

УДК 616.311-018.7-07

Использование различных методов исследования эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта для определения физиологического состояния человека

Батог К.А., Яковлев М.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

(614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: kirill_batog18@mail.ru; mikhailyak@mail.ru

Батог К.А. (Batog K.A.) – студент стоматологического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России

Яковлев М.В. (Yakovlev M.V.) – студент стоматологического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России

Специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Резюме. Статья посвящена сравнительной характеристике методов изучения состояния эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта. Подробно рассмотрены методы исследования эпителия полости рта, такие как цитологический метод, метод внутриклеточного микроэлектрофореза, метод определения конденсации хроматина, метод лазерной корреляционной спектроскопии. Приведены необходимые условия, наличие оборудования, время исследования при использовании каждым из методов. Показана необходимость применения методов для диагностики различных патологий. Описаны клеточные аномалии, выявляемые при использовании высокотехнологичных методов. Приводятся примеры патологий встречаемых у человека при исследовании эпителия полости рта каждым из методов. Рассмотрены положительные и отрицательные стороны каждого из методов, что дает возможность исследователю сделать выбор методики согласно целям и задачам исследования. В заключении приводятся рекомендации по использованию рассмотренных методов в лабораторных исследованиях.

Ключевые слова: Эпителиоциты, слизистая оболочка, цитология, микроскопия, методы.

The use of various methods of examining epithelial cells of the oral mucosa to determine the physiological state of a human

Batog K.A.

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Yakovlev M.V.

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Abstract. The article is devoted to the comparative characteristics of the methods of studying the state of epithelial cells of the mucous membrane of the oral cavity. Methods for studying the epithelium of the oral cavity, such as the cytological method, the intracellular microelectrophoresis method, the method for determining chromatin condensation, and the laser correlation spectrometry method are considered in detail. The necessary conditions, the availability of equipment, and the time of investigation while using each of the methods are mentioned. The necessity of application of methods for diagnostics of various pathologies is shown. Cell anomalies revealed using high-tech methods are described. Examples of the pathologies encountered in humans in the study of the epithelium of the oral cavity by each of the methods are given. The positive and negative aspects of each method are considered, which enables the researcher to make a choice of the methodology according to the goals and objectives of the study. In conclusion, recommendations on the use of these methods in laboratory studies are given.

Keywords: Epithelial cells, mucous membrane, cytology, microscopy, methods.

В настоящее время люди ищут более простые и информативные методы диагностики изменения гомеостаза человека. Одним из современных методов диагностики является исследование клеток буккального эпителия полости рта. Этот объект является одним из не инвазивных тестов, отражающих общее состояние человека. Отклонение биохимических, физико-химических и морфофункциональных показателей, возникающие под воздействием различных экзогенных и эндогенных факторов, приводят к изменениям дифференцировки эпителия, регистрируемым морфологически (размер, характер ядер и гранул, признаки цитолиза), а также изменению заряда на поверхности ядра живой клетки.

Цель исследования – провести сравнительную характеристику методов определения состояния эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта.

Цитологический метод. Со слизистой оболочки щеки стерильным шпателем соскабливают эпителиальные клетки, которые аккуратно наносят на предметное стекло. Мазок фиксируют метанолом в течение 1 суток. Далее проводят предварительный гидролиз соляной кислотой (37 °С, 30 мин) и окрашивают по Фельгену. На каждом стекле подсчитывают некоторое количество клеток. В образцах буккального эпителия определяют частоту встречаемости клеток с аномалиями ядра [1]. Микроядра идентифицируют как округлые хроматиновые тела с непрерывным гладким краем, лежащие в цитоплазме отдельно от ядра в одной плоскости с ним и имеющие тот же рисунок хроматина и окраску той же интенсивности. Параллельно учитывают клетки с другими ядерными аномалиями: кариопикноз – плотное гомогенное ядро, размером до 6 мкм; кариорексис – распад ядра на отдельные части с гомогенной структурой; двуядерные клетки идентифицируют, если рисунок цитоплазмы не указывает на наложение двух клеток и отсутствует наложение ядер; амитоз – клетки с двумя тесно примыкающими друг к другу ядерными структурами, примерно равными по размеру, разделенными достаточно глубокой бороздой, но на небольшом протяжении сливающимися; феномен «разбитого яйца» – ядро, связанное с основным ядром ахроматиновым мостиком; клетки с лизисом ядерной мембраны – клетки с негладким прерывистым краем ядер [7]. По наличию той или иной ядерной аномалии можно судить о механизме воздействия патогенного фактора на клетку.

Метод внутриклеточного микроэлектрофореза. Сущность метода состоит в том, что у здорового человека ядра клеток буккального эпителия в электрическом поле смещаются к аноду, т. е. они электроотрицательны. У клеток с патологией изменяется заряд мембраны, следовательно, такие клетки меняют свое «нормальное» направление в электрическом поле. Установка для микроэлектрофореза состоит из стабилизатора, камеры для микроэлектрофореза и микроскопа. Камера представляет собой предметное стекло с платиновыми электродами, находящимися на расстоянии 2 см друг от друга. Стабилизатор предназначен для преобразования напряжения электросети в постоянную величину напряжения 50 В и подачи его на камеру микроэлектрофореза. Напряженность в камере при этом составляет 2500 В/м, а величина тока 0,1—0,2 мА. Нарушение электрокинетических свойств ядер буккального эпителия в форме значительного уменьшения количества подвижных ядер говорит о наличии патологии. Такое явление наблюдается у больных алкоголизмом и гипертонической болезнью.

При дополнительной оценке скорости пробега ядер буккального эпителия с помощью окуляр-микрометра возможно составить интегральную кривую. При анализе данной кривой возможно проследить зависимость процента электроподвижных ядер от возраста и определить биологический возраст испытуемого [6].

Метод определения конденсации хроматина. При окрашивании ядра клетки орсеином в нем можно четко определить количество гранул гетерохроматина. Этот показатель характеризует морфологический параметр клеточного ядра, связанный с его функциональным состоянием. Для определения изменения степени конденсации хроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия клетки окрашивают в 2% растворе орсеина в 45% уксусной кислоте, в течение 30 мин, затем рассматривают при увеличении $\times 600$. Определяют среднее количество гранул гетерохроматина на одно ядро, потом подсчитывают среднюю величину содержания гранул гетерохроматина для некоторого количества ядер и величину статистической ошибки. Повышение показателя содержания гранул гетерохроматина свидетельствует о возрастании степени конденсации хроматина.

Как правило, явление конденсации хроматина связано с понижением активности биосинтетических процессов в ядре [10]. Эта реакция является также неспецифическим клеточным ответом на действие повреждающих факторов [11]. Также известно, что содержание стрессовых гормонов в крови возрастает в ответ на физическую нагрузку [9]. Было установлено, что гормоны стресса вызывают увеличение содержания гранул гетерохроматина в концентрациях, близких к физиологическим [8], поэтому в случае утомления, вызванного физическими нагрузками конденсация хроматина может быть связана с воздействием гормонов стресса [5].

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). Для измерения размеров наночастиц используется метод динамического рассеяния света (ДРС). Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее, из коэффициента диффузии рассчитывается радиус наночастиц. Метод ЛКС позволяет определять дисперсный состав исследуемой жидкости по относительному вкладу содержащихся в ней частиц в рассеяние света. Распределение частиц по размерам, в результате математической обработки, позволяет охарактеризовать дисперсный состав конкретной биологической жидкости и классифицировать распределения в соответствии с выделенными информативными зонами спектра.

Для рото-глоточных смывов принято выделять следующие информативные зоны – низкомолекулярную (0-50 нм), среднемолекулярную (51-400 нм), высокомолекулярную (401-2000 нм) и сверхвысокомолекулярную (выше 2000 нм). Предполагается, что нарастание площадей низко- и среднемолекулярных мод ЛК-спектров свидетельствует о преобладании процессов биосубстратной деградации, а высоко- и сверхвысокомолекулярных мод – о преобладании процессов биосубстратной полимеризации. На этих принципах создан классификатор, позволяющий по характеру распределения частиц выделить три типа спектров: «норма», спектры с преобладанием катаболических процессов и спектры с преобладанием анаболических процессов [1]. Так у клеток с кариорексисом или кариолизисом преобладает катаболический тип ЛК-спектра. Это происходит из-за выхода из клеток разрушенного ядерного

материала, что приводит к увеличению вклада в светорассеяние низкомолекулярной субфракции, которое характерно для катаболических процессов.

Заключение. Таким образом, среди рассмотренных методов нет ни одного, который подходил бы для диагностики всех заболеваний. Отдельно взятый метод имеет свои достоинства и недостатки. Так, например, цитологический метод прост в использовании, не требует специализированного оборудования и высокой квалификации микроскописта. Появление микроядер в клетках буккального эпителия служит хорошим индикатором воздействия ксенобиотиков или лучевого поражения. Однако этот метод отражает только цитогенетические характеристики и не дает возможности определить локализацию патологии. Остальные методы более сложны в использовании и требуют дорогого оборудования для их осуществления, но позволяют исследовать клетки более детально. С помощью метода внутриклеточного микроэлектрофореза можно определить функциональное состояние человека и его биологический возраст

Метод определения конденсации хроматина показывает влияние стрессовых факторов на состояние организма и утомляемость человека при физических нагрузках. С помощью, описанных выше, методов можно исследовать отдельные структуры клетки. Но для более объективной оценки функционального состояния человека по буккальному эпителию необходимо использовать комплексный подход.

Литература:

- 1.Алещенко А.В., Алчинова И.Б. и др. Использование цитогенетического метода исследования буккального эпителия и метода лазерной корреляционной спектроскопии для мониторинга нарушений в организме детей // Цитология. – 2006. – Т.48.№2. – С.170-171.
2. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Шипилина Е.Д. Некоторые особенности лабораторной диагностики дисбиотических состояний полости рта // В мире научных открытий. – 2010. – № 4-14. – С. 7-8.
3. Годовалов А.П., Лебединская О.В., Комарова Ю.Р. Роль эпителиоцитов в защите слизистых оболочек дыхательных путей // В мире научных открытий. – 2010. – № 4-14. – С. 9-10.
4. Комарова Ю.Р., Годовалов А.П., Лебединская О.В. Участие эпителиоцитов в местной защите при воспалительных заболеваниях дыхательных путей // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 7. – С. 50-51.
- 5.Магда И.Ю., Темченко В.А., Колий С.Н., Шкорбатов Ю.Г. Клеточный ответ на физические нагрузки во время выполнения спортивных тренировок // Вісник проблем біології і медицини. – 2014 – Вип.1(106). – С.312-315.
- 6.Хусаинова И.С., Варвулева И.Ю., Кожина Н.А. Оценка цитологических показателей буккального эпителия для диагностики функционального состояния человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №3. – С.10-11.

- 7.Чемикосова Т.С., Камалова О.А., Ибрагимова З.Н. Состояние слизистой оболочки рта у лиц, профессионально контактирующих с хлорфеноксигербицидами // Стоматология. – 2004. – №6. – С. 15-16.
- 8.Шкорбатов Ю. г. Изменение состояния ядра и хроматина человеческих клеток под влиянием гормональных факторов in vitro / Ю. Г. Шкорбатов, В. Г. Шахбазов, О. В. Горенская [идр.] // Цитология и генетика. – 1999. – С. 33, 64-71.
- 9.Kraemer W. J. Hormonal Responses and Adaptations to Resistance Exercise and Training Sports / W. J. Kraemer, N. A. Ratamess // Med. – 2005. – Vol. 35 (4). – P. 339-361.
- 10.Lewin B. Genes – 8-th ed. / B. Lewin. – New York : Pearson Prentice Hall, 2004. – 909 p
- 11.Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress. In New Developments in Chromatin Research. / Y. Shckorbatov. – New York : Editors: Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart, Nova Publishers, 2012 .