



ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТИ ЦИТОМОРФОЛОГИИ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ КУРЯЩИХ СТУДЕНТОВ ТЕРМЕЗСКОГО ФИЛИАЛА ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ

Ташниязов Х.Б.

Асфандиёров Ж.М.

Термезский филиал Ташкентской медицинской академии
Кафедра медицинской биологии и гистологии.
г. Термез. Республика Узбекистан.

А.Т. Ашуров

Научный руководитель – канд.биол.наук

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7651822>

Аннотация. Исследованы особенности цитоморфологии в клетках буккальных эпителиоцитов курящих студентов 20-22 летнего возраста со стажем курения от 2 до 4 лет. В биоматериале курящих студентов выявлено достоверное снижение доли клеток нормы и не менее чем двукратное увеличение доли клеток с разными морфологическими отклонениями. В буккальном эпителии курящих студентов в 2 раза чаще регистрируются клетки с цитогенетическими нарушениями; более чем в два раза чаще встречаются клетки с признаками нарушения процессов пролиферации и начальными признаками деструкции ядра. Из клеток с признаками завершения деструкции ядра у курящих студентов достоверно чаще регистрируются клетки с кариолизисом. Рассчитан индекс накопления цитогенетических нарушений у курящих студентов.

Ключевые слова: курящий студенты, цитоморфологическое исследование буккального эпителия, мукозальный эпителий, индекс накопления цитогенетических нарушений.

Актуальность. Известно, что буккальный эпителий ротовой полости, как часть мукозальной системы, представляет собой многослойный неороговевающий плоский эпителий [2]. Клетки его поверхностного слоя обновляются за 20–25 дней благодаря делению пролиферативных клеток базального (частично) и глубоких отделов шиповатого слоя с последующей дифференциацией и десквамацией [18;19]. Нарушение процессов дифференцировки клеток буккального эпителия указывает на локальные или системные расстройства [13]. Клеточная атипия с высокой долей вероятности свидетельствует о динамике онкологического процесса [14]. Нарушение процесса дифференцировки клеток буккального эпителия ротовой полости возможно при метаболических, гормональных сдвигах, воздействии механических факторов, химических и радиоактивных веществ [1; 5; 8; 12; 13].

Цель исследования – оценить значение табачного дыма на нарушение процесса дифференцировки клеток буккального эпителия ротовой полости у курящих студентов.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. приготовить цитологические препараты
2. определить цитоморфометрические показатели буккального эпителия



Материалы и методы исследования. Объектом исследования последствий курения по особенностям цитоморфологии буккальных эпителиоцитов проведено на биоматериале от 25 волонтеров-студентов 20–22-летнего возраста со стажем курения от 2 до 4 лет. В качестве контроля использован биоматериал от 10 некурящих того же возраста.

Все обследованные не имели хронических патологий, стоматологических проблем, инфекционных заболеваний на момент забора материала. Соскоб с внутренней поверхности щеки проводился стандартным методом с последующим приготовлением фиксированного мазка, окрашенного по методу Романовского-Гимзе [7]. В процессе микроскопического изучения на каждом препарате исследовали 10 полей зрения при увеличении 400 и учитывали 500 клеток. При интерпретации результатов учитывались следующие патологии клетки:

- цитогенетические – клетки с микроядрами; клетки с ядерными протрузиями; клетки с ядром атипичной формы;
- показатели пролиферации – клетки с двумя ядрами; клетки с круговой насечкой ядра;
- деструкции ядра (апоптоз или некроз) – клетки с перинуклеарной вакуолью; клетки с конденсацией хроматина; клетки с вакуолизацией ядра;
- завершение деструкции ядра – клетки с кариорексисом; клетки с кариопикнозом; клетки с кариолизисом.

Материалы исследований были обработаны математико-статистическими методами с использованием программ статистической обработки данных Statistica 10.0. Применялись методы оценки достоверности различия по t-критерию Стьюдента. В качестве критерия статистической надежности выбрано значение для двух несвязанных групп ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. Нетрадиционные свойства мукозального эпителия (эпителия слизистых оболочек рта) обуславливают его значительный иммуногенный и маркерный потенциал для клинико-лабораторной диагностики [5;7;9].

Эпителиальные ткани организма, в том числе буккальный эпителий, образуют естественный барьер между внешней и внутренней средой, испытывая постоянное воздействие факторов внешней среды, в том числе канцерогенно-мутагенного характера. Одним из таких патологических факторов можно считать табачный дым,

в котором содержится около 5000 химических соединений, из которых более 60 канцерогенны. Известно, что 92 % всех злокачественных новообразований возникает в эпителиальных тканях [14]. Хроническое воздействие табачного дыма на слизистую ротовой полости повышает онкологический риск у курильщика [16].

Для оценки риска патологического влияния курения на буккальный эпителий рассчитывали индекс накопления цитогенетических нарушений; – индекс накопления цитогенетических нарушений; – интегральный показатель цитогенетических нарушений (сумма клеток с микроядрами, ядерными протрузиями и межъядерными мостами в промилле); – интегральный показателя пролиферации (сумма клеток с двумя и более ядрами в промилле); – апоптотический индекс (сумма клеток в апоптозе,

включая конденсацию хроматина и начало kariolизиса, учтенного как вакуализация ядра, в промилле).

Выделяют три группы риска цитогенетических повреждений: низкий ($Iac \leq 2$), умеренный ($2 < Iac < 4$) и высокий ($Iac \geq 4$).

В биоматериале курящих студентов выявлено достоверно меньше клеток нормы и достоверно больше клеток с разными признаками цитоморфологических патологий, чем у некурящих. В частности, клеток с морфологически нормальными ядрами у курящих почти в три раза меньше, чем у некурящих. Похожие результаты отмечены и другими авторами, в отношении воздействия радиоактивных факторов [3; 4; 10; 11].

Цитогенетические аномалии клеток буккального эпителия у курящих регистрируются достоверно чаще, чем у некурящих. В первую очередь это касается клеток с протрузией ядра, в меньшей степени клеток с микроядрами. Увеличение числа клеток с протрузиями ядер считается интегративным показателем генетических нарушений в интерфазных ядрах у лиц, подверженных генотоксическим и цитотоксическим воздействиям экзогенных факторов [3].

Достоверно значимых различий в отношении клеток с микроядрами у курящих и некурящих лиц не выявлено. Похожие результаты получены и другими авторами, в частности при исследовании генотоксических эффектов ионизирующего облучения [4; 10]. Микроядра могут быть фрагментами хромосом, образовавшимися при повреждении ДНК из-за нарушения образования веретена деления в процессе митоза. Также, микроядра могут представлять собой одну или несколько целых хромосом, не вошедших в состав ядра в анафазе митоза [15]. Так или иначе, повышение частоты буккальных эпителиоцитов с микроядрами, выявленное нами и другими исследователями [3; 4; 10; 11], считается наиболее ранним признаком онкопроцесса [16].

Клетки с атипичной формой ядра встречались в биоматериале курящих в три раза чаще, чем у некурящих. Возможной причиной формирования атипичной формы ядра считают хромосомные мутации. Доказана прямая корреляция ($R=0,33$) между частотой клеток с хромосомными абберациями и частотой клеток с атипичной формой ядра у лиц из радиационно неблагоприятных мест проживания [3; 6].

Морфологические признаки нарушения пролиферации в два раза чаще регистрировались в биоматериале курящих. Увеличение количества двуядерных клеток буккального эпителия, как результат полиплоидизирующего ацитокинетического митоза [1], достоверно коррелирует с хроническим радиоактивным облучением [3; 4; 10; 11], представляя собой естественный ответ на радиоактивное облучение [17; 18; 20]. В табачном дыме содержатся, в том числе, и радиоактивные вещества, оказывающие хроническое воздействие на слизистые оболочки ротовой полости и дыхательной системы курящих. Это объясняет двукратное повышение двуядерных клеток и клеток с круговой насечкой ядра, в буккальном эпителии курильщиков с четырёхлетним стажем.

Круговая насечка ядра как один из признаков нарушения процесса пролиферации в два раза чаще регистрировалась в буккальных эпителиоцитах курящих. Образуясь в процессе незавершенного митоза из-за повреждения веретена деления, ядра с круговой насечкой свидетельствуют о нарушении цитотомии и kariотомии [3]. Достоверное повышение этой формы ядерной патологии



регистрируется также у лиц, подверженных хроническому радиоактивному облучению [4; 10;11].

Из показателей деструкции ядра следует отметить высокую статистическую достоверность повышения количества клеток со всеми вариантами ядерной деструкции у курящих. Наименьшая разница в показателях деструкции ядра отмечена в отношении числа клеток с конденсацией хроматина. Процесс конденсации хроматина считается этапом, предшествующим процессу кариорексиса, при котором ядро распадается на хроматиновые конгломерации с последующей естественной гибелью путем апоптоза [3; 11]. При сравнении частоты встречаемости клеток с признаками кариорексиса выявили достоверное увеличение доли таких клеток у курящих в 2,6 раза. Это может свидетельствовать о нарушении естественной стимуляции процессов апоптоза буккальных эпителиоцитов путем воздействия цитотоксических и генотоксических экзогенных факторов (табачный дым). Похожая тенденция отмечена у лиц из радиационно неблагоприятных и безопасных мест проживания [4;10;11]. Из показателей деструкции ядра статистически значимыми оказались признаки некроза клетки – перинуклеарная вакуоль (в 2,3 раза чаще у курящих) и вакуолизация ядра (в 3,3 раза чаще у курящих). Выявленные формы некроза клеток свидетельствуют о деструктивных изменениях мембраны ядра и нарушении ее барьерной и транспортной функции [3;11]. Признаки некротического пути деструкции буккальных эпителиоцитов выявлены и в исследованиях последствий воздействия радиоактивных факторов [4;10;11]. Результат некротического процесса клеточной деструкции – кариолизис, которому предшествуют появления перинуклеарной вакуоли и/или вакуолизация ядра. Мы не выявили статистически значимых отличий в частоте клеток с признаками кариолизиса у курящих и некурящих. Однако статистически достоверное повышение доли клеток с начальными признаками некротического пути деструкции у курящих (перинуклеарная вакуоль и вакуолизация ядра) косвенно подтверждает патологическую роль курения.

Естественной формой апоптоза клеток буккального эпителия считается кариопикноз. Выявленная разница частоты встречаемости клеток с кариопикнозом у курящих и некурящих незначительна и статистически не достоверна. Это свидетельствует о сохранении механизмов естественного процесса деструкции клеток буккального эпителия у курящих лиц с непродолжительным стажем курения (не более 5 лет). Тем не менее суммарное число признаков некротического пути деструкции буккальных эпителиоцитов достоверно чаще (в 1,7 раза) регистрируется у курящих, по сравнению с некурящими ($P < 0,01$), подтверждая генотоксическое и цитотоксическое воздействие табачного дыма.

С помощью индекса накопления цитогенетических нарушений [12] был оценен риск возникновения цитологических нарушений у курящих и некурящих 20–22-летних студентов. У некурящих индекс накопления цитогенетических изменений в клетках буккального эпителия соответствует группе умеренного риска ($2 < Iac < 4$), у курящих – группе высокого риска ($Iac \geq 4$). Выявленная разница в показателях индекса накопления цитогенетических нарушений в клетках буккального эпителия у курящих студентов и некурящих лиц 20–22-летнего возраста достоверна при 0,1 % уровне значимости с вероятностью $P = 0,001$.



Выводы. Таким образом, курение значительно повышает риск развития цитогенетических нарушений в клетках эпителия слизистой оболочки полости рта, переводя курящего из группы умеренного риска в группу высокого риска. Цитоморфологически это выражается в двукратном повышении числа клеток с признаками нарушения процесса пролиферации и клеток с признаками деструкции по типу некроза. Косвенными признаками повышения риска развития цитогенетических нарушений можно считать изменение соотношения доли клеток нормы и клеток с различными цитоморфологическими отклонениями в сторону уменьшения доли клеток нормы и увеличения доли клеток с отклонениями.

Литература:

1. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия: пролиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981. 237 с.
2. Гемонов В.В. Морфология и гистохимия слизистой оболочки полости рта в норме и при некоторых патологических состояниях в эксперименте: автореф. ... дис. док. наук. М., 1969. 39 с.
3. Генотоксические и цитотоксические эффекты в буккальных эпителиоцитах детей, проживающих в экологически различающихся районах Кузбаса / А.В. Мейер и др. // Цитология. 2010. Т. 52. № 4. С. 305–310.
4. Генотоксические эффекты в буккальном эпителии горняков, работающих в условиях облучения природными источниками ионизирующего излучения / Д.А. Петрашова и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 1–7. С. 1792–1796.
5. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Некрасов В.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов // Цитология и генетика. 1988. Т. 22. №1. С. 67–71.
6. Индивидуальная чувствительность генома и особенности проявления генотоксических эффектов у людей, длительно подвергающихся воздействию повышенных концентраций радона. Изучение возможных механизмов модификации эффектов / В.Г. Дружинин и др. // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы»: тез. докл. М.: ИМБ РАН, 2008. С. 124–126.
7. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: метод. рекомендации / сост. Т.С. Колмакова и др. Ростов н/Д: РГМУ, 2013. 31 с.
8. Комплексная оценка состояния слизистой оболочки полости рта с помощью современных диагностических методик / Е.И. Бердникова и др. // Современные проблемы науки и образования (электронный научный журнал). 2012. №6. URL: <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=7851> (Дата обращения: 20.02.2017).

9. Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах / В.В. Юрченко и др. //Полиорганый микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. М.: Гениус, 2007. С. 220–267.
10. Молоканова Ю.П., Угольников М.Н. Оценка риска онкологической заболеваемости молодежи, проживающей в условиях повышенного радиационного фона, по уровню накопления цитогенетических нарушений в клетках буккального эпителия // Актуальные проблемы биологической и химической экологии: сборник материалов V Международной научно-практической конференции (г. Москва, 21–23 ноября 2016 г.). М.: ИИУ МГОУ, 2016. С. 205–212.
11. Молоканова Ю.П. Особенности цитоморфологии буккального эпителия курящих лиц юношеского возраста. Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки 2017 / №1 С. 21–30.
12. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // Медицинская генетика. 2007. Т. 6 (11). С. 3–11.
13. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека // Гигиена и санитария. 2012. № 6. С. 68–72.
14. Хусаинова И.С., Варулева И.Ю., Кожина Н.А. Оценка цитологических показателей буккального эпителия для диагностики функционального состояния человека //Клин. лаб. диагностика. 1997. № 3. С. 10–12.
15. Cairns J. Mutational selection and natural history of cancer // Nature (London). 1975. V. 255. P. 197–200.
16. Cea Guide F.A., Etcheberry K.F.C., Dulout F.N. Induction of micronuclei in mouse bone marrow cells by the flavonoid // Mut. Res. 1983. V. 119. № 3/4. P. 339–345.
17. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation / R.S. Cardozo et al. //Teratog. Carcinog. Mutagen. 2001. V. 21. P. 431–439.
18. Koss L.G. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. Vol. 1–2. Philadelphia; Toronto: J.P. Lippincott Co, 1979. 1266 p.
19. Schroeder H.E. Differentiation of Human Oral Stratified Epithelia. Basel: S. Karger, 1981. 306 p.
20. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development //Mut. Res. 1992. Vol. 271. № 1. P. 69–77.