

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН НА ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ И РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Ж.А. Кучербаева

Представлены результаты изучения показателей микроядерного теста в клетках слизистой оболочки полости рта у женщин с физиологически протекающей беременностью, у беременных, кратковременно принимавших антибиотики и однократно получивших рентгеновское облучение в ранние сроки гестации.

Ключевые слова: беременность; буккальные эпителиоциты; антибиотики; рентгеновское облучение; микроядра.

В настоящее время известно, что многие лекарственные препараты могут вызвать врожденные пороки развития (ВПР), поскольку имеются доказательства их тератогенного или эмбриотоксического действия как у животных, так и у человека. Доказанный тератогенный эффект имеют и многие антибиотики и противогрибковые препараты. Также известно, что к группе факторов, обладающих тератогенным эффектом, относятся и рентгеновские лучи, которые могут оказывать прямое действие на генетический аппарат, разрушая главным образом ДНК клеточного ядра. Даже простая рентгеноскопия и рентгенография в ранние сроки беременности могут привести к нарушению морфогенеза эмбриона и органогенеза плода. До сих пор не оценены в количественном отношении последствия “малых” мутаций для жизнедеятельности человека к воздействию негативных факторов. Противоречивы данные о количественной зависимости

ВПР плода от уровня рентгеновского воздействия [1, с. 3–11].

Обнаружение клеток, имеющих в своем составе микроядра (МЯ), может позволить использовать их в качестве своеобразного маркера патологических изменений в организме беременных женщин [2, с. 22–23]. Образование МЯ свидетельствует не только об активации апоптоза, но и о наличии повреждений хромосом [3, с. 1–10].

Однако работы, посвященные изучению генотоксического эффекта при кратковременном приеме антибиотиков и однократном рентгеновском облучении у беременных в ранних сроках гестации методом исследования МЯ, отсутствуют, что обусловило необходимость проведения настоящих исследований.

Целью настоящего исследования было изучение генотоксических и цитотоксических эффектов в буккальных эпителиоцитах при кратковременном

приеме антибиотиков и однократном рентгеновском облучении у беременных женщин в ранние сроки гестации в аспекте формирования МЯ.

Материал и методы. В качестве объекта исследования послужили 28 беременных женщин, составивших клиническую группу: из них – 14 женщин применяли в течение 2–3 дней антибиотики (цефалоспорины, аминогликозиды, группы тетрациклина и др.) в сроке до 6 недель беременности (II клиническая группа) и 14 женщин подверглись рентгеновскому облучению в сроке до 6 недель беременности (III клиническая группа). В качестве контроля обследовано 30 женщин в сроке 4–10 недель беременности (I группа), не принимавших антибиотики и не проходивших рентгеновское облучение.

Образцы буккального эпителия женщин получали шпателем, предварительно смоченным в буферном растворе (Tris-HCL, EDTA, NaCl с pH 7.0), после чего шпатель ополаскивали в буферном растворе. Процедуру повторяли 4–5 раз с каждой стороны щеки до помутнения раствора. Клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут, надосадов отсасывали, осадок аспирировали буферным раствором доводимым объемом до 10 мл. Промывку проводили три раза, после третьей промывки осадок объемом 1 мл раскапывали на предметные стекла. Препараты фиксировали в ацетоуксусном фиксаторе в течение одного часа. Докрашивание цитоплазмы клеток проводили краской Романовского – Гимза. Анализ препаратов проводили на люминесцентном микроскопе “Олимпус” при увеличении $100 \times 1,5 \times 1,0$.

При подсчете МЯ учитывали отношение их количества к общему числу ядросодержащих клеток на 1000 клеток [4, с. 69–72]. Кроме учета МЯ проводили регистрацию ядерных аномалий, таких как двуядерность, конденсированность хроматина, пикноз, кариорексис, протрузии, ядра с центральной круговой насечкой, ядра с перинуклеарными и ядерными вакуолями, ядра атипичной формы и клетки с апоптозными телами [5, с. 53–56]. Клетки с конденсацией хроматина в ядре, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и апоптозными телами не подходят для учета МЯ, поэтому их частоту выражали как число клеток, найденных сверх 1000.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы “Statistica-6,0”.

Результаты и обсуждение. Как показали исследования (таблица 1), у беременных II клинической группы по сравнению с данными контрольной группы наблюдалось достоверное повышение

частоты клеток с МЯ ($P < 0,05$), а все анализируемые показатели находились в пределах колебаний частоты клеток контрольной группы ($P > 0,05$). Эти данные свидетельствуют о том, что при анализе МЯ-теста не прослеживается явной тенденции повреждения клеток при кратковременном употреблении антибиотиков. Однако при этом нельзя исключить тенденцию к тому, что при употреблении антибиотиков клетки обладают способностью к удалению части хромосом – МЯ, чем предотвращается запуск срабатывания системы их саморазрушения. Удаление МЯ в буккальном эпителии у беременных является приспособительным механизмом на генотоксическое воздействие антибиотиков.

Противоположная картина наблюдалась в III контрольной группе беременных женщин, получивших рентгеновское облучение в ранние сроки гестации плода. Так, отмечается достоверное увеличение частоты клеток с МЯ по сравнению с показателями I контрольной группы ($P < 0,001$). При этом частота клеток с протрузиями также значительно повышена ($P < 0,05$). Показатель частоты клеток с ядром атипичной формы не достигает достоверных значений ($P > 0,05$). Со стороны показателей пролиферации наблюдалось увеличение клеток с двумя ядрами ($P > 0,05$). Показатель частоты клеток с круговой насечкой не превышал значение контроля, но при этом суммарная частота пролиферации клеток значительно увеличивалась ($P < 0,05$). Показатели ранней стадии деструкции ядра свидетельствовали об увеличении частоты клеток с перинуклеарной вакуолью и вакуолизацией ядра, которые значительно выше показателей контроля ($P < 0,05$). При этом частота клеток с конденсацией хроматина достоверно снижается ($P < 0,05$). При завершении процессов деструкции ядра происходит увеличение клеток с кариопикнозом и апоптозными телами ($P < 0,05$), а частота клеток с кариолизисом значительно снижается ($P < 0,01$).

Образование МЯ происходит в результате повреждения ДНК либо (в случае повреждения веретена деления) они представлены одной или несколькими целыми хромосомами, оставшими в анафазе и не вошедшими в основное ядро. Протрузии, подобно МЯ, могут быть образованы фрагментами хромосом, ядерная оболочка вокруг которых соединена с оболочкой основного ядра. Некоторые протрузии образуются при “высыхании” в интерфазном ядре длинных плеч маркерных дицентрических хромосом, а также путем почкования интерфазных ядер в связи с удалением из ядра и из клетки амплифицированной ДНК и элиминацией из ядра ДНК-репарационных комплексов.

Таблица 1 – Кариологические показатели эксфолиативных клеток у беременных женщин, принимавших антибиотики и получивших рентгеновское облучение в период 1–6 недель гестации

Анализируемые показатели	Группа			Уровень достоверности, P	
	I контрольная, n = 30 (M ± m)	II клиническая, n = 14, (M ± m)	III клиническая, n = 14, (M ± m)	P ₁	P ₂
Цитогенетические показатели клеток					
с МЯ	0,393 ± 0,021	0,58 ± 0,02	0,74 ± 0,04	< 0,05	< 0,001
с протрузиями	3,4 ± 0,31	3,5 ± 0,44	4,3 ± 0,46	> 0,05	< 0,05
с МЯ и протрузиями	3,83 ± 0,36	4,08 ± 0,43	5,04 ± 0,48	> 0,05	< 0,05
с ядром атипичной формы	22,6 ± 1,85	23,5 ± 2,44	24,1 ± 2,01	> 0,05	> 0,05
Показатели пролиферации клеток					
с двумя ядрами	3,12 ± 0,29	3,3 ± 0,36	4,1 ± 0,32	> 0,05	< 0,05
с круговой насечкой	4,7 ± 0,41	4,9 ± 0,51	5,2 ± 0,34	> 0,05	> 0,05
суммарная частота	7,82 ± 0,43	8,2 ± 0,48	9,3 ± 0,33	> 0,05	< 0,05
Показатели ранней деструкции ядра					
с перинуклеарной вакуолью	30,3 ± 2,64	32,3 ± 1,98	41,2 ± 3,1	> 0,05	< 0,05
с конденсацией хроматина	225,0 ± 13,71	211,0 ± 20,85	184,0 ± 17,1	> 0,05	< 0,05
с вакуолизацией ядра	15,7 ± 1,92	16,7 ± 2,3	22,4 ± 2,3	> 0,05	< 0,05
Показатели завершения деструкции ядра					
с кариорексисом	5,4 ± 0,71	5,8 ± 0,88	6,1 ± 0,88	> 0,05	> 0,05
с кариопикнозом	12,1 ± 1,05	14,9 ± 1,99	18,4 ± 1,12	> 0,05	< 0,05
с кариолизисом	227,0 ± 30,1	213,0 ± 39,8	144,0 ± 32,9	> 0,05	< 0,01
с апоптозными телами	0,26 ± 0,018	0,3 ± 0,031	0,32 ± 0,019	> 0,05	< 0,05

Примечание: P₁ – достоверность II клинической группы по сравнению с I контрольной; P₂ – достоверность III клинической группы по сравнению с I контрольной.

Соответственно суммарные показатели частот цитогенетических нарушений в клетках буккального эпителия у женщин, подвергшихся рентгеновскому облучению, выше.

Оценка показателей пролиферации свидетельствует о том, что в результате более высокого полиплоидирующего ацитокинетического митоза частота эпителиоцитов с двумя ядрами становится выше. Признаки ранней деструкции ядра показывают, что у женщин III группы наблюдается активация некротических процессов в ткани, оцениваемой по частоте клеток с перинуклеарной вакуолью и вакуолизацией ядра. При более высоких значениях частоты клеток с вакуолизацией ядра происходят деструктивные изменения клеточных мембран и нарушение их барьерной и транспортной функций. Результаты частоты клеток с конденсацией хроматина и лизисом ядра свидетельствуют о снижении интенсивности обновления буккального эпителия у беременных в ранние сроки гестации плода.

Оценка значимости апоптоза в клеточной гибели клеток проведена по значениям частот выявления апоптозных тел и пикнотических ядер.

Оба показателя в III группе превышают значения контрольной группы. Известно, что апоптоз связан с нерепарируемыми или плохо репарируемыми повреждениями хромосом, такими как многочисленные разрывы ДНК, нарушение ее конформации, сшивка между цепями, а также с неправильной интеграцией хромосом.

Следовательно, даже однократное применение рентгеновского облучения у беременных женщин в ранние сроки гестации плода приводит к изменению интенсивности формирования МЯ в клетках, что может в дальнейшем привести к формированию врожденных пороков развития плода.

Выводы

1. При кратковременном употреблении антибиотиков беременными женщинами в ранние сроки гестации происходит удаление части хромосом – микроядер (МЯ).

2. Рентгеновское облучение в ранние сроки беременности сопровождается повышенной частотой выявления МЯ в клетках буккального эпителия женщин, ядерных протрузий, пролиферации клеток, клеток с некрозом и апоптозными телами.

Литература

1. *Ильин Д.А.* Формирование микроядер при воздействии светового излучения и обзор литературы / Д.А. Ильин // *Естествознание и гуманизм*. 2006. Т. 3. № 4. С. 1–10.
2. *Калаев В.Н.* Частота встречаемости клеток с микроядрами в плоском эпителии, полученном из соскобов с шейки матки женщин детородного возраста при различных физиологических состояниях, в норме и при воспалении / В.Н. Калаев, А.К. Буторина, О.Л. Кудрявцева // *Естествознание и гуманизм*. 2006. Т. 3. № 2. С. 22–23.
3. *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. № 11. С. 3–11.
4. *Юрченко В.В.* Использование микроядерного теста на эпителии слизистой оболочки щеки человека / В.В. Юрченко, Е.К. Кривцова, М.А. Подольская и др. // *Гигиена и санитария*. 2008. № 6. С. 53–56.
5. *Tolbert P.E.* Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development / P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.M. Allen // *Mut. Res.* 1992. V. 271. P. 69–77.