

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ СТУДЕНТОВ РАЗНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП

Касимова С.К.¹, Ломтева Н.А.¹, Кондратенко Е.И.¹, Кузина Т.В.¹, Сазбанова А.Д.¹

¹ ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», Астрахань, e-mail: molecula01@yandex.ru

Представлены результаты изучения частоты встречаемости эпителиоцитов с микроядрами и иными цитогенетическими нарушениями у студентов разных национальностей. Микроядерный тест используется при проведении цитогенетического анализа в качестве объективного индикатора для экспресс-оценки стабильности генетического аппарата. Цель исследования – изучить особенности и частоту встречаемости цитогенетических нарушений в эпителиоцитах у добровольцев разных этнических групп в микроядерном тестировании. Исследования проводились на группе студентов-добровольцев (90 человек) – представителей трех национальностей: русских, казахов, туркмен. В каждой группе было по 15 юношей и 15 девушек в возрасте от 18 до 22 лет. В ходе анализа частоты встречаемости цитогенетических нарушений в буккальном эпителии у лиц разных этнических групп были выявлены следующие нарушения ядра: протрузии типа «разбитое яйцо», ядра с перинуклеарными вакуолями, протрузии типа «с насечкой», протрузии типа «язык», а также выделяли отдельно двуядерные клетки и клетки с микроядром. Исследуемые выборки различались по частоте встречаемости клеток с микроядрами и другими нарушениями ядра. Были выявлены половые и национальные различия. Выборка представителей туркменской национальности отличалась увеличением частоты встречаемости клеток с ядерными нарушениями в клетках буккального эпителия при использовании микроядерного теста.

Ключевые слова: микроядерный тест, эпителиоциты, буккальный эпителий, этнические группы, микроядра, цитогенетические нарушения.

CYTOGENETIC DISORDERS IN CELLS OF BUCCAL EPITHELIUM OF STUDENTS OF DIFFERENT ETHNIC GROUPS

Kasimova S.K.¹, Lomteva N.A.¹, Kondratenko E.I.¹, Kuzina T.V.¹, Sazbanova A.D.¹

¹ Astrakhan State University, Astrakhan, e-mail: molecula01@yandex.ru

In the article are presented the results of the study of micronucleus and other cytogenetic disorders in the buccal epithelium cells of students of different ethnic groups. The micronuclear test is used at performing cytogenetic analysis as an objective indicator for the rapid assessment of the stability of the genetic apparatus. The purpose of the study – to assess the characteristics of cytogenetic disorders in the cells of the buccal epithelium at individuals of different ethnic groups using micronuclear testing. The studies were conducted on a group of volunteer students (90 people) - representatives of three nationalities: Russians, Kazakhs, and Turkmen. In each group there were 15 men and 15 women aged from 18 to 22 years. The analysis of cytogenetic abnormalities in buccal epithelial cells in individuals of different ethnic groups revealed the following nuclear abnormalities: «broken egg», «notched» and «tongue» protrusions, nuclei with perinuclear vacuoles, and also isolated binuclear cells and cells with micronucleus. The studied samples differed in the frequency of occurrence of cells with micronucleus and other nucleus disorders. Gender and national differences were identified. A sample of representatives of the Turkmen nationality was distinguished by an increase in the average indicators of cells with micronucleus and the sum of nuclear disorders noted in buccal epithelium cells using the micronucleus test.

Keywords: micronucleus test, buccal epithelium, cytogenetic disorders, nuclear protrusions, ethnic group.

Микроядерный тест используется при проведении цитогенетического анализа в качестве объективного индикатора для оценки стабильности генетического аппарата. Микроядра в интерфазных клетках появляются в результате хромосомных aberrаций и/или повреждения веретена деления клетки и являются общепризнанным показателем цитогенетических нарушений. Его считают относительно простым в применении и неинвазивным диагностическим методом, отражающим последствия негативного воздействия на организм факторов окружающей среды [1; 2]. Это становится все более

актуальным в последнее время, так как с каждым годом происходит рост экологических катастроф, загрязнения окружающей среды, использования генетически модифицированных объектов и других потенциально опасных технологий.

Генетический мониторинг представляет собой контроль наследственной изменчивости популяций с целью защиты от экологических последствий загрязнения окружающей среды. Актуальность и необходимость проведения цитогенетического мониторинга как составной части генетического мониторинга при оценке состояния генома на клеточном уровне обусловлены рядом аспектов. Накапливается все больше фактов о ведущей роли генома в развитии и функционировании отдельных клеток, тканей, органов, а также организма в целом, об этиологической роли нарушений в строении генома и экспрессии генов в развитии и течении онкологических и других заболеваний [3].

Благодаря цитогенетическому мониторингу можно получить информацию о состоянии здоровья населения обследуемой популяции и о наличии генотоксических факторов в среде обитания, т.е. цитогенетический статус человека может служить биомаркером уровня загрязнения среды генотоксикантами.

В последнее время внимание исследователей привлекают клетки буккального эпителия, которые возможно использовать для относительно точной, быстрой и неинвазивной диагностики, и, кроме того, они могут служить важным источником информации о воздействиях стрессоров, состоянии здоровья человека, действии факторов окружающей среды и других влияниях [4].

Метод микроядерного теста имеет такие преимущества, как надежность, независимость от изучения кариотипа вида, который может содержать большое количество мелких хромосом, скорость и возможность его проведения в тканях с низкой митотической активностью [5].

Часть исследователей считает возможным применять метод микроядерного теста для скрининга людей, предрасположенных к геномной нестабильности, для своевременности и мониторинга эффективности для их профилактики и лечения [6]. Считают, что клетки буккального эпителия позволяют получить информацию о состоянии здоровья, влиянии факторов окружающей среды на организм человека и действии стрессоров, являясь своеобразным отражением полученной информации. А, следовательно, результаты, полученные при проведении микроядерного теста на эпителиоцитах, вызывающие структурные и численные хромосомные нарушения и приводящие к образованию микроядер, могут являться показателем воздействия факторов окружающей среды на организм [7; 8]. Однако влияние межнациональных особенностей на стабильность генетического аппарата человека является слабоизученным. В связи с вышеизложенным перед нами была поставлена

следующая цель исследования: изучить особенности и частоту встречаемости цитогенетических нарушений в эпителиоцитах у добровольцев разных этнических групп в микроядерном тестировании.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились на базе ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» на группе студентов-добровольцев – представителей трех национальностей: русских, казахов, туркмен. В каждой группе было по 15 юношей и по 15 девушек в возрасте от 18 до 22 лет.

Для изучения частоты встречаемости ядерных нарушений в клетках буккального эпителия проводили микроядерный тест. Перед взятием клеток буккального эпителия добровольцы прополаскивали рот водой два раза. Далее делали соскоб со слизистой оболочки щеки стерильным шпателем выше линии смыкания зубов. Затем готовили мазки из взятых эпителиоцитов, помещая их на обезжиренное предметное стекло, растирая по нему тонким равномерным слоем. Полученные препараты клеток буккального эпителия слизистой ротовой полости подсушивали на воздухе, а затем фиксировали. Затем полученные мазки окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза. При окрашивании мазков использовали краситель ОАО «ПО «ТОС» (Россия). Профильтрованный водный раствор азур-эозина по Романовскому-Гимза (1:5) наносили на мазки, выдерживали в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего накрывали полученный препарат покровным стеклом и убрали лишний краситель фильтровальной бумагой [9].

После того как мазки были приготовлены, проводили их анализ, для этого исследовали 200 находящихся на стекле эпителиоцитов под микроскопом в проходящем свете при увеличении 600х, при этом определяли частоту встречаемости микроядер и других цитогенетических нарушений. На мазках буккального эпителия изучали неповрежденные отдельно лежащие эпителиоциты, которые располагались в монослое. Цитогенетические нарушения учитывали только в клетках с ядрами, которые имеют отчетливую и гладкую границу ядерной мембраны.

При проведении микроскопического исследования эпителиоцитов микроядрами считали округлые или овальные хроматиновые тела с гладким непрерывным краем, которые лежали отдельно от ядра, имели окрашивание и рисунок хроматина, аналогичные основному ядру, кроме того, если они не преломляли свет и находились в одной плоскости с ядром [10].

Кроме микроядер, подсчитывали частоту встречаемости таких цитогенетических нарушений, как перинуклеарные вакуоли, двуядерные клетки, протрузии типа «разбитое яйцо», «с насечкой» и «язык» (рис. 1).

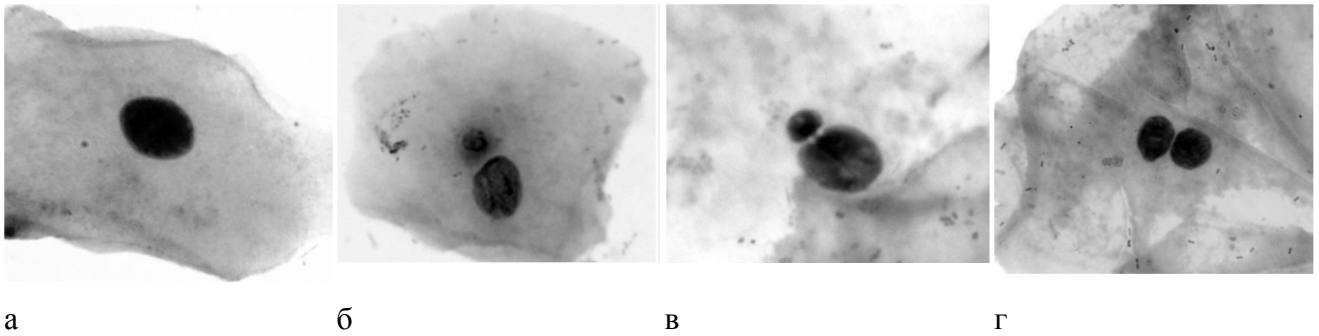


Рис. 1. Цитогенетические нарушения в эпителиоцитах:

а – буккальный эпителиоцит в норме; б – клетка с ядром и микроядром; в – клетка с ядерной протрузией; г – клетка с двумя изолированными ядрами

При проведении микроядерного теста вычисляли частоты встречаемости клеток с каждым типом нарушений – как отношение числа клеток с той или иной аберрацией к общему числу проанализированных клеток (в %); частоту встречаемости аберраций всех типов – как отношение суммы клеток с нарушениями к общему числу проанализированных клеток (в %).

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistica 6,0. Все количественные показатели обрабатывали с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Характер распределения вариационных рядов определяли с помощью методов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Различия сравниваемых результатов ($X \pm m$, где X - выборочное среднее арифметическое, m - ошибка среднего арифметического) считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе анализа ядерных нарушений в клетках буккального эпителия у лиц разных этнических групп были выявлены следующие нарушения ядра: протрузии типа «разбитое яйцо», протрузии «с насечкой» и протрузии типа «язык», ядра с перинуклеарными вакуолями, а также выделяли отдельно двуядерные клетки и клетки с микроядром.

Отмечены существенные различия по следующим четырем показателям нарушений ядра у юношей русской и казахской национальностей: протрузии типа «разбитое яйцо», «с насечкой» и «язык», а также ядра с перинуклеарными вакуолями (рис. 2, 3). У юношей русской и туркменской национальностей обнаружены различия только по наличию протрузий типа «язык» и двуядерности клеток.

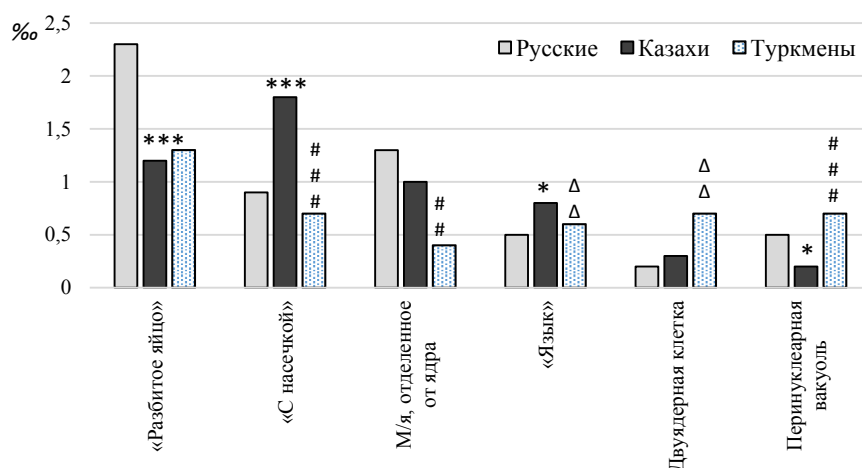


Рис. 2. Нарушения ядра в клетках буккального эпителия юношей различных национальностей

Примечание: * - отличия между показателями русской и казахской национальностей; * - $p < 0,05$; ** - $p \leq 0,01$, *** - $p \leq 0,001$; # - различия между показателями казахской и туркменской национальностей, # - $p < 0,05$; # # - $p \leq 0,01$, # # # - $p \leq 0,001$; Δ - различия между показателями русской и туркменской национальностей, Δ - $p < 0,05$; ΔΔ - $p \leq 0,01$, ΔΔΔ - $p \leq 0,001$.

Между юношами казахской и туркменской национальностей обнаружены различия по следующим цитогенетическим нарушениям в клетках буккального эпителия: протрузии типа «с насечкой», микроядра, ядра с перинуклеарной вакуолью. Все изменения носили разнонаправленный характер.

При оценке нарушений ядра в клетках буккального эпителия девушек-туркменок отметили повышение уровня протрузий типа «язык» и количества двухъядерных клеток, с параллельным снижением уровня клеток с ядерными aberrациями, выразившимися в протрузиях типа «разбитое яйцо», относительно представительниц русской и казахской национальностей (рис. 3).

При изучении половых различий генетических нарушений в ядрах клеток буккального эпителия у представителей русской национальности обнаружено следующее: 1) у девушек выявлено более низкое содержание клеток с микроядрами и протрузий типа «разбитое яйцо» ($p \leq 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно); 2) количество эпителиоцитов, имевших нарушения ядер в виде протрузий «с насечкой», было ниже у юношей той же национальности ($p \leq 0,001$).

В результате анализа клеток буккального эпителия представителей казахской национальности установлены достоверные половые различия между такими показателями клеточных aberrаций, как наличие протрузий типа «язык» ($p \leq 0,001$) и перинуклеарных вакуолей ($p \leq 0,001$), что проявлялось разнонаправленно.

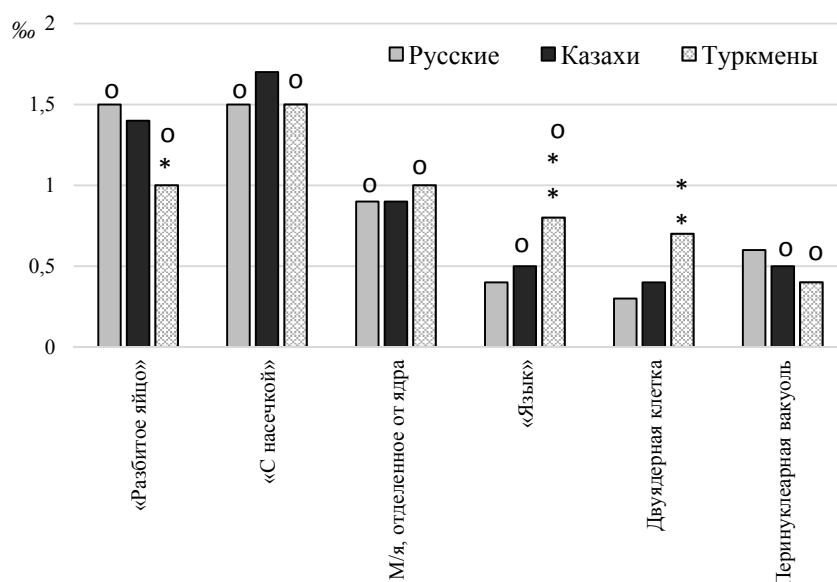


Рис. 3. Нарушения ядра в клетках буккального эпителия девушек различных национальностей, %

Примечание: * - отличия между показателями русской и казахской национальностей; * - $p < 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; o – различия между юношами и девушками, o - $p < 0,05$.

Выборка представителей туркменской национальности отличалась увеличением средних показателей клеток с микроядрами и суммой ядерных нарушений, отмеченных в клетках буккального эпителия с использованием микроядерного теста. Выявлено наибольшее количество различающихся показателей ядерных нарушений, которые имели разнонаправленный характер. При объединении всех типов нарушений ядра нами были получены следующие данные (табл.), согласно которым выявлены достоверные различия нарушений у девушек казахской и туркменской национальностей в сравнении с русской.

Национальные особенности нарушений ядра клеток буккального эпителия, %

Пол	Русская национальность	Казахская национальность	Туркменская национальность
Юноши, n=15	5,5±0,06	5,4±0,08	5,5±0,07
Девушки, n=15	5,1±0,09 # #	5,4±0,07 *	5,6±0,07 **

Примечание: * - отличия по сравнению с показателями русской национальности; * - $p < 0,05$; ** - $p \leq 0,01$, *** - $p \leq 0,001$; # - половые различия; # - $p < 0,05$; # # - $p \leq 0,01$, # # # - $p \leq 0,001$.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии национальных особенностей частоты встречаемости нарушений ядра клеток буккального эпителия. Наиболее выраженные различия были у девушек, у юношей они имели более усредненный характер. Вместе с тем при более детальном анализе обнаружены расхождения в динамике изменений, которые в большинстве случаев носили разнонаправленный характер. Было отмечено, что

частота встречаемости двуядерных клеток была выше и у девушек, и у юношей туркменской национальности. Двуядерные клетки являются показателем пролиферации и образуются в результате нарушения цитокинеза. Повышение частоты двуядерных клеток выявлено при токсическом действии многих химических соединений, воспалении, предопухолевых и онкогенных процессах [1]. Повышение частоты двуядерных эпителиоцитов у обследуемых можно рассматривать как проявление адаптации. Частота встречаемости клеток с другими показателями деструкции ядра, отражающими их естественную гибель (апоптоз), незначительно, но статистически значимо увеличилась. Известно, что повреждение ДНК запускает процесс апоптоза для удаления генетически поврежденных клеток.

Исследователи в своих работах отмечают повышенное число клеток с микроядрами у представителей мужского пола, что соответствует представителям русской и казахской национальностей [1]. Практически все литературные источники свидетельствуют о том, что выборку лучше формировать из людей одного пола, и различия между полами определяются гормональным статусом. Кроме того, наиболее высокий уровень частоты встречаемости ядерных aberrаций клеток буккального эпителия у представителей туркменской национальности может быть связан с высоким уровнем реактивной тревожности [7; 11]. В работах В.Н. Калаева и соавт. [1] было выявлено, что адаптация к климатогеографическим условиям происходит медленнее, чем к социальным. Студенты-туркмены, принимавшие участие в исследованиях, являются коренным населением Республики Туркменистан и учатся в основном на первом курсе биологического факультета ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет». Возможно, что к моменту проведения нами исследований их адаптация к условиям новой страны и обучения в вузе не была завершена. Представители русской и казахской национальностей являлись коренным населением Астраханской области и имели менее выраженные различия по отношению друг к другу.

Заключение. Исследуемые выборки различались по частоте встречаемости клеток с микроядрами и другими нарушениями ядра. Были выявлены половые и национальные различия. Выборка представителей туркменской национальности отличалась увеличением средних показателей клеток с микроядрами и суммой ядерных нарушений, отмеченных в клетках буккального эпителия с использованием микроядерного теста. Однозначно необходимы дальнейшие исследования в данной области, в том числе у тех же студентов, на старших курсах в условиях лучшей социальной адаптации.

Список литературы

1. Калаев В.Н., Нечаева М.С., Калаева Е.А. Микроядерный тест буккального эпителия

ротовой полости человека: монография. Воронеж: изд. дом ВГУ, 2016. 136 с.

2. Мейер А.В., Дружинин В.Г., Ларионов А.В., Толочко Т.А. Генотоксические и цитотоксические эффекты в буккальных эпителиоцитах детей, проживающих в экологически различающихся районах Кузбасса // Цитология. 2010. Т.52, №4. С. 305-310.
3. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека // Генетические исследования в гигиене. 2012. №6. С. 68-72.
4. Седов Е.В. Возрастные особенности экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии: дисс. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2013. 22 с.
5. Юрченко, Ю.Ю. Анализ частоты микроядер и ядерных аномалий в эпителиальных клетках слизистой щеки у женщин, контактирующих с диоксинами // Токсикологический вестник. 2000. № 3. С. 2-6.
6. Сальников В.Н., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Бабошкина Л.С., Федонина А.А., Сальников Н.В. Изучение цитогенетической активности хлоргексидина на буккальный эпителий с помощью микроядерного теста // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2017. Т. 6, № 1. С. 371-373.
7. Соболев М. В., Афанасьева Е. С., Безруков В. Ф. Частота микроядер и уровень тревожности у школьников // Вестник Украинского товарищества генетиков и селекционеров. 2008. Т. 6, № 1. С. 131-136.
8. Usha Verma Sex, Chowdhary D.S., Sugna Chhabra Chromatin positive cells in the buccal smears of normal newborn females. International journal of biological & medical research. 2013. Vol. 4 (3). P. 3317-3319.
9. Fenech M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. Mutagenesis. 2011. Vol. 26. P. 63-67.
10. Нечаева М.С., Тюнина О.И., Дорохов Е.В., Аралова А.Ю., Потапова Ю.О. Влияние спелеоклиматотерапии на психоэмоциональное состояние, генетическую стабильность и активность а-амилазы ротовой полости студентов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2020. № 2 (74). С. 139-144.
11. Прядко А. О., Морозова Е. Н., Заболотная С. В., Михайлик Т. А., Морозов В. Н. Микроскопические особенности буккального эпителия студентов-индусов в НИУ «БелГУ» // Сетевой журнал «Научный результат». Серия «Медицина и фармация». 2015. Т.1. №4 (6). С. 18-24.