

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА АНАЛИЗИРУЕМЫХ БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ НА ПРЕПАРАТЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА

Н. А. Соболева<sup>1</sup>, В. Н. Калаев<sup>2</sup>, М. С. Нечаева<sup>1</sup>, Е. А. Калаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 01.07.2016 г.

**Аннотация.** Обсуждается проблема получения статистически значимых результатов при заданном уровне доверительной вероятности для редких событий (обнаружение аберрантных клеток). Проведены расчеты для определения минимального объема выборки по формуле Животовского и на основании закона распределения Пуассона. Получены весьма близкие значения, но формула Животовского не требует размышлений о характере распределения выборки. Минимальный объем обследуемой выборки для получения результата с заданной доверительной вероятностью при частоте встречаемости аберрантных клеток 1 - 6 на 1000 находится в интервале 500 - 3000 клеток при  $P = 0.95$ ; 767 - 4600 клеток при  $P = 0.99$ ; 1150 - 6900 клеток при  $P = 0.999$ .

**Ключевые слова:** микроядерный тест, минимальный объем выборки, формула Животовского закон распределения Пуассона, уровень значимости.

**Abstract.** The problem of obtaining statistically significant results for a given level of probability of rare events (detection of aberrant cells) is discussed. The calculations to determine the minimum sample size using Zhivotovsky's formula and the Poisson's law of the distribution was held. It has been obtained very similar values, but Zhivotovsky's formula does not require a reflection on the nature of the sample distribution. The minimum volume of the examined sample to obtain the result with a predetermined probability of occurrence at the frequency of aberrant cells 1 - 6 on 1000, is in the range 500 - 3000 cells at  $P = 0.95$ ; 767 - 4600 cells at  $P = 0.99$ ; 1150 - 6900 cells at  $P = 0.999$ .

**Keywords:** micronucleus test, the minimum sample size, Zhivotovsky's formula, Poisson's law of the distribution, the level of significance.

Микроядерный тест буккального эпителия последние десятилетия активно используется учеными многих стран для выявления влияния факторов различной этиологии на генетический гомеостаз человека [1 - 7]. Однако до сих пор нет общепринятого мнения о необходимом для анализа количестве эпителиальных клеток. Некоторые исследователи просматривают до 500 клеток [8 - 10] на препарате, большинство ученых анализируют не менее 1000 [11 - 18] или 2000 клеток [19 - 23]. Martino-Roth [24] и Hol-

land [25] советуют анализировать до 3000 клеток. Tolbert [26] считает необходимым просматривать не менее 1000 клеток с увеличением их числа до 2000 - 3000 в случаях, если было найдено менее 5 клеток с микроядрами. Kashyap [6] отмечает, что хотя в большинстве исследований просматривают от 1000 до 3000 клеток, существует предположение о необходимости учета 10000 клеток для получения статистически значимых результатов.

Средняя частота встречаемости клеток с микроядрами у здорового человека 18 - 45.7 лет по данным Мамуйлова и соавт. [22] равна 0.63 - 0.64 %; по мнению Юрченко [20] - 0.33 %. В исследованиях Буториной [27] у детей в возрас-

те 3 - 7 лет средняя частота встречаемости клеток с микроядрами составила  $1.1 \pm 0.2$  %; Беляевой [28] для детей в возрасте 5 - 8 лет фоновый уровень эпителиоцитов с микроядрами установлен в диапазоне  $0.42 \pm 0.25$  %. Средняя частота встречаемости микроядер в исследованиях Соболев [29] составила  $2.5 \pm 0.11$  %. Dawasaz [30] у испытуемых в возрасте 21 - 40 лет обнаружил в среднем 5,21 клеток с микроядрами на 2000 просмотренных клеток. Nersesyan [1] говорит об 1 - 3 микроядрах на 1000 клеток. Kashyap [6] отмечает, что диапазон частот встречаемости клеток с микроядрами достаточно широк (0.05 - 11.5 клеток на 1000), но в среднем колеблется между 0.5 и 2.5 на 1000 клеток.

Несовпадение данных, по-видимому, обусловлено различиями в методиках при выполнении теста разными авторами.

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось обоснование минимального размера выборки при проведении микроядерного теста с заданной доверительной вероятностью  $P$  95.0 %, 99.0 %, 99.9 %.

#### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Известна формула Животовского (1), представленная им в 1991 году в книге «Популяционная биометрия» [31]:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-\pi)}, \quad (1)$$

где  $P$  – заданная вероятность наличия хотя бы одной особи с искомым признаком;  $\pi$  – частота искомого признака в генеральной совокупности,  $N$  – объём выборки, в которой будет присутствовать искомым объект.

Значение  $N$  округляют в большую сторону в случае нецелого числа. Объёмы выборок для различных значений генеральной частоты  $\pi$  рассчитаны Л.А. Животовским и представлены в табл. 1.

Опираясь на данные о средней частоте встречаемости клеток с нарушениями у здоровых индивидуумов (0.1 – 0.3 %), нами было рассчитано количество клеток, которое необходимо анализировать на препарате при проведении микроядерного анализа в буккальном эпителии с учетом

закона распределения в выборке для получения результата с заданной доверительной вероятностью.

Если учитывать, что распределение вероятностей встречаемости клеток с патологиями не подчиняется нормальному закону, а связано с биномиальным распределением, то можно опереться на закон Пуассона, который, как известно, является предельным для биномиального распределения, если одновременно устремлять число опытов  $n$  к бесконечности, а вероятность  $p$  – к нулю, причем их произведение  $np$  сохраняет постоянное значение  $np = a$ . [32]:

$$P_{m,n} = C_n^m p^m (1-p)^{n-m}, \quad (2)$$

где  $P$  – доверительная вероятность,  $n$  – число испытаний,  $m$  – число «успехов» (обнаружения aberrantных клеток),  $p$  – средняя частота встречаемости искомого признака в выборке;  $C_n^m$  – число сочетаний из  $n$  исходов по  $m$  раз ( $C_n^m = n! / m! (n-m)!$ )

Это предельное свойство биномиального закона часто находит применение на практике. Допустим, производится большое количество независимых опытов  $n$ , в каждом из которых событие  $A$  имеет очень малую вероятность  $p$ . Тогда для вычисления вероятности  $P_{m,n}$  того, что событие  $A$  появится ровно  $m$  раз, можно воспользоваться приближенной формулой (3):

$$P_{m,n} \approx \frac{(np)^m}{m!} e^{-np}, \quad (3)$$

где  $np = a$  – параметр закона Пуассона, которым приближенно заменяется биномиальное распределение.

Вероятность нулевого события равна по данной формуле  $P_n(0) = e^{-np}$ . Вероятность противоположного события равна  $1 - e^{-np}$ .

Пусть вероятность того, что в случайно взятом материале буккального эпителия человека будет найдена клетка с микроядром равна  $p = 0.003$ . Считая применимым закон редких событий, вычислим, сколько клеток буккального эпителия необходимо просмотреть, чтобы с вероятностью  $P = 0.95$  найти хотя бы одну клетку с микроядром.

События «найден клетка с микроядром» (обозначим через  $P$ ) и «не найдена ни одна клет-

Таблица 1

Объём выборки  $N$ , в которой с вероятностью  $P$  хотя бы одна особь имеет признак, распространенный в исследуемой группе с частотой  $\pi$  [31]

| Вероятность $P$ | Генеральная частота признака $\pi$ |      |       |        |         |
|-----------------|------------------------------------|------|-------|--------|---------|
|                 | 0.05                               | 0.01 | 0.001 | 0.0001 | 0.00001 |
| 0.950           | 59                                 | 299  | 3000  | 30000  | 300000  |
| 0.990           | 90                                 | 495  | 4600  | 46000  | 461000  |
| 0.999           | 135                                | 688  | 6900  | 69000  | 691000  |

ка с микроядром» (обозначим через  $Q$ ), очевидно, являются противоположными. Следовательно,  $P + Q = 1$ , откуда

$$P = 1 - Q = 1 - P_n(0) = 1 - e^{-a} \quad (4)$$

По условию  $P = 0.95$ , следовательно  $e^{-a} = 0.05$ , откуда  $a = np = 3$ , то есть  $n = a/p = 3 / 0.003 = 1000$ .

Таким образом, искомое количество клеток, которое необходимо исследовать, чтобы с вероятностью  $P = 0.95$  найти хотя бы одну клетку с микроядром при  $p = 0.003$  равно 1000 штук.

Аналогично вычислим, сколько необходимо рассмотреть клеток, чтобы, например, с вероятностью  $P = 0.98$  найти хотя бы одну клетку с микроядром. По условию  $P = 0.98$ , или  $1 - e^{-a} = 0.98$ . Откуда  $e^{-a} = 0.02$ . Найдем  $e^{-3.9} = 0.02$ ,  $np = 3.9$ . Отсюда  $n = 3.9 / 0.003 = 1300$ . Таким образом, надо просмотреть 1300 клеток, чтобы найти хотя бы одну клетку с патологией с вероятностью  $P = 0.98$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенных вычислений для определения объема выборки (в нашем случае - количества клеток буккального эпителия человека, необходимого для обнаружения хотя бы одной клетки с патологией ядра при проведении микроядерного анализа) при различных значениях частоты  $p$  и доверительной вероятности  $P$  представлены в табл. 2.

Таблица 2

*Минимальное число клеток буккального эпителия человека, необходимое для выявления с заданной вероятностью хотя бы одной клетки с патологией ядра при проведении микроядерного анализа*

| Частота встречаемости клеток с микроядрами на 1000 клеток | Заданная доверительная вероятность |          |           |
|---|------------------------------------|----------|-----------|
|   | $P=0.95$                           | $P=0.99$ | $P=0.999$ |
| 1   | 3000                               | 4600     | 6900      |
| 2   | 1500                               | 2300     | 3450      |
| 3   | 1000                               | 1534     | 2300      |
| 4   | 750                                | 1150     | 1725      |
| 5   | 600                                | 920      | 1380      |
| 6   | 500                                | 767      | 1150      |

Следует заметить, что вычисления по формулам (1) и (4) дают идентичные результаты. Вместе с тем, формула Животовского (1) не требует размышлений о характере распределения выборки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать вывод, что минимальное число клеток, которое необходимо анализировать на препарате при проведении ми-

кроядерного анализа в буккальном эпителии, для получения результата с заданной доверительной вероятностью при частоте встречаемости аберрантных клеток 1 - 6 на 1000, находится, соответственно, в интервале от 3000 до 500 при  $P=0.95$ ; от 4600 до 767 при  $P=0.99$ ; от 6900 до 1150 при  $P=0.999$ .

Данные табл. 1, 2 свидетельствуют о том, что объем выборки возрастает при увеличении значения задаваемой доверительной вероятности  $P$  и уменьшении частоты встречаемости искомого признака. Как отмечает Л.А. Животовский, «это означает, что если мы хотим с большей «надежностью»  $P$  гарантировать обнаружение нужной редкой особи, то мы должны быть готовы к «просеиванию» выборки большей численности».

*Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2014 – 2016 годы. Проект № 1035.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Использование микроядерного теста на эпителии слизистой оболочки щеки человека / В.В. Юрченко [и др.] // Гигиена и санитария. — 2008. — № 6. — С. 53 – 56.
2. Nersesyan A.K. The micronucleus assay in exfoliated human cells: a mini – review of papers from the CIS / A.K. Nersesyan, A.I. Ilin // Цитология и генетика. — 2007. — V. 41, № 2. — P. 56 – 66.
3. Сычева Л.П. Цитогенетический статус эксфолиативных клеток человека как биомаркер генотоксического, цитотоксического и канцерогенного действия факторов окружающей среды / Л.П. Сычева, В.С. Журков, Ю.А. Ревазова // 5 Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина. — М., 2009. — Ч. 2. — С. 352.
4. Buccal micronucleus cytome assay / P. Thomas [et al.] // Nature Protocols. — 2009. — V. 4. — P. 825 – 837.
5. The HUMAN MicroNucleus project on exFOliated buccal cells (HUMN(XL)): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol / S. Bonassi [et al.] // Mutation Research. — 2011. — V. 728, № 3. — P. 88–97.
6. Kashyap V. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases / V. Kashyap, P.S. Reddy // Journal of Cancer Research and Therapeutics. — 2012. — V.8, № 2. — P. 184–191.
7. Калаев В.Н., Артюхов В.Г., Нечаева М.С. Микроядерный тест буккального эпителия рото-

вой полости человека: проблемы, достижения, перспективы / В.Н. Калаев, М.С. Нечаева, В.Г. Артюхов // Цитология и генетика. — 2014. — Т. 48, № 6. — С. 62 - 80

8. Горовая А.И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами / А.И. Горовая, И.И. Климкина // Цитология и генетика. — 2002. — Т. 36, № 5. — С. 21 – 25.

9. Микроядерный тест в буккальном эпителии детей, проживающих в районах Центрально-Черноземного региона с различным уровнем антропогенного загрязнения окружающей среды / С.С. Карпова [и др.] // Актуальные проблемы медицины и биологии: сб. науч. раб. — Томск, 2003. — Вып. 2. — С. 58 – 62.

10. Increased frequency of micronuclei in diabetes mellitus patients using pioglitazone and glimepiride in combination / Noor Ahmad Shaik [et al.] // Food and Chemical Toxicology. — 2010. — V. 48, № 12. — P. 3432 – 3435.

11. Левински М. В. Анализ встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии и уровень сывороточных антител среди детского и взрослого населения, проживающего в различных районах города Кишинева / М.В. Левински, В.Н. Калаев, А.К. Буторина // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». — 2008. — № 2. С. 12 – 17.

12. Джамбетова П. М. Оценка влияния загрязнения почв нефтепродуктами на цитогенетический статус и показатели апоптоза в клетках буккального эпителия у детей / П.М. Джамбетова, Л.Г. Молочаева, А.Б. Махтиева // Экологическая генетика человека. — 2009. — Т. 7, № 4. — С.34 – 40.

13. Калаев В.Н. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма: учебное пособие / В.Н. Калаев, С.С. Карпова. — Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2004. — 80 с.

14. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography / E.M.M. Cerqueira [et al.] // Dentomaxillofacial Radiology — 2008. — № 37. — P. 398–403.

15. Изменение частоты встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии военнослужащих в течении года / В.Н. Калаев [и др.] // Актуальные проблемы охраны здоровья лиц молодого возраста: сб. материалов. — Брянск, 2010. — С. 128 – 134.

16. Palaskar S. Evaluation of micronuclei using Papanicolaou and May-Grunwald-Giemsa stain in individuals with different tobacco habits – a comparative study / S. Palaskar, C. Jindal // Journal of Clinical and Diagnostic Research. — 2010. — V. 4. — P. 3607–3613.

17. Biomonitoring of genotoxic and cytotoxic effects of gingival epithelial cells exposed to digital panoramic radiography / A. Pai [et al.] // Journal of Orofacial Sciences.—2012.—V.4,№2.—P.124–128.

18. Cytogenetic abnormality in exfoliated cells of buccal mucosa in head and neck cancer patients in the Tunisian population: Impact of different exposure sources / R. Khelifi [et al.] // BioMed Research International. — 2013. — V. 2013. — <http://dx.doi.org/10.1155/2013/905252/>

19. Ramirez A. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas / A. Ramirez, P. H. Saldanha // Genetics and Molecular Research. — 2002. — V. 1, № 3. — P. 246 – 260.

20. Анализ частоты микроядер и ядерных аномалий в эпителиальных клетках слизистой щеки у женщин, контактирующих с диоксинами / В.В. Юрченко [и др.] // Токсикологический вестник. — 2000. — № 3. — С. 2 – 6.

21. Голубь А.А. Выявление микроядер в эпителии слизистой оболочки полости рта у курящих студентов / А.А. Голубь, Т.С. Чемикосова, О.А. Гуляева // Проблемы стоматологии. — 2010. — Т. 1, № 6. — С. 7 – 9.

22. Оценка частоты микроядер в эпителиоцитах слизистой оболочки полости рта у дошкольников в районах с различной интенсивностью загрязнения окружающей среды / В.Г. Маймулов [и др.] // Научно-методические и законодательные основы обеспечения генетической безопасности факторов и объектов окружающей и производственной среды в целях сохранения здоровья человека: материалы объединенного Пленума Научных советов Минздравсоцразвития Российской Федерации и РАМН по экологии человека и гигиене окружающей среды и по медико-экологическим проблемам здоровья работающих. — М., 2010. — С. 106 – 107.

23. Микроядерный тест как индикатор эффекта действия хлорорганических пестицидов / А.Х. Майрапетян [и др.] // Ученые записки ЕГУ. — 2008. — Т. 2, № 216. — С. 153–155.

24. Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages / M.G. Martino-Rothl [et al.] // Genetics and Molecular Biology.—2002.—V.25,№4.—P.495–500.

25. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps / N. Holland [et al.] // Mutation Research. — 2008. — V. 659, № 1-2. — P. 93–108.

26. Tolbert P.E. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users / P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen // Am. J. Epidemiol. — 1991. — V. 134, № 8. — P. 840–850.

27. 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 ВГУ. Серия химия и биология. — 2000. — № 2. — С. 143–145.

28. Медико-биологические критерии оценки влияния загрязнения окружающей среды на здо-

ровье населения / Н.Н. Беляева [и др.] // Гигиена и санитария. — 2003. — № 6. — С. 77–79.

29. Соболев М.В. Частота микроядер в клетках буккального эпителия у школьников Украины разного возраста и пола / М.В. Соболев, В.Ф. Безруков // Цитология и генетика. — 2007. — Т. 41, № 4. — С. 56–58.

30. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay / A.A. Dawasaz [et al.] // Dental Materials Journal. — 2013. — V. 32, № 3. — P. 519–521.

31. Животовский Л.А. Популяционная биометрия / Л.А. Животовский. — М.: Наука, 1991. — 271 с.

32. Вентцель Е.С. Теория вероятностей: учебник для вузов / Е.С. Вентцель. — М.: Высш. шк., 1999. — 576 с.

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*Соболева Н. А., кандидат технических наук, инженер-математик кафедры стоматологии института дополнительного профессионального образования*

*E-mail: natasable@yandex.ru*

*Нечаева М. С., ассистент кафедры нормальной физиологии*

*Тел.: 8(951)8741420*

*E-mail: mar-y-ana@ya.ru*

*Воронежский государственный университет*  
*Калаев В. Н., доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, цитологии и биоинженерии*

*Тел.: 8(472)2208876*

*E-mail: Dr\_Huixs@mail.ru*

*Калаева Е.А., кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии*

*Тел.: 8(473)2208586*

*E-mail: kalaevae@gmail.com*

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*Soboleva N. A., Ph.D., mathematical engineer of the Department of dentistry Institute of additional professional education*

*E-mail: natasable@yandex.ru*

*Nechaeva M. S., assistant of normal physiology department*

*Ph.: 8(951)8741420*

*E-mail: mar-y-ana@ya.ru*

*Voronezh State University*  
*Kalaev V. N., doctor of biology, professor of the Genetic, cytology and bioengineering department*

*Ph.: 8(473)2208876*

*E-mail: Dr\_Huixs@mail.ru*

*Kalaeva E. A., Ph.D., associate professor of the Department of biophysics and biotechnology*

*Ph.: 8(473)2208586*

*E-mail: kalaevae@gmail.com*