

Юрченко В.В., Ингель Ф.И., Юрцева Н.А., Кривцова Е.К., Ахальцева Л.В.

ЭФФЕКТЫ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА В ЛИМФОЦИТАХ И ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ЩЕКИ ДЕТЕЙ В ГОРОДЕ С ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва

Введение. Анализ литературы показал, что в атмосферных выбросах целлюлозно-бумажного производства (ЦБП) присутствуют генотоксиканты – мутагены и канцерогены. Кроме того, в разных странах у рабочих ЦБП был выявлен дополнительный риск возникновения онкологических заболеваний, что позволяет предположить высокую его вероятность у жителей города, в котором расположено ЦБП. Признанным индикатором генотоксического воздействия является повышенный уровень нестабильности генома, определяемый, в частности, в микроядерном тесте.

Цель исследования – сравнительный анализ эффектов нестабильности генома в двух тканях второклассников, школы которых находятся на разном расстоянии от ЦБП.

Материал и методы. Исследование проведено в г. Коряжма Архангельской области, где градообразующим предприятием является ЦБП. Территории, на которых располагались школы, подразделили на 3 группы по удалённости от ЦБП. Эффекты нестабильности генома детей 8–9 лет определяли цитомным анализом в микроядерном тесте параллельно на двух тканях – лимфоцитах крови, культивированных с цитохалазином В, и эпителиоцитах слизистой оболочки щеки.

Результаты. На культуре лимфоцитов крови выявлена связь между показателями нестабильности генома (включая частоты клеток с микроядрами и нуклеоплазменными мостами, апоптоз, а также изменения спектра клеточных популяций) и расстоянием между ЦБП и школами, в которых учились обследованные дети. В буккальных эпителиоцитах проявления эффектов нестабильности генома носили менее систематический характер, что не позволило сделать определённого заключения. В то же время в обоих тестах выявлены гендерные различия в показателях цитомного анализа (например, зависимость частоты лимфоцитов с генетическими повреждениями от удалённости школ от ЦБП была ярче выражена у мальчиков).

Заключение. По результатам исследования и с учётом данных литературы сформулирована гипотеза о том, что выраженность гендерных различий по показателям цитомного анализа может указывать на присутствие токсических и/или генотоксических соединений в компонентах окружающей среды.

Ключевые слова: целлюлозно-бумажное производство; нестабильность генома младших школьников; микроядерный тест; культура лимфоцитов крови; эпителиоциты слизистой щеки; гендерные различия; эмоциональное состояние детей и их родителей.

Для цитирования: Юрченко В.В., Ингель Ф.И., Юрцева Н.А., Кривцова Е.К., Ахальцева Л.В. Эффекты нестабильности генома в лимфоцитах и эпителиоцитах щеки детей в городе с целлюлозно-бумажным производством. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(12): 1392-1401. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-12-1392-1401>

Для корреспонденции: Ингель Фаина Исааковна, доктор биол. наук, зав. лаб. генетической токсикологии с группой цитогистологии ФГБУ «ЦСП» Минздрава России. E-mail: fainaigel@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «ЦСП» Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: общий план исследования, поиск источников литературы, взятие образцов буккального эпителия; цитомный анализ эпителиоцитов, анализ, интерпретация полученных данных и данных литературы, написание статьи, окончательное утверждение работы для публикации – Юрченко В.В.; идея, общий план исследования, поиск источников литературы, культивирование клеток крови, приготовление цитогенетических препаратов, цитомный анализ лимфоцитов, интерпретация полученных данных и данных литературы, редакция статьи, окончательное утверждение работы для публикации – Ингель Ф.И.; цитомный анализ лимфоцитов, поиск источников литературы, анализ и интерпретация полученных данных и данных литературы, написание статьи, окончательное утверждение работы для публикации – Юрцева Н.А.; поиск источников литературы, цитомный анализ эпителиоцитов и лимфоцитов, написание статьи, окончательное утверждение работы для публикации – Кривцова Е.К.; поиск источников литературы, анализ и интерпретация полученных данных и данных литературы, написание статьи, окончательное утверждение работы для публикации – Ахальцева Л.В.

Поступила 09.07.2019

Принята к печати 17.09.19

Опубликована: декабрь 2019

Yurchenko V.V., Ingel F.I., Urtseva N.A., Akhaltseva L.V.

EFFECTS OF GENOME INSTABILITY IN LYMPHOCYTES AND BUCCAL EPITHELIOCYTES OF CHILDREN FROM THE CITY WITH BIG PULP AND PAPER INDUSTRY

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. Analysis of literature has shown genotoxicants (mutagens and carcinogens) to be present in the atmospheric emissions of pulp and paper industry (PPI). Moreover, among PPI workers from different countries, there was identified an additional risk of cancer, which suggests its high probability among residents of the cities where the PPI is located. The recognized index of genotoxic effects is an increased level of genome instability, which is determined, in particular, in the micronucleus test.

The scope of the study - the comparative analysis of the effects of genomic instability in the two tissues - blood lymphocytes cultured with Cytochalasin B, and buccal epithelial cells in the second grade school children (8-9 years old, boys and girls), whose schools were located at different distances from the pulp and paper mill.

Material and methods. The study was carried out in the city of Koryazhma, the Arkhangelsk Region (42000 citizens), where the pulp and paper plant as the city-forming industry was located. For the analysis, we subdivided the territories on which the schools were located, into 3 groups according to their distance from the pulp and paper mill. The effects of genomic instability were determined by cytome analysis in the micronucleus test.

Results. Cytome analysis of cultivated lymphocytes demonstrated that levels of genome instability indices (including cell frequencies with micronuclei and nucleoplasm bridges, apoptosis, as well as changes in the spectrum of cell populations) to decrease along with the rising the distance between the pulp and paper mill and schools where the children go. In buccal epithelial cells, the manifestations of genomic instability effects were less systematic, which did not allow making a definitive conclusion. At the same time, in both tests, gender differences in the results of cytome analysis were revealed (for example, the alteration of frequency of lymphocytes with genetic damage dependence on the distance between schools and the PPI was more pronounced among boys).

Conclusion. According to the results of this study and taking into consideration the data of literature, we hypothesized that the discovering of gender dimorphism in the effects of genome instability may indicate the presence of toxic and/or genotoxic compounds in an environment.

Key words: pulp and paper industry; genome instability in younger schoolchildren; micronucleus test; blood lymphocyte culture; buccal epithelial cells; gender differences.

For citation: Yurchenko V.V., Ingel F.I., Urtseva N.A., Akhaltseva L.V. Effects of genome instability in lymphocytes and buccal epithelial cells of children from the city with big pulp and paper industry. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(12): 1392-1401. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-12-1392-1401>

For correspondence: Faina I. Ingel, MD, Ph.D., DSci., head of the Laboratory of genetic toxicology with a group of cytohistology, Centre for Strategic Planning, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: fainaingel@mail.ru

Information about the authors: Yurchenko V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4377-245X>

Ingel F.I., <http://orcid.org/0000-0002-2262-6800>; Urtseva N.A., <https://orcid.org/0000-0001-5031-2916>

Krivtsova E.K., <https://orcid.org/0000-0002-5039-8980>; Akhaltseva L.V., <https://orcid.org/0000-0002-3619-3858>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. This work was carried out as part of the state assignment of the Centre for Strategic Planning.

Contribution: Yurchenko V.V. – the general work plan, search and analysis of literature, cytome analysis of epithelial cells, the idea of complex analysis and its realization, interpretation of the obtained and literature data, writing an article, final approval of the paper for publication; Ingel F.I. – the idea of the study, the general plan of work, search and analysis of literature, cytome analysis of lymphocytes and interpretation of own and literature data, edition of the article, final approval of the work for publication; Urtseva N.A. – search for sources of literature, cytome analysis of lymphocytes, interpretation of own and literature data, final approval of the article for publication; Krivtsova E.K. – search for sources of literature, cytome analysis of epithelial cells and lymphocytes, writing the article, final approval of the article for publication; Akhaltseva L.V. – search for sources of literature, analysis, and interpretation of own and literature data, writing an article, final approval of the article for publication.

Received: July 9, 2019

Accepted: September 17, 2019

Published: December 2019

Введение

Население городов с целлюлозно-бумажным производством (ЦБП) больше всего беспокоит неприятный запах производных меркаптана. Однако в состав воздушных выбросов ЦБП входят более 30 веществ, которые могут оказывать токсическое и генотоксическое действие. Это окислы азота, аммиак, сернистый ангидрид, взвешенные вещества, метилмеркаптан, скипидар, оксид углерода, диоксид серы, хлор, бенз(а)пирен, формальдегид, пятиокись ванадия и др. [1]. По классификации Международного агентства по изучению рака (IARC), бенз(а)пирен является безусловным, а формальдегид – вероятным канцерогеном для человека. По остальным веществам из списка, приведённого в [1], нам удалось найти лишь ограниченные сведения об оценке мутагенной/канцерогенной активности. Так, в атмосфере под действием света оксид азота (II) может образовывать канцерогенные производные алкенов и/или нитрозированные полициклические ароматические углеводороды; эндогенный или вдыхаемый в воздухе оксид азота играет важную роль в канцерогенезе, связанном с воспалением, а также подавляет апоптоз в культуре фибробластов человека [2]. Кроме того, оксид азота (II) может влиять на синтез ДНК путём необратимого окисления атома кобальта в витамине B₁₂, что приводит к снижению активности метионин- и тимидилат-синтетаз [3]. Показано, что оксид азота (II) вызывает генные мутации в тесте Эймса и культуре лимфобластоидных клеток человека ТК6 [4], а также разрывы хромосом *in vitro* [5]. В организме человека при ингаляционном поступлении оксида азота (IV) могут образовываться канцерогенные нитрозамины [6]. В первичной культуре назального эпителия человека фрагментация ДНК (метод комет) наблюдалась при содержании NO₂ над питательной средой уже на уровне 0,01 ppm [7]. Метилмеркаптан при 10-минутной экспозиции вызывал у крыс угнетение активности цитохромоксидазы в печени, а также каталазы в печени, селезёнке и эритроцитах [8]. После воздействия метилмеркаптана (10 и 50 нг/мл) на клетки человека *in vitro* наблюдали угнетение пролиферации и другие признаки токсического действия на перевиваемых клетках эпителия, но не на клетках первичной культуры фибробластов десны [9]. Сероводород повышал содержание окисленных оснований и повреж-

дений ДНК в изолированных ядрах клеток китайского хомячка в концентрациях 1 мкМ и выше [10], а также вызывал дозозависимые разрывы ДНК в нетрансформированных клетках кишки человека [11]. Пятиокись ванадия индуцировала гипердиплоидию в культуре лимфоцитов человека [12] и образование кинетохор-положительных микроядер в культуре клеток китайского хомячка [13], а при ингаляционном поступлении в организм мышей – микроядра в ретикулоцитах периферической крови самцов и угнетение эритропоэза у самцов и самок [14].

В ряде исследований был выявлен дополнительный риск онкозаболеваемости для рабочих ЦБП со стажем не менее года. Так, анализ национальных регистров по онкозаболеваемости показал превышение над общепопуляционной стандартизованной частотой случаев злокачественной меланомы среди 23 718 мужчин, экспонированных в интервале от 1920 до 1993 г., в Норвегии [15]; среди мужчин, занятых на варке целлюлозы (но не на изготовлении бумаги), в Швеции в период 1960–1970 гг., – частоты глиомы [16]; среди работавших в 1939–1999 гг. в Швеции не нашли повышения общей онкозаболеваемости, но локально среди мужчин, работавших на варке целлюлозы, была повышена частота тестикулярного рака, а у женщин, занимавшихся изготовлением бумаги, – опухоль кожи, отличных от злокачественной меланомы [17]. В аналогичных исследованиях в Польше (10 460 работников ЦБП периода 1968–1990 гг.) выявлена повышенная смертность от рака назальной полости, лёгких и брюшины, которая коррелировала с загрязнением воздуха пылью и, по мнению авторов, с адсорбированными на ней химическими веществами, а у женщин – от рака мозга [18]. Для 57 613 рабочих ЦБП из 12 стран не нашли превышения риска общей смертности от рака, но для 40 704 из них, подвергавшихся воздействию двуокиси серы, риск смерти от рака лёгких был повышен и находился в дозовой зависимости от кумулятивной экспозиции к двуокиси серы [19]. Среди рабочих с высокой экспозицией к двуокиси серы была также повышена и смертность от лейкемии. Анализ причин смерти 60 468 рабочих, экспонированных к хлороорганическим соединениям на ЦБП в 11 странах мира в период с 1920 по 1966 г., показал превышение смертности от болезни Ходжкина, но не общей смертности от рака [20].

План обследования детей в г. Коряжме

Культура крови		Соскоб эпителия		Тест Люшера	Семья			Анкеты родителей
девочки	мальчики	девочки	мальчики		полная	неполная	не установлено	
58	47	61	51	105	48	41	16	89

Таким образом, логично предположить, что воздушные загрязнения от ЦБП могут оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье населения, проживающего вблизи него. В связи с этим большое значение приобретает возможность выявления повышенного риска по раку на основании оценки цитогенетического статуса населения. Прогностическая ценность микроядерного теста на культуре лимфоцитов в отношении риска развития злокачественных заболеваний любой локализации (по повышению частоты микроядер в двуядерных лимфоцитах в присутствии блокатора цитотомии) была доказана в международных продольных лонгитудинальных исследованиях [21], а для микроядерного теста на буккальном эпителии она предполагается. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение эффектов нестабильности генома детей в городе с ЦБП по данным микроядерных тестов на эпителии щеки и культуре лимфоцитов периферической крови.

Материал и методы

Работу проводили в конце апреля 2009 г в г. Коряжма Архангельской области (см. рисунок), где градообразующим предприятием является крупнейшее в России и Европе ЦБП филиал ОАО «Группа «Илим» (прежнее название Котласский ЦБК; см. рис. 1). Несмотря на значительные успехи ОАО по снижению влияния предприятия на экологическую обстановку, в период проведения нашего исследования химический анализ воздуха на территории города не проводился. По данным Управления Росприроднадзора по Архангельской области, «контроль воздушных загрязнений осуществляли по ПДВ, при этом допускалась работа установок очистки газа с показателями, не соответствующими проектным. Автоматические газоанализаторы в практике регулирования выбросов не использовались» [22].

Для обследования были выбраны второклассники всех муниципальных общеобразовательных школ г. Коряжмы в возрасте 9–11 лет, которые не болели в течение месяца до начала обследования и в этот период не получали лекарственной и других видов терапии и/или хирургических вмешательств, физиотерапевтических процедур, рентгенодиагностики и флюорографии. Проведение обследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России. Родители всех детей дали письменное информированное согласие на обследование.

План работы представлен в табл. 1.

Анализ нестабильности генома лимфоцитов в культуре крови. Взятие проб венозной крови (1 мл, одноразовые шприцы) проводили процедурные медсестры городской детской больницы г. Коряжмы. В течение 24 ч. до постановки культур кровь хранили при +4 °С. Для получения препаратов использовали методику [23–25]. ФГА-стимулированные клетки цельной крови культивировали 72 ч. Цитохалазин В (ЦХВ) до конечной концентрации 6 мкг/мл добавляли на 44-м часу от начала культивирования. Препараты фиксировали и окрашивали азур-эозином по Гимзе–Романовскому.

Цитомный анализ шифрованных препаратов при увеличении 100 × 10 проводили в 2 этапа [26]. Сначала при подсчёте 500 клеток определяли спектр клеточных популяций, отмечая в протоколе количество клеток в стадии митоза, количество клеток с 1, 2, 3, 4 и > 4 ядрами и цитогенетические повреждения в них (микроядра (МЯ), нуклеоплазменные мосты (НПМ), протрузии ядра), а также количество клеток в состоянии апоптоза. Для анализа выбирали только те поля зрения, на которых все клетки лежали отдельно. Анализировали только клетки с чёткой цитоплазмой, причём такие, в которых можно было подсчитать количество ядер и определить другие ядерные аномалии. Поля зрения, не соответствовавшие этим критериям, пропускали.

Затем тот же препарат просматривали на других участках стекла, доводя число просмотренных 2-ядерных клеток до 1000 [25].

Индекс репликации ядер (ИР) оценивали по формуле:

$$\text{ИР} = [(1 \cdot \% \text{ 1-ядерных кл}) + (2 \cdot \% \text{ 2-ядерных кл}) + (3 \cdot \% \text{ 3-ядерных кл}) + (4 \cdot \% \text{ 4-ядерных кл})] / 100.$$

Индекс пролиферации (ИП) вычисляли по формуле:

$$\text{ИП} = [(1 \cdot \% \text{ 1-ядерных кл}) + (2 \cdot \% \text{ 2-ядерных кл}) + (3 \cdot \% \text{ полиядерных кл})] / 100.$$

Микроядерный тест на эпителии слизистой оболочки щеки. Соскоб клеток стерильным деревянным шпателем выполняли после двукратного полоскания рта кипячёной водой. Клетки распределяли на обезжиренном предметном стекле, высушивали при комнатной температуре, фиксировали 10 мин в спиртово-уксусной смеси 3:1 и окрашивали ацетоорсеином и зелёным светлым. Зашифрованные препараты анализировали при увеличении 100 × 10. Анализировали по 1000 отдельно лежащих эпителиоцитов с непрерывным гладким краем ядра, в которых учитывали клетки с МЯ, протрузией ядра («разбитые яйца», пузырьки), клетки с двумя ядрами и клетки с перинуклеарной вакуолью. Параллельно сверх этих 1000 клеток анализировали отдельно лежащие эпителиоциты, ядра которых не имели непрерывного гладкого края. Учитывали клетки с конденсированным хроматином в ядре, неполным лизисом ядра, кариопикнозом и кариорексисом [27–29].

Уровень тревоги детей и вегетативный тонус (коэффициент Шипова). Использовали стандартный тестерный набор [30] для выполнения 8-цветового теста Люшера [31]. Методика выявляет не столько осознанное субъективное отношение испытуемого к цветовым эталонам, сколько его неосознанные реакции, что позволяет считать метод глубинным и проективным [31, 32].

Психологическое тестирование детей в тесте Люшера проводили перед взятием крови. Каждого ребёнка тестировали дважды с интервалом в несколько минут. Поскольку второй выбор является более свободным, следовательно, более валидным, чем первый, для сравнений учитывали результаты второго выбора, а различия между первым и вторым выбором использовали для оценки уровня эмоционального напряжения испытуемого [31].

Оценка эмоционального напряжения родителей и учителей обследованных детей. Использовали батарею стандартных психологических тестов, разработанную для проведения комплексных генетико-психологических обследований взрослых людей [33]. Она позволяет охватить основные сферы жизнедеятельности, где может проявляться эмоциональная напряжённость. В неё входили следующие тесты: шкала социальной адаптации Холмса–Рея, шкала Тейлор, шкала Экклза, оценивающие степень выраженности психологической депрессии, степень тревожности и степень переутомления соответственно. Эту батарею тестов дополнили «градусником» Киселёва (оценивающим качество межличностных отношений) и шкалой социального благополучия (ШСБ), необходимой для выявления различных аспектов удовлетворённости качеством жизни [34]. Результаты оценивали в баллах в соответствии с рекомендациями разработчиков тестов, а также в категориях таким образом, что наилучшему результату всегда соответствовала категория 1, наихудшему – 5 [33].

Анализ социоэкономического статуса семьи. Отдельно каждый родитель ребёнка (в случае неполной семьи 1 взрослый) заполняли специально разработанную анкету. Ответы родителей кодировали по 5 категориям, как и результаты психологического тестирования, – наихудшей ситуации соответствовала максимальная категория.

Таблица 2

Спектр клеточных популяций лимфоцитов в культуре периферической крови детей, посещавших школы, расположенные на разном расстоянии от границы ЦБП¹⁾

Показатель	Территория (группа)		
	1	2	3
Обследовано детей	36	27	43
Пролиферативный пул, %	–	67,03 63,26 ÷ 70,80 41,00–80,80	67,19 64,70 ÷ 69,68 48,60–81,20
Митоз, %	2,75** (2) *** (3) 2,38 ÷ 3,12 1,40–6,00	3,06 2,49 ÷ 3,63 0,40–6,40	3,44 3,14 ÷ 3,73 1,00–5,20
Апоптоз, %	1,94** (2) * (3) 1,49 ÷ 2,39 0,00–5,00	1,14 0,57 ÷ 1,72 0,00–6,20	1,29 0,97 ÷ 1,62 0,00–5,00
Апоптоз/митоз	0,82** (3) 0,61 ÷ 1,03 0,00–2,50	0,44 0,22 ÷ 0,66 0,00–2,58	0,45 0,31 ÷ 0,60 0,00–2,27
1-ядерные клетки, %	32,61* (2, 3) 29,49 ÷ 35,72 13,60–50,00	28,77 24,60 ÷ 32,94 15,00–58,40	28,08 25,48 ÷ 30,68 12,00–46,40
2-ядерные клетки, %	31,32*** (2, 3) 28,54 ÷ 34,10 20,00–45,80	38,07 35,17 ÷ 40,98 23,20–53,60	37,19 34,90 ÷ 39,48 21,40–53,40
3-ядерные клетки, %	3,46 2,93 ÷ 3,99 0,50–9,20	2,88 2,51 ÷ 3,24 1,10–4,70	3,02 2,71 ÷ 3,32 1,20–5,50
4-ядерные клетки, %	20,13 18,06 ÷ 22,21 7,60–30,00	19,47 17,06 ÷ 21,87 8,80–30,20	20,13 18,25 ÷ 22,00 6,00–36,80
> 4-ядерные клетки, %	4,66* (3) 3,88 ÷ 5,43 1,40–9,60	3,73 2,45 ÷ 5,02 0,00–9,60	3,84 2,89 ÷ 4,79 0,20–17,60
3-ядерные/4-ядерные клетки	0,19 0,15 ÷ 0,22 0,02–0,46	0,16 0,14 ÷ 0,18 0,07–0,25	0,16 0,14 ÷ 0,18 0,07–0,25
Индекс пролиферации ядер	1,89 1,84 ÷ 1,94 1,59–2,21	1,92 1,86 ÷ 1,98 1,52–2,13	1,92 1,88 ÷ 1,97 1,63–2,25
Индекс репликации ядер	2,18 2,11 ÷ 2,26 1,77–2,63	2,19 2,09 ÷ 2,28 1,63–2,52	2,20 2,13 ÷ 2,28 1,74–2,79

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: ¹⁾ Приведены средние значения, 95% доверительный интервал, минимальное и максимальное значения в группе; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ различия статистически значимы (критерий Манна–Уитни) при сравнении с детьми из группы, указанной в скобке.

Для единой оценки социоэкономического статуса семьи использовали социальный индекс (сумму категорий), значения которого в наихудшей ситуации были максимальными.

Подробно оценка тревоги детей и социопсихологического анкетирования их родителей описаны в [35].

Статистический анализ. Для обработки большинства данных использовали непараметрические критерии χ^2 и Краскелла–Уоллиса, результаты анкетирования родителей оценивали с использованием критерия Манна–Уитни.

Анализ проводили в стандартном пакете программ Statistica 6.1 (Statsoft).

Результаты

Проведённый анализ показал, что семьи детей из разных школ не различались по средним уровням дохода и образования родителей, их социальному статусу и особенностям контакта с вредностями на производстве, по курению и употреблению алкоголя, а также по размеру жилой площади на члена семьи. Кроме того, семьи не различались по большинству использованных психологических показателей. Результаты психологического тестирования детей также не выявили различий между школами как по уровню тревоги, так и по степени сбалансированности работы отделов вегетативной нервной системы детей.

Гендерный состав детей, обследованных в отдельных школах, различался значимо, и при этом некоторые цитогенетические показатели имели гендерные различия. Поэтому для анализа эффектов ЦБП были сформированы укрупнённые группы из детей, посещающих две-три близко расположенные школы. Их удалённость от границы ЦБП составляла 1,37–2,18 км (школы 1, 2 и 3; группа 1), 2,65–3,01 км (школы 4 и 5, группа 2) и 3,39–3,58 км (школы 6 и 7, группа 3). Укрупнённые группы оказались сбалансированными по полу, поэтому сравнения проводили для смешанных по полу групп, а гендерные различия оценивали дополнительно.

Особенности пролиферации лимфоцитов в культурах крови в объединённых группах детей показаны в табл. 2.

По данным табл. 2, в лимфоцитах детей, посещавших ближайшие к ЦБП школы (группа 1), прослеживается выраженный токсический эффект: снижение доли клеток, поделившихся в присутствии цитохалазина, угнетение митотической активности, повышенная частота апоптоза, сдвиг отношения частот апоптоз/митоз в сторону апоптоза, повышение доли 1-ядерных (в основном клетки, не вступившие в деление в присутствии ЦХВ) и снижение доли 2-ядерных клеток (прошли один митотический цикл в присутствии ЦХВ). При этом увеличена доля клеток, успешных пройти не менее трёх делений (> 4 ядер) за 28 ч после добавления цитохалазина Б. Любопытно, что общепринятые показатели пролиферации (индекс пролиферации и индекс репликации ядер) не показали различий между группами, что указывает на целесообразность подробного анализа спектра клеточных популяций [26].

Результаты цитогенетического анализа лимфоцитов детей представлены в табл. 3.

По частоте клеток с МЯ группы детей не различались, а частота 2- и 4-ядерных клеток с нуклеоплазмными мостами была выше в группе 1. Протрузии ядра, наоборот, чаще встречались в группе 3 (статистически значимо только для 4-ядерных клеток).

Результаты цитомного анализа буккальных эпителиоцитов представлены в табл. 4.

Смешанные по полу группы детей статистически значимо различались только по частоте клеток с конденсированным хроматином в ядре, которая была самой высокой у детей, посещавших школы в непосредственной близости к ЦБП.

В табл. 5 представлены только те показатели цитомного анализа лимфоцитов и эпителиоцитов, которые проявили гендерные различия.

Как видно из табл. 5, учёт гендерных особенностей уточнил результаты сравнения групп, смешанных по полу. Так, стало понятно, что на культуре крови различия между первой и другими группами по частоте апоптоза и частоте 2-ядерных клеток с нуклеоплазмными мостами (НПМ) обусловлены вкладом в эффекты детей обоих полов, но только девочки обеспечивали различия по частоте клеток с числом ядер > 4 и клеток с протрузией ядра. Также нам представляется важным, что учёт ген-

дерных различий позволил выявить у мальчиков первой группы повышенную частоту не только клеток с НПМ, но и с МЯ в 2- и 4-ядерных клетках, а у девочек эти различия не обнаружены. В целом гендерные различия в первой группе детей были выявлены по 9 показателям цитомного анализа лимфоцитов крови, во второй группе – по 5 показателям и в третьей – по 4 показателям.

В эпителиоцитах слизистой оболочки щеки почти все гендерные различия были сосредоточены в третьей группе детей, где у мальчиков чаще встречались клетки со всеми признаками дегенерации (перинуклеарная вакуоль, конденсированный хроматин в ядре, неполный лизис ядра). В то же время клеток с протрузией ядра и с МЯ у мальчиков было меньше, чем у девочек. Учёт гендерных различий показал, что выявленное без учёта пола (см. табл. 4) снижение частоты клеток с конденсированным хроматином в ядре по мере удаления школ от ЦБП обусловлено в основном эффектами у девочек. Аналогичное снижение обнаружено – также у девочек – и по частоте клеток с неполным

Таблица 3

Показатели частоты генетических повреждений в культуре периферической крови детей, посещавших школы, расположенные на разном расстоянии от границы ЦБП¹⁾

Показатель	Территория (группа)		
	1	2	3
Число детей	36	27	43
1-ядерные клетки с микроядром, %	0,35 0,20 ÷ 0,49 0,00–1,33	0,26 0,05 ÷ 0,48 0,00–2,40	0,18 0,07 ÷ 0,30 0,00–1,68
2-ядерные клетки с микроядром, %	0,44 0,27 ÷ 0,60 0,00–2,40	0,40 0,26 ÷ 0,54 0,10–1,50	0,37 0,28 ÷ 0,47 0,00–1,40
3-ядерные клетки с микроядром, %	4,18 2,60 ÷ 5,77 0,00–20,00	3,58 2,01 ÷ 5,15 0,00–13,51	3,64 2,34 ÷ 4,93 0,00–18,75
4-ядерные клетки с микроядром, %	5,76 4,47 ÷ 7,05 0,00–13,79	5,32 3,67 ÷ 6,97 0,00–16,67	5,91 4,83 ÷ 6,99 0,00–16,28
> 4-ядерные. клетки с микроядром, %	7,19 4,43 ÷ 9,95 0,00–31,82	5,09 2,35 ÷ 7,82 0,00–21,43	8,96 5,76 ÷ 12,17 0,00–60,00
2-ядерные клетки с мостом, %	0,87* (2) 0,51 ÷ 1,23 0,00–4,60	0,35 0,21 ÷ 0,49 0,00–1,10	0,37 0,27 ÷ 0,46 0,00–1,40
3-ядерные клетки с мостом, %	7,23 3,70 ÷ 10,77 0,00–60,00	3,95 2,20 ÷ 5,71 0,00–19,05	5,20 3,46 ÷ 6,93 0,00–26,09
4-ядерные клетки с мостом, %	10,10** (2) 7,83 ÷ 12,37 0,00–30,51	5,94 4,13 ÷ 7,76 0,00–17,31	10,08 7,48 ÷ 12,68 0,00–36,05
> 4-ядерные. клетки с мостом, %	13,35 8,72 ÷ 17,98 0,00–50,00	13,32 4,88 ÷ 21,75 0,00–100,00	14,42 10,22 ÷ 18,62 0,00–63,64
2-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	1,31* (2, 3) 0,91 ÷ 1,70 0,00–4,80	0,75 0,52 ÷ 0,98 0,10–2,50	0,74 0,58 ÷ 0,90 0,10–2,40
3-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	11,42 7,66 ÷ 15,18 0,00–60,00	7,53 4,97 ÷ 10,09 0,00–20,69	8,83 6,26 ÷ 11,40 0,00–37,50
4-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	15,86 12,80 ÷ 18,92 0,00–41,53	11,26 8,61 ÷ 13,92 0,00–24,11	15,99 12,83 ÷ 19,14 2,33–52,33
> 4-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	20,54 14,39 ÷ 26,69 0,00–70,00	18,40 9,24 ÷ 27,57 0,00–100,00	23,38 17,73 ÷ 29,03 0,00–80,00
1-ядерные клетки с протрузией ядра, %	0,33 0,15 ÷ 0,50 0,00–2,09	0,29 0,09 ÷ 0,48 0,00–2,17	0,35 0,10 ÷ 0,60 0,00–4,24
2-ядерные клетки с МЯ типа «разбитое яйцо», %	0,10 0,06 ÷ 0,14 0,00–0,40	0,09 0,04 ÷ 0,13 0,00–0,40	0,07 0,05 ÷ 0,10 0,00–0,40
2-ядерные клетки с протрузией ядра, %	0,67 0,40 ÷ 0,94 0,00–2,80	0,59 0,37 ÷ 0,80 0,00–1,70	0,89 0,64 ÷ 1,13 0,00–3,00
3-ядерные клетки с протрузией ядра, %	3,41 1,91 ÷ 4,92 0,00–20,00	2,35 0,82 ÷ 3,87 0,00–14,29	3,90 2,02 ÷ 5,77 0,00–30,43
4-ядерные клетки с протрузией ядра, %	2,47** (3) 1,28 ÷ 3,67 0,00–14,00	2,62 1,55 ÷ 3,68 0,00–8,47	3,79 2,80 ÷ 4,77 0,00–13,95

Таблица 4

Результаты цитомного анализа буккального эпителия детей, посещавших школы, расположенные на разном расстоянии от границы ЦБП¹⁾

Показатель	Территория (группа)		
	1	2	3
Обследовано детей	38	29	45
Клетки с микроядром	0,32 0,13 ÷ 0,50 0–2	0,34 0,11 ÷ 0,58 0–2	0,22 0,08 ÷ 0,36 0–2
Клетки с протрузией ядра	1,42 1,03 ÷ 1,82 0–4	2,48 1,45 ÷ 3,51 0–11	2,96 0,77 ÷ 5,14 0–49
Клетки, содержащие более 1 ядра	6,66 5,33 ÷ 7,99 2–18	6,59 5,27 ÷ 7,90 2–14	7,80 6,67 ÷ 8,93 2–16
Клетки с перинуклеарной вакуолью	22,66 17,44 ÷ 27,87 2–72	16,55 12,97 ÷ 20,13 2–45	16,69 13,66 ÷ 19,71 1–43
Клетки с конденсацией хроматина	13,87*** (2) ** (3) 10,07 ÷ 17,66 0–45	6,10 0,93 ÷ 11,28 0–61	7,62 4,54 ÷ 10,71 0–47
Клетки с неполным лизисом ядра	70,97 49,29 ÷ 92,66 9–287	57,90 39,85 ÷ 75,94 8–184	60,69 42,52 ÷ 78,86 7–304
Сумма клеток с лизисом ядра и конденсацией хроматина	84,84 59,91 ÷ 109,78 10–325	64,00 42,92 ÷ 85,08 8–245	68,31 49,99 ÷ 86,63 9–309
Клетки с карioreксисом	0,13 0,00 ÷ 2,00 0–2	0,10 0,00 ÷ 0,22 0–1	0,07 0,00–0,14 0–1
Клетки с каріопикнозом	0,08 0,00 ÷ 0,20 0–2	0,07 0,00 ÷ 0,17 0–1	0,13 0,03 ÷ 0,24 0–1

лизисом ядра. Однако снижение частоты клеток с перинуклеарной вакуолью выявлено у детей обоего пола. В целом первые две группы детей имели гендерные различия по одному-двум показателям, а третья группа – по 6 показателям цитомного анализа эпителиоцитов.

Подводя первые итоги, следует отметить, что в связи с малочисленностью групп, разделённых по полу, для их сравнения использовали статистический критерий, который пренебрегает дисперсией значений показателей. В основном отмеченные в табл. 5 различия между группами носят довольно систематический характер, что вызывает доверие. Так, во всех группах детей у девочек чаще встречался апоптоз и реже, чем у мальчиков, клетки с числом ядер > 4. В первой группе детей МЯ систематически чаще встречались у мальчиков (в 2-, 4- и > 4-ядерных клетках), а мосты – у девочек в первой и третьей группах (в 2-ядерных клетках). Протрузий ядра в 2-, 3- и 4-ядерных клетках у мальчиков было больше. В то же время гендерные различия для самых малочисленных 3- и > 4-ядерных клеток (3–4%; см. табл. 2) могут оказаться случайными. Например, эффекты в самой малочисленной категории 3-ядерных клеток (с нуклеоплазматическими мостами и сумме частот 3-ядерных клеток с мостами и МЯ) выпадают из общей картины гендерных различий.

Обсуждение

Обобщая полученные данные, следует прежде всего отметить тканевые различия. Так, на эпителиоцитах щеки не удалось выявить связи эффектов нестабильности генома с расстоянием школ, в которых учились дети, от ЦБП. В то же время анализ клеток крови указывает на неблагоприятное действие ЦБП на детей, посещавших школы в непосредственной близости

Таблица 5

Гендерные различия в эффектах нестабильности, выявленные в обеих тканях детей, посещавших школы, расположенные на разном расстоянии от границы ЦБК

Показатель	Территория (группа)					
	1		2		3	
	девочки	мальчики	девочки	мальчики	девочки	мальчики
Число детей	20	16	15	12	23	20
	<i>Лимфоциты¹⁾</i>					
Апоптоз, %	2,18** ^(2,3) 1,46 ÷ 2,90 0,00–5,00	1,65 * ^(2,3) 1,14 ÷ 2,16 0,40–3,20	1,57 0,57 ÷ 2,58 0,20–6,20	0,60 *** ⁽³⁾ 0,28 ÷ 0,92 0,00–1,60	1,33 0,81 ÷ 1,85 0,00–5,00	1,25 0,85 ÷ 1,65 0,00–2,60
> 4-ядерные клетки, %	4,09*** ^(2,3) 3,02 ÷ 5,16 1,40–9,60	5,36 *** 4,22 ÷ 6,50 2,60–8,60	3,04 1,60 ÷ 4,48 0,20–9,60	4,60 *** 2,15 ÷ 7,05 0,00–9,40	2,86 2,20 ÷ 3,52 0,40–6,20	4,96 *** 3,09 ÷ 6,83 0,20–17,60
2-ядерные клетки с микроядром, %	0,30 0,19 ÷ 0,41 0,00–0,70	0,61 * ⁽³⁾ 0,26 ÷ 0,95 0,00–2,40	0,42 0,27 ÷ 0,57 0,10–1,00	0,38 0,09 ÷ 0,66 0,10–1,50	0,37 0,23 ÷ 0,51 0,00–1,40	0,38 0,23 ÷ 0,53 0,00–1,10
4-ядерные клетки с микроядром, %	4,93 3,31 ÷ 6,55 0,00–11,02	6,81 * ⁽²⁾ 4,63 ÷ 8,98 0,00–13,79	6,03 3,29 ÷ 8,77 0,00–16,67	4,43 2,57 ÷ 6,29 0,00–9,32	5,88 4,46 ÷ 7,30 0,00–16,28	5,94 4,15 ÷ 7,73 0,00–13,68
> 4-ядерные клетки с микроядром, %	5,44* ⁽³⁾ 2,30 ÷ 8,58 0,00–20,00	9,38** 4,34 ÷ 14,41 0,00–31,82	4,49* ⁽³⁾ 0,92 ÷ 8,06 0,00–21,43	5,83 0,96 ÷ 10,71 0,00–20,93	10,43 4,98 ÷ 15,88 0,00–60,00	7,27 3,97 ÷ 10,58 0,00–21,21
2-ядерные клетки с мостом, %	0,94** ^(2,3) 0,49 ÷ 1,39 0,00–3,40	0,78 * ⁽²⁾ 0,14 ÷ 1,42 0,00–4,60	0,39 0,11 ÷ 0,61 0,00–1,10	0,30 0,11 ÷ 0,49 0,00–1,00	0,41 0,25 ÷ 0,57 0,00–1,40	0,31*** 0,20 ÷ 0,42 0,00–0,80
3-ядерные клетки с мостом, %	9,89* ⁽²⁾ 3,86 ÷ 15,91 0,00–60,00	3,92* 1,32 ÷ 6,51 0,00–14,71	2,73* ⁽³⁾ 1,06 ÷ 4,41 0,00–10,00	5,48* 1,98 ÷ 8,97 0,00–19,05	5,21 2,60 ÷ 7,83 0,00–26,09	5,18 2,72 ÷ 7,64 0,00–18,75
2-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	1,24 0,77 ÷ 1,71 0,00–4,10	1,39*** ^(2,3) 0,66 ÷ 2,12 0,30–4,80	0,81 0,53 ÷ 1,10 0,20–2,10	0,68 0,25 ÷ 1,10 0,10–2,50	0,78 0,53 ÷ 1,03 0,20–2,40	0,69*** 0,46 ÷ 0,92 0,10–1,90
3-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	13,72** ⁽²⁾ 7,71 ÷ 19,74 0,00–60,00	8,53 4,29 ÷ 12,78 0,00–24,44	5,53* ⁽³⁾ 2,67 ÷ 8,40 0,00–16,67	10,03** 5,42 ÷ 14,65 0,00–20,69	8,64 5,20 ÷ 12,07 0,00–34,78	9,06 4,85 ÷ 13,28 0,00–37,50
4-ядерные клетки с микроядром и/или мостом, %	20,30 10,99 ÷ 29,61 0,00–70,00	20,84 12,10 ÷ 29,57 0,00–52,17	14,44 4,61 ÷ 24,26 0,00–50,00	23,36 5,17 ÷ 41,56 0,00–100,00	27,08*** ^(1,2) 17,67 ÷ 36,48 0,00–80,00	19,14** 13,18 ÷ 25,09 0,00–37,50
2-ядерные клетки с протрузией ядра, %	0,54*** ⁽³⁾ 0,18 ÷ 0,91 0,00–2,40	0,82* 0,38 ÷ 1,26 0,00–2,80	0,54*** ⁽³⁾ 0,26 ÷ 0,82 0,00–1,50	0,64 0,26 ÷ 1,03 0,00–1,70	0,90 0,55 ÷ 1,24 0,00–2,90	0,88 0,49 ÷ 1,26 0,00–3,00
3-ядерные клетки с протрузией ядра, %	2,81*** ⁽³⁾ 0,66 ÷ 4,95 0,00–20,00	4,17* 1,88 ÷ 6,47 0,00–14,81	2,53* ⁽³⁾ 0,22 ÷ 4,84 0,00–14,29	2,12 0,00 ÷ 4,41 0,00–10,34	4,52 1,40 ÷ 7,63 0,00–30,43	3,18 1,04 ÷ 5,33 0,00–18,52
4-ядерные клетки с протрузией ядра, %	2,16*** ⁽³⁾ 0,65 ÷ 3,68 0,00–14,00	2,86 0,77 ÷ 4,96 0,00–14,00	1,95*** ⁽³⁾ 0,89 ÷ 3,02 0,00–5,56	3,44** 1,34 ÷ 5,55 0,00–8,47	4,54 2,86 ÷ 6,22 0,00–13,95	2,92 2,01 ÷ 3,82 0,00–6,78
	<i>Эритроциты²⁾</i>					
Микроядро	0,38 0,11 ÷ 0,65 0–2	0,24 0,00 ÷ 0,52 0–2	0,31 0,00 ÷ 0,63 0–2	0,38 0,00 ÷ 0,78 0–2	0,38 0,13 ÷ 0,62 0–2	0,05* ⁽²⁾ 0,00 ÷ 0,15 0–1
Протрузия ядра	1,43 0,96 ÷ 1,90 0–3	1,41 0,68 ÷ 2,14 0–4	2,50*** ⁽¹⁾ 1,17 ÷ 3,83 0–9	2,46* ⁽¹⁾ 0,62 ÷ 4,30 0–11	3,50*** ⁽²⁾ 0,00 ÷ 7,62 0–49	2,33* ⁽¹⁾ 1,20 ÷ 3,47 0–9
Более 1 ядра	7,52 5,43 ÷ 9,62 2–18	5,59* 4,02 ÷ 7,15 2–13	7,31 5,58 ÷ 9,05 2–13	5,69 3,52 ÷ 7,86 2–14	8,00 6,30 ÷ 9,70 2–16	7,57* ^(1,2) 5,98 ÷ 9,17 2–15
Перинуклеарная вакуоль	23,10 15,32 ÷ 30,87 3–72	22,12 14,55 ÷ 29,69 2–51	15,06** ⁽¹⁾ 11,23 ÷ 18,89 2–31	18,38* ⁽¹⁾ 11,36 ÷ 25,41 5–45	15,33* ⁽¹⁾ 11,13 ÷ 19,54 1–36	18,24* ⁽¹⁾ 13,58 ÷ 22,89 5–43
Конденсация хроматина	14,43 8,45 ÷ 20,41 0–45	13,18 8,25 ÷ 18,11 1–30	5,50*** ⁽¹⁾ 0,00 ÷ 11,49 0–41	6,85 0,00 ÷ 16,82 0–61	6,25*** ⁽¹⁾ 3,24 ÷ 9,26 0–25	9,19** 3,28 ÷ 15,10 0–47
Неполный лизис ядра	72,86 37,11 ÷ 108,61 9–287	68,65 43,74 ÷ 93,55 12–154	57,06*** ⁽¹⁾ 35,19 ÷ 78,94 11–143	58,92* ⁽¹⁾ 25,06 ÷ 92,79 8–184	47,08*** ^(1,2) 29,66 ÷ 64,51 7–196	76,24*** ⁽¹⁾ 42,13 ÷ 110,34 15–304
Сумма клеток с лизисом ядра и конденсацией хроматина	87,29 45,97 ÷ 128,60 10–325	81,82 53,69 ÷ 109,96 15–163	62,56*** ⁽¹⁾ 38,32 ÷ 86,80 11–149	65,77*** ⁽¹⁾ 24,91 ÷ 106,63 8–245	53,33*** ^(1,2) 35,67 ÷ 71 9–198	85,43*** ⁽²⁾ 51,40 ÷ 119,46 16–309
Кариорексис	0,24* 0,00 ÷ 0,52 0–2	0,00 0,00 ÷ 0,52 0–2	0,13 0,00 ÷ 0,31 0–1	0,08 0,00 ÷ 0,24 0–1	0,04 0,00 ÷ 0,13 0–1	0,10 0,00 ÷ 0,23 0–1

Примечание. ¹⁾Приведены средние частоты, 95% доверительный интервал, минимальное и максимальное значения; ²⁾приведены средние значения частоты клеток с аномалиями на 1000 клеток с непрерывным гладким краем ядра, 95% доверительный интервал, минимальное и максимальное значения; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ значимость половых различий между детьми в пределах одной территории (критерий χ^2); * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ значимость различий с детьми того же пола из групп, указанных в скобках (критерий χ^2).

от него, что прослеживается по всем признакам токсического действия и основным признакам мутагенного действия (у всех детей повышена частота нуклеоплазменных мостов и у мальчиков – микроядер в 2- и 4-ядерных клетках). В то же время частота клеток с протрузией ядра показала обратную динамику: в школах, максимально удалённых от ЦБП (и максимально приближенных к химическому заводу (ХЗ)), их частота максимальна, особенно у девочек. Очень важно, что этот эффект мы наблюдали в клетках обеих тканей.

Следует отметить, что протрузии в лимфоцитах начали учитываться позднее, чем в буккальных клетках, поэтому к настоящему времени на эпителиоцитах накоплено больше данных. Протрузии ядра принято считать цитогенетическим нарушением, связанным в том числе с элиминацией из ядра незаконно амплифицированной ДНК [36] или нераспавшихся репарационных комплексов [28] или же с изменённым порядком репликации ДНК (по аналогии с барабанными палочками в сегментоядерных лейкоцитах у женщин). Зачастую в литературе повышение частоты протрузий при неизменном уровне МЯ уверенно трактуют как индукцию цитогенетических повреждений генотоксическим фактором. Однако это не всегда так. Например, «разбитых яиц» и ядерных почек было больше до панорамной рентгенографии зубов (доза всего 21,4 μ Sv), чем после неё [37]. Курение, как и сочетание курения с потреблением алкоголя, вызывало снижение частоты «разбитых яиц» без изменения частоты клеток с МЯ [38]. Частота клеток с «разбитыми яйцами» не отличалась от контроля при повышенной частоте клеток с МЯ у алкоголиков с оральной карциномой [39], у потребителей снаффа [27], у пациентов после курса химиотерапии [40] и у людей, экспонированных к пестицидам [41]. Интересно, что в ходе лучевой терапии (2 Гр/день 5 дней в неделю) в эпителии на противоположной от опухоли стороне щеки статистически значимое повышение частоты МЯ, а также 2-ядерных клеток над исходными уровнями наблюдали при накопленной дозе 8 Гр, ядерных почек – 16 Гр и многоядерных клеток – 24 Гр [42]. На основании этих наблюдений А. Нерсесян выдвинул предположение, что ядерные почки могут отражать реакцию здоровой слизистой оболочки на стресс низкой интенсивности, а также могут быть связаны с дегенеративным процессом в клетке, с вирусной инфекцией или другими событиями [43].

В настоящем исследовании динамика частоты клеток с протрузией ядра по мере удаления школ от ЦБП была противоположна динамике клеток с МЯ, что чётко прослеживалось на культуре крови. Учитывая, что МЯ и НПМ в качестве индикатора цитогенетических нарушений имеют больший вес, чем ядерные почки, можно сделать заключение о генотоксическом воздействии воздушных выбросов ЦБП на детей.

Результаты цитомного анализа буккальных клеток интерпретировать сложнее. Общепринятые индикаторы токсического воздействия на буккальный эпителий (частоты клеток с конденсированным хроматином в ядре и неполным лизисом ядра) в настоящем исследовании показали достаточно гладкое снижение от первой зоны к третьей, но эта динамика не позволяет обозначить градиент загрязнения. В работах с измеренными экспозициями (индивидуальными или групповыми) было показано как постепенное повышение частоты дегенерирующих буккальных клеток по мере увеличения экспозиции [29], так и её снижение [44]. Изменение частот этих клеток может быть связано как с нарушением естественного созревания буккальных клеток, так и с индукцией некроза [27], хотя однозначным признаком некроза является наличие вакуоли в клетке [45]. Частота клеток с перинуклеарной вакуолью в данном исследовании снижалась по мере удаления от ЦБП, что достаточно надёжно указывает на токсическое действие его выбросов.

Значения цитогенетических показателей у детей 1–3-й групп не различались значимо при анализе данных без учёта пола (см. табл. 4), а по данным табл. 5, у мальчиков в третьей группе наблюдалось сочетание минимальной частоты клеток с МЯ и повышенной частоты клеток с числом ядер более одного (в основном двуядерных).

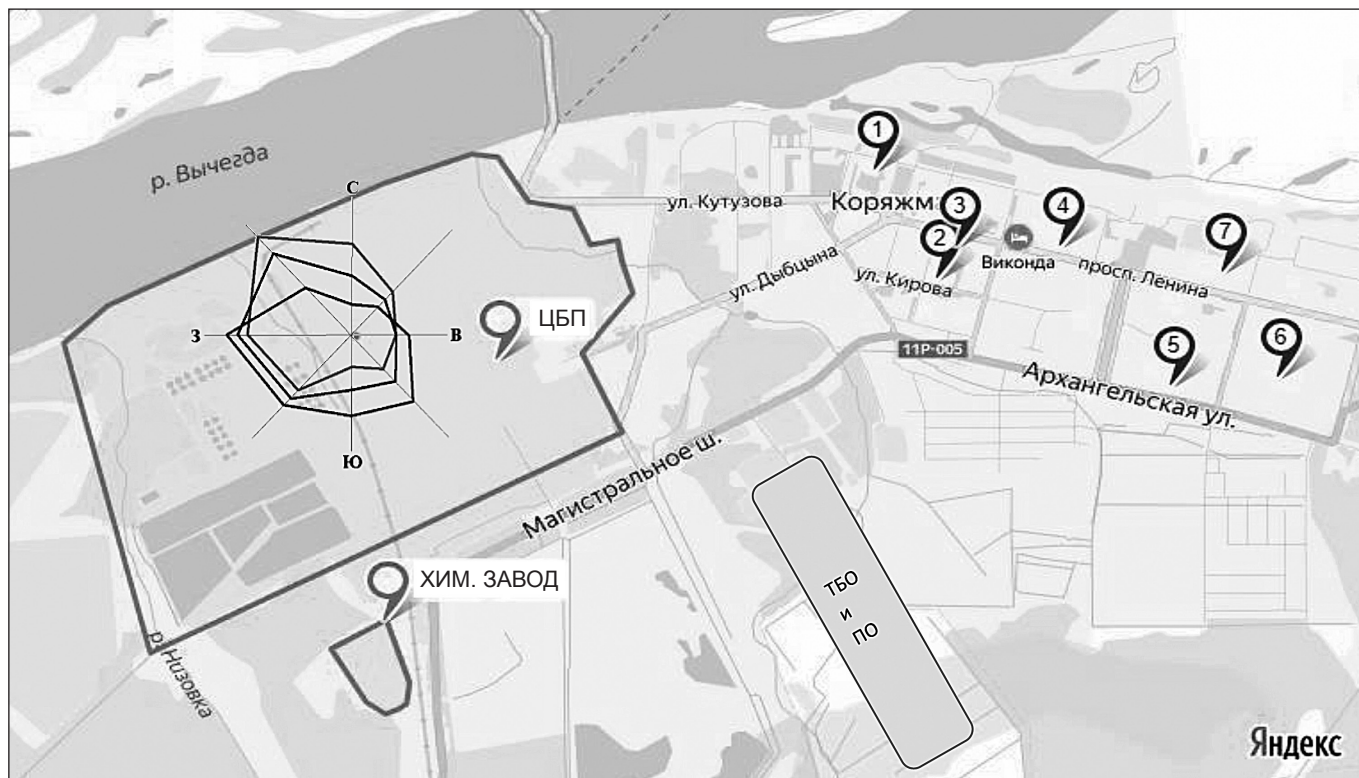
Двуядерные клетки в эпителии могут образовываться по разным механизмам. На культурах клеток было показано, что это может быть следствием хромосомных мостов в анафазе (в том числе в связи с дисфункцией теломер), повреждения ДНК,

задержки репликации хромосом и др. [46, 47]. Однако самой частой причиной является нерасхождение хромосом [48], поэтому нет большого противоречия в сочетании минимальной частоты клеток с МЯ и максимальной частоты 2-ядерных клеток у мальчиков в третьей группе настоящего исследования. Блок цитотомии в клетках эпителиального происхождения является механизмом выживания анеуплоидного продукта митоза в состоянии двуядерности. При восстановительной регенерации ткани двуядерные клетки тоже делятся, и при этом полноценный геном будут иметь только их тетраплоидные потомки, которые образуются в результате полиплоидизирующего митоза, когда в митоз вступают оба ядра, но полюсов деления в клетке образуется всего два [49]. Тогда из одной клетки с двумя околодиплоидными ядрами образуются две одноядерные околотетраплоидные клетки, что приводит к снижению частоты двуядерных клеток. Поэтому различие между детьми из разных групп по частоте 2-ядерных клеток в эпителии может сложиться как за счёт индукции нерасхождения хромосом (увеличение), так и за счёт восстановительной регенерации эпителия (снижение). В нашем случае в первой группе наблюдался максимальный уровень клеток, подвергающихся некрозу, что в принципе могло вызвать восстановительную регенерацию ткани. Таким образом, если мы говорим об индукции нерасхождения хромосом, то относим этот эффект за счёт максимальной близости третьей территории к химическому заводу и полигону ТБО и ПО, о выбросах которых мы не имеем информации. Если мы говорим о восстановительной регенерации буккального эпителия у детей на территориях, примыкающих к ЦБП, то относим различие по частоте 2-ядерных клеток у мальчиков за счёт токсичности выбросов ЦБП.

Гендерные различия по некоторым показателям цитомного анализа двух тканей, обнаруженные в настоящем исследовании, заслуживают отдельного обсуждения. По опубликованным данным, в контрольных группах людей гендерные различия по частоте клеток с МЯ обычно не наблюдаются [50]. Мы нашли единственную работу, в которой у мужчин контрольной группы в эпителии слизистой оболочки щеки находили больше клеток с МЯ, чем у женщин контрольной группы [51]. А в группах экспонированных людей половые различия находили довольно часто, причём направление сдвигов могло зависеть от действующего фактора. Так, по частоте микроядер в буккальном эпителии женщины были чувствительнее мужчин к воздействию формальдегида [52] и ПАУ [53], а девочки чувствительнее мальчиков к экспозиции к тяжёлым металлам [54]. Однако при оценке в том же тесте производственного контакта с мышьяком [55] или пребывания студентов в химических лабораториях вуза чувствительнее оказались юноши [29]. В то же время гендерная чувствительность к одному и тому же фактору может быть противоположной в разных тканях. Например, при изучении влияния газообразных анестетиков на персонал хирургических операционных мужчины оказались чувствительнее женщин в микроядерном тесте на лимфоцитах [56], а на буккальном эпителии – наоборот [57]. Возникает вопрос: не может ли сам факт обнаружения гендерных различий служить косвенным индикатором наличия генотоксического воздействия?

В настоящей работе гендерные различия в тесте на лимфоцитах были отмечены у детей первой группы по 9 показателям, второй группы – по 5 и третьей – по 4 показателям. При этом в лимфоцитах детей из первой группы наиболее массовые гендерные различия сочетались с максимальными уровнями клеток с МЯ (среди мальчиков) и клеток с НПМ. На буккальном эпителии гендерные различия носили менее систематический характер, но у детей первой группы они были выявлены по двум показателям, второй группы – по одному и третьей группы – по шести. Не может ли это послужить пусть слабым, но практически единственным основанием предположить другой химический состав и/или более высокий уровень экспозиции на третьей территории, поскольку сравнение групп детей по отдельным показателям цитомного анализа буккального эпителия не позволило сделать определённого заключения.

При планировании работы и в соответствии с представлением администрации города мы ставили задачу проанализировать только влияние ЦБП. Однако позднее мы узнали, что с юго-запада от ЦБП расположен химический завод по производству лако-



Макет карты г. Коряжма. <http://maprossiya.ru/arhangel'skaya-oblast/koryazhma>.

Контуром показаны территории ЦБП, Химзавода и полигона ТБО и ПО. Цифрами обозначены номера школ. Сезонная роза ветров показана на территории ЦБП, приведена по <http://weatherarchive.ru/Temperature/Koryazhma>.

красочных материалов и химической продукции для дорожного строительства и нефтедобычи, а с юго-запада от школ и значительно ближе к ним – МУП «Полигон твёрдых бытовых (ТБО) и промышленных (ПО) отходов» (см. рисунок). Информацию по выбросам этих предприятий мы найти не смогли, но понятно, что любая территория в городе находится под воздействием выбросов всех предприятий.

Однако на рисунке видно, что только по отношению к ЦБП выделенные нами группы территорий школ располагаются в одну линию. Поэтому выявленную динамику уровней цитогенетических повреждений крови в лимфоцитах крови детей логично связать именно с ЦБП. В то же время на эпителиоцитах предполагается динамика эффектов нестабильности генома с максимумом в третьей группе (противоположная эффектам на лимфоцитах), что может быть связано с более выраженным влиянием полигона ТБО и ПО или ХЗ. Поэтому можно предположить, что эффекты нестабильности генома, которые мы обнаружили в клетках разных тканей детей, обеспечиваются разными по составу атмосферными выбросами.

Следует отметить, что годом ранее нашего исследования в г. Коряжма был проведён цитомный анализ в клетках буккального и назального эпителия 50 десятиклассников – учащихся школ №№ 1 и 6 (см. карту) [59]. Результаты этой работы выявили разнонаправленные различия по частоте клеток с начальным кариолизисом и с протрузиями в назальном эпителии, но не обнаружили различий между школами ни по одному показателю в клетках буккального эпителия. Общим в нашей и цитированной работах является оценка эффектов в эпителиоцитах щеки, хотя в цитированной работе эффекты не были выявлены, а в настоящем исследовании обнаружено закономерное увеличение доли клеток с конденсированным хроматином в ядре при приближении к ЦБП. Мы полагаем, что качественные различия между результатами обоих исследований в эпителиоцитах щеки могут быть связаны с разным возрастом обследованных, так как имеются данные о снижении чувствительности к генотоксическим воздействиям с увеличением возраста [60], а также с ря-

дом неучтённых факторов, как соотношение полов, численность групп, эмоциональное состояние обследованных и пр. Однако тот факт, что и на назальном эпителии, и на лимфоцитах крови со всей определённой были выявлены генотоксические и цитотоксические эффекты у детей, проживающих вблизи от ЦБП, позволяет уверенно сделать заключение о вредном его влиянии на население г. Коряжмы.

Заключение

Результаты нашего исследования выявили значимое снижение уровней основных эффектов нестабильности генома в лимфоцитах крови (включая частоты клеток с микроядрами и нуклеоплазменными мостами, частоту апоптоза и изменения спектра клеточных популяций) с увеличением расстояния между ЦБП и школами, в которых учились обследованные дети.

Сравнение эффектов нестабильности генома в двух тканях показывает, что различие эффектов нестабильности генома в разных тканях может быть связано не только с вариабельностью спектра воздействующих компонентов атмосферных выбросов на разных территориях, но и различной чувствительностью лимфоцитов крови и эпителиоцитов щеки к этим воздействиям. Таким образом, данная работа пополняет пока ещё очень немногочисленный список исследований, в которых эти две ткани от одних и тех же людей как индикаторы генотоксического воздействия проявили разную чувствительность [58] вопреки сложившемуся в литературе мнению об их идентичности [61].

Половой диморфизм эффектов нестабильности генома, обнаруженный в данной работе, также показан в ряде более ранних публикаций [29, 50–57]. Хотя этот феномен пока не получил теоретического обоснования, он заслуживает внимания уже только потому, что воспроизводится в исследованиях, выявивших генотоксические эффекты, и практически отсутствует при изучении групп сравнения. Это позволяет сформулировать гипотезу о том, что наличие гендерных различий в эффектах нестабильности генома может указывать на присутствие токсических и/или генотоксических факторов в компонентах окружающей среды.

Л и т е р а т у р а

(п.п. 2–21, 24, 25, 27, 28, 34, 36–43, 45–51, 53, 55–57, 59, 61 см. References)

1. Промышленное загрязнение территорий российской части Баренцева региона. Доклад объединения Bellona. 2014: https://bellona.org/assets/sites/4/2015/10/fil_BAR_REG_05.pdf.
22. Миняев А. Завершена проверка филиала ОАО «Группа «Илим» в г. Коряжма (Котласский ЦБК). <http://www.wood.ru/ru/lonewsid-31580.html>.
23. Пелевина И.И., Готлиб В.Я., Кудряшова О.В. и соавт. Нестабильность генома после воздействия радиации в малых дозах (в 10-километровой зоне аварии на ЧАЭС и в лабораторных условиях). *Радиационная биология. Радиоэкология*. 1996; 36 (4): 546–59.
26. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Проллиферация клеток. *Экологическая генетика*. 2006; 4 (3): 7–19.
29. Кривцова Е.К., Юрченко В.В., Ингель Ф.И., Юрцева Н.А., Синицына Е.Р., Макарова А.С. Применение цитомного анализа буккального эпителия в системе гигиенической оценки условий обучения студентов разных факультетов одного ВУЗа. *Гигиена и санитария*. 2018; 97 (2): 179–87.
30. Дубровская О.Ф. *Руководство по использованию восьмицветового теста Люшера*. М.: Когито-Центр; 2008. 63 с.
31. Собчик Л.Н. Метод цветowych выборов – модификация восьмицветового теста Люшера. СПб.: Речь; 2006.
32. Драгунский В.В. *Цветовой личностный тест. Практическое пособие*. Минск: Харвест; 1999. 448 с.
33. Прихожан А.М., Ингель Ф.И., Гулянец С.С., Ревазова Ю.А. *Методика проведения психологических обследований взрослого населения и её использование в генетико-экологическом мониторинге. Методические рекомендации*. М.; 2003. 22 с.
35. Ингель Ф.И., Юрченко В.В., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А., Легостаева Т.Б., Анциферов Б.М. Психосоциальные проблемы семьи и учителя как модификаторы нестабильности генома детей в промышленных городах России. *Гигиена и санитария*. 2015; 94 (6): 91–6.
44. Юрченко В.В., Кривцова Е.К., Подольная М.А., Беляева Н.Н., Малышева А.Г., Дмитриева Р.А. и соавт. Микроядерный тест на эпителии щёки в комплексной оценке экологического благополучия детей в Москве. *Гигиена и санитария*. 2007; 6: 83–5.
52. Китаева Л.В., Михеева Е.А., Шеломова Л.Ф., Шварцман П.Я. Генотоксический эффект формальдегида в соматических клетках человека *in vivo*. *Генетика*. 1996; 32 (9): 1287–90.
54. Маймулов В.Г., Китаева Л.В., Верецагина Т.В., Михеева Е.А., Шеломова Л.Ф. Цитогенетические нарушения в соматических клетках у детей, проживающих в районах с различной интенсивностью загрязнения окружающей среды. *Цитология*. 1998; 40 (7): 686–9.
58. Юрченко В.В., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А., Ингель Ф.И. Микроядерный тест на клетках буккального эпителия и культуре крови человека: сравнение эффективности. *Гигиена и санитария*. 2018; 97 (12): 1244–8.
60. Сычева Л.П., Иванов С.И., Коваленко М.А., Журков В.С., Беляева Н.Н., Анциферов Б.М. Цитогенетический статус детей, проживающих вблизи целлюлозно-бумажного комбината. *Гигиена и санитария*. 2010; 1: 7–10.

References

1. Industrial pollution of the territories of the Russian part of Barents region. Report of the Bellona Association. 2014: https://bellona.org/assets/sites/4/2015/10/fil_BAR_REG_05.pdf. (in Russian)
2. Argentin G., Cicchetti R. Evidence for the role of nitric oxide in antiapoptotic and genotoxic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Apoptosis*. 2006; 11 (11): 1887–97.
3. Baden J.M., Rice S.A. Metabolism and toxicity of inhaled anesthetics. In: Miller RD, ed. *Anesthesia*, 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2000: 147–73.
4. Zhuang J.C., Wright T.L., de Rojas-Walker T., Tannenbaum S.R., Wogan G.N. Nitric oxide-induced mutations in the HPRT gene of human lymphoblastoid TK6 cells and in *Salmonella typhimurium*. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35 (1): 39–47.
5. Wu X., Takenaka K., Sonoda E., Hochegger H., Kawanishi S., Kawamoto T. et al. Critical roles for polymerase zeta in cellular tolerance to nitric oxide-induced DNA damage. *Cancer Res*. 2006; 66 (2): 748–54.
6. Victorin K. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res*. 1994; 317 (1): 43–55.
7. Koehler C., Ginzkey C., Friehs G., Hackenberg S., Froelich K., Scherzed A. et al. Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 245 (2): 219–25.

8. Finkelstein A., Benevenga N.J. The Effect of Methanethiol and Methionine Toxicity on the Activities of Cytochrome c Oxidase and Enzymes Involved in Protection from Peroxidative Damage. *J Nutr*. 1986; 116: 204–9.
9. Setoguchi T., Machigashira M., Yamamoto M., Yotsumoto Y., Yoshimori M., Izumi Y. et al. The effects of methyl mercaptan on epithelial cell growth and proliferation. *Int Dent J*. 2002; 52 (13): 241–6.
10. Attene-Ramos M.S., Wagner E.D., Gaskins H.R., Plewa M.J. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res*. 2007; 5 (5): 455–9.
11. Attene-Ramos M.S., Nava G.M., Muellner M.G., Wagner E.D., Plewa M.J., Gaskins H.R. DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. *Environ Mol Mutagen*. 2010; 51 (4): 304–14.
12. Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res*. 1997; 386 (3): 291–8.
13. Zhong B.Z., Gu Z.W., Wallace W.E., Whong W.Z., Ong T. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res*. 1994; 321 (1–2): 35–42.
14. Rojas-Lemus M., Altamirano-Lozano M., Fortoul T.I. Sex difference in blood genotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation. *J Appl Toxicol*. 2014; 34 (3): 258–64. DOI: 10.1002/jat.2873.
15. Langseth H., Andersen A. Cancer incidence among male pulp and paper workers in Norway. *Scand J Work Environ Health*. 2000; 26 (2): 99–105.
16. Andersson E., Nilsson R., Toren K. Gliomas among men employed in the Swedish pulp and paper industry. *Scand J Work Environ Health*. 2002; 28 (5): 333–40.
17. Andersson E., Westberg H., Bryngelsson A., Persson B. Cancer incidence among Swedish pulp and paper mill workers: a cohort study of sulphate find sulphite mills. *Int Arch Occup Environ Health*. 2013; 86 (5): 529–40. DOI: 10.1007/s00420-012-0785-1.
18. Szadkowska-Stanczyk I., Szymczak W., Szeszenia-Dabrowska N., Wilczynska U. Cancer risk in workers of the pulp and paper industry in Poland. A continued follow-up. *Int J Occup Med Environ Health*. 1998; 11 (3): 217–25.
19. Lee W.J., Teschke K., Kauhainen T., Andersen A., Jappinen P., Szadkowska-Stanczyk I. et al. Mortality from lung cancer in works exposed to sulfur dioxide in the pulp and paper industry. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 (10): 991–5.
20. McLean D., Pearce N., Langseth H., Jappinen P., Szadkowska-Stanczyk I., Persson B. et al. Cancer mortality in workers exposed to organochlorine compounds in the pulp and paper industry: an international collaborative study. *Environ Health Perspect*. 2006; 116 (7): 1007–12.
21. Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 625–31.
22. Minyaev A. The audit of the branch of OJSC “Ilim Group” in the city of Koryazhma (Kotlas Pulp and Paper Mill). <http://www.wood.ru/ru/lonewsid-31580.html>. (in Russian)
23. Pelevina I.I., Gotlib V.Ya., Kudryashova O.V. et al. Genome instability after exposure to small doses of irradiation (in the 10-km zone of the Chernobyl NPP accident and in laboratory studies). *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya [Radiation biology. Radioecology]*. 1996; 36 (4): 546–59. (in Russian)
24. Titenko-Holland N., Jacob R.A., Shang N. et al. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in filate. *Mutat Res*. 1998; 417: 101–14.
25. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 2006; 537 (7): 127–32.
26. Ingel F.I. Perspectives Of Micronuclear Test In Human Lymphocytes Cultivated In Cytogenetic Block Conditions. Part 1: Cell Proliferation. *Ekologicheskaya genetika [Ecological Genetics]*. 2006; 4 (3): 7–19. (in Russian)
27. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992; 271: 69–77.
28. Bolognesi C., Knasmueller S., Nersesyan A., Thomas Ph., Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013; 753: 100–13.
29. Krivtsova E.K., Yurchenko V.V., Ingel F.I., Yurtseva N.A., Sinitynsina E.R., Makarova A.S. Buccal micronucleus cytome assay in the system of the hygienic evaluation of learning conditions of students of different faculties of the same university. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2018; 97 (2): 179–87. (in Russian)
30. Dubrovskaya O. *Guide to the use of eight-color test Luscher [Rukovodstvo po ispol'zovaniyu vos'mitsvetovogo testa Lyushera]*. Moscow: Kogito center; 2008. 63 p. (in Russian)

31. Sobchik L.N. The color selection method. *The modification of 8-color M. Lusher's test [Metod tsvetovyykh vyborov – modifikatsiya vos'mitsvetovogo testa Lyushera]*. St.-Peterburg: Rech; 2006. (in Russian)
32. Dragunskiy V.V. *Color personal test. Practical guide [Tsvetovoy lichnostnyy test. Prakticheskoye posobiye]*. Minsk: Harvest; 1999. 448 p. (in Russian)
33. Prikhozhan A.M., Ingel F.I., Gulyants S.S., Revazova Y.A. *Methods of conducting psychological testing of the adults and its application to genetic and hygienic monitoring. Guidelines [Metodika provedeniya psikhologicheskikh obsledovaniy vzroslogo naseleniya i yeye ispol'zovaniye v genetiko-gigiyenicheskom monitoringe. Metodicheskiye rekomendatsii]*. Moscow; 2003. 22 p. (in Russian)
34. Perrudet-Badoux A., Mendelsohn G., Chiche J. Developpement et validation d'une echelle pour l'évaluation subjective du "Bientre". *Cak Antkropol Biomet Hum.* 1988; V: 121–34.
35. Ingel F.I., Yurchenko V.V., Krivtsova E.K., Yurtseva N.A., Legostaeva T.B., Antsiferov B.M. Psychosocial problems of the family and the teacher as modifiers of the children's genomic instability in Russian industrial towns. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2015; 94 (6): 91–6. (in Russian)
36. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol.* 1998; 140 (6): 1307–20.
37. Cerqueira E.M., Gomes-Filho I.S., Trindade S., Lopes M.A., Passos J.S., Machado-Santelli G.M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res.* 2004; 562: 111–7.
38. Bohrer P.L., Filho M.S., Paiva R.L., da Silva I.L., Rados P.V. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol.* 2005; 49: 265–72.
39. Ramirez A., Saldanha P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res.* 2002; 1 (3): 246–60.
40. Torres-Bugarin O., Ventura-Aguilar A., Zamora-Perez A., Gomez-Meda B.C., Ramos-Ibarra M.L., Morgan-Vilella G. et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicin regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res.* 2003; 539 (1–2): 177–86.
41. Gomez-Arroyo S., Diaz-Sanchez Y., Meneses-Perez M.A., Villalobos-Petrini R., De Leon-Rodriguez J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res.* 2000; 466: 117–24.
42. Raj V., Mahajan S. Dose response relationship of nuclear changes with fractionated radiotherapy in assessing radiosensitivity of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Dent.* 2011; 3 (3): 193–200. DOI: 10.4317/jced.3e193.
43. Nersesyan A.K. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutat Res.* 2005; 588 (1): 64–8.
44. Yurchenko V.V., Krivtsova Y.K., Podolnaya M.A., Belyaeva N.N., Malyshova A.G., Dmitriyeva R.A. et al. Buccal epithelial micronuclear test in the comprehensive assessment of children's ecological well-being in Moscow. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2007; 6: 83–5. (in Russian)
45. Koss L.G. *Diagnostic cytology and its gistopathologic bases. Ed. 3. Vol. 1–2*. Philadelphia: Lippincott Co; 1979. 48 p.
46. King R.W. When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1786 (1): 4–14. DOI: 10.1016/j.bbcan.2008.07.007.
47. Pampalona J., Frias C., Genesca A., Tusell L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS Genetics.* 2012; 8 (4): e1002679. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002679.
48. Shi Q., King R.W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature.* 2005; 437: 1038–42.
49. Uryvaeva I.V., Delone G.V. An improved method of mouse liver analysis: an application to age-related genetic alteration and polyploidy study. *Mutat Res.* 1995; 334: 71–80.
50. Bonassi S., Coskun E., Ceppi M., Lando C., Bolognesi C., Burgas S. et al. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011; 728 (3): 88–97.
51. Benites C.I., Amado L.L., Packeiser Vianna R.A., da Graça Martino-Roth M. Micronucleus test on gas station attendants. *Genet Mol Res.* 2006; 5 (1): 45–54.
52. Kitaeva L.V., Mikheeva E.A., Shelomova L.F., Shvartsman P.Ya. Genotoxic Effect of Formaldehyde in Somatic Human Cells *in vivo*. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 1996; 32 (9): 1287–90. (in Russian)
53. Sram R.J., Svecova V., Rossnerova A. Systematic review of the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay to measure DNA damage induced by exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 2016; 770 (PtA): 162–9. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.07.009.
54. Maimulov V.G., Kitaeva L.V., Vereshchagina T.V., Mikheeva E.A., Shelomova L.F. Cytogenetic aberrations in somatic cells of children living in areas with various levels of environmental pollution. *Tsitologiya [Cytology]*. 1998; 40 (7): 686–9. (in Russian)
55. Moore L.E., Warner M.L., Smith A.H. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated epithelial human cells. *Environ Mol Mutagen.* 1996; 27 (3): 176–84.
56. Bilban M., Bilban Jakopin C., Ogrinc D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). *Int Arch Occup Environ Health.* 2005; 8: 60–4.
57. Chandrasekhar M., Rekhadevi P.V., Sailaja N., Rahman M.F., Reddy J.P., Mahboob M. et al. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis.* 2006; 21 (4): 249–54.
58. Yurchenko V.V., Krivtsova E.K., Urtseva N.A., Ingel F.I. Comparison of an efficiency between micronucleus test in buccal epithelial cells and cultured human blood lymphocytes. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2018; 97 (12): 1244–8. (in Russian)
59. Sycheva L.P., Ivanov S.I., Kovalenko M.A., Zhurkov V.S., Belyaeva N.N., Antsiferov B.M. Cytogenetic status of children living near a pulp and paper mill. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2010; 1: 7–10 (in Russian)
60. Neri M., Ceppi M., Knudsen L.E., Merlo D.F., Barale R., Puntoni R. et al. Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environ Health Perspect.* 2005; 113 (9): 1226–9.
61. Ceppi M., Biasotti B., Fenech M., Bonassi S. Human populational studies with the exfoliated buccal micronuclei assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res-Rev Mutat.* 2010; 705: 11–9.