

Н. В. Шило, О. А. Полюхович

**МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ, ЗАНЯТЫХ В УСЛОВИЯХ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ФАКТОРА**

Научные руководители: канд. мед. наук, доц. И. П. Семёнов,

*мл. науч. сотр. Е. С. Щербинская **

Кафедра гигиены труда,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

**Республиканский научно-практический центр гигиены, г. Минск*

N. V. Shilo, O. A. Polyukhovich

**MICRONUCLEAR TEST AS A METHOD OF ASSESSING THE RISK OF DE-
VELOPING DISEASES AMONG WORKERS WHO ARE EMPLOYED UN-
DER THE INFLUENCE OF A CHEMICAL PRODUCTION FACTOR**

Tutors: assistant professor I. P. Siamionau,

*junior research scientist E. S. Shcherbinskaya **

Department of Occupational Health,

Belarusian State Medical University, Minsk

Republican scientific and practical center of hygiene, Minsk

Резюме. Приводятся результаты генетического исследования с помощью микроядерного теста буккального эпителия работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора (ОАО «МАЗ», ОАО «КЗТШ», УП «ЦВЕТМЕТ»). Установлена достаточно высокая чувствительность микроядерного анализа для выявления повреждающего действия факторов среды обитания человека.

Ключевые слова: микроядерный тест, генетическое исследование, буккальный эпителий.

Resume. The results of genetic research using the micronucleus test of buccal epithelium of workers employed under the influence of chemical production factor (corporation “MAZ”, “KZTSH”, “TSVET-MET”) are presented. A sufficiently high sensitivity of micro-nuclear analysis to identify the damaging effects of the factors of the human environment was established.

Keywords: micronucleus test, genetic research, buccal epithelium.

Актуальность. Производственная деятельность неразрывно связана с работой в условиях воздействия вредных химических факторов. Среди неблагоприятных факторов химический фактор является одним из ведущих и самых разнообразных. По данным ВОЗ, из 10 млн. химических веществ более 100 тыс. представляют реальную угрозу для здоровья человека [1]. Развитие патологического состояния под действием химических веществ вызвано нарушением регуляторных, энергетических и метаболических механизмов поддержания гомеостаза [2]. В Республике Беларусь неинфекционные заболевания остаются основной причиной заболеваемости, инвалидности и преждевременной смертности населения, на их долю приходится 86 % случаев смертности и 77 % случаев вносит вклад в структуру общей заболеваемости. По данным ВОЗ, профессиональная заболеваемость работников на 75 % связана с работой и только оставшиеся 25 % обусловлены другими причинами, что указывает

на необходимость проведения научных исследований в этой области. Одним из таких генетических исследований является микроядерный тест [3]. Микроядерный тест для буккального эпителия ротовой полости появился сравнительно недавно (в 80-е гг. XX в.) и быстро стал одним из самых широко используемых методов для оценки генетического гомеостаза организма, скрининга химических соединений и физических факторов на генотоксичность. Это обусловлено тем, что микроядерный тест клеток слизистой оболочки ротовой полости достаточно быстр, легок, нетравматичен, экономически выгоден, позволяет проводить прижизненное обследование неограниченное число раз, не требует специального оборудования для культивирования клеток. Несмотря на появление в последние десятилетия новых молекулярно-генетических методов, микроядерный тест не только не уступает своих позиций, но и продолжает активно использоваться, а сфера его применения – расширяться. Тест получил признание многих исследователей и считается биомаркером генетических нарушений в организме [4]. Актуальность исследований, включающих идентификацию и регистрацию клеток, имеющих в своем составе микроядра, также объясняется еще и тем, что данные структуры часто встречаются при различных заболеваниях. Микроядерный тест с успехом используется в клинической практике для выявления и прогнозирования течения ряда заболеваний, а также при проведении экспериментальных исследований [5].

Цель: определить диагностическую информативность генетического исследования путем выявления возможных нарушений в генетическом аппарате клеток буккального эпителия.

Задачи:

1. Провести сравнительную оценку частоты цитогенетических нарушений и деструкции ядер (гибели клеток) в буккальном эпителии работников с ОРВИ и артериальной гипертензией.

2. Провести сравнительную оценку частоты цитогенетических нарушений и деструкции ядер (гибели клеток) в буккальном эпителии работников с учетом возраста.

3. Провести сравнительную оценку частоты цитогенетических нарушений и деструкции ядер (гибели клеток) в буккальном эпителии работников с учетом возраста и имеющих в анамнезе заболеваний.

Материалы и методы. Материалом исследования является буккальный эпителий работников, занятых в условиях воздействия химического производственного фактора (ОАО «МАЗ», ОАО «КЗТШ», УП «ЦВЕТМЕТ»). Для проведения микроядерного теста буккальный эпителий забирали из ротовой полости ватной палочкой и переносили на обезжиренное стекло. После цитологический препарат фиксировали этанолом. На следующие сутки препараты окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 10 минут. Анализ проводили при помощи световой микроскопии (Zeiss, Axioscop 40), учитывали клетки с микроядрами, протрузиями ядра и признаками гибели. С каждого препарата подсчитывали не менее 1000 клеток. Клетки с протрузиями, кариопикнозом, кариорексисом и кариолизисом объединяли в общий класс клеток с признаками гибели. Статистическую обработку проводили по t-критерию Стьюдента.

Основой для формирования групп рисков стало проспективное когортное

исследование поведенческих, производственных и бытовых факторов работников по данным анкетирования по специально разработанной анкете, учитывающей специфику работы на предприятии. Анкета состояла из 6 блоков: «Общие сведения», «Неблагоприятные и обременительные факторы», «Психосоциальные факторы», «Организационные факторы», «Проблемы здоровья», «Мнения о работе». Всего анкеты заполнили 400 работников промышленных предприятий: 81 анкета заполнена работниками ОАО «КЗТШ», 54 – работниками УП «ЦВЕТМЕТ», 265 – работниками ОАО «МАЗ».

Результаты и их обсуждение. В настоящее время имеется мало данных о влиянии респираторных заболеваний на число клеток буккального эпителия с цитогенетическими повреждениями. Однако было решено сформировать выборки, включающие группу клинического наблюдения (ГКН) – 29 работников без ОРВИ и артериальной гипертензии в анамнезе, группу сравнения 1 (ГС 1) – 23 работника с ОРВИ в анамнезе, но без артериальной гипертензии, и группу сравнения 2 (ГС 2) – 10 работников с частыми ОРВИ и артериальной гипертензией. Учитывалось наличие вредных привычек (курение).

Микроядерный тест показал наличие достоверного увеличения всех маркеров нестабильности генома клеток буккального эпителия у работников с заболеваниями органов дыхания и артериальной гипертензией ($21,40 \pm 2,95$ ‰) и у работников с заболеваниями органов дыхания, но без артериальной гипертензии ($25,47 \pm 2,59$ ‰) (таблица 1).

Табл. 1. Сравнительная оценка частоты цитогенетических нарушений и деструкции ядра (гибели клеток) в буккальном эпителии работников (на 1000 клеток, ‰)

Цитогенетический критерий оценки	ГКН, n=29	ГС 1, n=23	ГС 2, n=10
Клетки с микроядрами	$0,49 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,27$	$1,27 \pm 0,30$ *
Клетки с признаками гибели	$15,29 \pm 3,49$	$21,40 \pm 2,95$ *	$25,47 \pm 2,59$ *

* статистически значимые ($p < 0,05$) различия с ГКН

Также была выдвинута рабочая гипотеза о влиянии возраста на скорость пролиферации и тем самым на уровень клеток с поврежденной ДНК, что явилось основой для формирования еще 2 групп обследованных работающих мужского пола с учетом возраста: 1-ая – 43-64 лет (41 работник) и 2-ая 28-41 лет (32 работника).

Были получены следующие результаты: в первой группе уровень клеток с микроядрами составил $0,40 \pm 0,02$ ‰, а во второй $0,76 \pm 0,03$ ‰, что достоверно выше ($p < 0,001$). По уровню гибели клеток особых различий не обнаружено, в первой группе он составил $18,41 \pm 1,45$ ‰, а во второй $19,73 \pm 1,53$ ‰ (таблица 2).

Табл. 2. Сравнительная оценка частоты цитогенетических нарушений и деструкции ядра (гибели клеток) в буккальном эпителии работников (на 1000 клеток, ‰)

Цитогенетический критерий оценки	Группа обследованных	
	1-я группа; n = 41	2-я группа; n = 32
Клетки с микроядрами	0,40 ± 0,02	0,76 ± 0,03
Клетки с признаками гибели	18,41±1,45	19,73±1,53

Для наглядности была создана еще одна выборка в зависимости от возраста и имеющихся в анамнезе заболеваний: группа 1 – работники, не имеющие заболеваний (практически здоровые); группа 2 – работники, имеющие в анамнезе ОРВИ, артериальную гипертензию, сахарный диабет, хронический гастрит, хронический бронхит, язвенную болезнь желудка; группа 3 – работники, имеющие в анамнезе более 2 заболеваний ОРВИ, артериальную гипертензию, нарушения жирового обмена, хронический гастрит, хронический бронхит, язвенная болезнь. В свою очередь группа 1 в зависимости от возраста была разделена на подгруппы: 1 подгруппа – 12 человек 44-64 лет и 2 подгруппа – 10 человек 22-41 года. Группу 2 также разделили на 2 подгруппы: 1 подгруппа – 15 человек 43-63 года, 2 подгруппа – 14 человек 26-41 года. И в группу 3 включены 1 подгруппа, состоящая из 14 человек 45-61 года; 2 подгруппа, состоящая из 8 человек 26-40 лет (таблица 3).

Табл. 3. Сравнительная оценка частоты цитогенетических нарушений и деструкции ядра (гибели клеток) в буккальном эпителии работников (на 1000 клеток, ‰)

Цитогенетический критерий оценки	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	Подгруппа 1 (n=12)	Подгруппа 2 (n=10)	Подгруппа 1 (n=15)	Подгруппа 2 (n=14)	Подгруппа 1 (n=14)	Подгруппа 2 (n=8)
Клетки с микроядрами	0,11±0,02	0,48±0,05	0,52±0,04	0,71±0,05	1,04±0,05	1,63±0,10
Клетки с признаками гибели	16,25±1,88	12,24±1,35	16,86±1,99	21,66±1,59	21,94±3,22	26,19±0,58

Сравнительный анализ данных с учетом возрастного фактора позволил определить минимальный уровень клеток с микроядрами (0,11±0,02 ‰) в группе 1 у работающих старшего возраста (подгруппа 1). Уровень микроядер 0,48±0,05 ‰ у молодых работающих (подгруппа 2) группы 1 указывает на то минимальное увеличения числа клеток с повреждениями, которые накапливаются за счет усиленной пролиферации в условиях воздействия производственного фактора. В группе 2 отмечается резкое увеличение ($p=0,004$) числа клеток с микроядрами, при этом только у молодых работающих (подгруппа 2) отмечается нарастания гибели клеток. Так в 1 группе у молодых работающих (подгруппа 2) клетки с признаками гибели составили 12,24±1,35 ‰, в то же время в группе 2 в подгруппе 2 – 21,66±1,59 ‰. Это может указывать на включение механизмов элиминации клеток с повреждениями ДНК и замещающей клеточной репарацией без генетических повреждений. В группе 3 отмечается на-

растание клеток с микроядрами у всех возрастных групп, а также увеличение гибели клеток у работающих старшего возраста (подгруппа 1). Так у работающих старшего возраста уровень гибели составил $21,94 \pm 3,22$ %, а у молодых работающих (подгруппа 2) $26,19 \pm 0,58$ %, что может указывать на верхние пределы числа клеток с данными маркерами повреждения [6].

Выводы:

1 Установлена достаточно высокая чувствительность проведенного микроядерного анализа клеток буккального эпителия работающих, что позволяет контролировать различные факторы, которые являются причиной или следствием повышения нестабильности генома у человека.

2 Следует отметить, что на уровень цитогенетических повреждений влияют возраст, заболеваемость и производственные факторы.

3 Клетки с микроядрами являются более чувствительным маркером, чем клетки с признаками гибели. Однако необходимо учитывать данные маркеры в комплексе, т.к. они реагируют на неблагоприятные факторы внутренней и внешней среды взаимосвязано.

4 Результаты микроядерного теста могут использоваться в донозологической диагностике заболеваний.

Литература

1. Рембовский, В. Р. Классификация состояния здоровья работающих при воздействии химического фактора / В. Р. Рембовский, Л. А. Могиленкова. – Москва: Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова, 2006. – 31 с.
2. Структурные основы адаптации и компенсации нарушений функции: Руководство / под ред. Д. С. Саркисова. – М.: Медицина, 1987.
3. Семенихин, В. А. Профилактика профессиональных заболеваний у работников, занятых во вредных условиях труда: мет. Рекомендации / В. А. Семенихин. – Кемерово: 2015. – 7 с.
4. Калаев, В. Н. Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: монография / В. Н. Калаев, М. С. Нечаева, Е. А. Калаева. – Воронеж: 2016. – 9 с.
5. Кучербаева, Ж. А. Микроядерный тест для оценки патологических процессов в организме человека (обзор) / Ж. А. Кучербаева. – Бишкек: Наука и новые технологии, 2012. – 108–110 с.
6. Зеленко, А. В. Отчет о научно-исследовательской работе РУП «Научно-практический центр гигиены / А. В. Зеленко, Е. А. Семушина, О. К. Синякова, Е. С. Щербинская и др. – Минск: 2017. – 34 с.