

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.576.08-57.022.574.2/574.24

© А.Т. Волкова, О.С. Целоусова, С.Р. Загидуллина, И.А. Потапова, Т.В. Викторова, 2014

А.Т. Волкова, О.С. Целоусова, С.Р. Загидуллина, И.А. Потапова, Т.В. Викторова
**ОЦЕНКА КАРИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА В ПРОЦЕССЕ
 АДАПТАЦИИ СЕЛЬСКИХ ЖИТЕЛЕЙ К ГОРОДСКОЙ СРЕДЕ**
*ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»
 Минздрава России, г. Уфа*

Проведен анализ кариологических показателей апоптоза в клетках буккального эпителия у сельских жителей в процессе адаптации к городской среде. Выявлено повышение показателей ранней деструкции ядра, свидетельствующие об интенсификации процессов апоптоза.

Ключевые слова: буккальный эпителий, кариологические показатели, апоптоз, микроядра.

A.T. Volkova, O.S. Tselousova, S.R. Zagidullina, I.A. Potapova, T.V. Victorova
**APOPTOSIS INDICATORS ANALYSIS
 IN ADAPTATION TO THE URBAN ENVIRONMENT**

The analysis of apoptosis karyological indicators in buccal epithelium cells of the rural population in the process of adapting to the urban environment has been made. The study revealed karyological indicators of nucleus destruction, proving an intensification of apoptosis.

Key words: buccal epithelium, karyological indicators, apoptosis, micronuclei.

Городская среда представляет собой взаимосвязь самых сложных и многообразных комплексов антропогенного воздействия. Сложную экологическую обстановку в крупных городах создает наличие большого количества загрязнителей атмосферного воздуха, таких как предприятия химической и нефтехимической промышленности, топливно-энергетического комплекса и автотранспорта, являющихся негативными источниками постоянного техногенного воздействия на здоровье населения. Вследствие повышенных концентраций в воздухе таких веществ, как формальдегид, бенз(а)пирен и диоксид азота, г. Уфа относится к числу городов с высоким уровнем загрязнения атмосферы (индекс загрязнения – 7,5). Доля автотранспорта в суммарном объеме выбросов загрязняющих веществ в атмосферу составляет 65% [2]. В связи с этим г. Уфа может рассматриваться как модель для исследования сложных взаимосвязей организма человека и негативных факторов окружающей среды. Возрастающая антропогенная нагрузка на организм сочетанного воздействия эндогенных и экзогенных факторов, в частности техногенных загрязнителей, является одной из причин роста частоты мультифакториальных заболеваний. Наиболее важными показателями, определяющими степень влияния негативных факторов окружающей среды на изменение структурно-функциональных характеристик клеток, являются уровень и виды хромосомных aberrаций [10,11,12]. При воздействии повреждающих факторов на генетический аппарат клет-

ки может инициироваться процесс апоптоза – генетически запрограммированной клеточной гибели. Апоптоз наряду с пролиферацией обеспечивает физиологическую регенерацию ткани, саморазрушение клеток, прошедших жизненный цикл или функционально неполноценных, а также постоянство количества клеточных элементов в органах и тканях организма [6]. При воздействии различных повреждающих факторов процесс апоптоза может усиливаться или снижаться [3,11]. Интенсификация процесса апоптоза может способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [18]. Ослабление способности к апоптозу лежит в механизме развития злокачественных опухолей различных органов и тканей [7,13,14,16,17,19]. Нарушение процесса контроля апоптоза ведет к сдвигам гомеостаза и является одним из множества факторов, способствующих развитию иммунопатологического состояния [4]. Микроядерный тест с использованием эксфолиативных клеток успешно используется различными группами исследователей для скрининга населения и выявления групп риска злокачественных опухолей полости рта, мочевого пузыря, шейки матки и пищевода [12,16,14,19]. Микроядра представляют собой интрацитоплазматические включения, образованные из фрагментов хроматина или целых хромосом. Наличие микроядер в клетках является отражением хромосомных aberrаций во время клеточного митоза, когда клетки наиболее подвержены повреждениям генетического

аппарата [11,12]. Известно, что их частота увеличивается в тканях, подвергшихся воздействию канцерогенов или облучению, задолго до проявления клинических симптомов [16,14,19]. Таким образом, анализ кариологических показателей деструкции ядра в эксфолиативных клетках буккального эпителия способствует уточнению роли этиологических факторов в индукции патологических процессов мультифакториальных заболеваний, что имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

Материал и методы

С целью сравнительного анализа показателей апоптоза в клетках буккального эпителия сельских жителей в процессе адаптации к проживанию в городской среде нами проанализировано 26972 клетки, полученные от 13 девушек (средний возраст $18,3 \pm 0,14$ года) и 24412 клеток от 12 юношей (средний возраст $18,3 \pm 0,31$ года). Оценка влияния факторов городской среды была проведена в двух сериях эксперимента. Первый этап включал анализ кариологических показателей в образцах буккального эпителия сельских жителей, взятых сразу по прибытии в город. Второй этап – анализ кариологических показателей в образцах буккального эпителия этих же индивидов через три месяца проживания в городской среде. От каждого индивида было проанализировано не менее 1000 нормальных клеток в каждой серии эксперимента. Анализ кариологических показателей проводили на отдельно лежащих клетках с непрерывным гладким краем ядра в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка цитологического и

цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека» [1,8]. Препараты после фиксации этанолом и уксусной кислотой окрашивали растворами ацеорсеина (orcein Merck) и светлого зеленого (light green, ICN Biomedicals Inc.) в стандартных условиях.

На шифрованных препаратах различали ранние и поздние стадии апоптоза в соответствии с классификацией Л.П.Сычевой [8]. Ранним показателем деструкции ядра считали конденсацию хроматина, характерную для ранних стадий апоптоза. К поздним показателям деструкции ядра относили клетки с кариопикнозом, кариорексисом, кариолизисом, характерные для поздних стадий апоптоза. Кроме того, рассчитывали интегральный показатель апоптотического индекса (сумма клеток на поздней стадии деструкции ядра, выраженная в промилле). При этом нами использовались критерии для подсчета клеток, находящихся в процессе апоптоза, разработанные группой исследователей международного проекта HUMN (Human micronuclei) [9, 15]. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы STATISTICA V.7 с использованием критерия хи-квадрат (χ^2). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

При анализе ранних апоптотических показателей деструкции ядра нами выявлено достоверное возрастание показателя конденсации хроматина у всех обследованных сельских жителей после трех месяцев проживания в городской среде (табл. 1).

Таблица 1

Кариологические показатели апоптоза в буккальных эпителиоцитах на 1000 клеток $M \pm m$ (min-max) сельских жителей

Показатели	Девушки			Юноши		
	сельские жители (n=13)	сельские жители через 3 месяца проживания в городе (n=12)	χ^2 ; p (df=1)	сельские жители (n=12)	сельские жители через 3 месяца проживания в городе (n=11)	χ^2 ; p (df=1)
1. Ранний показатель апоптоза						
Конденсация хроматина	65,85±22,234 (14-300)	115,00±17,371 (36-242)	199,27*** 0,000	111,92±26,888 (3-347)	225,00±30,164 (69-398)	533,95*** 0,000
2. Стадии апоптоза						
Кариорексис	3,15±1,295 (0-13)	4,58±2,856 (0-35)	3,75; 0,053	2,25±0,880 (0-10)	4,27±1,415 (0-13)	7,47** 0,006
Кариопикноз	12,77±1,878 (0-21)	7,17±1,989 (1-22)	18,09*** 0,000	7,83±2,128 (0-24)	2,73±0,488 (1-6)	27,57*** 0,000
Кариолизис	21,69±6,028 (2-78)	9,00±1,425 (1-18)	61,90*** 0,000	10,17±2,458 (0-24)	13,455±2,225 (2-26)	5,59* 0,018
3. Интегральный показатель апоптоза						
Апоптотический индекс	37,62±6,554 (3-95)	20,75±3,371 (10-41)	64,07*** 0,000	20,25±4,040 (1-38)	20,45±2,229 (7-33)	0,17 0,679
4. Дополнительные (фагоцитированные) ядерные структуры в клетке						
Апоптотические тельца	0,69±0,208 (0-2)	1,58±0,514 (0-5)	4,69* 0,030	0,67±0,355 (0-4)	0,91±0,315 (0-3)	0,45 0,503
Общее число проанализированных клеток	14176	12796		12775	11637	

* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Как в группе женщин, так и в группе мужчин величина показателя конденсации хроматина увеличилась практически в 2 раза ($\chi^2=199.27$, $df=1$, $p=0.0001$ для женщин и $\chi^2=533.95$, $df=1$, $p=0.0001$ для мужчин). Известно, что дисбаланс в экспрессии генов индукторов или ингибиторов апоптоза, нарушение гомеостаза кальция вследствие повышенного инфлюкса являются факторами, инициирующими апоптоз [5]. Морфологически апоптоз начинается с конденсации хроматина до разрушения ядра клетки и образования апоптозных телец с сохранением на ранних стадиях апоптоза плазматической мембраны эпителиоцитов [8]. Для стадии конденсации хроматина характерно появление по периферии ядра глыбок и тяжей различных форм и размеров, разделенных небольшими бесцветными полостями кариоплазмы [5,8]. Конденсации хроматина способствует повышенная активность эндонуклеаз рестрикции, расщепляющих ДНК на отдельные нуклеосомы [8]. Интенсивный процесс конденсации хроматина приводит к уплотнению и сморщиванию массы ядерного вещества, что является морфологическим показателем кариопикноза. При кариопикнозе ядро уплотняется, становится гиперхроматозным и уменьшается в размере в 2 и более раза.

При анализе показателя кариопикноза в эксфолиативных клетках буккального эпителия наблюдалось достоверное снижение величины данного показателя у всех обследованных. Стоит отметить, что в группе мужчин процесс кариопикноза происходил интенсивнее по сравнению с группой женщин. Так, по прошествии 3-х месяцев проживания в городской среде частота показателя кариопикноза у мужчин уменьшилась в 2,9 раза ($\chi^2=27.57$, $df=1$, $p=0.0001$), а у женщин – в 1,8 раза ($\chi^2=18.09$, $df=1$, $p=0.0001$).

Значительная активность эндонуклеаз после конденсации хроматина и кариопикноза обуславливает переход клетки в следующую стадию апоптоза – кариорексис, характеризующуюся увеличением расстояния между глыбками и тяжами хроматина с сохранением мембраны ядра [7,8,11,15]. При анализе поздних стадий апоптоза в эксфолиативных клетках буккального эпителия у всех обследованных было отмечено увеличение показателя кариорексиса после 3-х месяцев адаптации к городской среде. Однако в группе женщин повышение данного показателя апоптоза имело лишь тенденцию и не достигло статистически значимых величин, в то время как в группе мужчин количество клеток, находящихся в

стадии кариорексиса, увеличилось в 2 раза ($\chi^2=7.47$, $df=1$, $p=0.006$).

Окончательной стадией апоптоза является процесс кариолизиса, приводящий к окончательной деструкции ядра и аутолизу. Морфологически при кариолизисе в клетке отмечается бледно окрашенный гомогенный хроматин, клеточные ядра напоминают тени нормальных ядер [15].

По характеру изменения показателя кариолизиса у обследованных сельских жителей после 3-х месяцев проживания в городской среде выявлены значительные гендерные различия. Так, в группе женщин наблюдалось снижение величины кариолизиса в 2,4 раза ($\chi^2=61.90$, $df=1$, $p=0.0001$), в то время как в группе мужчин данный показатель увеличился в 1,3 раза ($\chi^2=5.59$, $df=1$, $p=0.018$). Кроме того, при оценке интегрального показателя апоптоза при адаптации к городской среде отмечено статистически достоверное понижение данного показателя у женщин в 1,8 раза ($\chi^2=64.07$, $df=1$, $p=0.0001$), тогда как у мужчин частота данного показателя практически не изменилась. Стоит отметить, что у женщин через три месяца проживания в городской среде значимо увеличилось количество апоптозных телец в клетках буккального эпителия на фоне снижения апоптического индекса и возрастания показателя ранней деструкции ядра. Высокая частота встречаемости клеток с апоптозными тельцами, повышение показателя раннего апоптоза и уменьшение уровня поздней деструкции ядра у женщин через три месяца проживания в городской среде, возможно, обусловлены стимулирующим влиянием эстрогенов на пролиферацию эпителиальных клеток и ускорением процессов апоптоза.

Клетки буккального эпителия, находясь на границе между внешней и внутренней средами, непосредственно подвергаются воздействию ксенобиотиков, содержащихся в загрязненном атмосферном воздухе, через ротовую полость или ингаляционно [12, 17, 18]. В связи с этим результаты микроядерного теста в клетках данного типа могут служить показателем действия на организм поступающих ксенобиотиков, вызывающих численные и структурные aberrации хромосом и приводящих к образованию микроядер. В системе *in vitro* показано, что хлорорганические соединения вызывают ингибирование апоптической гибели клеток, а тяжелый металл ванадий способствует активационно-индуцированной гибели лимфоцитов [4]. На основе этих данных становятся актуальными дальнейшие ис-

следования влияния ксенобиотиков окружающей среды на изменение апоптоза в клетках буккального эпителия.

Таким образом, нами проведен сравнительный анализ кариологических показателей апоптоза в эксфолиативных клетках буккального эпителия сельских жителей в процессе

адаптации к проживанию в городской среде. Выявлено повышение у всех обследованных показателей ранней деструкции ядра, что свидетельствует об интенсификации процессов апоптоза и характеризует неблагоприятное воздействие окружающей среды на организм человека.

Сведения об авторах статьи:

Волкова Альфия Талхеевна – ст. преподаватель кафедры биологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347) 272-57-82. E-mail: volkovaufa@mail.ru.

Целоусова Ольга Сергеевна – к.б.н., доцент кафедры биологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347) 272-57-82.

Загидуллина Светлана Рустамовна – студентка 6 курса педиатрического факультета ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347) 272-57-82.

Потапова Ирина Анатольевна – студентка 5 курса медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347) 272-57-82.

Викторова Татьяна Викторовна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347) 272-57-82.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева, Н.Н. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека / Н.Н. Беляева, [и др.]. – М., 2005. – 37 с.
2. Государственный доклад «О состоянии природных ресурсов и окружающей среды Республики Башкортостан в 2011 году». – Уфа, 2012.
3. Загидуллина, С.Р. Анализ показателей апоптоза в клетках буккального эпителия сельских жителей в процессе адаптации к городской среде / С.Р. Загидуллина, И.А. Потапова, О.С. Целоусова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2013. – №1 (приложение). – С. 52-56.
4. Долгих, О.В. Особенности апоптоза в условиях экспозиции хлорорганических соединений и ванадия / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, Р.А. Харахорина // Гигиена и санитария. – 2012. – №3. – С. 15-17.
5. Ковалева, О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О.А. Ковалева // Цитология и генетика. – 2008. – №1. – С. 58-72.
6. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов. – М.: Медицина, 2001. – 192 с.
7. Рахманин, Ю.А. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / Ю.А. Рахманин, Л.П. Сычева. – М.: Гениус, 2007. – 312 с.
8. Сычева, Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека / Л.П. Сычева // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6, №11 (65). – С. 3-11.
9. Coman, N. Ultrastructural modifications at uterine cervix level induced by human papillomaviruses infections / N. Coman, M.D. Ionescu, D. Miscalencu // Roum. Arch. Microbiol. Immunol. – 1999. – №1 (58). – P. 65-78.
10. Das, R.K. Induction of chromosome aberrations and micronuclei in pulmonary alveolar macrophages of rats following inhalation of mosquito coil smoke / R.K. Das, K. Sahu, B.C. Dash // Mutat. Res. – 1994. – № 4 (320). – P. 285-292.
11. Fenech, M. Necrosis, apoptosis, cytoskeleton and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide / M. Fenech, J. Crott, J. Turner, S. Brown // Mutagenesis. – 1999. – № 14 (6). – P. 605-612.
12. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique / M Fenech // Mutation Research. – 2000. – № 455. – P. 81-95.
13. Gandhi, G. Elevated frequency of Micronuclei in uterine smears of cervix cancer patients / G. Gandhi, B. Kaur // Caryologia. – 2003. – № 56. – P. 217-222.
14. Gayathri, B.N. Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma / B.N. Gayathri, R. Kalyani, A. Hemalatha, B. Vasavi // J Cytol. – 2012. – № 29 (4). – P. 236-240.
15. Holland, N. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps / N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech // Mutation Research / Reviews in Mutation Research. – 2008. – № 659. – P. 93-108.
16. Kalyani, R. Cancer profile in the Department of Pathology of Sri Devaraj Urs Medical College, Kolar: A ten years study / R. Kalyani, S. Das, M.S. Bindra Singh, H. Kumar // Indian J. Cancer. – 2010. – V. 47. – P. 160-165.
17. Lal, A. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status / A. Lal, B. Ames // Mutagenesis. – 2011. – № 26 (1). – P. 57-62.
18. Migliore, L. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases / L. Migliore, F. Coppede, M. Fenech, P. Thomas // Mutagenesis. – 2011. – № 26 (1). – P. 85-92.
19. Palve, D.H. Clinico-pathological correlation of micronuclei in oral squamous cell carcinoma by exfoliative cytology / D.H. Palve, J.V. Tupkari // Oral and Maxillofac Pathol. – 2008. – № 12. – P. 2-7.