

УДК 616: 575.2

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МАЛЫХ ДОЗ КАДМИЯ**Агбальян Е.В., Шинкарук Е.В.***ГКУ ЯНАО «Научный центр изучения Арктики», Салехард, e-mail: agbelena@yandex.ru*

Одним из самых распространенных поллютантов является кадмий. Значительная часть населения подвержена воздействию малых доз кадмия в связи с табакокурением. Содержание кадмия в крови курильщиков в 4-5 раз выше, чем у некурящих лиц. Изучены цитогенетические и цитотоксические показатели эксфолиативных клеток населения при воздействии малых доз кадмия методом полиорганного кариологического теста. Малые дозы кадмия, не вызывая изменений цитогенетических и пролиферативных показателей, оказывают влияние на показатели апоптоза. На ранней стадии деструкции ядра в несколько раз повышается активность карюлизиса и перенуклеарной вакуолизации.

Ключевые слова: кадмий, генотоксические показатели, пролиферация, апоптоз, буккальный эпителий**CHARACTERIZATION OF THE GENOTOXIC AND CITOTOXIC EFFECTS OF SMALL DOSES OF CADMIUM****Agbalyan E.V., Shynkaruk E.V.***State Public Institution of Yamalo-Nenets Autonomous District Scientific Research Centre of the Arctic, Salekhard, e-mail: agbelena@yandex.ru*

One of the most common pollutants is cadmium. A significant portion of the population exposed to low doses of cadmium in connection with tobacco Smoking. The content of cadmium in the blood of smokers have 4-5 times higher than non-smokers. Studied the cytogenetic and cytotoxic indicators exfoliative cells of the population when exposed to low doses of cadmium method micronucleus test. Small doses of cadmium without causing cytogenetic changes and proliferative indices that influence the indicators of apoptosis. At an early stage of destruction of the nucleus is several times more active karyolysis and perinuclear vacuolization.

Keywords: cadmium, genotoxic parameters, proliferation, apoptosis, buccal epithelium

Факторы экологического риска оказывают непосредственное воздействие на здоровье населения. Одним из самых распространенных поллютантов является кадмий. Кадмий в виде сульфида содержится в красках, в никель-кадмиевых аккумуляторах, в солнечных батареях, в сплавах металлов (сплав Вуди), в дыме от сжигания угля и дров, в фосфорных удобрениях, на свалках и местах переработки мусора.

Кадмий присутствует в табачном дыме, образуя при сжигании оксид кадмия. Значительная часть населения подвержена воздействию малых доз кадмия в связи с табакокурением. Известно, что у лиц, выкуривающих до 30 сигарет в день, за 40 лет в организме накапливается 13-52 мкг кадмия, что превышает его количество, поступающее с пищей [7]. Содержание кадмия в крови курильщиков в 4-5 раз выше, чем у некурящих лиц [10], в моче курильщиков концентрация кадмия составляла 0,71 мкг/г, тогда как у некурящих – 0,26 мкг/г [11].

Кадмий относится к стойким токсическим веществам с канцерогенным и мутагенным действием, обладает высокой кумулятивной активностью. По степени канцерогенной опасности для человека в соответствии с классификацией Международного агентства по изучению рака

(МАИР, 1982) кадмий входит в подгруппу 2А – «агент, вероятно являющийся канцерогенным».

Научный интерес представляет изучение эффектов влияния кадмия на кариологические показатели популяции клеток человека. Клетки буккального эпителия являются первичными мишенями воздействия токсикантов. Микроядерный анализ в буккальных эпителиоцитах признан экспресс-методом выявления мутагенной активности веществ различной природы [6].

Исследование проводилось в рамках темы НИР 04.11.20 «Экологический мониторинг исконной среды обитания коренного малочисленного населения Ямало-Ненецкого автономного округа», включенной в окружной план научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ на 2014 год.

Цель исследования – изучить цитогенетические показатели эксфолиативных клеток при воздействии малых доз кадмия.

**Материалы
и методы исследования**

Сформирована репрезентативная выборка из числа жителей национального села Ныда Надымского района Ямало-Ненецкого автономного округа в количестве 67 человек, из них 28 % мужчин и 72 %

женщин (табл. 1). Средний возраст обследованных составил $47,6 \pm 14,1$ лет. В исследование не включены лица, перенесшие вирусные инфекции в период трех месяцев до сбора материала. В группу воздействия малыми дозами кадмия включены обследованные лица со статусом «курение» – 28 человек. Контролем служили обследованные некурящие жители – 39 человек. Группы воздействия и контроля не отличались по полу, возрасту и этнической принадлежности.

значений (M) и стандартных отклонений (SD), t – критерий Стьюдента, Манна-Уитни. При уровне $p < 0,05$ различия оценивались как статистически значимые.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка цитогенетических эффектов воздействия малых доз кадмия на популяцию клеток буккального эпителия проведена на основании показателей «частота

Таблица 1

Характеристика выборки

	Все обследованные	Группа воздействия	Группа контроля
Количество обследуемых	67	28	39
из них мужчин	19 (28%)	9 (32%)	10 (26%)
женщин	48 (72%)	19 (68%)	29 (74%)
Средний возраст, (M±SD)	$47,6 \pm 14,1$	$47,5 \pm 14,1$	$47,4 \pm 13,8$

На следующей степени исследования мы провели анализ длительного воздействия малыми дозами кадмия и выделили две группы, не отличающиеся по полу, возрасту, этнической принадлежности. В первую группу вошли лица со стажем курения более 15 лет, в другую группу некурящие.

Препараты клеток буккального эпителия были подготовлены в соответствии с методическими рекомендациями Беляевой Н.Н. (2005). Окраска клеток осуществлялась 2,5% раствором ацетоорсеина при 37°C в течение 1 ч., цитоплазму докрасивали 1% раствором светлого зеленого. Микроскопирование проводилось при увеличении $\times 1000$ на приборе Микромед 2. На каждом препарате анализировали 1000 клеток в соответствии с классификацией и критериями Л.П. Сычевой [8, 9].

Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica v.8.0 и включал описание средних

клеток с микроядрами» и «частота клеток с протрузиями» (табл. 2, рис. 1). Выявлены различия изучаемых показателей на уровне тенденций. Незначительно выше частота клеток с микроядрами у лиц, подверженных воздействию малых доз кадмия по сравнению с группой контроля ($0,303 \pm 0,577\%$ против $0,281 \pm 0,544\%$, $p > 0,05$). Фоновая частота клеток с микроядрами варьирует от 0,25 до 1,30%.

Пролиферативная активность эксфолиативных клеток не отличалась в группах воздействия и контроля (рис. 2). Доля клеток с двумя ядрами и более при воздействии малых доз кадмия составила $1,061 \pm 1,085\%$ при фоновой частоте в пределах 2,76-5,12%.

Таблица 2

Цитогенетические и пролиферативные показатели клеток буккального эпителия на фоне воздействия малых доз кадмия (‰)

Кариологические показатели	Все обследованные (n = 67) M±SD	Группа воздействия (n = 28) M±SD	Группа контроля (n = 39) M±SD
Частота клеток с микроядрами	$0,313 \pm 0,578$	$0,303 \pm 0,577$	$0,281 \pm 0,544$
Частота клеток с протрузиями	$1,105 \pm 1,067$	$1,091 \pm 1,069$	$1,125 \pm 1,068$
Частота клеток с двумя и более ядрами	$1,045 \pm 1,085$	$1,061 \pm 1,085$	$1,047 \pm 1,096$
Частота клеток со сдвоенными ядрами	$3,941 \pm 1,536$	$2,0 \pm 1,547$	$2,031 \pm 1,541$

Примечание. Статистически достоверных отличий средних значений показателей в сравниваемых группах не выявлено.

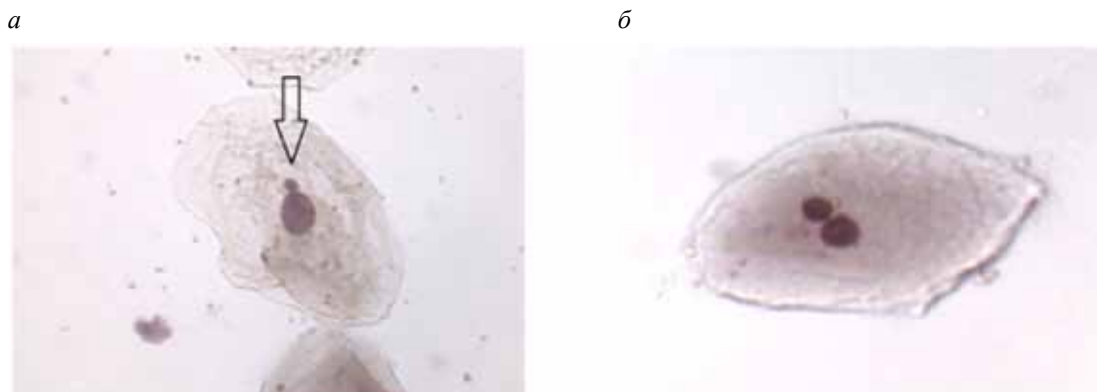


Рис. 1. Цитогенетические нарушения в клетках буккального эпителия у жителей с.Ныда ЯНАО: а – микроядро; б – протрузия 2-го типа «разбитое яйцо»



Рис. 2. Показатели пролиферации (удвоение генетического материала) в клетках буккального эпителия жителей с. Ныда ЯНАО – сдвоенное ядро

Характеристика раннего апоптоза клеток буккального эпителия на фоне кадмиевого воздействия основана на результатах анализа частоты клеток с перинуклеарной вакуолью, вакуолизацией ядра, конденсацией хроматина (табл. 3, рис. 3). Статистически значимые различия получены для такого показателя некроза

клетки как частота клеток с перинуклеарной вакуолью. В группе воздействия данный показатель ниже, чем в группе сравнения и был равен $7,258 \pm 4,891\%$ против $7,328 \pm 2,966\%$. Доля клеток с нарушениями ранней стадии деструкции ядра у всех обследованных соответствует фоновым значениям.

Таблица 3

Показатели апоптоза клеток буккального эпителия населения села Ныда ЯНАО на фоне воздействия малых доз кадмия (%)

Кариологические показатели	Все обследованные (n = 67) M±SD	Группа воздействия (n = 28) M±SD	Группа контроля (n = 39) M±SD
Частота клеток с перинуклеарной вакуолью	7,224±4,862	7,258±4,891	7,328±2,966*
Частота клеток с повреждением ядерной мембраны	0,910±1,047	0,909±1,055	0,922±1,050
Частота клеток с конденсацией хроматина	3,194±2,913	3,312±2,931	3,219±2,966
Частота клеток с началом кариолизиса	2,672±1,888	2,697±1,891	2,672±1,921
Частота клеток с кариорексисом	6,552±4,240	6,652±4,194	6,672±4,298
Частота клеток с кариопикнозом	5,224±3,894	5,258±3,913	4,875±3,252*
Частота клеток с завершённым кариолизисом	9,209±6,366	9,349±6,311	9,109±6,399

Примечание. * – $p < 0,05$.

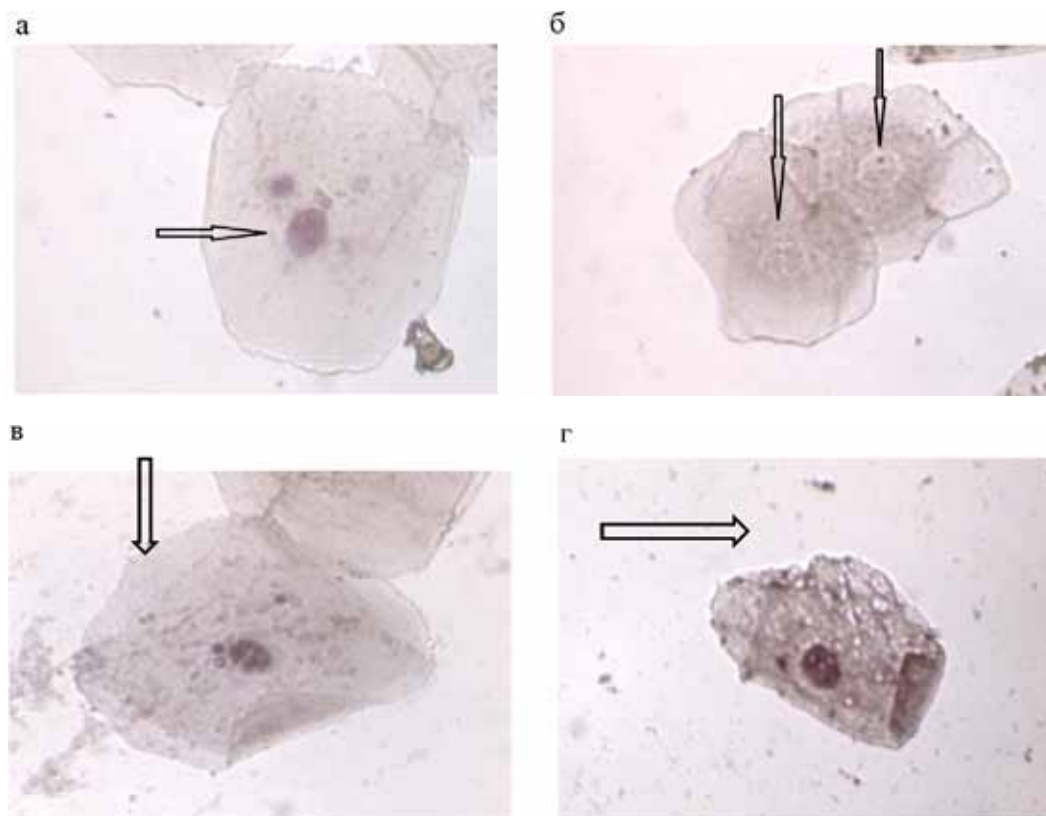


Рис. 3. Показатели деструкции ядра (апоптоза/некроза):
 а – лизис (растворение) ядра клетки; б – полный лизис ядра клетки; в – кариорексис;
 г – вакуолизация ядра

Показатели завершения деструкции ядра эксфолиативных клеток при воздействии малых доз кадмием не превышают фоновые частоты: доля клеток с кариопикнозом составила $5,258 \pm 3,913\%$ (фоновые значения – $25,85 \pm 0,85\%$), доля клеток с кариорексисом – $6,652 \pm 4,194\%$ (фоновые значения – $7,13 \pm 0,58\%$), доля клеток с кариолизисом – $9,349 \pm 6,311\%$ (фоновые значения – $42,63 \pm 2,20\%$). На фоне воздействия малыми дозами кадмия выше частота кле-

ток с кариопикнозом, что свидетельствует о повышении роли ферментов конденсации и активном преобразовании конденсированного хроматина в пикнотическое состояние.

Анализ цитогенетических и пролиферативных кариологических показателей эксфолиативных клеток при длительном воздействии малых доз кадмия (более 15 лет) не выявил статистически значимых различий между группами воздействия и сравнения (табл. 4).

Таблица 4

Показатели цитогенетического и цитотоксического действия длительных малых доз кадмия (более 15 лет)

Кариологические показатели	Группа воздействия (n = 5) M±SD	Группа контроля (n = 5) M±SD	U – критерий Манна – Уитни
Частота клеток с микроядрами	0,80±0,683	0,0±0,0	5 (p>0,05)
Частота клеток с протрузиями	1,8±1,065	0,8±0,683	6,5 (p>0,05)
Частота клеток с двумя и более ядрами	2,0±0,816	1,2±1,342	8 (p>0,05)
Частота клеток со сдвоенными ядрами	3,2±1,862	2,0±1,414	7 (p>0,05)

В нашем исследовании малые дозы кадмия оказывают влияние на показатели апоптоза (табл. 5). На ранней стадии деструкции ядра в несколько раз повышается активность начальных этапов кариолизиса и перенуклеарная вакуолизация. Средние показатели группы воздействия в 3,5 раза выше по уровню клеток с перинуклеарной вакуолью и в 2,6 раза выше по уровню клеток с началом кариолизиса в сравнении с группой контроля. При этом частота клеток с конденсацией хроматина ниже при длительном воздействии малых доз кадмия, чем в группе сравнения (1,0±0,8% против 3,4±1,7%, p<0,05).

ция процесса перекисного окисления липидов и нарастание свободных радикалов в клетке на фоне увеличения концентрации ионов кадмия внутри клетки [4].

Заключение. Малые дозы кадмия не оказывают цитогенетического воздействия на клетки буккального эпителия обследованного населения. Пролиферативная активность эксфолиативных клеток не изменялась на фоне малых доз кадмия. Цитотоксические эффекты длительного воздействия малыми дозами кадмия проявлялись в повышении активности кариолизиса и перенуклеарной вакуолизации, нарушении клеточного гомеостаза.

Таблица 5

Показатели деструкции ядра на фоне воздействия длительных малых доз кадмия (более 15 лет) (%)

Кариологические показатели	Группа воздействия (n = 5) M±SD	Группа контроля (n = 5) M±SD	U – критерий Манна – Уитни
Частота клеток с перинуклеарной вакуолью	18,0±6,272	5,20±1,770	1 (p<0,01)
Частота клеток с конденсацией хроматина	1,0±0,817	3,4±1,693	2 (p<0,05)
Частота клеток с началом кариолизиса	4,6±0,730	1,8±1,342	0 (p<0,01)
Частота клеток с кариорексисом	10,2±5,697	5,6±2,921	7 (p>0,05)
Частота клеток с кариопикнозом	4,4±2,049	4,0±2,708	10 (p>0,05)
Частота клеток с завершённым кариолизисом	3,0±2,309	9,4±6,648	6,5 (p>0,05)

Повышенная активация апоптоза является звеном патогенеза нейрогенеративных и миелодиспластических заболеваний, а также ишемических повреждений разных тканей [5]. Малые дозы кадмия приводят к нарушению клеточного гомеостаза за счет цитотоксического эффекта и выступают в роли пускового механизма нарушения апоптоза.

По результатам нашего исследования воздействие малых доз кадмия на кариологические показатели клетки слабое и не вызывает значимого изменения цитогенетических и пролиферативных показателей. Аналогичные данные получены в исследованиях многих авторов [1,2,3]. Нами показано, что воздействие малых доз кадмия приводит к деструктивным изменениям в клетках. Длительное воздействие малых доз кадмия нарушает клеточный метаболизм. Ионы Cd²⁺ встраиваются в кальций-зависимые регуляторные системы клетки. Есть работы, в которых показано прямое влияние кадмия на аденин и гуанин, компоненты нуклеотидов ДНК [4]. В нашем исследовании повреждения ДНК не происходит, ферментативные репликационные и репарационные системы сохраняют высокую активность и предохраняют от возникновения хромосомных перестроек. Основным звеном в механизме цитотоксического действия кадмия является интенсифика-

Список литературы

1. Дружинин В.Г. Хромосомные нарушения у населения крупного промышленного региона: пространственно-временной цитогенетический мониторинг: дис... докт. биол. наук. – М., 2003. – С. 206.
2. Иванов К.Ю., Никанорова Е.А., Хаймович Т.И., Снигирева Г.П. Влияние факторов нерадиационной природы на состояние генома клеток крои профессионалов-атомщиков // Научные труды IV Международной конференции «Человек и электромагнитные поля». – Саров, 2013.
3. Мейер А.В. Молекулярные и клеточные маркеры чувствительности буккальных эпителиоцитов человека к воздействию излучений радона в бытовых условиях: автореф. канд. биол. наук. – М., 2013. – 23 с.
4. Мирзоев Э.Б., Кобялко В.О. Механизмы цитотоксического действия кадмия при однократном и хроническом воздействии на крыс // Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии: Тезисы докладов Российской научной конференции с международным участием. – СПб: ООО «Изд-во Фолиант», 2011. – С. 111.
5. Пальцев М.А. Молекулярная медицина: достижения и перспективы // Молекулярная медицина. – 2004. – № 4. – С. 3-12.
6. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. Под ред. Рахманина Ю.А., Сычевой Л.П. – М.: «Гениус», 2007. – 312 с.
7. Ревич Б.А. Экологическая эпидемиология: Учебник для высш. учеб. заведений / Б.А. Ревич, С.Л. Авалиани, Г.И. Тихонова; под ред. Б.А. Ревича. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 384 с.
8. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. // Медицинская генетика. – 2007. – № 11. – С. 3-11.
9. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека // Гигиена и санитария. – 2012. – №6. – С. 68-72.
10. Impact of different reference period definitions in the quantification of alcohol consumption: results from a nationwide steps survey in Mozambique / J. Pires, P. Padrao, A. Damasceno [et al.] // Alcohol and Alcoholism. – 2012. – Vol. 47, №3. – P. 328-333.
11. Tellez-Plaza M., Navas-Acien A. et al. Reduction in Cadmium Exposure in the United States Population, 1988-2008: The Contribution of Declining Smoking Rates // Environmental Health Perspectives, 2012. – 120, 2. – p. 204-209.