

ЧАСТОТА БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ С МИКРОЯДРАМИ У ЛИЦ, СТРАДАЮЩИХ ПАРОДОНТИТОМ

В. Н. Калаев, И. В. Игнатова, С. С. Карпова, О. В. Артемова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 15.04.2010 г.

Аннотация. Проведено исследование частоты встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии слизистой оболочки полости рта у подростков, страдающих пародонтитом. Выявлено влияние стадии заболевания пародонтитом и совместного влияния пола и стадии на уровень клеток с микроядрами в буккальном эпителии.

Ключевые слова: пародонтит, микроядро, нестабильность генома.

Abstract. A research of frequency of cells occurrence with micronuclei in buccal mucosa of the mouth cavity adolescents suffering from periodontitis was made. It is revealed the effect of disease stage of periodontitis and the joint effect of sex and stage on the level of the cells with micronuclei in buccal epithelium.

Keywords: periodontitis, micronuclei, genomic instability.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время при скрининговых обследованиях населения, в клинике для выявления ранних форм заболевания в качестве объекта изучения используют клетки буккального эпителия. Это неинвазивный тест, отражающий общее состояние организма. Одни авторы считают, что появление микроядер в клетках буккального эпителия служит индикатором воздействия ксенобиотиков [1], другие используют морфологические критерии клеток, оценивая тяжесть соматических патологий [2].

Одним из распространенных заболеваний слизистой ротовой полости является пародонтит, который представляет собой процесс разрушения морфологических структур пародонта, возникающий вследствие погружения защитного роста многослойного эпителия десны после нарушения непрерывности базальной мембраны в участке ее перехода в эмалево-дентинную границу.

В зависимости от длительности течения и характера изменений в пародонте различают пародонтит легкой, средней и тяжелой степени. При пародонтите легкой степени периодически появляются чувство зуда и неприятного ощущения в разных участках десны. Слизистая оболочка десны имеет бледно-розовую или бледную окраску. Имеются первые признаки обнажения цемента корня вследствие ретракции десны. Как правило, зубных отложений нет или они имеются в незначительном количестве.

При пародонтите средней тяжести могут быть жалобы на быстро проходящие боли в зубах от температурных, механических, химических раздражителей, «летучие» и неопределенные болевые ощущения в десне. Слизистая оболочка десны бледная, шейки зубов обнажены, на которых нередко имеются дефекты. Зубы устойчивы. Вследствие обнажения шеек зубов длина коронки увеличивается.

При пародонтите тяжелой степени могут быть быстро проходящие боли от температурных раздражителей, иногда резкая болезненность. Во время осмотра выявляется значительное обнажение шеек зубов наполовину и более длины корня, как правило, без признаков воспаления слизистой оболочки десневого края. При значительной убыли костной ткани возможна подвижность зубов [3].

Болезни пародонта — одни из самых распространенных заболеваний, поражающих по данным ВОЗ до 80 % населения, среди них на долю пародонтита приходится 60 % случаев [4].

Клетки буккального эпителия находятся в тесной связи с деснами человека. Возможно, пародонтит оказывает определенное влияние на изменения, происходящие в этих клетках, в частности на образование микроядер, что может отразиться на результатах микроядерного теста в клетках буккального эпителия.

В связи с этим целью работы явилось изучение влияния стадий заболевания пародонтитом на уровень клеток с микроядрами в буккальном эпителии ротовой полости и выявление влияния сопутствующих факторов (пола, групп крови (системы АВ0 и Rh) и стадии заболевания) на этот показатель.

© Калаев В. Н., Игнатова И. В., Карпова С. С., Артемова О. В., 2010

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны подростки в возрасте 14—18 лет. Соскобы слизистой полости рта были взяты у 79 человек (мальчики — 36 человек; девочки — 43 человек).

При приготовлении мазков подростки дважды полоскали рот водой. Стерильным шпателем с внутренней стороны щеки делали соскоб со слизистой оболочки щеки и помещали на обезжиренное предметное стекло, высушивали мазок на воздухе в течение нескольких минут. В качестве красителя использовали ацетоорсеин.

Анализ препаратов производили на микроскопе LABOVAL-4 (Carl Zeiss, Jena) при увеличении $40 \times 1,5 \times 10$. Препарат считается пригодным к изучению только в том случае, если клетки лежат в один слой. Для анализа микроядер отбирали отдельно лежащие клетки с непрерывным гладким краем ядра. Микроядро идентифицировали как хроматиновое тело округлой или овальной формы с гладким непрерывным краем, размером не более $1/3$ ядра, лежащее четко отдельно от ядра, не преломляющее свет, имеющее интенсивность окрашивания и рисунок хроматина как у основного ядра и находящееся в одной плоскости с ядром [1].

При подсчете микроядер учитывали отношение их количества к общему числу ядросодержащих клеток (в %). Статистическая обработка полученных данных велась на ПЭВМ с использованием пакета статистической программы Stadia. Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева [5]. Проводили сравнение частот встречаемости буккальных эпителиоцитов с микроядрами у больных пародонтитом, отличающихся по показателям пол, группа крови, резус фактор и стадия заболевания с использованием непараметрических X-критерия Ван-дер-Вардена. Коэффициент вариации (C_v) определяли по Лакину [6]. Пределы варьирования устанавливались по данным 95 % доверительного интервала. Для выявления влияния пола, группы крови, резус фактора и стадии заболевания использовали многофакторный дисперсионный анализ. Силу влияния фактора определяли по Снедекору (в %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что средняя частота встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии обследованных группа лиц составила $0,19 \pm 0,01$ %, что не превышает среднепопуляционных значений $0,2—0,5$ %

[7]. Индивидуальные значения клеток с микроядрами варьировал от $0,16$ % до $0,22$ % ($C_v = 63,2$ %).

Найденные нами средние значения частот клеток с микроядрами в буккальном эпителии достаточно хорошо совпадают с литературными данными для «нормальных» уровней микроядер в клетках буккального эпителия. При отсутствии генотоксических влияний частота буккальных эпителиоцитов с микроядрами для разных популяций варьирует от 0 до 9 на 1000 клеток [8] однако при наличии весомого давления какого либо фактора частота микроядер может существенно увеличиваться [9].

У девушек средний уровень клеток с микроядрами был несколько выше ($0,21 \pm 0,02$ %), чем у мужчин ($0,18 \pm 0,02$ %), однако различия не достигали статистически значимого уровня. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, которые показали, что спонтанная частота клеток с микроядрами не зависит от пола индивида [10]. Рядом авторов показано, что различия между полами по частоте микроядер в клетках буккального эпителия достигают значимых уровней примерно с 40 лет [11].

Однако, в работах ряда авторов [12] показана более высокая частоту встречаемости клеток с микроядрами, у женского пола, чем мужского.

Было показано, что уровень микроядер в буккальном эпителии достоверно повышен у курящих людей по сравнению с некурящими, причем у женщин он больше ($0,2 \pm 0,01$ %), чем у мужчин ($0,09 \pm 0,02$ %) [13].

Другие авторы высказываются за большую чувствительность мужского пола по сравнению с женским [14].

Четырехфакторный дисперсионный анализ показал, что на частоту встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии больных пародонтитом людей, не влияет группа крови и резус фактор, пол, но оказывает влияние стадия заболевания (сила влияния $99,7$ % ($P < 0,001$)), а также отмечено совместное влияние пола и стадии заболевания (сила влияния $6,3$ % ($P < 0,001$)).

У людей с первой стадией заболевания пародонтитом уровень клеток с микроядрами достоверно ниже ($0,13 \pm 0,02$ %), чем у людей со второй ($0,22 \pm 0,03$ % ($P < 0,001$)) и третьей стадией ($0,27 \pm 0,02$ % ($P < 0,001$)) (рис. 1).

У мужчин с первой стадии развития пародонтита уровень буккальных эпителиоцитов с микроядрами достоверно ниже ($0,14 \pm 0,03$ %), чем на второй ($0,26 \pm 0,04$ % ($P < 0,01$)) и третьей ($0,26 \pm 0,04$ % ($P < 0,05$)) (табл. 1).

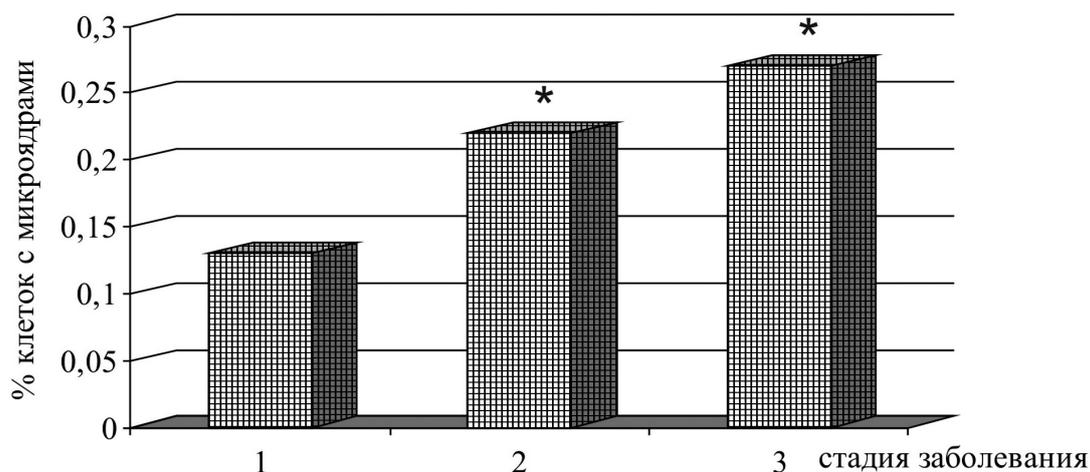


Рис. 1. Встречаемость клеток с микроядрами в буккальном эпителии человека при пародонтите: * — различия с первой стадией статистически достоверны ($P < 0,001$)

Для женщин с третьей стадией заболевания пародонтитом частота клеток с микроядрами выше ($0,27 \pm 0,02$ %), чем со второй ($0,17 \pm 0,03$ %) ($P < 0,01$) и первой ($0,12 \pm 0,02$ %) ($P < 0,001$) (табл. 1).

У юношей на первой и второй стадии заболевания пародонтитом уровень клеток с микроядрами в буккальном эпителии достоверно выше, чем у девушек ($P < 0,05$). Половые различия на обратимых стадиях заболевания пародонтитом могут быть обусловлены особенностями метаболизма и антиоксидантных систем [12], а также разными сроками становления иммунной и эндокринной систем. Активирование гормональной функции гонад происходит в 9—12 лет у девочек и в 12—14 лет у мальчиков. Поэтому в период проведения

исследований у девушек возможно перестроилась система гормональной защиты, а у юношей этот процесс еще не завершился. Так как патогенез пародонтита во многом обусловлен неспецифической защитой, специфическими иммунологическими процессами, действием медиаторов воспаления, то можно сказать, что женский организм более устойчив к этому воздействию.

Появление клеток с микроядрами часто связывают с развитием воспалительных процессов в организме [15], важную роль в которых играет апоптоз [16]. С развитием воспаления происходит увеличение доли aberrantных клеток. Это объясняется тем, что нарушение митотического деления при неблагоприятных условиях влечет за собой потерю части генетического материала, и морфологически выражается в формировании микроядер [17].

Таким образом, на основании проведенных исследований, можно говорить, что частота клеток с микроядрами у больных пародонтитом не превышала среднепопуляционные значения. Однако, данную группу людей нельзя использовать при проведении мониторинговых исследований для выявления действия факторов различной этиологии на организм человека, так как заболевание пародонтитом может отразиться на результатах исследования.

Показано совместное влияние стадии заболевания и пола на частоту aberrantных клеток (большая генетическая нестабильность отмечается у лиц мужского пола). Различия в частоте буккальных эпителиоцитов с микроядрами по принадлежности к группе крови, резус фактору и полу не установлены.

Таблица 1

Частота клеток с микроядрами в буккальном эпителии человека при пародонтите

Стадия заболевания пародонтозом	пол	
	мужской	женский
1	$0,14 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02^{*3}$
2	$0,26 \pm 0,04^1$	$0,17 \pm 0,03^{*4}$
3	$0,26 \pm 0,04^2$	$0,27 \pm 0,02$

Обозначения: * — различия между полами достоверны ($P < 0,05$); 1 — различия с юношами на первой стадии заболевания достоверны ($P < 0,01$); 2 — различия с юношами на первой стадии заболевания достоверны ($P < 0,05$); 3 — различия с девушками на третьей стадии заболевания достоверны ($P < 0,001$); 4 — различия с девушками на третьей стадии заболевания достоверны ($P < 0,01$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юрченко В. В. Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах / В. В. Юрченко, М. А. Подольская, Ф. И. Ингель и др. // Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. — 2007. — С. 220—267.
2. Быкова И. А. Результаты цитологического исследования отпечатков со слизистой оболочки полости рта у лиц пожилого возраста / И. А. Быкова, А. А. Агаджанян // Клин. Лаб. Диагн. — 1999. — № 2. — С. 33—35.
3. Боровский Е. В. Стоматология: Руководство к практическим занятиям / Е. В. Боровский, В. Н. Копейкин, А. А. Колесов и др. — М.: Медицина, 1987. — 164 с.
4. <http://www.med.aspirinby.org/index.php?go=Vox&in=view&id=27>
5. Кулаичев А. П. Методы и средства комплексного анализа данных / А. П. Кулаичев. — М.: ФОРУМ: ИНФА-М, 2006. — 512 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
7. Безруков В. Оценка уровня нестабильности генома зимовщиков / В. Безруков, Е. Моисеенко, С. Рушковский и др. // Вісник Київського університету. Біологія. — 2002. — Вип. 36—37. — С. 19—22.
8. Соболев М. В. Частота микроядер и уровень тревожности у школьников / М. В. Соболев, Е. С. Афанасьева, В. Ф. Безруков // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — Т. 6. — № 1. — С. 131—136.
9. Горювая А. И. Цитогенетическая оценка мутагенного фона в промышленном Приднестровье / А. И. Горювая, В. М. Дигурко, Т. В. Скворцова // Цитология и генетика. — 1995. — Т. 29. — № 5. — С. 16—22.
10. Романова О. П. Спонтанна частота микроядер у лімфоцитах периферійної крові жителів Києва / О. П. Романова, Л. К. Бездробна // Цитология и генетика. — 2001. — Т. 35, № 3. — С. 56—58.
11. Bonatti S. HUmAn MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei / S. Bonatti, P. H. Lohman, F. Berends et al. // Environmental and Molecular Mutagenesis. — 2001. — V. 37. — P. 31—45.
12. Маймулов В. Г. Цитогенетические нарушения в соматических клетках у детей, проживающих в районах с различной интенсивностью загрязнения окружающей среды / В. Г. Маймулов, Л. В. Китаева, Т. В. Верещагина и др. // Цитология. — 1998. — Т. 40. — № 7. — С. 686—689.
13. Калаев В. Н. Влияние факторов различной этиологии на встречаемость клеток с микроядрами в буккальном эпителии человека / В. Н. Калаев, А. А. Саженков // 6 Сибирский физиологический съезд: тез. докл (25—27 июня 2008 г., г. Барнаул). — Барнаул: Принтэкспресс, 2008. — Т. 2. — С. 11.
14. Буторина А. К. Влияние пола и возраста детей на частоту встречаемости микроядер в буккальном эпителии ротовой полости / А. К. Буторина, В. Н. Калаев, С. С. Карпова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия химия, биология. — 2000. — № 6. — С. 143—145.
15. Calveley V. L. Partial volume rat lung irradiation: temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation / V. L. Calveley, M. A. Khan, I. W. Yeung et al. // Int. J. Radiat. Biol. — 2005. — V. 81. — № 12. — P. 887—899.
16. Murphy F. J. Targeting inflammatory diseases via apoptotic mechanisms / F. J. Murphy, I. Hayes, T. G. Cotter // Curr. Opin. Pharmacol. — 2003. — V. 3. — № 4. — P. 412—419.
17. 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 // Естественное и гуманизм — 2006. — Т. 3. — № 2. — С. 22—23.

Калаев Владислав Николаевич — доц. каф. генетики, цитологии и биоинженерии, биолого-почвенный факультет, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208876, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Карпова Светлана Сергеевна — м.н.с. каф. генетики, цитологии и биоинженерии, биолого-почвенный факультет, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208852, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Артемова Ольга Валентиновна — соискатель, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208852, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Игнатова Ирина Викторовна — аспирант, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208876, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Kalaev Vladislav N. — Assoc. dep. Genetics, cytology and Bioengineering, Biological Faculty, Voronezh State University, tel.: (4732) 208876, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Karpova Svetlana S. — JRS dep. Genetics, cytology and Bioengineering, Biological Faculty, Voronezh State University, tel.: (4732) 208852, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Artyomova Olga V. — applicant, Voronezh State University, tel.: (4732) 208852, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Ignatova Irina V. — graduate student, Voronezh State University, tel.: (4732) 208876, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru