитый достоверными коэффициентами взаимной корреляции. Содержание ИЛ-6 было связано с уровнями экспозиции зависимостью подъем-спад и вопреки общепринятым представлениям не имело никакой связи с содержанием sIgA. Полученные данные, возможно, имеют отношение к отсутствию способности ИЛ-6 и дефензинов индуцировать sIgA у мышей [Woyaka et al., 2001].

Заключение. Результаты обследования свидетельствуют о том, что градиент выбросов промзоны содержит взвешенные вещества и не содержит гаптенных или иммунотоксичных соединений. Пост-скрининг может оказаться полезным приемом при использовании проб слюны как недостаточно изученного объекта.

К л ю ч е в ы е с л о в а : загрязнение атмосферного воздуха; дети; смешанная слюна; люминол-зависимая хемилюминесценция; ИЛ-1 β ; ИЛ-6; ИЛ-8; секреторный IgA; зависимость «экспозиция – эффект».

Для цитирования: Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Маковецкая А.К., Коганова З.И., Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Ингель Ф.И., Демина Н.Н., Лебедева Н.В. Скрининг и пост-скрининг маркеров загрязнения атмосферного воздуха в пробах слюны детей дошкольного возраста. Гигиена и санитария. 2020; 99 (6): 610–617. DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-6-610-617>

Для корреспонденции: Хрипач Людмила Васильевна, доктор биол. наук, зав. лаб. биохимических и молекулярно-генетических методов исследования ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: LKhripach@cspmz.ru

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Госзадания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Хрипач Л.В., Бударина О.В., Ингель Ф.И.; организация обследования детей, отбор и транспортировка проб слюны – Ингель Ф.И., Бударина О.В., Демина Н.Н.; оценка экспозиций – Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Лебедева Н.В.; иммуноферментный анализ – Князева Т.Д. (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8), Маковецкая А.К. (sIgA); хемилюминесцентный анализ – Железняк Е.В.; спектрофотометрический анализ – Хрипач Л.В., Коганова З.И.; математическая обработка и интерпретация результатов, написание текста статьи – Хрипач Л.В.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила 16.04.2020

Принята в печать 22.05.2020

Опубликована 29.07.2020

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

Screening and post-screening of air pollution markers in mixed saliva of preschool children

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. Salivary diagnostics is a promising area that requires further research.

The aim of the study. The two-stage study is aimed at identifying reliable biochemical and immunological markers of the influence of atmospheric air pollution in saliva samples in preschool children.

Material and methods. Mixed saliva samples were taken from 112 children aged 5–7 years in 6 kindergartens located at distances of 1.7–5.9 km from the complex of agricultural processing enterprises. At the screening stage, the intensity of luminol-dependent chemiluminescence (LC), levels of secretory IgA (sIgA), IL-8, uric acid, activities of α -amylase, and lysosomal enzyme N-acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) were determined in saliva samples; at the post-screening stage, IL-1 β and IL-6 were added.

Results. In children at the screening stage only those markers that can be considered as indirect signs of phagocyte activation were associated with exposure levels to industrial zone emissions by significant equations: CL ($y = 6.98 - 0.17x$; $p = 7.2 \cdot 10^{-9}$); IL-8 ($y = 776.2 - 83.2x$; $p = 3 \cdot 10^{-4}$); NAG ($y = 13.94 - 0.93x$; $p = 0.037$). To check whether this coincidence is random, we selected two additional markers in the form of functional “fork”: IL-1 β (leukocyte pyrogen) and IL-6 (cofactor of B-lymphocyte differentiation). Methods of regression, correlation, and

cluster analysis confirmed all 4 "phagocytic" markers significantly to increase along the gradient of industrial emissions and form a single cluster, cross-linked with significant correlation coefficients. IL-6 saliva content was associated with exposure levels by a rise-fall relationship, and, contrary to conventional beliefs, had no connection with sIgA content. The last finding may be related to the lack of ability of IL-6 and defensins to induce sIgA in mice [Boyaka et al., 2001].

Conclusion. The survey results suppose that emission gradient from the industrial zone contains PM and does not contain haptens or immunotoxic compounds. Post-screening can be a useful technique when using saliva samples as insufficiently studied objects.

Key words: outdoor air pollution; children; mixed saliva; luminol-enhanced chemiluminescence; IL-1 β ; L-6; IL-8; sIgA; exposition-response relationships.

For citation: Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., Makovetskaya A.K., Koganova Z.I., Budarina O.V., Sabirova Z.F., Ingel F.I., Demina N.N., Lebedeva N.V. Screening and post-screening of air pollution markers in mixed saliva of preschool children. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (6): 610-617. DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-6-610-617>. (In Russian)

For correspondence: Ludmila V. Khripach, MD, Ph.D., DSci., head of the laboratory of biochemical and molecular genetics methods, Centre for Strategic Planning, Federal Medical Biological Agency of Russia. E-mail: LKhripach@cspmrz.ru

Information about the authors:

Khripach L.V., <https://orcid.org/0000-0003-0170-3085>; Knyazeva T.D., <https://orcid.org/0000-0001-5279-5018>; Zheleznyak E.V., <https://orcid.org/0000-0001-9339-9310>; Makovetskaya A.K., <https://orcid.org/0000-0002-4652-1755>; Koganova Z.I., <https://orcid.org/0000-0002-4622-8110>; Budarina O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4319-7192>; Ingel F.I., <https://orcid.org/0000-0002-2262-6800>; Sabirova Z.F., <https://orcid.org/0000-0003-3505-8344>; Demina N.N., <https://orcid.org/0000-0002-8386-911X>; Lebedeva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6181-4628>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contributions. Khripach L.V. – research concept and design, spectrophotometric assays, statistical analysis, interpretation, and writing of the manuscript. Budarina O.V. – research concept and design, organization of children survey, withdrawn and transport of saliva samples, evaluation of exposure. Ingel F.I. – research concept and design, organization of children survey, withdrawn and transport of saliva samples. Demina N.N. – organization of children survey, withdrawn and transport of saliva samples. Sabirova Z.F., Lebedeva N.V. – evaluation of exposure. Knyazeva T.D. – ELISA (IL-1 β , IL-6, IL-8). Makovetskaya A.K. – ELISA (sIgA). Zheleznyak E.V. – chemiluminescence assay. Koganova Z.I. – spectrophotometric assays. All co-authors – approval of the final version, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: March 03, 2020

Accepted: May 25, 2020

Published: July 29, 2020

За последние десятилетия в научных обзорах появился устойчивый термин «salivary diagnostics», под которым подразумевается оценка состояния организма человека по результатам анализа содержания различных белков, метаболитов и регуляторных молекул в пробах смешанной слюны [1–3]. В целом современное состояние неинвазивной диагностики с помощью проб слюны оценивается как перспективное, но ещё не устоявшееся направление, которое требует заново выстраивать приоритеты маркеров и их внутреннюю взаимосвязь в каждой области исследований.

Слюна является пограничной жидкостью не вполне постоянного состава и содержит компоненты как локального, так и системного происхождения, а также большое количество микробов и продуктов их жизнедеятельности. Формально те же медико-биологические показатели при их определении в пробах слюны не только могут отличаться от соответствующих показателей в пробах сыворотки крови по порядку величин, но иногда имеют совсем иной физиологический смысл.

В частности, активность α -амилазы в сыворотке крови является маркером повреждения клеток поджелудочной железы, а в слюнной жидкости этот же фермент оказался маркером тонуса симпатического отдела вегетативной нервной системы, под контролем которого он вырабатывается слюнными железами [4–6]. Показано, что базовая (вне приёмов пищи) активность α -амилазы в пробах слюны людей пропорциональна содержанию норадреналина в пробах сыворотки крови [7, 8].

Слюна имеет свой характерный профиль цитокинов, отличающийся от профиля цитокинов плазмы крови резким – на 1–2 порядка – увеличением содержания провоспалительных интерлейкинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-8 [9–11]. Уровни содержания других цитокинов сопоставимы по величине с соответствующими маркерами плазмы крови, но не коррелируют с ними [12–14], что в общем случае характерно для тех компонентов слюны, которые образуются преимущественно локально.

Напротив, компоненты системного происхождения, попадающие в слюну из крови путём пассивной диффузии, содержатся в ней в следовых количествах, но при этом могут

иметь достоверные корреляционные связи с их содержанием в сыворотке. Это касается в основном низкомолекулярных гормонов (стероидов, тиреоидов и мелатонина) [15, 16] и, возможно, некоторых клинико-лабораторных сывороточных маркеров при определённых патологиях [17, 18].

В гигиенических обследованиях населения слюну чаще всего используют для определения содержания секреторного иммуноглобулина А (sIgA) [19–21], иногда в качестве единственного показателя, на основании которого делается заключение о состоянии иммунитета обследуемых людей [22].

Целью данного исследования является поиск достоверных маркеров влияния загрязнений атмосферного воздуха в пробах смешанной слюны детей 5–7 лет, посещающих детские сады на территории небольшого города в агропромышленном регионе 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. Часть выбросов промзоны представлена веществами, обладающими достаточно выраженным запахом, с наличием соответствующих жалоб населения.

Особенностью данного исследования является его проведение в два этапа – скрининговый, по результатам которого было высказано предположение о возможных механизмах влияния выбросов промзоны на состояние организма обследованных детей, и постскрининговый, предназначенный для проверки этого предположения. Результаты этапа скрининга частично опубликованы в статье [23].

Материал и методы

Всего было обследовано 112 детей 5–7 лет (53 мальчика и 59 девочек) из 6 детских садов, расположенных на расстояниях 1,7–5,7 км от промплощадки и достаточно равномерно распределённых по территории города.

Пробы свободновытекающей смешанной слюны детей отбирали в одноразовые пластиковые контейнеры и в замороженном виде транспортировали в Москву. До проведения экспериментов слюна хранилась при температуре –23 °С.

Биохимические и иммунологические показатели в пробах слюны обследованных детей на этапе скрининга

Детские сады	d, км	Количество обследованных детей, n	Среднегрупповые значения показателей ¹					
			ЛЗХЛ, Ig имп./мин.	ИЛ-8, пг/мл	NAG, Ед/мл	sIgA, мкг/мл	МК, мкМ	α -амилаза, Ед • 10 ³ /л
A	1,74 (ЮЗ)	8	6,62 [6,40; 6,76] <i>p</i> = 0,00007*	286 [142; 1150]	12,9 [8,0; 16,6] <i>p</i> = 0,025*	92 [20; 246]	95 [71; 113]	25,8 [22,4; 29,4]
B	3,01 (ЮЗ)	24	6,65 [6,34; 6,87] <i>p</i> = 4,3 • 10 ⁻⁷ *	534 [136; 904] <i>p</i> = 0,005*	8,9 [6,6; 12,2] <i>p</i> = 0,045*	130 [93; 209]	82 [47; 123]	43,8 [17,5; 64,0]
C	3,03 (ЮВ)	14	6,39 [6,05; 6,52] <i>p</i> = 0,007*	420 [206; 800] <i>p</i> = 0,02*	9,4 [7,5; 15,9] <i>p</i> = 0,049*	116 [78; 234]	80 [60; 136]	34,8 [29,4; 52,7]
D	4,28 (ЮВ)	13	6,20 [5,89; 6,35]	364 [102; 564]	8,2 [5,6; 13,3]	100 [47; 138]	85 [72; 106]	43,4 [28,3; 64,1]
E	5,58 (ЮЗ)	25	6,01 [5,78; 6,24]	238 [127; 618]	8,0 [5,6; 12,2]	100 [72; 146]	128 [96; 175]	30,5 [16,2; 47,1]
F	5,87 (ЮВ)	28	5,99 [5,73; 6,19]	215 [118; 448]	5,6 [3,3; 10,8]	113 [65; 183]	100 [65; 158]	38,9 [13,9; 88,1]
Полная выборка	Уравнения линейной регрессии «экспозиция – эффект» ²							
A–F	1,74–5,87	112	$y = 6,98 - 0,17x$ $R = -0,517$; $p = 7,2 \cdot 10^{-9}$ *	$y = 776,2 - 83,2x$ $R = -0,338$; $p = 0,0003$ *	$y = 13,94 - 0,93x$ $R = -0,208$; $p = 0,037$ *	$y = 150,9 - 3,9x$ $R = -0,058$; $p = 0,543$	$y = 78,9 + 12,0x$ $R = 0,118$; $p = 0,214$	$y = 36,06 + 2,11x$ $R = 0,085$; $p = 0,375$

Примечание. Здесь и в табл. 2: A–F – условные обозначения детских садов; d – расстояние между детским садом и промзоной (в скобках – направление от промзоны); ¹ – данные приведены в виде Me [Q1; Q3]; достоверность различий с наиболее удалённым от промзоны детским садом F определяли тестом Манна–Уитни; ² – x – расстояние между детским садом и промзоной; y – индивидуальные значения данного показателя в полной выборке детей (n = 112); * – *p* < 0,05.

После размораживания пробы центрифугировали для удаления осадка клеток и других частиц.

Содержание в слюне интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 и секреторного иммуноглобулина А (sIgA) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (в скобках указаны каталожные номера): «Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ» (А-8766), «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» (А-8768), «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ» (А-8762) и «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ» (А-8668). Клинические тест-наборы этого же производителя использовали для спектрофотометрического определения содержания в слюне мочевой кислоты (МК) и активности α -амилазы.

Активность N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (NAG) в пробах слюны детей определяли по скорости отщепления п-нитрофенола от модельного субстрата 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,2 [24].

Интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) слюны, индуцированной перекисью водорода, определяли в среде инкубации, содержащей 140 мМ Na-фосфатного буфера, 50 мкМ натриевой соли люминола, 50 мкл/мл слюны. Запуск реакции производили добавлением перекиси водорода в конечной концентрации 59 мМ; результаты выражали в виде десятичных логарифмов светосуммы сигнала за первую минуту после добавления индуктора [25].

Математический анализ полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica for Windows v. 7.0. Использовались двусторонний непараметрический тест Манна–Уитни, корреляционный анализ, линейный регрессионный анализ, иерархический агрегативный кластерный анализ.

Результаты

Для этапа скрининга мы выбрали ряд биохимических и иммунологических показателей, руководствуясь в основном соображениями охватить предполагаемые адаптивные изменения состояния организма детей с разных сторон. Всего

было использовано 6 маркеров: два показателя окислительного стресса (интенсивность ЛЗХЛ слюны и содержание в ней МК – катаболического антиоксиданта), содержание в слюне sIgA и провоспалительного цитокина ИЛ-8, активность лизосомального фермента NAG и α -амилазы как маркера психологического стресса.

Результаты этапа скрининга представлены в табл. 1. Для анализа данных мы использовали два варианта статистической обработки – оценку достоверности межгрупповых различий маркеров по отношению к детскому саду F (наиболее удалённому от промплощадки и расположенному к юго-востоку от неё, при преимущественных направлениях ветров с северо-востока и юго-запада) и оценку достоверности уравнений линейной регрессии между индивидуальными значениями изучавшихся показателей в полной выборке детей и расстояниями между детскими садами и промплощадкой.

Оба варианта статистической обработки данных дали один и тот же результат – по мере приближения места расположения детских садов к промплощадке в слюне детей наблюдалось увеличение трёх из шести использованных маркеров, причём именно тех, которые имеют какое-либо отношение к функциональной активности фагоцитов (интенсивность ЛЗХЛ слюны, содержание в ней ИЛ-8 и активность NAG). В частности, ИЛ-8 является хемоаттрактантом и способствует локальному накоплению лейкоцитов за счёт их выхода из кровеносного русла. Интенсивность ЛЗХЛ слюны, индуцированной перекисью водорода, в основном определяется активностью пероксидаз, секретируемых клетками слюнных желёз (лактопероксидаза) и взвешенными в слюне нейтрофилами (миелопероксидаза) [26–28]. Источником лизосомальных ферментов в бесклеточной фракции слюны также являются активированные нейтрофилы [29].

Три остальных маркера, не связанных функционально с активностью фагоцитарных клеток (содержание в слюне sIgA, МК и активность α -амилазы), не имели достоверной связи с расстояниями между детскими садами и промзоной.

Полученные результаты позволяют предположить, что под влиянием выбросов промзоны у обследованных детей происходит адаптивное увеличение функциональной активности фагоцитов полости рта, опережающее изменения

со стороны секреторного иммунитета. Однако строгим доказательством этого механизма вышеописанные данные не являются, поскольку мы использовали косвенные признаки активации фагоцитов, причём из числа имеющихся и исходно введённых в исследование совсем из других соображений.

Для того чтобы проверить это предположение, мы провели дополнительное постскрининговое исследование на том же биологическом материале, подобрав ещё два показателя так, что они образовали своеобразную функциональную «вилку».

В дополнение к уже имеющимся маркерам фагоцитарной активности был выбран провоспалительный цитокин ИЛ-1β (лейкоцитарный пироген, вырабатываемый активированными макрофагами); в дополнение к показателю гуморального иммунитета sIgA – интерлейкин ИЛ-6. ИЛ-6 может действовать как про- или противовоспалительный цитокин, в зависимости от ситуации. Одной из его основных функций считается участие в качестве кофактора в процессах дифференцировки В-лимфоцитов и регуляции активности плазматических клеток, синтезирующих антитела [30, 31].

Как это видно из табл. 2 и рис. 1, поведение ИЛ-1β как дополнительного «фагоцитарного» маркера полностью оправдало наши ожидания. На этапе постскрининга все 4 маркера, имеющие отношение к фагоцитарной активности, достоверно увеличивались по мере приближения расположения детских садов к промзоне и были полностью перешиты достоверными коэффициентами взаимной корреляции (табл. 3). Лучшим маркером уровней экспозиции по-прежнему осталась интенсивность ЛЗХЛ слюны (рис. 2), наиболее тесная корреляционная связь внутри совокупности фагоцитарных маркеров выявлена между содержанием в слюне детей цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-8 (см. табл. 3). Далее в порядке снижения коэффициентов корреляции идут пары ИЛ-1β/ЛЗХЛ и ИЛ-1β/NAG, а затем уже более слабо связанные между собой

Таблица 2

Содержание цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-6 в пробах слюны обследованных детей (пост-скрининг)

Детские сады	d, км	Количество обследованных детей, n	Среднегрупповые значения показателей	
			ИЛ-1β, пг/мл	ИЛ-6, пг/мл
A	1,74 (ЮЗ)	8	340 [128; 524] <i>p</i> = 0,013*	1,6 [0,5; 3,3]
B	3,01 (ЮЗ)	24	259 [128; 434] <i>p</i> = 0,003*	3,3 [0,2; 7,6]
C	3,03 (ЮВ)	14	368 [148; 524] <i>p</i> = 0,0007*	5,0 [0,0; 8,2]
D	4,28 (ЮВ)	13	187 [80; 227]	8,8 [4,7; 14,2] <i>p</i> = 0,02*
E	5,58 (ЮЗ)	25	201 [82; 399]	3,7 [0,9; 12,9]
F	5,87 (ЮВ)	28	100 [68; 206]	1,3 [0,0; 4,7]

Полная выборка	Уравнения линейной регрессии «экспозиция – эффект»			
	d, км	n	ИЛ-1β	ИЛ-6
A–F	1,74 – 5,87	112	$y = 508,1 - 54,8x$ <i>R</i> = -0,299; <i>p</i> = 0,0016*	$y = 9,93 - 0,20x$ <i>R</i> = -0,016; <i>p</i> = 0,887

пары исходных маркеров фагоцитарной активности. Таким образом, выбор ИЛ-1β для этапа постскрининга оказался удачным. Новый маркер не только вошёл в уже существующий набор показателей фагоцитарной активности, но и стал его основным скрепляющим элементом.

Напротив, вопреки нашим предположениям не было найдено корреляционной (см. табл. 3) или какой-либо иной связи между содержанием в слюне детей sIgA и содержи-

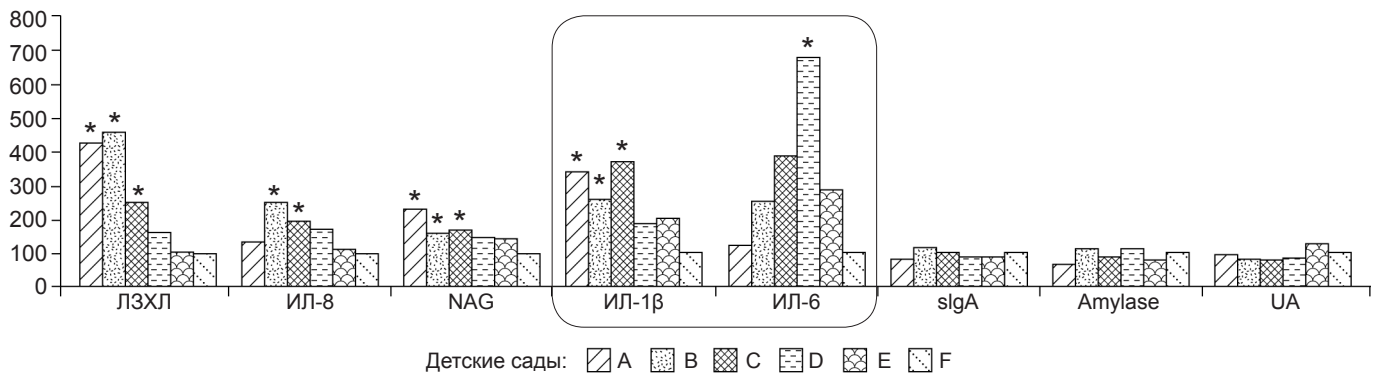


Рис. 1. Соотношение медиан показателей в ряду детских садов А–F в процентах по отношению к наиболее удалённому от промзоны детскому саду F. Используются нелогарифмированные значения интенсивности ЛЗХЛ (светосуммы сигналов в имп./мин). Овалом обведены маркеры этапа постскрининга.

Таблица 3

Корреляционная матрица маркеров для объединённой выборки детей (n = 112)

ИЛ-1β								
0,557 <i>p</i> = 4 · 10 ⁻¹⁰	ИЛ-8							
0,378 <i>p</i> = 0,00006	0,311 <i>p</i> = 0,001	ЛЗХЛ						
0,374 <i>p</i> = 0,0001	0,204 <i>p</i> = 0,041	0,342 <i>p</i> = 0,001	NAG					
0,381 <i>p</i> = 0,0004	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	ИЛ-6				
<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	0,228 <i>p</i> = 0,017	0,351 <i>p</i> = 0,0003	<i>p</i> > 0,05	sIgA			
<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	Амилаза		
<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	МК	

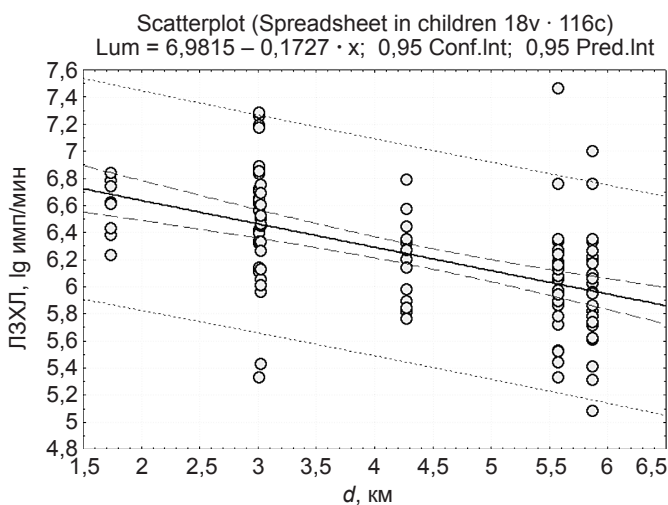


Рис. 2. Зависимость интенсивности ЛЗХЛ слюны детей от расстояний между детскими садами и промзоной ($y = 6,98 - 0,17x$; $R = -0,517$; $p = 7,2 \cdot 10^{-9}$).

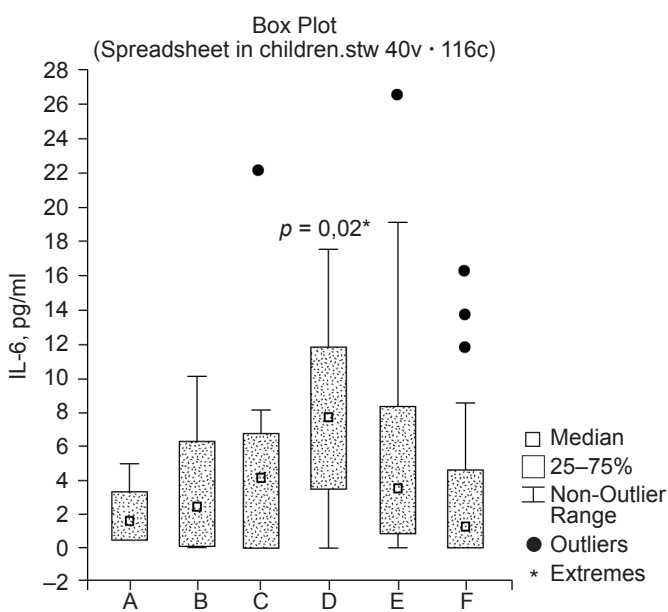


Рис. 3. Положение медиан и квартилей содержания ИЛ-6 в слюне детей из детских садов А–F.

ем цитокина ИЛ-6, введённого в постскрининг как один из кофакторов, влияющих на гуморальный иммунитет. Как это видно из графика на рис. 1, медианы содержания sIgA у детей из детских садов А–F практически не менялись, а медианы содержания ИЛ-6 в ряду А–F образовывали зависимость «подъём-спад» с высокими превышениями значений по отношению к условно контрольному детскому саду F (в 2,5; 3,8 и 2,8 раза в детских садах В, С и Е и почти в 7 раз в единственной достоверно отличающейся от контрольной точке D). Дополнительный график на рис. 3 показывает, что достаточно плавную зависимость «подъём-спад» образуют не только медианы, но и верхние квартили содержания ИЛ-6 в слюне детей из детских садов А–F, однако эти различия не выявляются как достоверные из-за особенностей распределения данного показателя (большой межквартильный размах и практическое совпадение нижнего квартиля с минимальным значением диапазона в большинстве сравниваемых подгрупп).

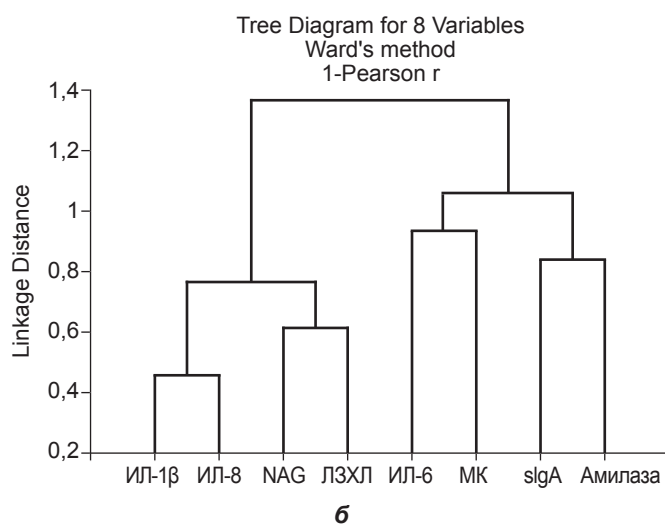
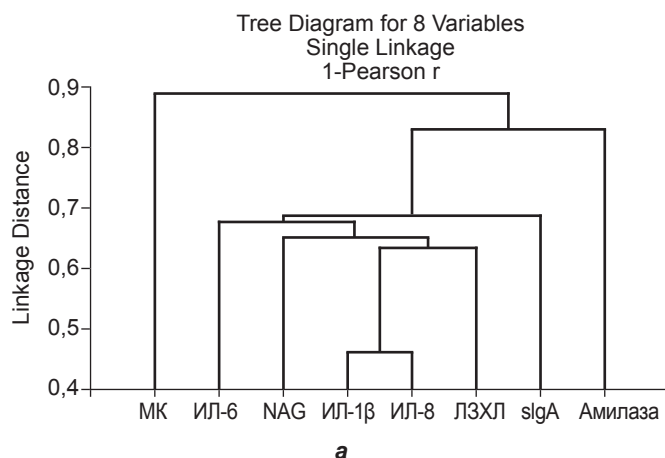


Рис. 4. Кластерный анализ матрицы маркеров в объединённой выборке детей: а – метод ближайшего соседа; б – метод Уорда (см. текст).

На рис. 4 средствами кластерного анализа показана внутренняя структура матрицы использованных нами маркеров в объединённой выборке детей ($n = 112$). Представлены два алгоритма построения иерархических кластерных деревьев – методом ближайшего соседа (Single Linkage, см. рис. 4, а) и методом Уорда (Ward's method, см. рис. 4, б). Оба алгоритма широко применяются для анализа матриц данных, в том числе и в биологических исследованиях [32–35]. Метод ближайшего соседа наращивает кластеры постепенно, выстраивая их в цепочку, а метод Уорда исходит из минимизации суммы квадратов расстояний между объединяемыми объектами и ценится за свою способность выделять кластеры относительно небольшого размера. В качестве меры расстояния между кластерами использовалась величина 1-R, где R – коэффициент корреляции Пирсона между объединяемыми объектами в n -мерном пространстве.

Как это видно из рис. 4, оба алгоритма начинают кластеризацию переменных с маркеров фагоцитарной активности как наиболее тесно связанных между собой. Первыми кластеризуются регуляторные маркеры ИЛ-1β/ИЛ-8, за ними – маркеры реакции на них фагоцитов (выброс пероксидаз и лизосомальных ферментов). Отдельный кластер (sIgA – амилаза – ИЛ-6 – МК), выделяемый методом Уорда, по-видимому, не имеет другого смысла, кроме «совокупности маркеров, не относящихся к маркерам фагоцитарной активности», поскольку он начинает формироваться при близких к единице значениях длины связи, и внутри этого кластера нет достоверных попарных корреляционных связей переменных (см. табл. 3).

Обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что по мере приближения места расположения обследованных детских садов к промзоне в пробах слюны детей монотонно увеличиваются показатели активности фагоцитарного звена иммунитета (интенсивность ЛЗХЛ слюны, содержание в ней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-8, активность лизосомального фермента NAG) при отсутствии реакции со стороны маркеров антителообразования (содержание в слюне sIgA) и психологического стресса (активность α -амилазы).

Известно, что активация фагоцитов может быть вызвана следующими факторами: микробы, нерастворимые микро-частицы и повреждённые клетки данного организма. Возможное влияние микробиологических факторов мы не оценивали, и вполне вероятно, что санитарно-гигиенические условия в обследованных детских садах различаются и могут вносить определённый вклад в наблюдавшиеся изменения маркеров слюны детей. Но вероятность того, что санитарные условия в обследованных детских садах ухудшаются именно в направлении с юга на север, практически равна нулю. Третий возможный механизм — повреждение эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта компонентами выбросов промзоны с соответствующей реакцией фагоцитарных клеток — в данном случае тоже можно исключить, поскольку цитоморфологический анализ отпечатков слизистой оболочки полости рта обследованных детей не выявил достоверных межгрупповых различий (личное сообщение Н.Н. Деминой, данные будут опубликованы отдельно). Таким образом, наиболее вероятным механизмом наблюдавшихся изменений показателей фагоцитарной активности в пробах слюны детей является воздействие взвешенных частиц, попадающих в городской атмосферный воздух с выбросами промзоны.

Кроме того, на основании отсутствия изменений со стороны показателя секреторного иммунитета (sIgA) можно с достаточной уверенностью предположить, что содержащиеся в выбросах промзоны химические вещества не являются гаптенами и не токсичны для лимфоцитов слизистой оболочки полости рта и регионарных лимфоузлов — по крайней мере в тех концентрациях, которые в данном случае имеются в окружающей среде.

Зависимости доза-эффект типа «подъём-спад» не являются редкостью в гигиенических обследованиях населения и санитарно-токсикологических экспериментах на животных. Куполообразная связь между расстояниями от детских садов до промзоны и содержанием в слюне детей ИЛ-6 (см. рис. 1, 3), по-видимому, отражает особенности участия этого не вполне обычного цитокина в регуляции реакции клеток полости рта на загрязнение атмосферного воздуха выбросами промзоны.

ИЛ-6 — плейотропный цитокин эндокринного типа с многочисленными функциями. Он имеет циркадный ритм, стимулирует образование гормонов коры надпочечников и выделяется многими неиммунными клетками (кератиноцитами, астроцитами, остеокластоцитами, адипоцитами, клетками сокращающихся скелетных мышц и т. д.) [36–39]. По данным разных авторов, свой вклад в общий пул ИЛ-6 слюнной жидкости, кроме иммунных клеток, вносят кератиноциты и фибробласты слизистой оболочки полости рта и периодонта [40–43], нейтрофилы слюны [44] и, возможно, миоциты жевательных мышц и языка. Несмотря на большое количество вкладчиков, содержание ИЛ-6 в слюне одного порядка с его содержанием в сыворотке крови и на 1–2 порядка ниже содержания в слюне «антимикробных» провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-8.

Мы получили примерно такие же соотношения между содержанием в слюне обследованных детей цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ИЛ-6 (см. табл. 1, 2); медианы этих показателей в объединённой выборке детей составили 189; 286 и 3 пг/мл соответственно. Однако, несмотря на различия в содержании и характере выявленных зависимостей экспозиция-эффект,

Scatterplot (Spreadsheet in children. stw 40v · 116c)
IL-6 = 1,6788 + 0,0273 · x

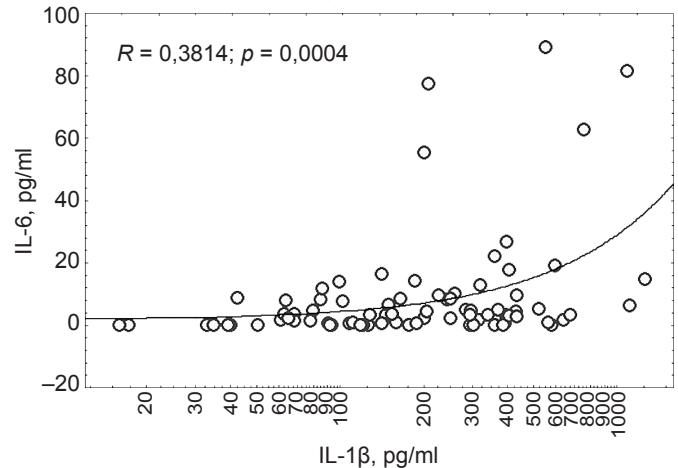


Рис. 5. Достоверная связь между содержанием в слюне обследованных детей цитокинов ИЛ-1 и ИЛ-6 ($R = 0,381$; $p = 0,0004$). Ось абсцисс логарифмирована.

ИЛ-6 в нашем исследовании вёл себя как расположенный несколько сбоку, но всё-таки не утративший связь с преобладающей парой ИЛ-1 β /ИЛ-8 компонент цитокиновой сети, поскольку его содержание в слюне детей было связано достоверной корреляционной связью с содержанием ИЛ-1 β (см. табл. 3) — не только формальной, но и достаточно явной графически (рис. 5).

С общебиологической точки зрения наиболее интересным результатом данного исследования является отсутствие связи между содержанием в слюне детей sIgA и содержанием цитокина ИЛ-6, введённого в постскрининг как один из эндогенных регуляторов, влияющих на гуморальный иммунитет. Анализ литературных данных выявил только одно исследование с относительно сходными результатами [45], цитирующееся затем в нескольких обзорах и монографии [46]. При разработке мукозальных вакцин было обнаружено, что внутриназальное введение мышам рекомбинантного ИЛ-6 в комбинации с антигеном приводит к индукции образования иммуноглобулинов IgG1/G2 в сыворотке крови, но не изменяет содержание sIgA в слюне мышей — в отличие от ИЛ-12, который индуцировал и гуморальный, и секреторный иммунитет. Авторы пришли к выводу, что для участия ИЛ-6 в регуляции секреторного иммунитета требуются какие-то дополнительные факторы, кроме сдвига дифференцировки Т-лимфоцитов в сторону Th2. Позднее эти же авторы показали, что аналогичный дефект индукции sIgA характерен для дефензинов, в то время как ИЛ-1, ИЛ-12, лимфотактин и цитокин A5 (RANTES) в сходных условиях в равной степени стимулировали гуморальный и секреторный иммунитет [46, 47]. Таким образом, неудачный выбор нами второго маркера для постскрининга объясняется тем, что мы исходили из общих механизмов регуляции образования антител, которые, по-видимому, не полностью реализуются в слюнной жидкости.

Заключение

Проведённое неинвазивное обследование детей 5–7 лет из 6 детских садов позволяет предположить, что градиент выбросов промзоны, расположенной с северной стороны от данного города, содержит взвешенные вещества в концентрациях, вызывающих адаптивное увеличение активности фагоцитов полости рта детей, и не содержит гаптенных или иммунотоксичных соединений.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования биохимических и иммунологических показателей смешанной слюны для гигиенических исследований. В то же время необходимо учитывать, что состав и функциональные особенности слюны существенно отличаются от аналогичных характеристик сыворотки крови,

что накладывает свой отпечаток на физиологический смысл привнесённых из классической токсикологии маркеров, требует заново выстраивать их приоритеты и внутреннюю взаимосвязь. Постскрининг может оказаться полезным приёмом при использовании проб слюны как недостаточно изученного объекта.

Литература

(пп. 1–7, 9–19, 21, 26–47 см. References)

8. Якушенко Н.Л., Нагобадзе Д.Т., Копейка У.Э., Михельсон М.О. Изменение активности а-амилазы слюны как индикатор адренергической активности во время ларингоскопии и интубации трахеи. *Анестезиология и реаниматология*. 2011; 3: 29–33.
20. 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): 31–3.
22. Бяхова М.М., Сычева Л.П., Журков В.С., Гельштейн В.С., Сухарева И.В., Шишкина Л.И. и соавт. Кариологические и иммунологические показатели у детей в условиях различного загрязнения атмосферного воздуха. *Гигиена и санитария*. 2010; 3: 9–11.
23. Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Маковецкая А.К., Коганова З.И., Бударина О.В. и соавт. Адаптивные изменения биохимических и иммунологических показателей смешанной слюны при воздействии загрязнений атмосферного воздуха на детей дошкольного возраста. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019; 6: 68–73.
24. Покровский А.А., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Влияние афлатоксина и митомицина С на активность лизосомальных ферментов. *Биохимия*. 1971; 36 (4): 690–6.
25. Хрипач Л.В. Применение свободнорадикальных методов для оценки влияния полихлорированных диоксинов и фуранов на состояние здоровья населения. *Гигиена и санитария*. 2002; 2: 72–6.

References

1. Miller C.S., Foley J.D., Bailey A.L., Campell C.L., Humphries R.L., Christodoulides N. et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med*. 2010; 4 (1): 171–89.
2. Pfaffe T., Cooper-White J., Beyerlein P., Kostner K., Punyadeera T. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem*. 2011; 57 (5): 675–87.
3. 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. *Dis Markers*. 2019; 4: 1–11.
4. Chatterton R.T., Vogelsohn K.M., Lu Y.C., Ellman A.B., Hudgens G.A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol*. 1996; 16 (4): 433–48.
5. Nater U.M., Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a noninvasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34: 486–96.
6. Tananska V.T. Salivary α -amylase and chromogranin A in anxiety-related research. *Folia Med*. 2014; 56 (4): 233–6.
7. Rohleder N., Nater U.M., Wolf J.M., Ehler U., Kirschbaum C. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1032: 258–63.
8. Yakushenko N.L., Kopeyka U.E., Nagobadze D.T., Mihelson M.O. Changes of salivary alpha amylase as an indicator of adrenergic activity in response to laryngoscopy and endotracheal intubation. *Anesteziology i reanimatologiya*. 2011; 3: 29–33. (in Russian)
9. Byrne M.L., O'Brien-Simpson N.M., Reynolds E.C., Walsh K.A., Laughon K., Waloszek J.M. et al. 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 Behav Immun Health*. 2013; 34: 164–75.
10. Riis J.L., Granger D.A., DiPietro J.A., Bandeen-Roche K., Johnson S.B. Salivary cytokines as a minimally-invasive measure of immune functioning in young children: correlates of individual differences and sensitivity to laboratory stress. *Dev Psychobiol*. 2015; 57 (2): 153–67.
11. La Fratta I., Tatangelo R., Campagna G., Rizzuto A., Franceschelli S., Ferrone A. et al. The plasmatic and salivary levels of IL-1 β , IL-18 and IL-6 are associated to emotional difference during stress in young male. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 3031. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21474-y>
12. Williamson S., Munro C., Pickler R., Grap M.J., Elswick R.K. Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. *Nurs Res Pract*. 2012; 246178. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/246178>
13. Cox A.J., Pyne D.B., Gleson M., Callister R. Resting plasma and salivary IL-6 concentrations are not correlated in distance runners. *Eur J Appl Physiol*. 2008; 103 (4): 477–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0722-x>
14. Cullen T., Thomas A.W., Webb R., Hughes M.G. The relationship between interleukin-6 in saliva, venous and capillary plasma, at rest and in response to exercise. *Cytokine*. 2015; 71 (2): 397–400.
15. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., Elio F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 2007; 383 (1–2): 30–40.
16. Pervanidou P., Kolaitis G., Charitaki S., Margeli A., Ferentinos S., Bakoula C. et al. Elevated morning serum interleukin IL-6 or evening salivary cortisol concentrations predict posttraumatic stress disorder in children and adolescents six months after a motor vehicle accident. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32 (8–10): 991–9.
17. Honnamurthy J., Shivashankara A., Avinash S.S., Johnmathai P. Biochemical markers of liver function in smoking and non-smoking alcohol-dependent males. *J Clin Diagn Res*. 2018; 12 (5): 1–6.
18. Yamaguchi M., Kawabata Y., Hatakeyama T., Kashii Y. Proposal of non-invasive liver function measurement method via saliva. *IEEE Trans Sens Micromachines*. 2003; 123 (11): 483–6.
19. Tsujita S., Morimoto K. Secretory IgA in saliva can be a useful stress marker. *Env Health Prevent Med*. 1999; 4 (1): 1–8.
20. Бударина О.В., Мольков Ю.Н., Пономарева О.Ю., Ульянова А.В. Иммунологические методы для оценки здоровья в условиях загрязнения атмосферного воздуха. *Гигиена и санитария [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2014; 93 (2): 31–3. (in Russian)
21. Yu Y., Yu Z., Sun P., Lin B., Li L., Wang Z. et al. Effects of ambient air pollution from municipal solid waste landfill on children's non-specific immunity and respiratory health. *Environ Pollut*. 2018; 236: 382–90.
22. Byakhova M.M., Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Gelshtein V.S., Sukhareva I.V., Shishkina L.I. et al. Karyological and immunological parameters in children under conditions of varying ambient air pollution. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2010; 3: 9–11. (in Russian)
23. Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Маковецкая А.К., Коганова З.И., Бударина О.В. и соавт. Адаптивные изменения биохимических и иммунологических показателей смешанной слюны при воздействии загрязнений атмосферного воздуха на детей дошкольного возраста. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019; 6: 68–73. (in Russian)
24. Pokrovskij A.A., Kravchenko L.V., Tutel'jan V.A. The effect of aflatoxin and mitomycin C on the activity of lysosomal enzymes. *Biokhimiya [Biochemistry]*. 1971; 36 (4): 690–6. (in Russian)
25. Хрипач Л.В. Применение свободнорадикальных методов для оценки влияния полихлорированных диоксинов и фуранов на состояние здоровья населения. *Гигиена и санитария [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2002; 2: 72–6. (in Russian)
26. 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. *J Dental Res*. 1994; 73 (2): 544–55.
27. Kou F., Takahama U. Hydrogen peroxide induced luminescence and evolution of molecular oxygen in human saliva. *Arch Oral Biol*. 1995; 40 (1): 15–22.
28. 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): 119–26.
29. Ramamurthy J., Jayakumar N.D., Varghese S. Comparison of salivary beta-glucuronidase activity in chronic periodontitis patients with and without Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8 (6): ZC19–ZC21.
30. Hirano T., Akira S., Taga T., Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Trends Immunol*. 1990; 11 (12): 443–9.
31. Kishimoto T. IL-6 – from laboratory to bedside. *Clin Rev Allerg Immun*. 2005; 28 (3): 177–85.
32. Cobzac S.C., Casoni D., Balabanova B., Ruzdik N.M. Ultraviolet-visible spectroscopy and cluster analysis as a rapid tool for classification of medicinal plants. *Studia UBB Chemia*. 2019; 64 (4): 191–203.
33. Khan H.L., Bhatti S., Abbas S., Khan Y.L., Gonzalez R.M. et al. Longer trinucleotide repeats of androgen receptor are associated with higher testosterone and low oxytocin levels in diabetic premature ejaculatory dysfunction patients. *Basic Clin Androl*. 2018; 28: 3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12610-018-0068-0>

34. Xu S.J., Xie Y.P., Xu C.X. Routine classification of food pathogens *Staphylococcus* and *Salmonella* by ATR-FT-IR spectroscopy. *Spectroscopy*. 2011; 26 (1): 53–8.
35. Rachev N. Students' concepts of intelligence: prototypes and implicit theories. *Bulg J Psychol*. 2009; 1: 1–10.
36. Papanicolaou D.A., Vgontzas A.N. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 1331–3.
37. Rotter V., Nagaev I., Smith U. Interleukin-6 induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , over-expressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003; 278 (46): 45777–84.
38. Nielsen A.R., Pedersen B.K. The biological roles of exercise-induced cytokines IL-6, IL-8 and IL-15. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007; 32 (5): 833–9.
39. Nava-Castro K.E., Méndez-García L.A., Solleiro-Villavicencio H., Morales-Montor J. The cytokine Interleukin 6 (IL-6) as a neural and endocrine regulator. *Adv Neuroimm Biol*. 2018; 7 (11): 1–14.
40. Formanek M., Knerer B., Temmel A., Thurner D., Millesi W., Kornfehl J. Oral keratinocytes derived from the peritonsillar mucosa express the proinflammatory cytokine IL-6 without prior stimulation. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27: 202–6.
41. Winkler O., Hadnagy W., Idel H. Cytokines detectable in saliva of children as appropriate markers of local immunity of the oral cavity – an approach for the use in air pollution studies. *Int J Hyg Environ Health*. 2001; 204: 181–4.
42. Knerer B., Formanek M., Temmel A., Martinek H., Schickinger B., Kornfehl J. The role of fibroblasts from oropharyngeal mucosa in producing proinflammatory and mitogenic cytokines without prior stimulation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1999; 256: 266–70.
43. Cvikl B., Lussi A., Moritz A., Sculean A., Gruber R. Sterile-filtered saliva is a strong inducer of IL-6 and IL-8 in oral fibroblasts. *Clin Oral Investig*. 2015; 19 (2): 385–99.
44. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S. et al. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon”. *Eur J Clin Invest*. 2018; 48 (Suppl 2): e12952. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.12952>
45. Boyaka P.N., Marinaro M., Jackson R.J., Menon S., Kiyono H. et al. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J Immunol*. 1999; 162: 122–8.
46. Boyaka P.N., McGhee J.R., Czerkinsky C., Mestecky J. Mucosal vaccines: an overview. In: Mestecky J., Lamm M.E. et al., eds. *Mucosal immunology: 3rd edit.* Elsevier Science: Academic Press; 2005: 855–74.
47. Boyaka P.N., McGhee J.R. Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 51 (1–3): 71–9.