

УДК 611.311-053.2

ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ У ДЕТЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

¹Куркин А.В., ²Рыбалкина Д.Х., ¹Барышев Б.Б.

¹Медицинский университет Астана, Нур-Султан;

²Медицинский университет Караганды, Караганда, e-mail: alexandr194126@inbox.ru

Для идентификации стадий дифференцировки буккальных эпителиоцитов у детей разного возраста проведен денситометрический анализ оптической плотности ядер клеток в мазках окрашенных азур-эозином и оптической плотности содержания гликогена в цитоплазме эпителия в препаратах окрашенных шифф-реактивом. Показано, что независимо от возраста ребенка с увеличением степени дифференцировки эпителиоцитов в них уменьшаются показатели ядерно-цитоплазматического отношения, увеличивается показатель оптической плотности ядра, падает средняя оптическая плотность и среднее количество гликогена. Возрастные особенности заключаются в большем содержании среднего количества гликогена в цитоплазме клеток 3-й, 4-й и 5-й стадий дифференцировки в период первого детства и достоверно меньших значений площадей клеток и ядер эпителиоцитов всех стадий дифференцировки у подростков. Анализ корреляционных связей показал, что между стадией дифференцировки клеток и оптической плотностью ядер эпителиоцитов, между стадией дифференцировки клеток и оптической плотностью и содержанием гликогена имеются прямые сильные связи. Таким образом, к критериям идентификации клеток эпителия полости рта наряду с визуальной оценкой следует отнести денситометрическое определение оптической плотности ядер эпителиоцитов и содержания в цитоплазме клеток гликогена.

Ключевые слова: оптическая плотность ядра, оптическая плотность гликогена, буккальные эпителиоциты, дети

DENSITOMETRIC CHARACTERISTICS OF BUCCAL EPITHELIAL CELLS IN CHILDREN OF DIFFERENT AGES

¹Kurkin A.V., ²Rybalkina D.Kh., ¹Baryshev B.B.

¹Astana Medical University, Nur Sultan;

²Karaganda Medical University, Karaganda, e-mail: alexander194126@inbox.ru

To identify the stages of differentiation of buccal epithelial cells in children of different ages, a densitometric analysis of the optical density of the nuclei of cells in smears stained with azure-eosin and the optical density of glycogen content in the cytoplasm of the epithelium in preparations stained with cipher-reagent was carried out. It was shown that, regardless of the age of the child, with an increase in the degree of differentiation of epithelial cells in them, the indicators of the nuclear-cytoplasmic ratio decrease, the index of the optical density of the nucleus increases, the average optical density and the average amount of glycogen fall. Age features consist in a higher content of the average amount of glycogen in the cytoplasm of cells of the 3rd, 4th and 5th stages of differentiation during the first childhood and significantly lower values of cell areas and epithelial cells of all stages of differentiation in adolescents. Analysis of correlations showed that there are direct strong connections between the stage of differentiation of cells and the nucleus optical density of epithelial cells, between the stage of differentiation of cells and optical density and glycogen content. Thus, the criterion for the identification of cells of the epithelium of the oral cavity along with a visual assessment should include the densitometric determination of the optical density of epithelial cells and the content of glycogen cells in the cytoplasm.

Keywords: optical density of the nucleus, optical density of glycogen, buccal epithelial cells, children

Буккальный эпителий является традиционным объектом цитологического исследования, преимуществом которого является неинвазивное для исследуемого взятие материала с приготовлением мазков и отпечатков. Он играет важную роль в диагностике социально значимых заболеваний [1, 2]. Буккальные эпителиоциты могут быть индикатором местных и общих нарушений гомеостаза у взрослых и детей [3–5]. Для идентификации стадий дифференцировки буккальных эпителиоцитов необходимо учитывать их характерные цитологические особенности: форму и размеры клеток, интенсивность окраски цитоплазмы и ядра. Находит применение морфометрическое исследование площа-

дей ядра и цитоплазмы, определение ядерно-цитоплазматического отношения, денситометрическое исследование клеток для дифференцировки эпителиоцитов. Этот метод основан на избирательном поглощении различными веществами лучей со строго определенной длиной волны. Интенсивность поглощения света зависит от концентрации вещества. Наши исследования показали, что у детей при оптической плотности ядра от 0,004 усл. ед. и ниже в основном встречаются эпителиоциты 3-й стадии развития, оптической плотности от 0,06 до 0,10 усл. ед. содержатся клетки 4-й стадии. И при значениях показателя от 0,14 и выше определяются клетки 5-й стадии дифференцировки [6, 7].

Цель исследования: изучение и сопоставление денситометрических параметров оптической плотности ядра и оптической плотности содержания гликогена в цитоплазме эпителиоцитов разной стадии дифференцировки у детей различного возраста.

Материалы и методы исследования

В период первого детства (от 4 до 7 лет) было обследовано 56 здоровых детей, во втором детстве изучены мазки 67 детей. В пубертатный период (13–16 лет) исследование проведено на 39 подростках. До забора материала дети прополаскивали ротовую полость физиологическим раствором. Соскоб эпителия получали пластиковым шпателем со слизистой щеки. Мазки эпителия переносили на предметные стёкла, высушивали и фиксировали в спиртацетоне (1:1) в течение 5 мин окрашивали метиленовым синим (15 мин), затем азурэозином в течение 30 мин. Для изучения содержания в цитоплазме клеток гликогена мазки окрашивались шифф-реактивом. В мазках определяли в процентах клетки различных стадий дифференцировки на 1000 клеток. Для морфоденситометрического исследования использован комплекс: микроскоп, видеокамера и компьютер. В каждой возрастной группе получали черно-белые изображения эпителиоцитов каждой стадии дифференцировки в формате JPG. Всего цитометрическому и денситометрическому исследованию подвергнуто более 10000 эпителиальных клеток. Затем определяли площади клеток, их ядер в $\mu\text{м}^2$ и ядерно-цитоплазматическое отношение. Затем денситометрически исследовали среднюю плотность и содержание гликогена в цитоплазме. Для изучения тинкториальных свойств ядер эпителиоцитов разной стадии дифференцировки определяли оптическую плотность интерфазного ядра. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью профессионального пакета статистических программ Statsoft «Statistica-6», методами вариационной статистики. При корреляционном анализе применяли коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди буккальных эпителиоцитов во всех возрастных группах детей в норме в соскобе различают клетки 3-й, 4-й, 5-й и 6-й стадий дифференцировки. Они отличаются процентным содержанием, формой, размерами, площадью ядра и цитоплазмы.

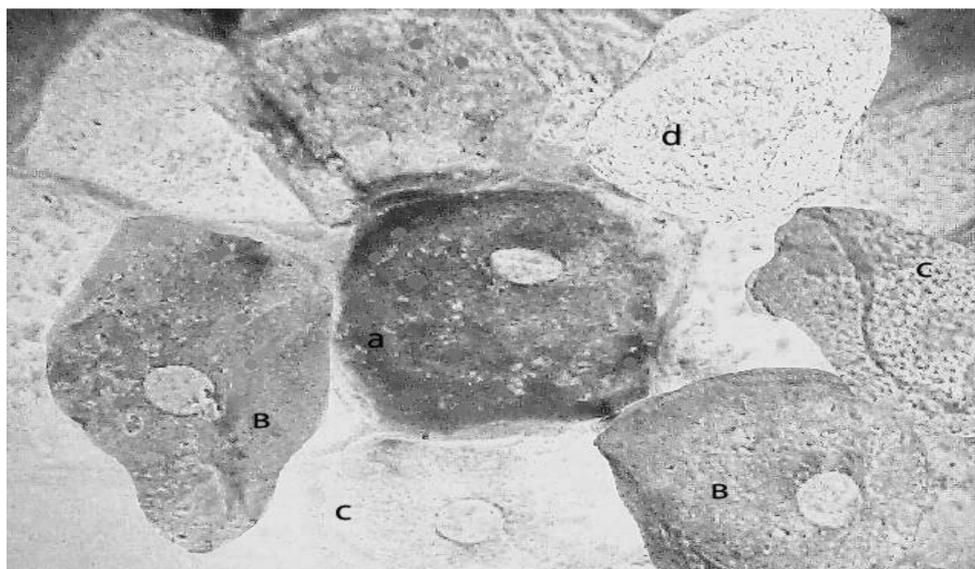
В период первого детства содержание клеток 3-й стадии дифференцировки в цитограмме незначительно и составляет $2,7 \pm 0,53\%$, Число эпителиоцитов 4-й

стадии равно $31,1 \pm 1,70$, клеток 5-й стадии превалирует и составляет $58, \pm 2,35$. С повышением степени кератинизации поверхностные клетки превращаются в безъядерные – 6-й стадии дифференцировки. Процент клеток 6-й стадии в цитограмме равен $2,1 \pm 0,27$. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 3-й стадии равняется $0,05 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,03 \pm 0,001$ усл. ед.

В клетках 3 стадии дифференцировки содержится большое количество гранул гликогена, которые заполняют всю цитоплазму, окрашивая её в пурпурный цвет. Наблюдается тенденция к формированию конгломератов. Средняя оптическая плотность гликогена в клетках равна $0,244 \pm 0,0197$ усл. ед. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 4-й стадии равняется $0,04 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,08 \pm 0,002$ усл. ед. Цитоплазма клеток 4-й стадии сохраняет положительную реакцию на гликоген, но интенсивность окраски по сравнению с клетками 3-й стадии уменьшается, гранулы гликогена диффузно рассеяны по всей цитоплазме. Оптическая плотность гликогена клеток 4-й стадии дифференцировки существенно уменьшается ($p < 0,001$) и имеет значение $0,07 \pm 0,009$ усл. ед. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 5-й стадии равняется $0,03 \pm 0,001$.

Оптическая плотность ядер составляет $0,18 \pm 0,004$ усл. ед. Гликоген в эпителиальных клетках 5-й стадии дифференцировки выявляется в незначительном количестве, цитоплазма имеет бледнорозовый цвет. Средний денситометрический показатель гликогена в эпителиоцитах 5-й стадии равен $0,03 \pm 0,004$ усл. ед., интенсивность окрашивания по сравнению с предшествующей стадией продолжает снижаться ($p < 0,01$). Безъядерные пластинки бедны гликогеном, а некоторые клетки лишены его (рисунок). Средняя оптическая плотность гликогена в роговых чешуйках равна $0,01 \pm 0,002$ усл. ед. это минимальный показатель из всех стадий дифференцировки ($p < 0,001$). Анализ средней оптической плотности гликогена показывает, что в процессе дифференцировки эпителиоцитов чётко прослеживается снижение содержания гликогена в клетке ($p < 0,001$).

В период второго детства количество клеток 3-й стадии дифференцировки в цитограмме невелико ($2,5 \pm 0,46\%$), доля эпителиоцитов 4-й стадии дифференцировки равняется $24,0 \pm 1,83\%$, клетки 5-й стадии составляют $64,4 \pm 2,87\%$. Процент безъядерных пластинок в цитограмме равен $2,5 \pm 0,09\%$. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 3-й стадии равняется $0,05 \pm 0,001$.



Фрагмент мазка щеки здорового ребёнка. ШИК-реакция, $\times 630$. Гликоген в эпителиоцитах: а – 3-й, в – 4-й, с – 5-й, d – 6-й – стадий дифференцировки

Денситометрические показатели буккальных эпителиоцитов у детей разного возраста

Стадии эпителиоцитов	Возраст детей	ЯЦО	оптическая плотность ядра	оптическая плотность гликогена
3	первое детство	$0,05 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,001$	$0,24 \pm 0,019$
	второе детство	$0,05 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,015$
	подростки	$0,05 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,002$	$0,19 \pm 0,011$
4	первое детство	$0,04 \pm 0,001^*$	$0,08 \pm 0,002^*$	$0,07 \pm 0,009^*$
	второе детство	$0,04 \pm 0,001^*$	$0,08 \pm 0,002^*$	$0,06 \pm 0,008^*$
	подростки	$0,04 \pm 0,001^*$	$0,08 \pm 0,002^*$	$0,05 \pm 0,003^*$
5	первое детство	$0,03 \pm 0,001^*$	$0,18 \pm 0,004^*$	$0,03 \pm 0,004^*$
	второе детство	$0,03 \pm 0,001^*$	$0,19 \pm 0,004^*$	$0,02 \pm 0,005^*$
	подростки	$0,03 \pm 0,001^*$	$0,17 \pm 0,003^*$	$0,02 \pm 0,005^*$
6	первое детство			$0,01 \pm 0,002^*$
	второе детство			$0,01 \pm 0,002$
	подростки			$0,01 \pm 0,001$

Оптическая плотность ядер составляет $0,03 \pm 0,003$ усл. ед. Средний денситометрический показатель гликогена в клетках 3-й стадии равен $0,21 \pm 0,015$ усл. ед. Показатели не имеют существенной разницы при сравнении с детьми 3–7 лет. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 4-й стадии равняется $0,04 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,08 \pm 0,002$ усл. ед. Денситометрический параметр гликогена клеток 4-й стадии в сравнении с 3-й стадией дифференцировки значимо снижается ($p < 0,001$) и имеет значение $0,06 \pm 0,008$ усл. ед., при этом достоверно не изменяясь с предыдущим возрастным периодом. Ядерно-цитоплазматическое

отношение эпителиоцитов 5-й стадии равняется $0,03 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,19 \pm 0,004$ усл. ед. Средний денситометрический показатель гликогена в эпителиоцитах 5-й стадии равен $0,02 \pm 0,005$ усл. ед. Интенсивность окрашивания в клетках по сравнению с предшествующей стадией дифференцировки и предшествующим периодом детства снижается ($p < 0,05$).

Средняя оптическая плотность гликогена в роговых чешуйках равна $0,01 \pm 0,002$ усл. ед. без достоверной разницы между клетками 5-й стадии дифференцировки и безъядерными пластинками периода первого детства.

У подростков содержание клеток 3-й стадии дифференцировки в цитограмме незначительно и составляет $1,9 \pm 0,48\%$, Число эпителиоцитов 4-й стадии равно $19,4 \pm 1,47$, клеток 5-й стадии превалирует и составляет $69,8 \pm 3,12$. Процент клеток 6-й стадии в цитограмме равен $4,9 \pm 0,47$.

Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 3-й стадии равняется $0,05 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,03 \pm 0,002$ усл. ед. Эпителиоциты при гистохимической реакции на гликоген визуально сохраняют тинкториальные свойства. Оптическая плотность гликогена в клетках 3-й стадии составляет $0,19 \pm 0,011$ усл. ед., что не имеет существенной разницы при сравнении с детьми 8–12 лет. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 4-й стадии равняется $0,04 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,08 \pm 0,002$ усл. ед. Оптическая плотность гликогена эпителиоцитов 4-й стадии в сравнении с 3-й стадией дифференцировки снижается ($p < 0,001$) и имеет значение $0,05 \pm 0,003$ усл. ед., при этом достоверно не изменяясь с предыдущим возрастным периодом. Ядерно-цитоплазматическое отношение эпителиоцитов 5-й стадии равняется $0,03 \pm 0,001$. Оптическая плотность ядер составляет $0,17 \pm 0,003$ усл. ед. Денситометрический показатель гликогена эпителиоцитов 5-й стадии равен $0,02 \pm 0,005$ усл. ед., что существенно не изменяется по сравнению с 3-й стадией и с периодом второго детства. Средняя оптическая плотность гликогена в роговых чешуйках равна $0,01 \pm 0,001$ усл. ед. без достоверной разницы между клетками 5-й стадии дифференцировки и безъядерными пластинками периода второго детства.

Заключение

Независимо от возраста ребёнка с увеличением степени дифференцировки эпителиоцитов в них уменьшаются показатели ядерно-цитоплазматического отношения, увеличивается показатель оптической плотности ядра, падает средняя оптическая плотность и среднее количество гликогена. Однако цитометрический способ по значениям ядерно-цитоплазматического значения не позволяет дифференцировать эпителиоциты 3-й и 4-й стадий. Денситометрический способ повышает качество диагностики стадий буккального эпителия.

трический способ повышает качество диагностики стадий буккального эпителия.

Возрастные особенности заключаются в большем содержании среднего количества гликогена в цитоплазме клеток 3-й, 4-й и 5-й стадий дифференцировки в период первого детства и достоверно меньших значений площадей клеток и ядер эпителиоцитов всех стадий дифференцировки у подростков. Анализ корреляционных связей показал, что между стадией дифференцировки клеток и оптической плотностью ядер эпителиоцитов, между стадией дифференцировки клеток и оптической плотностью и содержанием гликогена, между оптической плотностью ядер и оптической плотностью гликогена в цитоплазме эпителиоцитов имеются прямые сильные связи. Таким образом, к критериям идентификации клеток эпителия полости рта наряду с визуальной оценкой следует отнести денситометрическое определение оптической плотности ядер эпителиоцитов и содержания в цитоплазме клеток гликогена.

Список литературы

1. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Линькова Н.С., Костылев А.В. Сигнальные молекулы в буккальном эпителии: оптимизация диагностики социально значимых заболеваний // Молекулярная медицина. 2012. № 4. С. 18–23.
2. Полякова В.О., Пальцева Е.М., Крулевский В.А. Буккальный эпителий. Новые подходы к молекулярной диагностике социально значимой патологии. СПб.: Изд-во Н-Л, 2015. 128 с.
3. Юй Р.И. Цитологический анализ слизистой оболочки полости рта как достоверный критерий оценки её гистофизиологии, патологии и эффективности лечения // Вестник КазНМУ. 2006. № 1. С. 299–314.
4. Доменюк Д.А., Давыдов Б.Н., Ведешина Э.И., Ивченко Л.Г. Отклонения цитологических и функциональных показателей буккального эпителия у больных с аутоиммунным сахарным диабетом // Научно-практический журнал Института стоматологии. Сентябрь, 2017. № 3 (76). С. 74–77.
5. Мейер А.Б. Генотоксические и цитотоксические в буккальных эпителиоцитах детей, проживающих в экологически различающихся районах Кузбасса // Цитология. 2010. Т. 52. № 4. С. 305–310.
6. Куркин А.В., Рыбалкина Д.Х. Способ определения стадий дифференцировки буккальных эпителиоцитов в мазке слизистой оболочки полости рта // База патентов Казахстана № патента 21838, автор. свидет. на изобрет. от 16.11.2009. бюл. № 11 (72).
7. Куркин А.В., Рыбалкина Д.Х. Морфоденситометрические параметры в оценке стадий дифференцировки буккальных эпителиоцитов у детей // Астана медицинский журнал. 2010. № 4 (62). С. 128–131.