

© ИВАНОВА С.М., 2019

Иванова С.М.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ОБРАЗЦОВ МОЧИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТОВ ФАКТОРОВ СРЕДЫ МИКРОЯДЕРНЫМ МЕТОДОМ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119121, Москва

Введение. Многочисленные исследовательские работы указывают на существование взаимосвязи между риском развития рака мочевого пузыря и увеличением в моче количества эксфолиативных эпителиальных клеток (ЭК) с микроядрами (МЯ). Поскольку рак в большинстве случаев развивается именно из эпителиальных клеток, необходима стандартизированная методика их выделения и анализа. При оценке мутагенности, токсичности фактора, класса опасности важно оценивать не только его цитогенетическое, но и цитотоксическое воздействие.

Материал и методы. В качестве метода выделения клеток из образцов мочи использовали модифицированный нами способ Stich. Для оценки цитогенетических повреждений в ЭК применяли МЯ-тест.

Результаты. Результатом наших исследований стала приведённая в статье упрощённая модифицированная методика выделения клеток из образцов мочи, их окраска, микрофото, критерии анализа цитогенетического и цитотоксического воздействия. Применяя модифицированную методику, мы нашли, что примерно 75% клеток в моче у женщин поступают в мочу из половой системы. При тампонаде уменьшается количество клеток плоского эпителия в среднем в 2 раза и уменьшается число лизированных клеток в среднем в 3,5 раза, но увеличивается в 2 раза показатель пролиферации (частота двуядерных клеток). При этом увеличивается чувствительность самого метода вследствие увеличения числа взятых в анализ уротелиальных клеток, которые обладают большей чувствительностью к цитогенетическим воздействиям. Предложенный нами расширенный протокол анализа ЭК мочи с фиксацией цитотоксических повреждений (частота встречаемости клеток с конденсацией, лизисом, вакуолизацией ядра) и изменений в пролиферации увеличивает чувствительность и информативность метода.

Заключение. Таким образом, разработанная нами модификация метода МЯ-теста в ЭК мочи является информативной – демонстрирует генотоксические и цитотоксические повреждения, изменения в пролиферации, наличие воспалительного процесса и его причину. Тест является экономичным, подходит для массового мониторинга населения, так как неинвазивный и позволяет собирать материал вне клиники.

Ключевые слова: микроядра; эксфолиативные эпителиальные клетки; рак мочевого пузыря; образцы мочи; влажная тампонада.

Для цитирования: Иванова С.М. Выделение эпителиальных клеток из образцов мочи человека для цитогенетической и цитотоксической оценки эффектов факторов среды микроядерным методом. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(11): 1235-1239. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-11-1235-1239>

Для корреспонденции: Иванова Светлана Михайловна, кандидат биол. наук, научный сотрудник лаборатории генетической токсикологии с группой цитогистологии ФГБУ ЦСП Минздрава России, 119121, Москва. E-mail: shersvetlana@bk.ru

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.
Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.03.2019
Принята к печати 17.09.19
Опубликована: ноябрь 2019

Ivanova S.M.

SEPARATION OF EXFOLIATED EPITHELIAL CELLS FROM HUMAN URINE SAMPLES FOR CYTOGENETIC AND CYTOTOXIC EVALUATION OF THE EFFECTS OF FACTORS BY THE MICRONUCLEUS ASSAY

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

Introduction. Numerous research studies indicate a relationship between the risk of developing bladder cancer and an increase in the number of exfoliative epithelial cells (EEC) with micronuclei (MN) in the urine. Since cancer in most cases develops precisely from epithelial cells, a standardized method for their isolation and analysis is needed. When assessing mutagenicity, the toxicity of a factor, hazard class, it is important to evaluate not only it is cytogenetic but also cytotoxic effect.

Material and methods. As a method for isolating cells from urine samples, we used the modified Stich method. To assess cytogenetic damage in the EEC, the ME test was used.

Results. The result of our research was the simplified modified method for isolating cells from urine samples given in the article, their color, microphotograph, and criteria for analyzing cytogenetic and cytotoxic effects. Using a modified method, we found that approximately 75% of the cells in the urine of women enter the urine from the reproductive system. With tamponade, the number of squamous epithelium cells decreases average by 2 times and the number of lysed cells decreases average by 3.5 times, but the proliferation rate increases (the frequency of binuclear cells) by 2 times. At the same time, the sensitivity of the method itself increases as a result of a the gain in the number of urothelial cells taken in the analysis, which are more sensitive to cytogenetic effects. The proposed advanced protocol for the analysis of the EEC of urine with the fixation of cytotoxic damage (the frequency of occurrence of cells with condensation, lysis, vacuolization of the nucleus) and changes in proliferation (the frequency of dual-core cells) increases the sensitivity and informativeness of the method.

Conclusion. Thus, the modification of the MN method of the urine EEC test developed by us is informative as it demonstrates genotoxic and cytotoxic damage, changes in proliferation, the presence of an inflammatory process and its cause. The test is economical, suitable for the mass monitoring of the population because it is non-invasive and allows collecting material outside the clinic.

Key words: micronuclei kinetics; exfoliated epithelial cells; bladder cancer; urine samples; vaginal tamponade.

For citation: Ivanova S.M. Separation of exfoliated epithelial cells from human urine samples for cytogenetic and cytotoxic evaluation of the effects of factors by the micronucleus assay. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)* 2019; 98(11): 1235-1239. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-11-1235-1239>

For correspondence: Svetlana M. Ivanova, MD, Ph.D., researcher of the laboratory of genetic toxicology with a group of cytohistology of the Center for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: shersvetlana@bk.ru.

Information about authors: Ivanova S.M., <https://orcid.org/0000-0001-5057-9514>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: March 11, 2019

Accepted: September 17, 2019

Published: November 2019

Введение

По данным Министерства Российской Федерации, рак мочевого пузыря (РМП) у мужчин занимает 7-е, а у женщин 17-е место среди всех раковых заболеваний. В России в 2014 г. на учёте в онкодиспансерах с диагнозом РМП числилось 95 728 человек, что соответствует показателю 65,7 на 100 тыс. населения, тогда как в 2002 г. этот показатель равнялся 40,6 [1]. По данным онкологического института им. Герцена, в России только в 2016 г. зафиксировано новых случаев рака мочевого пузыря у мужчин – 12 635, у женщин – 3830, рака почки у мужчин – 13 148, у женщин – 10 760 человек [2]. Даже этот небольшой объём данных свидетельствует об острой необходимости оценки воздействия различных факторов среды на эпителиальные клетки мочеобразующей и мочевыводящей систем.

Такие цитогенетические повреждения, как разрыв, потеря и перестройка хромосомы, всегда предшествуют развитию рака [3], поэтому использование биомаркёров повреждения хромосом, таких как микроядра (МЯ) и протрузии, может позволить прогнозировать риск заболевания [4]. МЯ выглядят как небольшие хроматиновые тельца, находящиеся в цитоплазме, состоящие или из участка хромосомы, или из целой хромосомы, которые становятся видны после завершения телофазы митоза [5]. На существование взаимосвязи между возникновением МЯ и развитием опухоли указывает множество работ [6, 7]. Достоверно известно, что раковые клетки в подавляющем большинстве случаев развиваются из эпителиальных клеток [8]. Впервые предложил применять МЯ-тест на эксфолированных эпителиальных клетках человека, в том числе и уротелии, в 1984 г. Stich H.F. [9]. Свой выбор он объяснил высокой скоростью обновления эпителиальных тканей, что позволяет выявить повреждение ДНК, произошедшее в базальном слое клеток, уже через 1–3 нед. Доказано, что действие целого ряда мутагенных факторов среды приводит к хромосомным повреждениям ДНК в базальных клетках эпителия, которые в свою очередь приводят к развитию РМП [10]. Например, к увеличению количества МЯ в эксфолиативных эпителиальных клетках (ЭЭК) приводит курение [11], контакт с мышьяком [12], работа в ряде отраслей промышленности и сельского хозяйства [13]. Также известно, что под действием естественных эндогенных механизмов с возрастом у человека происходит увеличение количества МЯ в ЭЭК [14]. Выявлено достоверное повышение частоты эпителиальных клеток с МЯ в мазках у пациенток с диагнозом рака шейки матки на всех стадиях развития опухоли, в том числе и на ранней, когда клинически болезнь ещё не проявилась [15]. Tolbert P.E. и соавт. предложили наряду с микроядрами в эксфолиативных эпителиальных клетках щеки (буккальном эпителии) анализировать и другие показатели, такие как протрузии (МЯ типа «разбитое яйцо»), конденсацию хроматина, кариолизис, двуядерность и т. д. [16]. Лизис ядра и апоптоз являются механизмами естественной «самоочистки» ткани от геномных изменений [17]. Вакуолизация ядра, конденсация хроматина, кариолизис и т. д. рассматриваются как показатели цитотоксического воздействия на клетку. На буккальном и назальном эпителии человека была продемонстрирована важность этих показателей при оценке эко-

логически обусловленных заболеваний [18]. Подобная оценка необходима и для обоснования класса опасности лекарственных отходов [19]. В работе Юрченко В.В. и соавт. показано на клетках буккального эпителия дозозависимое снижение частоты клеток с конденсацией и лизисом по мере увеличения суммарного загрязнения воздуха на территории детских садов Москвы [20]. Увеличение клеток с «вакуолизированным ядром» в 5,2 раза по сравнению с клетками контрольной группы было обнаружено при анализе буккального эпителия женщин, живших на территории Южного Вьетнама, где применялись гербициды, содержащие диоксин [21]. Также показано, что у больных раком шейки матки частота клеток с «вакуолизированным ядром» в 25 раз выше, а у пациенток носителей вируса HPV в 33 раза выше по сравнению с контролем [22]. В эксфолиативных клетках конденсация хроматина – это деструкция ядра, при которой хроматин имеет вид тёмных глыбок и тяжей, между которыми находятся небольшие бесцветные полости. Особенностью ядра при «вакуолизации» является то, что оно бледное, слегка увеличено и имеет округлые вакуоли. Кариолизис рассматривается как окончательный этап деструкции ядра и выглядит как «растворённое ядро» или как «тень» ядра [23]. Большинство клеток человека одноядерные, но, например, клетки активно функционирующих желёз – двуядерные. Количество двуядерных клеток при воспалительных и раковых процессах увеличивается [24, 25]. Также увеличивается число двуядерных клеток в уротелии человека при заражении папилломавирусом [26]. В наших работах по тестированию МЯ методом различных мутагенных факторов на экспериментальных животных выявлено достоверное увеличение количества двуядерных клеток в эпителии мочевого пузыря в опытных группах по сравнению с контрольными при изучении мутагенных свойств диоксида [27], диоксида азота [28]. Увеличение количества двуядерных клеток может рассматриваться как показатель генотоксичности фактора [29]. Появление под воздействием токсических веществ двуядерных клеток с биологической точки зрения оправданно – такие клетки более активны и благодаря полиплоидии защищены от последствий мутаций [30].

Протокол анализа ЭЭК мочи на сегодняшний день не разработан. Поэтому мы предлагаем использовать критерии оценки, разработанные для клеток буккального эпителия. В этой статье мы предлагаем упрощённую модификацию методики приготовления препаратов ЭЭК из мочи человека для цитогенетического и цитотоксического анализа МЯ-тестом. Данная работа является продолжением исследований эксфолиативных эпителиальных клеток мочи человека, начатых в 2006 г. лабораторией генетической токсикологии с группой цитогистологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

Материал и методы

В основу метода выделения клеток из мочи был взят способ Stich [9]. Методику отработывали на образцах мочи волонтеров – 5 мужчин и 4 женщин. Возрастной диапазон группы от 32 лет до 71 года. От каждой женщины были получены два образца

Таблица 1

Цитогенетические и цитотоксические показатели в эксфолиативных эпителиальных клетках мочи мужчин

№	Волонтер		Количество проанализированных клеток	Плоский эпителий		Микроядра	Протрузии	Двуядерные клетки	Конденсация хроматина	Вакуолизация	Лизис
	пол	возраст, годы		б/т	вт						
1	Мужчина	32	1000	26	0	0	0	6	40	8	104
2	Мужчина	36	1000	227	1	1	1	0	43	9	9
3	Мужчина	50	1000	11	2	1	1	1	30	10	5
4	Мужчина	71	1000	19	0	0	0	4	1	0	108
5*	Мужчина	34	228*	7*	0*	0*	0*	3*	1*	0*	68*
$x_{cp} \pm m$				70 ± 104,3	0,75 ± 0,9	0,5 ± 0,6	2,75 ± 2,7	28,5 ± 19,1	6,75 ± 4,6	56,5 ± 57,2	

Примечание.* 228 – количество эпителиальных клеток на препарате. Показатели под звездочкой в сравнение не берутся.

мочи: без влажной тампонады, другой с тампонадой. Всего проанализировано 13 препаратов.

Методика сбора мочи. После инструктирования от каждого участника был собран образец мочи в чистый контейнер. Объём мочи варьировался от 100 до 300 мл. Полученные образцы обрабатывали сразу или хранили в холодильнике не более 2 ч. Первая порция мочи после сна не использовалась, так как содержит много лизированных клеток.

Приготовление препаратов. Первое центрифугирование проводили в течение 12 мин при 2000 об./мин. Надосадочную жидкость аккуратно убрали, оставляя по 1 мл в каждой пробирке. «Осадок» из всех пробирок переносили в одну и центрифугировали с фиксатором (метанол : ледяная уксусная кислота, 4 : 1) в том же режиме. Клетки осадка распределяли на предметном стекле и сразу приступали к окраске ядер 2,5% раствором ацетоорсеина в течение 8 мин, цитоплазму докрашивали, помещая стекло на 1 с в 1% спиртовой раствор светлого зелёного. Препарат можно анализировать в день его приготовления, после 30-минутной просушки. Для оценки генотоксических эффектов подсчитывали количество клеток, содержащих МЯ, и протрузии в 1000 проанализированных. Оценивая цитотоксический эффект в той же 1000 клеток, считали клетки с конденсацией хроматина, вакуолизацией и лизированным ядром. Для оценки изменения пролиферации считали количество двуядерных клеток. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы «Statistica for Windows». Для выявления статистически значимых отличий при сравнении показателей в ЭЭК женщин без тампонады с показателями в клетках, взятых от женщин с тампонадой, использовали критерий χ^2 .

Результаты

При микроскопировании под масляной иммерсией (увеличение в 10×90) различимы клетки эпителиальной ткани трёх видов: почечный эпителий (рис. 1, а, см. на 2-й стр. обложки); переходный эпителий (уротелий) покрывает почечные лоханки, мочеточники, мочевой пузырь, проксимальную уретру (рис. 1, б, см. на 2-й стр. обложки); плоский эпителий выстилает дистальный отдел уретры и наружные половые органы (рис. 1, в, см. на 2-й стр. обложки). На микрофото № 4–6 разные степени и пути деструкции ядра. На рис. 1, г конденсация хроматина выглядит как совокупность «глыбок» в ядре. При вакуолизации хроматина в ядре образуются округлые вакуоли (рис. 1, д, см. на 2-й стр. обложки).

В динамике лизиса ядро постепенно бледнеет и может исчезнуть совсем (рис. 2, а, см. на 2-й стр. обложки). На этой фотографии клетка окружена фагоцитами. Рис. 2, б (см. на 2-й стр. обложки) – двуядерная клетка с палочкой Дедерлейна, выделенная из мочи женщины. Палочка Дедерлейна обеспечивает нормальную кислую среду, защищая влагалище и шейку матки от воспаления. При воспалении палочка заменяется кокковой флорой, как показано на рис. 2, в, г (см. на 2-й стр. обложки). Здесь картины бактериального кандидоза, о чём свидетельствует мицелий гриба *Candida* (1) и многочисленные бактерии (2).

По результатам исследования мы разработали протокол цитогенетического и цитотоксического анализа ЭЭК мочи (табл. 1, 2). Наши исследования показали, что из одной пробы мочи мужчин и женщин с вагинальной тампонадой можно получить один препарат, пригодный для цитогенетического анализа

Таблица 2

Цитогенетические и цитотоксические показатели в эксфолиативных эпителиальных клетках мочи женщин без тампонады и с влажной тампонадой

№	Волонтер		Количество проанализированных клеток	Плоский эпителий		Микроядра		Протрузии		Двуядерные клетки		Конденсация хроматина		Вакуолизация		Лизис	
	пол	возраст, годы		б/т	вт	б/т	вт	б/т	вт	б/т	вт	б/т	вт	б/т	вт	б/т	вт
1	Женщина	25	1000	144	56	0	0	0	0	3	4	3	1	0	0	226	92
2	Женщина	40	1000	145	75	0	0	0	1	2	7	0	0	5	1	44	4
3	Женщина	51	1000	14	3	0	1	0	2	5	4	1	4	0	0	246	76
4	Женщина	61	1000	23	12	0	0	2	1	1	1	0	3	0	0	113	5
$x_{cp} \pm m$			1000	81,5 ± 36,4	36,5 ± 17,3	0	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,5	1 ± 0,41	2,7 ± 0,8	4 ± 1,2	1 ± 0,7	2 ± 0,91	1,2 ± 1,2	0,2 ± 0,2	157 ± 47,8	44,2 ± 23,2

Статистически значимое отличие по критерию χ^2 , показателей в клетках женщин без тампонады и с тампонадой

+
 $p < 0,00$

+
 $p < 0,00$

Примечание. б/т – без тампонады; вт – с влажной тампонадой.

МЯ-методом, а у тех же женщин без предварительной тампонады из одной пробы мочи – 4 хороших препарата. Это связано с попаданием в мочу клеток из женской половой системы. У мужчин только в одном случае из 5 не удалось набрать для МЯ-анализа 1000 клеток. У мужчины № 5 на препарате было найдено только 228 клеток, поэтому его показатели для сравнения с другими волонтерами не берутся. Несмотря на то что у мужчин по сравнению с женщинами без тампонады лизированных клеток меньше почти в 3 раза (у мужчин – $56,5 \pm 57,2\%$, у женщин $157 \pm 47,8\%$), обнаружено увеличение частоты встречаемости клеток с конденсацией хроматина в среднем в 28 раз (у мужчин – $28,5 \pm 19,1\%$, у женщин $0,1 \pm 0,7\%$), а с вакуолизацией ядра увеличение в 6 раз (у мужчин – $6,75 \pm 4,6\%$, у женщин – $1,2 \pm 1,2\%$).

Спонтанный уровень частоты клеток с микроядрами у мужчин в среднем $0,75 \pm 0,9\%$, у женщин без влагалищной тампонады клетки с микроядрами не найдены, у женщин с влагалищной тампонадой $0,2 \pm 0,2\%$. Частота клеток с протрузиями у мужчин $0,5 \pm 0,6\%$, у женщин без тампонады $0,5 \pm 0,5\%$, у женщин с тампонадой $1 \pm 0,41\%$. Частоты встречаемости двуядерных клеток у мужчин и женщин без тампонады совпали и составили соответственно $2,75 \pm 2,7$ и $2,7 \pm 0,8\%$, у женщин с тампонадой их количество выросло почти в два раза до $4 \pm 1,2\%$. Количество выделяемых клеток плоского эпителия зависит, во-первых, от наличия влагалищной тампонады – разница есть во всех случаях и составляет от 2 до 4,7 раза, во-вторых, с увеличением возраста уменьшается число выделяемых клеток из половых путей и мочевыделительной системы. Из половых путей женщины поступает большое число клеток с лизированным ядром, при влагалищной тампонаде их число во всех случаях уменьшается от 2,5 до 22,6 раза. Тампонирование статистически значительно уменьшает количество клеток с лизисом ядра и клеток плоского эпителия, но чувствительность метода, предназначенного для ранней диагностики и профилактики РМП, повышается, так как увеличивается взятых в анализ число уротелиальных клеток, которые оказываются более чувствительными к цитогенетическим факторам воздействия. Это подтверждается тем, что, проанализировав 13 тыс. клеток, мы обнаружили цитогенетические повреждения (МЯ, протрузии) в 10 уротелиальных клетках и только в 1 клетке плоского эпителия. Уротелием выстланы мочевого пузыря, почечные лоханки, мочеточники, проксимальная уретра, и именно эти клетки могут оказаться мишенью для воздействия многих мутагенных факторов.

Обсуждение

В нашей модификации метода предложено два центрифугирования в режиме 12 мин 2000 об./мин, и только последнее центрифугирование с фиксатором. Окраску препаратов мы рекомендуем проводить 2,5% раствором ацетоорсеина и 1% спиртовым раствором светлого зелёного. В результате образуется хороший контраст – ядра вишневого цвета, а цитоплазма бирюзового. В зарубежной методике предлагают три центрифугирования по 20; 10 и 10 мин в режиме 2500 и 1000 об./мин, в двух сменах фиксатора и с последующей окраской раствором Гимзы [31]. Хотя мы и показали, что МЯ и протрузии чаще встречаются в клетках переходного эпителия (уротелия), однако для массового мониторинга женского населения целесообразно проводить МЯ-тест на ЭЖ мочи без тампонады. Это позволит прогнозировать и выявлять более распространённое среди женщин заболевание – рак шейки матки, так как связь между увеличением частоты встречаемости в клетках плоского эпителия МЯ и риском развития рака шейки матки доказана [15, 32]. Также целесообразно в протокол анализа ЭЖ мочи включить предложенную нами оценку цитотоксических показателей; так, например, зарубежные исследователи определили, что у больных раком шейки матки количество клеток с вакуолизацией ядра увеличивается в 25 раз при их отсутствии в контрольной группе [22]. К этому показателю близки данные и нашей работы, где у женщин с тампонадой частота встречаемости клеток с вакуолизацией ядра составила всего лишь $0,2 \pm 0,2\%$, а без тампонады $1,2 \pm 1,2\%$. В России много научных работ, посвящённых цитологическому исследованию осадка мочи больных с диагнозом РМП [33], хроническим воспалением уротелия [34], но мы не нашли работ по

оценке цитогенетическими методами степени риска возникновения РМП. Данное направление требует дальнейшего накопления данных. Ограничения метода обусловлены агрессивной средой мочи, в которой клетки достаточно быстро разрушаются, поэтому препараты необходимо готовить или сразу после получения образца мочи, или хранить его в холодильнике перед приготовлением не более 2 ч. Содержание ЭЖ в образце мочи зависит от пола, возраста и индивидуальных особенностей человека, поэтому на анализ одного препарата может требоваться от 2 до 6 ч.

Заключение

Таким образом, предложенная нами упрощённая методика выделения ЭЖ из мочи подходит для массового мониторинга населения, так как является нетрудоёмкой и неинвазивной, поэтому не требует стерильности. Предлагаемый нами расширенный протокол анализа ЭЖ мочи позволяет оценить одновременно цитогенетические и цитотоксические факторы воздействия, а также пролиферативные процессы в клетке, что позволяет прогнозировать риск развития РМП.

Литература

(пп. 3, 6–17, 24, 26, 31, 32 см. References)

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.; 2016.
2. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018. 250 с.
3. Сычева Л.П., Юрченко В.В., Журков В.С. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом. Метод. рекомендации. М.; 2001. 22 с.
4. Бродский И.Б., Брянцева С.А., Ковалева А.М., Урюпова Е.Ф., Гусев С.А., Сергиенко В.И. и соавт. Микроядра как маркеры хромосомных изменений клеток. Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2012; 4: 4–9.
5. Сычева Л.П., Рахманин Ю.А., Губернский Ю.Д., Коваленко М.А., Шереметьева С.М., Можая Т.Е. Диагностика экологически обусловленных нарушений здоровья человека путем оценки цитогенетического и кариологического статуса буккального и назального эпителия. В сб.: «Экологически обусловленные ущербы здоровью: методология, значение и перспективы оценки. Материалы Пленума НС по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и МЗ и СР РФ 22–23 декабря 2005 г.». Под ред. Ю.А. Рахманина. М.; 2005: 488–90.
6. Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Тепикина Л.А., Коваленко М.А., Шереметьева С.М., Шамарин А.А. и соавт. Необходимость использования морфофункциональных, цитогенетических и кариологических исследований при обосновании класса опасности лекарственных отходов. Сб. материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинские отходы: проблемы и пути решения». М.; 2005: 22–3.
7. 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.
8. Жулева Л.Ю., Умнова Н.В., Румак В.С. Регистрация микроядер в слущивающихся клетках слизистой ротовой полости человека на территории Южного Вьетнама. Генетика. 1996; 32 (12): 1700–4.
9. Коломиец Л.А., Чуруксаева О.П., Уразова Л.Н., Севостьянова Н.В. Особленности цервикальных клеток у женщин, инфицированных папилломавирусом HPV. Медицина в Кузбассе. 2005; 11: 39–41.
10. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. Медицинская генетика. 2007; 11: 3–11.
11. Исакова Л.М., Ганина К.П., Иванова И.М. и соавт. Цитологические особенности клеток многослойного сквамозного эпителия шейки матки в зависимости от ассоциации патологических процессов с вирусом папилломы человека. Цитология и генетика. 1997; 31 (6): 3–11.
12. Сычева Л.П., Шарова М.А., Коваленко М.А., Шереметьева С.М., Журков В.С. Оценка мутагенной активности диоксида полиорганического микроядерным методом в опыте на крысах. Биолетень экспериментальной биологии и медицины. 2005; 140 (11): 542–544.
13. Шереметьева С.М., Коваленко М.А. Оценка цитогенетического действия диоксида азота в клетках костного мозга, мочевого пузыря и легких крыс. Материалы Всероссийской научно-практической кон-

ференции молодых учёных и специалистов «Окружающая среда и здоровье» (19–22 мая 2005 г, Суздаль). Суздаль; 2005: 511–4.

29. Беляева Н.Н. Клеточная восстановительная регенерация как биомаркёр вредного действия при гигиенической оценке факторов окружающей среды. Дис. ... канд. биол. наук. М.; 1997. 266 с.
30. Бродский В.Я., Урываева И.В. *Клеточная полиплоидия. Пролiferация и дифференцировка*. М.: Наука; 1981. 237 с.
33. Аль-Шукри С.Х., Эмануэль В.Л., Корнеева И.А., Соколова Н.М., Агеев М.Н. Прогностическая ценность цитологического исследования осадка мочи у больных раком мочевого пузыря. *Нефрология*. 2006; 10 (3): 101–4.
34. Перепечин Д.В., Чернышев И.В., Лошилов Ю.А., Никонова Л.М. Особенности цитологического исследования мочи при хроническом воспалении уротелия. *Врач-аспирант*. 2013; 60 (5.1): 181–5.
18. Sycheva L.P., Rakhmanin Yu.A., Gubernsky Yu.D., Kovalenko M.A., Sheremetyeva S.M., Mozhaeva T.E. Diagnosis of environmental disorders in human health by assessing the cytogenetic and karyological status of the buccal and nasal epithelium. In: *Environmental damage to health: Methodology, significance and prospects for evaluation. Proceedings of the NA Plenum on Human Ecology and Environmental Hygiene of the Russian Academy of Medical Sciences and the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation* December 22–23, 2005, edit. by Yu.A. Rakhmanin [Ekologicheski obuslovennyye ushcherby zdorov'yu: metodologiya, znachenije i perspektivy otsenki. Materialy Plenuma NS po ekologii cheloveka i gigiyene okruzhayushchey sredy RAMN i MZ i SR RF 22–23 dekabrya 2005 g. Pod red. Yu.A. Rakhmanina]. Moscow; 2005: 488–90. (in Russian)
19. Belyaeva N.N., Sycheva L.P., Tepikina L.A., Kovalenko M.A., Sheremetyeva S.M., Shamarin A.A. et al. The need to use morpho-functional, cytogenetic and karyological studies in justifying the hazard class of medicinal waste. *Sat. materials of the III All-Russian scientific-practical conference with international participation "Medical waste: problems and solutions"*. 2005: 22–3. (in Russian)
20. Yurchenko V.V., Krivtsova E.K., Podolnaya M.A., Belyaeva N.N., Malyshcheva A.G., Dmitrieva R.A. et al. Micronuclear test on the cheek epithelium in a comprehensive assessment of the environmental well-being of children in Moscow. *Gigiyena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian Journal]*. 2007; 6: 83–5. (in Russian)
21. Zhuleva L. Yu., Umnova N.V., Rumak V.S. Registration of micronuclei in exfoliated cells of the oral mucosa of a person in the territory South Vietnam. *Genetika [Genetics]*. 1996; 32 (12): 1700–4. (in Russian)
22. Kolomiets L.A., Churuksaeva O.P., Urazova L.N., Sevostyanova N.V. Features of cervical cells in women infected with papilloma virus HPV. *Meditsina v Kuzbasse [Medicine in Kuzbass]*. 2005; 11: 39–41. (in Russian)
23. Sycheva L.P. Biological significance, criteria for determining and limits of variation of the full range of karyological parameters in assessing the human cytogenetic status. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2007; 11: 3–11. (in Russian)
24. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer*. 1972; 26: 239–57.
25. Isakova L.M., Ganina K.P., Ivanova I.M. et al. Cytological features cells of the squamous epithelium of the cervix depending on associations of pathological processes with human papillomavirus. *Tsitologiya i genetika [Cytology and Genetics]*. 1997; 31 (6): 3–11. (in Russian)
26. Coman N., Ionescu M.D., Miscalencu D. Ultrastructural modifications at uterine cervix level induced by human papillomaviruses infections. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 1999; 58 (1): 65–78.
27. Sycheva L.P., Sharov M.A., Kovalenko M.A., Sheremetyeva S.M., Zhurkov B.C. Evaluation of the mutagenic activity of dioxazide by the micronucleus method in experiments on rats. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny [Bulletin of experimental biology and medicine]*. 2005: 140 (11): 542–544. (in Russian)
28. Sheremetyeva S.M., Kovalenko M.A. Evaluation of cytogenetic action nitrogen dioxide in the bone marrow, bladder and lung cells of rats. *Materials All-Russian scientific-practical conference of young Scientists and Specialists "Environment and Health" (May 19–22, 2005, Suzdal)*. Suzdal; 2005: 511–4. (in Russian)
29. Belyaeva N.N. Cell regenerative regeneration as a biomarker harmful effects in the hygienic assessment of environmental factors [Kletochnaya vosstanovitel'naya regeneratsiya kak biomarker vrednogo deystviya pri gigiyenicheskoj otsenke faktorov okruzhayushchey sredy]. Diss. Moscow; 1997. 266 p. (in Russian)
30. Brodsky V.Ya., Uryvaeva I.V. *Cell polyploidy. Proliferation and differentiation [Kletochnaya poliploidiya. Proliferatsiya i differentsirovka]*. Moscow: Nauka; 1981. 237 p. (in Russian)
31. González Cid M., Loria D., Vilensky M., Miotti J.L., Matos E. Leather tanning workers chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine. *Mutat Res*. 1991; 259 (2): 197–201.
32. Gashi G. The association between micronucleus, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds frequency and the degree of uterine cervical lesions. *Biomarkers*. 2018; 23: 364–72.
33. Al-Shukri S.Kh., Emanuel V.L., Korneev I.A., Sokolovo N.M., Ageev M.N. Prognostic value of cytological investigations of urine sediment in patients with bladder cancer. *Nephrology*. 2006; 10 (3): 101–4. (in Russian)
34. Perepetchin D.V., Chernyshev I.V., Ioschilov Yu.A., Nikonova L.M. Features of urine Cytology in chronic inflammation of urothelium. *Vrach-aspirant*. 2013; 60 (5.1): 181–5. (in Russian)

References

1. *The state of cancer care in Russia in 2015. [Sostoyaniye onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2015 godu.]* Edited by Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Moscow; 2016. (in Russian)
2. *Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality)*. Edited by Kaprin A.D. Starinsky V.V., Petrova G.V. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2016 godu (zabolevayemost' i smertnost')]. Pod redaktsiyey Kaprina A.D. Starinskogo V.V. Petrovoy G.V.] Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena, filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii; 2018. 250 p. (in Russian)
3. Kimura M., Umegaki K., Higuchi M., Thomas P., Fenech M. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism, Folic Acid and Riboflavin Are Important Determinants of Genome Stability in Cultured Human Lymphocytes. *J Nutr*. 2004; 134: 48–56.
4. Sycheva L.P., Yurchenko V.V., Zhurkov V.S. *Assessment of mutagenic activity of environmental factors in cells of different mammalian organs by micronuclear method. Methodical recommendations [Otsenka mutagennoy aktivnosti faktorov okruzhayushchey sredy v kletkakh raznykh organov mlekopitayushchikh mikroyadernym metodom. Metodicheskiye rekomendatsii]*. Moscow; 2001. 22 p. (in Russian)
5. Brodsky I.B., Bryantseva S.A., Kovaleva A.M., Uryupova E.F., Gusev S.A., Sergienko V.I. et al. Microkernels as markers of abnormalities cells. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii [Journal of Fundamental Medicine and Biology]*. 2012; 4: 4–9. (in Russian)
6. Bonassi S. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 625–31.
7. Pardini B. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. *Br J Cancer*. 2017; 116: 202–10.
8. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975; 255: 197–200.
9. Stich H.F., Rosin M.P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett*. 1984; 22: 241–53.
10. Hoyos-Giraldo L.S., Escobar-Hoyos L.F., Saavedra-Trujillo D., Reyes-Carvajal I., Muñoz A., Londoño-Velasco E. et al. Gene-specific promoter methylation is associated with micronuclei frequency in urothelial cells from individuals exposed to organic solvents and paints. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2015; 1–6.
11. Freedman N.D., Silverman D.T., Hollenbeck A.R., Schatzkin A., Abnet C.C. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011; 306 (7): 737–45.
12. Ghosh P., Basu A., Singh K.K., Giri A.K. Evaluation of cell types for assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population. *Mol Cancer*. 2008; 7: 45.
13. Krech E. et al. Urinary bladder cancer risk factors in an area of former coal, iron, and steel industries in Germany. *J Toxicol Environ Health A*. 2017; 80: 430–8.
14. Fenech M., Holland N., Zeiger E., Chang W.P., Burgaz S., Thomas P. et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis*. 2011; 26 (1): 239–45.
15. Gandhi G., Kaur B. Elevated frequency of Micronuclei in uterine smears of cervix cancer patients. *Caryologia*. 2003; 56: 217–22.
16. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992; 271: 69–77.
17. Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12 (6): 385–92.

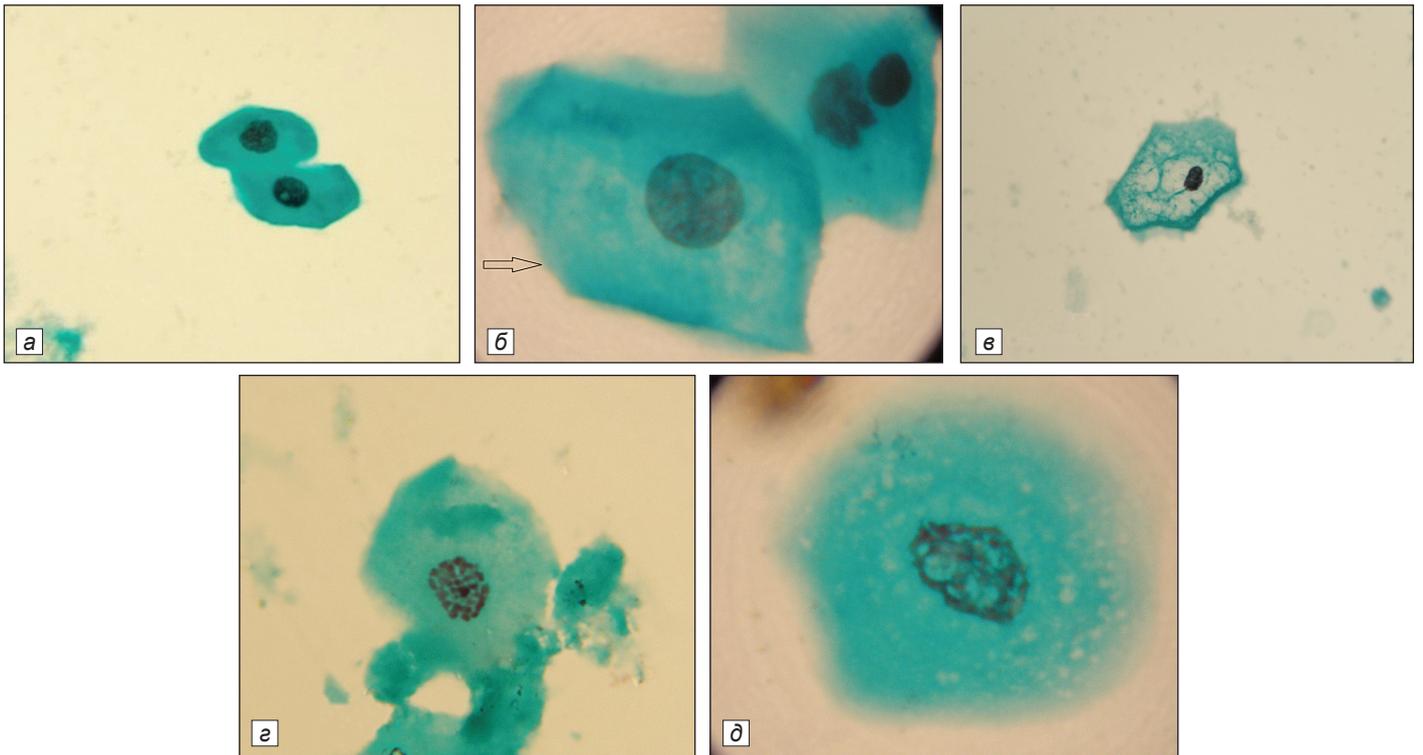


Рис. 1. Микрофото клеток почечного (а), переходного – уротелий (б) и плоского (в) эпителия; уротелиальные клетки с конденсацией (г) и вакуолизацией ядра (д) из образца мочи мужчины при увеличении в 10×90 .
Окраска ацетоорсеином и светлым зелёным (фото Ивановой С.М.).

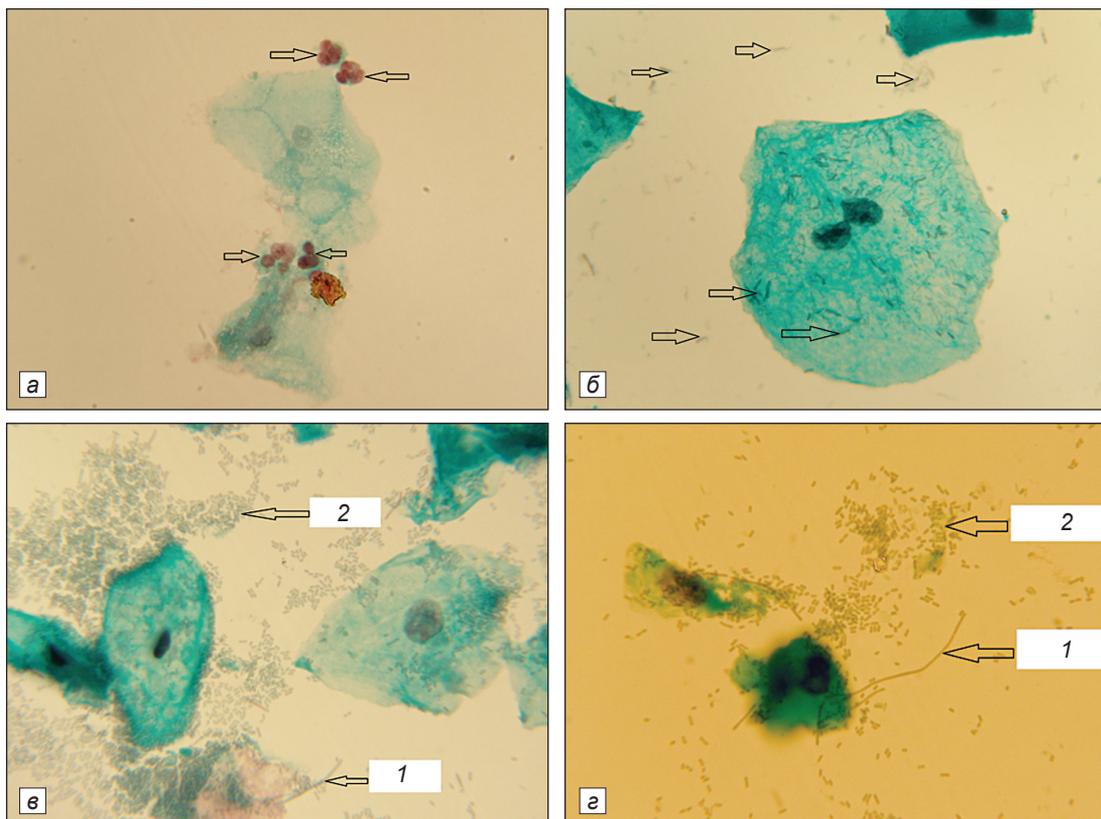


Рис. 2. Микрофото клетки с бледным лизированным ядром (а), окружённой четырьмя фагоцитами. Двухъядерная клетка (б) в окружении палочек Дедерлейна. Эксфолиативные клетки на фоне бактериального кандидоза (в, г), 1 – грибы *Candida*; 2 – воспалительная кокковая флора. Клетки из образца мочи женщины при увеличении в 10×90 .
Окраска ацетоорсеином и светлым зелёным (фото Ивановой С.М.).