

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ И МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ ДЕТЕЙ

© А. В. Алещенко,¹ И. Б. Алчинова,² О. С. Дмитриева,² Г. П. Дмитриева,³ М. Ю. Карганов,²
М. И. Кожевникова,² Л. А. Носкин,⁴ А. М. Серебряный,¹ Н. Н. Хлебникова,² И. И. Пелевина^{5,*}

¹ Институт биохимической физики РАН, ² Научно-исследовательский институт общей патологии
и патофизиологии РАМН, ³ Школа-интернат № 76 для детей с нарушениями опорно-двигательного аппарата,

⁴ Московский институт открытого образования и ⁵ Институт химической физики РАН, Москва;

* электронный адрес: pele@chph.ras.ru

Изучены цитогенетические нарушения в клетках слизистой оболочки полости рта у детей в одной из школ г. Москвы, в сельской школе Новгородской обл. и в Московском интернате для детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Наименьшая средняя частота встречаемости клеток с кариорексисом наблюдается у детей из экологически чистого района — школы Новгородской обл., а наибольшая — у детей из московской школы (выше почти в 13 раз). Частота встречаемости клеток кариорексисом у детей из интерната имеет промежуточное значение. Минимальная средняя частота встречаемости клеток с кариолизисом наблюдается у московских школьников, достоверно выше она у новгородских школьников и максимальна у детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Не различаются изученные массивы по средним частотам встречаемости двуядерных клеток, клеток с пикнозом, микроядрами и с повреждениями типа «битое яйцо». Параллельно тех же детей обследовали методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). Характер распределения ЛК-спектров у детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата и московских школьников достоверно отличается от распределения, характерного для здоровых детей, проживающих в экологически чистом районе. У детей в сельской школе преобладают нормальные спектры, велика доля спектров анаболического типа при низкой доле спектров катаболического типа. У детей из московской школы нормальные спектры встречаются практически так же часто, но существенно и достоверно снижается доля спектров анаболического типа и возрастает доля спектров катаболического типа. У больных детей чаще встречаются спектры катаболического типа. Авторы полагают, что использованные методы мониторинга качественно коррелируют: они показывают, что при проживании в неблагоприятных условиях и при заболеваниях опорно-двигательного аппарата увеличивается частота встречаемости клеток с кариорексисом и кариолизисом, а также частота встречаемости спектров катаболического типа при снижении доли спектров нормального и анаболического типов.

Ключевые слова: буккальный эпителий, кифоз, лазерная корреляционная спектроскопия, ро-то-глоточные смывы, сколиоз, цитогенетические методы, экология.

В последние годы в связи с ухудшающейся экологической обстановкой весьма актуальной является проблема оценки уровня здоровья населения и выявления потенциальных групп риска. При этом особое внимание уделяется разработке неинвазивных методов обследования, наиболее перспективных для мониторинга состояния здоровья в детских коллективах.

Клетки слизистой оболочки ротовой полости являются удобным объектом для оценки функционального состояния организма (Titenko-Holland et al., 1998), влияния факторов окружающей среды — пестицидов, выхлопных газов автомобилей (Karahalil et al., 1999; Lucero et al., 2000; Pastor et al., 2001), химиотерапии (Torres-Bugarin et al., 2003), курения, алкоголя (Ramirez, Saldanha, 2002; Копораска, 2003) и генотоксических агентов (Юрченко и др., 2000).

Критерием оценки влияния разных агентов обычно служат наличие и частота встречаемости цитогенетических нарушений — клеток с микроядрами (МЯ), пикнозом, кариорексисом, кариолизисом и другими аномалиями ядра (АЯ) (Tolbert et al., 1991).

Целью настоящей работы было сопоставление результатов оценки состояния здоровья школьников с помощью цитогенетического метода и метода лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС).

Метод ЛКС позволяет определять дисперсный состав исследуемой жидкости по относительному вкладу содержащихся в ней частиц в рассеяние света. Распределение частиц по размерам, в результате математической обработки представленное в виде гистограммы, позволяет охарактеризовать дисперсный состав конкретной биологической жидкости и классифицировать распределе-

ния в соответствии с выделенными информативными зонами спектра. Для рото-глоточных смывов принято выделять следующие информативные зоны — низкомолекулярную (0—50 нм), среднемолекулярную (51—400 нм), высокомолекулярную (401—2000 нм) и сверхвысокомолекулярную (выше 2000 нм). Предполагается, что нарастание площадей низко- и среднемолекулярных мод ЛК-спектров свидетельствует о преобладании процессов биосубстратной деградации, а высоко- и сверхвысокомолекулярных мод — о преобладании процессов биосубстратной полимеризации. На этих принципах создан классификатор, позволяющий по характеру распределения частиц выделить три типа спектров: «норма», спектры с преобладанием катаболических процессов (характеризуются увеличением вклада в светорассеяние низко- и среднемолекулярных субфракций) и спектры с преобладанием анаболических процессов (характеризуются увеличением вклада в светорассеяние высоко- и сверхвысокомолекулярных субфракций) (рис. 1).

Задачей исследования являлось выявление ряда цитогенетических нарушений в эпителиальных клетках полости рта и определение направленности метаболических процессов у детей, проживающих в различных экологических условиях, а также у детей, страдающих заболеваниями позвоночника (сколиоз и кифоз).

Материал и методика

Обследованы школьники в возрасте 9—12 лет в трех детских учреждениях: в общеобразовательной школе № 735 г. Москвы (25 человек), Школе-интернате № 76 для детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата (дети со сколиозом и кифозом) г. Москвы (73 человека) и в школе с. Нагово Новгородской обл. (23 человека).

Цитологическое обследование. Перед взятием образцов буккального эпителия дети тщательно ополаскивали рот стерильным физиологическим раствором. Затем со слизистой оболочки щеки ребенка стерильным шпателем соскабливали эпителиальные клетки, которые аккуратно наносили на предметное стекло. Собранные образцы, высушив, фиксировали метанолом в течение 1 сут. Далее проводили предварительный гидролиз 3 н. соляной кислотой (37 °С, 30 мин) и окрашивали образцы по Фельгену (37 °С, 30 мин; Кисели, 1962). На каждом стекле подсчитывали не менее 1000 клеток. В образцах буккального эпителия определяли частоту встречаемости клеток с АЯ, такими как микроядра, двуядерные клетки, кариорексис, кариолизис и «битое яйцо». Данная классификация АЯ клетки используется большинством

автором, но не всегда учитываются и приводятся данные по всем перечисленным нарушениям в одном образце.

Лазерная корреляционная спектроскопия. Используемая методика адаптирована для определения субклеточного состава биологических жидкостей (крови, мочи и т. п.). Материалом для настоящей работы служили рото-глоточные смывы (РГС). Субфракционный состав образцов регистрировали с помощью лазерного корреляционного спектрометра ЛКС-03-«ИНТОКС» (Санкт-Петербург). Технические характеристики прибора позволяют определять светорассеивающие частицы размером от 1 до 10 000 нм (Лебедев и др., 1987). В этот диапазон попадают практически все биомолекулы и комплексы. Показано, что полученные данные являются объективной и чувствительной характеристикой состояния гомеостаза на молекулярном и надмолекулярном уровнях (Бажора и др., 1996).

Отбора проб и измерение проводили по описанной ранее методике (Комаров и др., 2001). При обработке результатов учитывали только тех детей, которые были обследованы двумя методами: интернат № 76 — 62 человека; сельская школа — 25 человек; школа № 735 (г. Москва) — 23 человека. Анализ проводили с использованием статистического пакета Statistica 6.0 (однофакторный дисперсионный анализ, ряд непараметрических критериев).

Результаты и обсуждение

Результаты цитологического обследования детей. С помощью анализа цитологических препаратов было обнаружено, что в каждой из исследованных групп наблюдается своя собственная картина распределения нарушений генетического аппарата клеток буккального эпителия. Из данных таблицы видно, что наименьшая средняя частота встречаемости клеток с кариорексисом наблюдается у детей из школы в экологическом чистом районе (сельская школа), наибольшая — у детей из московской школы, причем у московских школьников она выше почти в 13 раз. Частота клеток с кариорексисом у детей из интерната имеет промежуточное значение.

Различаются эти три массива и по средней частоте встречаемости клеток с кариолизисом: минимальное значение наблюдается в группе московских школьников, достоверно более высокое — у новгородских школьников и максимальное — у детей с нарушением осанки.

Не различаются (см. таблицу) изученные массивы по частоте встречаемости двуядерных клеток (4.7—6.4

Частота основных ядерных изменений в клетках буккального эпителия в детских учреждениях различного профиля

Учреждение	Количество обследованных детей	Частота изменения (среднее число клеток на 1000 проанализированных по массиву)					
		двуядерные клетки	пикноз	кариорексис	кариолизис	микроядра	«битое яйцо»
Интернат (г. Москва)	73	6.0 ± 0.4	14.3 ± 2.3	121.6 ± 8.8 ^{а,б}	31.4 ± 5.1 ^а	0.19 ± 0.05	0.6 ± 0.1
Школа (г. Москва)	25	5.3 ± 0.4	7.6 ± 1.2	170.6 ± 23.5 ^а	3.0 ± 0.4	0.13 ± 0.07	0.6 ± 0.2
Школа (г. Новгород)	23	4.7 ± 0.4	12.2 ± 2.9	13.9 ± 8.5	7.8 ± 1.9 ^в	0	0.3 ± 0.2

^а $P < 0.001$ по сравнению со школой в Новгородской обл. ^б $P < 0.05$ по сравнению со школой в г. Москве. ^в $P < 0.01$ по сравнению со школой в г. Москве.

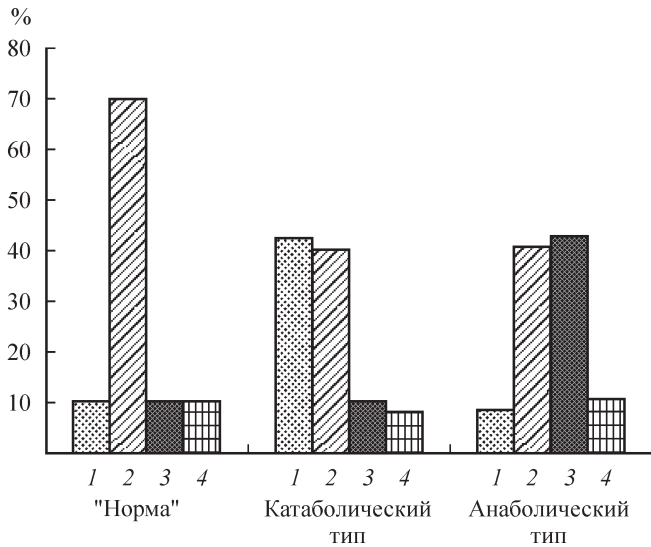


Рис. 1. Гистограммы распределения частиц в рото-глоточных смывах по размерам при различных типах метаболических процессов.

Размеры частиц, составляющих информативные зоны спектра: 1 — менее 50 нм, 2 — 51—400 нм, 3 — 401—2000 нм, 4 — более 2000 нм. По вертикали — вклад в светорассеяние частиц соответствующей зоны, %.

1000 проанализированных клеток) и по частоте встречаемости клеток с пикнозом. Во всех группах школьников средняя частота встречаемости клеток с МЯ очень низкая — от 0.19 на 1000 проанализированных клеток до полного отсутствия. Средняя частота клеток с повреждениями «битое яйцо» также невелика — от 0.3 до 0.6 на 1000 проанализированных клеток. Это совпадает с данными литературы (Tolbert et al., 1991; Ramirez et al., 2002; Tolbert et al., 1991; Ramirez et al., 2002; Torrs et al., 2003), в которых представлены результаты изучения клеток буккального эпителия в разных частях населения.

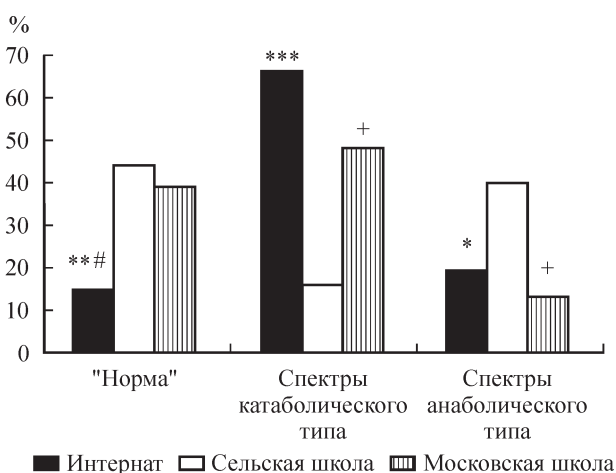


Рис. 2. Частота встречаемости спектров, характеризующих метаболические процессы различной направленности.

По вертикали — доля детей с определенной направленностью метаболизма, % от общего количества детей в группе. *, **, *** — $P < 0.05$, 0.005 и 0.0001 соответственно (по сравнению с детьми из сельской школы); # — $P < 0.02$ по сравнению с детьми из московской школы; + — $P < 0.02$ по сравнению с детьми из сельской школы (точный двухсторонний критерий Фишера).

Результаты обследования методом ЛКС. Анализ спектров с учетом преобладающего типа метаболических процессов (рис. 1) показал, что в группе детей из сельской школы преобладают «нормальные» спектры (44.0 %), велика доля спектров анаболического типа (40.0 %) при низком представительстве спектров катаболического типа (16.0 %) (рис. 2). У детей из московской школы по сравнению с детьми из сельской снижена доля спектров анаболического типа ($P < 0.05$). За счет этого возрастает доля спектров катаболического типа ($P < 0.05$). В группе детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата спектры катаболического типа встречаются еще чаще, достигая 66.1 %, доля нормальных спектров достоверно снижена по сравнению с сельскими школьниками ($P < 0.001$). Все три обследованные группы детей различаются по распределению преобладающего направления метаболизма ($P < 0.001$). Наиболее яркие различия выявлены по доле катаболических сдвигов.

Сопоставление результатов, полученных цитогенетическими методами и методом ЛКС. Обследования одних и тех же групп детей, проведенные независимо, выявили наличие корреляций между этими методами.

Корреляционный анализ всего массива обследованных детей ($N = 110$) показывает наличие зависимости между направленностью метаболических процессов и частотой встречаемости некоторых АЯ. У детей с катаболическими типами ЛК-спектров обнаруживается большее число клеток с кариорексисом ($r = 0.33$, $P < 0.0001$ по Спирмену) и кариолизисом ($r = 0.2$, $P < 0.05$). По-видимому, выход из клеток разрушенного ядерного материала, его лизис приводят к увеличению вклада в светорассеяние низкомолекулярной субфракции, которое характерно для катаболических процессов. Описанные выше результаты согласуются с полученными ранее данными о преобладании катаболических процессов у детей с заболеваниями позвоночника (Dmitrieva et al., 2002; Karganov et al., 2004).

Таким образом, в работе впервые были сопоставлены результаты двух принципиально различающихся методов (цитогенетический анализ клеток буккального эпителия и лазерная корреляционная спектрометрия рото-глоточных смывов), каждый из которых позволяет определить функциональное состояние организма и его реакцию на действие факторов среды. Оба метода показывают, что повышенная частота встречаемости клеток с кариорексисом и кариолизисом и увеличение доли спектров катаболического типа выявляются при проживании в неблагоприятных условиях и при заболеваниях опорно-двигательного аппарата.

Можно предположить, что сочетанное применение этих методов позволит в дальнейшем более плодотворно использовать их для исследования влияния различных факторов на здоровье человека.

Авторы сердечно благодарят В. В. Юрченко за помощь в освоении методики цитогенетического изучения буккального эпителия.

Список литературы

Бажора Ю. И., Носкин Л. А. 2002. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине. Одесса: Друк. 400 с.

Кисели Д. 1962. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт: Изд-во Академии наук. 194—197.

Комаров Г. Д., Кучма В. Р., Носкин Л. А. 2001. Полисистемный саногенетический мониторинг. М.: МИПКРО. 343 с.

Лебедев А. Д., Левчук Ю. Н., Ломакин А. В., Носкин В. А. 1987. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наук. думка. 266 с.

Юрченко В. В., Сычева В. П., Ревазова Ю. А., Ревич Б. А., Журков В. С. 2000. Анализ частоты микроядер и ядерных аномалий в эпителиальных клетках слизистой щęki у женщин, контактирующих с диоксинами. Токсикологич. вестн. 3 : 2—6.

Dmitrieva G. P., Karganov M. Yu., Khlebnikova N. N. et al. 2002. New approach to objective diagnostics of polyfunctional disorders of the neuromuscular regulation in children with various forms of spine deformities. Stud. Health Technol. Inform. 91 : 126—129.

Karahalil B., Karakaya A. E., Burgaz S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutat. Res. 442 : 29—35.

Karganov M. Yu., Kozhevnikova M. I., Khlebnikova N. N., Dmitrieva O. S., Dmitrieva G. P., Noskin L. A. 2004. Evaluation of metabolic shifts in schoolchildren during scoliosis development. In: Int. Res. Soc. of Spinal Deformaties. Symposium 2004. Vancouver. 242—245.

Lucero L., Pastor S., Suarez S., Durban R., Gomes C., Parron T., Creus A., Marcos R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. Mutat. Res. 464 : 255—262.

Pastor S., Gutierrez S., Creus A., Cebulka-Wasilewska A., Marcos R. 2001. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. Mutat. Res. 417 : 101—114.

Ramirez A., Saldanha P. H. 2002. Gen. Mol. Res. 1 : 246—260.

Titenko-Holland N., Jacob R. A., Shang N., Balaraman A., Smith T. 1998. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutat. Res. 417 : 101—114.

Tolbert P. E., Shy C. V., Allen J. W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutat. Res. 271 : 69—77.

Torres-Bugarin O., Ventura-Aguilar A., Zamora-Peres A., Gomes-Meda B. C., Ramos-Ibarra M. L., Morgan-Villela G., Gutierrez-Franco A., Zuniga-Gonzales G. 2003. Evaluation of cisplatin + 5FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in buccal mucosa. Mutat. Res. 539 : 177—186.

Поступила 23 VII 2005

USE OF A CYTOGENETIC METHOD FOR BUCCAL EPITHELIUM STUDY,
AND A METHOD OF LASER CORRELATION SPECTROMETRY
FOR HEALTH DISTURBANCES MONITORING IN CHILDREN

A. V. Aleshchenko,¹ I. B. Alchinova,² O. S. Dmitrieva,² G. P. Dmitrieva,³ M. Yu. Karganov,² M. I. Kozhevnikova,²
L. A. Noskin,⁴ A. M. Serebryany,¹ N. N. Khlebnikova,² I. I. Pelevina⁵, *

¹ Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, ² Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS,

³ Boarding School for Children with Musculoskeletal Disease N 76, ⁴ Moscow Institute of Open Education,
and ⁵ Institute of Chemical Physics RAS, Moscow;

* e-mail: pele@chph.ras.ru

Buccal epithelium cytogenetic disturbances were studied in schoolchildren from Moscow schools, a country school (Novgorod region) and a Moscow boarding school for children with musculoskeletal diseases (scoliosis and kyphosis). The minimal mean frequency of cells with karyorrhexis were revealed in children from an ecologically pure Novgorod region. Moscow schoolchildren demonstrated more than 13-fold higher level of this parameter. Children with spinal deformities had an intermediate frequency. Cells with karyolysis minimal mean frequency were observed in Moscow pupils. Children from Novgorod demonstrated a statistically valid higher level of this parameter, and the maximum was reached in Moscow boarding school. No difference between these groups was revealed in a study of the mean frequency of binucleated cells, cells with pyknosis, cells with micronuclei, or «broken eggs» incidence. Laser correlation spectrometry (LCS) method was used for parallel studies. It was shown that the distribution of spectra in Moscow pupils and in children with spinal deformities differs from that in children living in ecologically pure region. Normal spectra prevailed in pupils of country school, who demonstrated, in addition, high levels of anabolic and low levels of catabolic type metabolism. The examined Moscow schoolchildren demonstrated almost the same incidence of normal spectra. They differed from the country children by statistically valid reduction of anabolic type spectra, and by increased levels of catabolic type spectra. Young patients with spinal deformities demonstrated the maximum incidence of catabolic type spectra. The authors suggest the availability of a qualitative correlation between both the monitoring methods used in this study. It was shown that children living in unfavorable conditions and patients with musculoskeletal diseases manifested an enhanced incidence of buccal epithelium cells with karyorrhexis and karyolysis, as well as higher levels of catabolic type spectra accompanied by reduction of normal and anabolic type spectra.