

ЦИТОЛОГИЯ

© ПОЖАРСКАЯ В.В., 2021

Пожарская В.В.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ ДЕЛЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ШКОЛЬНИКОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ В СРЕДНИХ И ВЫСОКИХ ШИРОТАХ

ФГБУН ФИЦ Кольский научный центр РАН, 184209, Апатиты, Россия

Интенсивное промышленное развитие северных регионов РФ прежде всего связано с добычей и переработкой природных ресурсов, что приводит к загрязнению окружающей среды и делает актуальным задачи санитарно-гигиенического мониторинга. Для быстрой диагностики генетического благополучия среды удобны экспресс-методы, одним из которых является микроядерный тест в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В. Ценность данного метода, несмотря на его трудоемкость, заключается в том, что в результате представляется возможность оценить различные цитогенетические параметры на разных стадиях митоза. На данный момент имеются скудные данные по межширотному сравнению результатов цитогенетических исследований на клетках различных тканей человека, что в значительной мере затрудняет сопоставление получаемых в Арктической зоне РФ результатов с данными из более южных районов. Цель данного исследования состоит в выявлении и сравнении аномалий деления в клетках лимфоцитов периферической крови у двух групп школьников старшего возраста, проживающих в средних и высоких широтах. Исследование проводилось в г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.) и г. Апатиты Мурманской области (67° 34' 03" с.ш., 33° 23' 36" в.д.). Всего обследовано 40 детей в возрасте 16-18 лет – по 20 детей из г. Серпухова и из г. Апатиты. Микроядерный тест проводился согласно международному протоколу. Цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови школьников с использованием микроядерного теста показал, что спонтанное число клеток с микроядром сопоставимо в средних и в высоких широтах, и приближаются к верхней границе значений среднепопуляционной нормы. Следовательно, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках лимфоцитов периферической крови исследуемых групп допустимо не учитывать широту проживания.

Ключевые слова: микроядра; лимфоциты; микроядерный тест; нарушения деления; высокие широты; Арктика.

Для цитирования: Пожарская В.В. Цитогенетические аномалии деления лимфоцитов крови у школьников, проживающих в средних и высоких широтах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 213-216.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212>

Pozharskaya V.V.

CYTOGENETIC STATUS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN SCHOOLCHILDREN LIVING MIDDLE AND HIGH LATITUDES

Federal Research Centre «Kola Science Centre of the Russian Academy of Sciences», Apatity, 184209, Russia

Intensive industrial development of the northern regions of the Russian Federation is primarily associated with the extraction and processing of natural resources, which leads to environmental pollution and makes the tasks of sanitary and hygienic monitoring urgent. Rapid methods are convenient for the rapid diagnosis of the genetic well-being of the environment, one of which is the micronucleus test in combination with the cytokinetic block cytochalasin B. mitosis. At the moment, there are scanty data on the inter-latitudinal comparison of the results of cytogenetic studies on cells of various human tissues, which greatly complicates the comparison of the results obtained in the Arctic zone of the Russian Federation with data from more southern regions. The purpose of this study is to identify and compare division abnormalities in cells of peripheral blood lymphocytes in two groups of older schoolchildren living in middle and high latitudes. The study was carried out in the city of Serpukhov, Moscow region (54° 54' 56" N, 37° 24' 40" E) and the city of Apatity, Murmansk region (67° 34' 03" N, 33° 23' 36" E). A total of 40 children aged 16-18 were examined – 20 children each from the city of Serpukhov and from the city of Apatity. The micronucleus test was carried out in accordance with the international protocol. Cytogenetic analysis of schoolchildren's peripheral blood lymphocytes using the micronucleus test showed that the spontaneous number of cells with micronuclei is comparable in middle and high latitudes, and approaches the upper limit of the mean population norm. Therefore, when comparing the data of the micronucleus test on the cells of peripheral blood lymphocytes of the studied groups, it is permissible not to take into account the latitude of residence.

Key words: micronucleus; human lymphocytes; micronucleus assay high latitude, Arctic.

For citation: Pozharskaya V.V. Cytogenetic status of blood lymphocytes in schoolchildren living middle and high latitudes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 210-212 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212>

For correspondence: *Pozharskaya Victoria Victorovna*, Candidate of Biological Sciences, Research Officer; e-mail: vika_pozharskaja@mail.ru

Information about author:

Pozharskaya V.V., <http://orcid.org/0000-0002-5172-9446>.

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 11.11.2020
Accepted 16.11.2020

Для корреспонденции: Пожарская Виктория Викторовна, канд. биол. наук, науч. сотр.; e-mail: vika_pozharskaja@mail.ru

Введение. Согласно имеющимся данным в высоких широтах отмечается повышенная заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований [1-3]. В последние годы было показано, что в заболеваемость жителей арктического региона вносят высокоширотные космо- и гелиофизические агенты, ассоциированные с солнечной активностью [4], повышающие чувствительность к воздействию высокоширотных факторов среды и, приводящие к снижению адаптационных возможностей организма. При этом интенсивное промышленное развитие северных регионов Российской Федерации, прежде всего связанное с добычей и переработкой природных ресурсов, приводит к загрязнению окружающей среды и делает актуальным эколого-гигиенический мониторинг и поиск новых методов оценки генетического благополучия среды. Для диагностики благополучия среды и оценки мутагенного эффекта отдельных ее факторов удобны экспресс-методы, одним из которых является цитогенетический тест на лимфоцитах периферической крови человека. Ценность данного метода, несмотря на его трудоемкость, заключается в том, что в результате представляется возможность оценить различные цитогенетические параметры на разных стадиях митоза, и помимо микроядерного теста, возможно получить более объективную картину состояния различных характеристик хромосомного аппарата. Данный метод получил довольно широкое распространение, но несмотря на это, на данный момент отсутствуют данные по межширотному сравнению результатов цитогенетических исследований на клетках различных тканей детей, что в значительной мере затрудняет сопоставление получаемых в Арктической зоне РФ результатов с данными из более южных районов.

Цель данного исследования состоит в выявлении и сравнении цитогенетических нарушений в клетках лимфоцитов периферической крови у двух групп школьников старшего возраста, проживающих в средних и высоких широтах. Выбор детей старшего школьного возраста для исследования обусловлен следующими фактами. Во-первых, дети более чувствительны к генотоксическим агентам, чем взрослые. Во-вторых, они в течение всей своей жизни проживают чаще всего на рассматриваемой территории, тогда как взрослые могут не единожды менять место своего проживания. Кроме того, возможно интервьюирование их по широкому спектру вопросов [5].

Исследование проводилось в г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.) и г. Апатиты Мурманской области (67°34'03" с. ш., 33°23'36" в. д.). Всего обследованы 40 детей в возрасте 16-18 лет: по 20 детей из г. Серпухова и из г. Апатиты. Микроядерный тест проводился согласно международному протоколу.

Материал и методы. Выбор исследуемых территорий. Для проведения межширотного сравнения были выбраны населенные пункты, расположенные в разных широтах, сопоставимые по социально-экономическому развитию, транспортной доступности, доступности и качеству медицинской помощи, общим сетям поступления продуктов питания, половозрастной и этнической структуре населения и т.д.

В средних широтах был выбран г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.), поскольку он соответствовал описанным выше критериям. В качестве города-сравнения для проведения межширотного сравнения рассматривались города, расположенные за полярным

кругом Европейской части РФ, в связи с их наилучшей транспортной доступностью, промышленной развитостью и наибольшей плотностью населения и сходности представленного этнического населения. Наиболее развитой транспортной доступностью в данном регионе отличается Мурманская область, большая часть которой расположена за Полярным кругом. Среди крупных городов области г. Апатиты (67°34'03" с. ш., 33°23'36" в. д.) отличается отсутствием градообразующего предприятия, развитостью промышленного производства, сельского хозяйства, строительства, торговли, транспорта (в городе имеется своя железнодорожная станция и аэропорт), научной сферы.

Исследуемые группы. Всего для исследования цитогенетических параметров на лимфоцитах периферической крови были выбраны 40 детей – по 20 детей из каждого города. Исследование проводилось в среднеобразовательных школах среди учеников 10-11 классов, в возрасте 16-18 лет. Перед началом исследования были получены информированные согласия от родителей или опекунов детей на участие.

Перед взятием образцов венозной крови проводилось интервьюирование по специально разработанному опросному листу, позволяющее оценить степень подверженности вредным привычкам. Опросник включал в себя вопросы относительно места рождения, длительности проживания в данном населенном пункте, питания, роста, веса, вакцинации, употребления витаминов и медикаментозных препаратов, хронических и острых заболеваний, прохождения рентгенологических обследований, семейной истории относительно онкологических заболеваний, образа жизни, т.к. данные факторы могут иметь серьезное влияние на результаты, получаемые при оценке нестабильности генома человека с помощью микроядерного теста [6-9]. Также проводилось психологическое тестирование с помощью общепринятых тестов, среди которых – шкала тревожности Спилберга-Ханнина, Тест САН и др.

Критерии исключения: онкологические заболевания в семейной истории, наличие хронических заболеваний, диабет и ожирение, курение, употребление алкоголя, простудные заболевания в течение двух месяцев до исследований, прохождения рентгенологических исследований в течение полугода, использование в питании продуктов с приусадебного хозяйства, вегетарианство, высокий уровень тревожности подростка.

Цитогенетический тест на периферических лимфоцитах проводили на ФГА-стимулированных лимфоцитах цельной периферической крови человека в соответствии с методикой [10, 11]. Долю двуядерных клеток с микроядрами оценивали относительно 1000 двуядерных клеток, цитокинез которых был остановлен цитохалазином В (ЦХВ), т.е. в клетках, проходивших первый митоз между 48 и 72 ч после стимуляции ФГА [12]. Оценка частоты встречаемости клеток с генетическими и цитологическими нарушениями проводили на основе анализа не менее 1000 клеток на каждом препарате. На препаратах идентифицировали: одноядерные клетки, все клетки без нарушений (1-, 2-, 3- и 4-ядерные клетки), все клетки с микроядром или несколькими микроядрами. Микроядра идентифицировали как хроматиновые округлые тела с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, лежащие отдельно от основного ядра, не преломляющие свет, с интенсивностью окрашивания и рисунком хроматина, как у основного ядра, и находящиеся в одной плоскости с ядром.

Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа AXIOSTAR PLUS (Karl Zeiss, Германия) (об. 15 х ок. 40, 100), оснащенного камерой CoolSNAPes (Photometrics) с цифровой системой регистрации и обработки изображения на базе ПЗС (Media Cybernetics, Inc.).

Частота встречаемости клеток представлена как средняя частота на 1000 клеток с ошибкой. Достоверность различий между группами определялась согласно критерию Манна-Уитни. Критический уровень для подтверждения нулевой гипотезы принимался в 5% ($p < 0,05$). Статистический анализ был выполнен с использованием пакета программ Statistica 10.0.

Результаты. Средние арифметические значения спонтанной частоты лимфоцитов периферической крови с микроядрами в исследуемых группах, оцененные с помощью микроядерного теста в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В, в рассматриваемых группах школьников достоверно не отличались (см. таблицу) и не превышали показатели, характерные для среднепопуляционной нормы [11].

Обсуждение. Микроядра являются признанными биомаркерами генотоксического действия различных факторов. Они представляют собой отдельную часть генетического материала вне основного ядра, которая является либо фрагментом хромосомы, образованной в результате повреждения ДНК, либо одной или несколькими целыми хромосомами, отстающими в анафазе и не включенными в основное ядро [13]. По сравнению с хромосомным анализом лимфоцитов, подсчет микроядер более прост и дешев, но при этом, по чувствительности не уступает метафазному анализу [14]. При этом, в ряде исследований показано, что микроядерный тест может быть более чувствительным, чем тест хромосомных aberrаций [10], но позволяет выявлять только часть мутационного спектра [15]. На данный момент имеются доказательства наличия разных механизмов возникновения двуядерных клеток, но при этом до сих пор остается неисследованной связь между спонтанной частотой встречаемости двуядерных лимфоцитов в культуре периферической крови и одноядерными клетками, содержащими микроядра. Поэтому в данных исследованиях, несмотря на общий учет всех лимфоцитов вне зависимости от их ploидности, при оценке цитогенетической неустойчивости одноядерные клетки не рассматривались.

Несмотря на распространенность метода оценки генотоксических свойств среды с помощью микроядерного теста на протяжении нескольких последних десятилетий, на данный момент отсутствуют данные о возможности сопоставления полученных результатов разных авторов даже в пределах одного региона. Имеются лишь отрывочные данные, характеризующие вариативность пролиферативного пула, полученного от одного донора, также отмечены вариации при подсчете препаратов разными исследователями [11]. Данное исследование проводилось в один сезон, с минимально возможной временной разницей в заборе крови у школьников разных широт, культивирование клеток и анализ препаратов проводился одним человеком для избегания вариативности в идентификации аномалий деления.

При оценке частоты встречаемости полиядерных лимфоцитов у подростков, проживающих в средних и высоких широтах, установлено, что в Московской области (г. Серпухов) спонтанная частота встречаемости среди лимфоцитов крови полиядерных клеток без микроядер ниже, чем в крови подростков, проживающих

Частота встречаемости полиядерных лимфоцитов у подростков (16-18 лет), проживающих в различных регионах, на 1000 клеток, %

Показатели	Средние широты г. Серпухов (n=20)	Высокие широты г. Апатиты (n=20)
Число бинуклеарных лимфоцитов без микроядра	921,1±5,5	932,4±4,8
Число бинуклеарных лимфоцитов с микроядром	17,0±1,1	17,3±1,2
Число клеток содержащих микроядра, без учета двуядерных лимфоцитов	12,5±1,3	10,8±1,4
Всего лимфоцитов с микроядром	29,5±2,2	29,1±2,0
Общее число полиядерных лимфоцитов	948,5±3,6	956,2±2,4
Общее число полиядерных лимфоцитов, без учета бинуклеарных лимфоцитов	27,4±3,9	22,6±3,1

на территории Мурманской области (г. Апатиты). Однако, меньшее число 3 и 4-ядерных лимфоцитов в пуле культивированных лимфоцитов у подростков, проживающих в г. Апатиты (22,6±3,1 против 27,4±3,9 у подростков, проживающих в Московской области), на фоне большего общего числа многоядерных лимфоцитов (956,2±2,4 против 948,5±3,6) позволяет предположить, что влияние региональных условий проживания проявляется в различной скорости деления клеток. При этом, общее число как всех полиядерных клеток с микроядром (29,5±2,2 в средних широтах и 29,1±2,0 в высоких широтах), так и только бинуклеарных лимфоцитов с микроядром (17,0±1,1 и 17,3±1,2, соответственно) сопоставимо и приближаются к верхней границе значений среднепопуляционной нормы. Следовательно, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках лимфоцитов периферической крови вполне допустимо не учитывать широту проживания исследуемых групп.

Заключение. В ходе проведенных исследований не выявлено значимых различий в частоте встречаемости микроядер в лимфоцитах периферической крови подростков, проживающих в различных широтах, и, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках лимфоцитов периферической крови вполне допустимо не учитывать широту проживания исследуемых групп старших школьников. Но, имеющаяся тенденция к снижению частоты встречаемости спонтанных 3- и 4-ядерных лимфоцитов в пуле культивированных лимфоцитов у подростков, проживающих в Мурманской области (22,6±3,1) против 27,4±3,9 у подростков, проживающих в Московской области, на фоне большего общего числа многоядерных лимфоцитов (956,2±2,4 против 948,5±3,6) позволяет предположить, что влияние региональных условий проживания есть, и проявляется в различной скорости деления клеток.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность канд. биол. наук Петрову Владимиру Николаевичу за помощь в организации исследования в г. Серпухов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 7, 8, 10, 11 см. REFERENCES)

1. Гундаров И.А., Зильберт Н.Л. Изучение региональных различий в заболеваемости и смертности населения с позиций синдрома географической широты. *Вестник академии медицинских наук СССР*. 1991; 11: 52-6.
2. Белишева Н.К., Петров В.Н. Проблема здоровья населения в свете реализации стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации. *Труды Кольского научного центра*. 2013; 6 (19): 20.
4. Белишева Н. К., Талыкова Л. В., Мельник Н. А. Популяционные эффекты воздействия космических лучей в высоких широтах. *Медико-биологические эффекты действия радиации: материалы международной конференции (10-11 апреля 2012 г.)*. Москва: ФГУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России; 2012.
6. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе оценки нестабильности генома человека. Дополнительные возможности теста. Методика проведения экспериментов и цитогенетического анализа. *Экологическая генетика*. 2006; 4(4): 38-54.
9. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток. *Экологическая генетика*. 2006; 3(4): 7-19.
12. Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Алещенко А. В., Антошина М. М., Готлиб В. Я., Конрадов А. А. и др. Молекулярно-клеточные последствия аварии на ЧАЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011; 1 (51): 154-61.
13. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. *Медицинская генетика*. 2007; 6 (11): 3-12.
14. Горовая А.И., Климкина И.И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами. *Цитология и генетика*. 2002; 5 (36): 21-5.
15. Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А. Действие малых доз облучения на клетки китайского хомячка. *Радиационная биология*. 1998; 6 (38): 841-7.

REFERENCES

1. Gundarov I.A., Zil'bert N.L. Study of regional differences in the population morbidity and mortality from the standpoint of geographical latitude syndrome. *Vestnik akademii meditsinskikh nauk SSSR*. 1991; 11: 52-6. (in Russian)
2. Belisheva N.K., Petrov V.N. The Murmansk region's population health when implementing the strategy of the development of the Russian Federation's Arctic zone. *Trudy Kol'skogo nauchnogo tsentra*. 2013; 6 (19): 20. (in Russian)

3. Young T.K., Kelly J.J., Friborg J., Soininen L., Wong K.O. Cancer among circumpolar populations: an emerging public health concern. *International Journal of Circumpolar Health*. 2016; 75: 12.
4. Belisheva N. K., Talykova L. V., Mel'nik N. A. [Population effects of cosmic rays in high latitudes. Biomedical effects of radiation *Mediko-biologicheskie jeffekty dejstvija radiacii: materialy mezhdunar. konf. (10-11/04/2012)*]. Moscow: FGU FMBC im. A. I. Burnazyana FMBA Rossii; 2012. (in Russian)
5. Neri M., Ceppi M., Knudsen L.E., Merlo D.F., Barale R., Puntoni R. et al. Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environmental Health Perspectives*. 2005; 113: 1226-9.
6. Ingel' F.I. Prospects for the use of the micronucleus test on human blood lymphocytes cultivated under conditions of a cytokinetic block. Part 2. Environmental factors and individual characteristics in the system for assessing the instability of the human genome. Additional test capabilities. Experimental technique and cytogenetic analysis. *Ekologicheskaya genetika*. 2006; 4(4): 38-54. (in Russian)
7. Bukvic N., Gentile M., Susca F. et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat. Res*. 2001; 12 (498): 159-67.
8. Venkatachalam P., Solomon F. D., Prabhu B. K. et al. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentric and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res*. 1999; 1 (429): 1-12.
9. Ingel' F.I. Prospects for the use of the micronucleus test on human blood lymphocytes cultivated under conditions of a cytokinetic block. Part 1. Cell proliferation. *Ekologicheskaya genetika*. 2006; 3(4): 7-19. (in Russian)
10. Fenech M., Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*. 1985; 43 (172): 233-46.
11. Fenech M., Bonassi S., Turner J., Lando C., Ceppi M., Chang W. P. et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003; 1-2 (534): 45-64.
12. Pelevina I. I., Afanas'ev G. G., Aleshchenko A. V., Antoshchina M. M., Gotlib V. Ja., Konradov A. A. et al. Molecular-cellular consequences of the Chernobyl accident. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2011; 1 (51): 154-61.
13. Sycheva L.P. Biological significance, criteria for determination and limits of variation of the full spectrum of karyological parameters in assessing the cytogenetic status of a person. *Meditsinskaya genetika*. 2007; 6 (11): 3-12. (in Russian)
14. Gorovaya A.I., Klimkina I.I. The use of cytogenetic testing to assess the ecological situation and the effectiveness of the rehabilitation of children and adults with natural adaptogens. *Tsitologiya i genetika*. 2002; 5 (36): 21-5. (in Russian)
15. Shmakova N.L., Fadeeva T.A., Krasavin E.A. The effect of low doses of radiation on Chinese hamster cells. *Radiatsionnaya biologiya*. 1998; 6 (38): 841-7. (in Russian)

Поступила 11.11.20

Принята к печати 16.11.20