

УДК 576.08:613.6

3.1.33 Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия

DOI: 10.37903/vsgma.2023.3.19 EDN: GXGOPQ

ДОКАЗАТЕЛЬНОСТЬ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ПРИ ОЦЕНКЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ФАКТОРОВ

© Мешков Н.А., Вальцева Е.А.

*Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации курортологии Минздрава России, Россия, 121099, Москва, ул. Новый Арбат, 32**Резюме*

Цель. Изучение и систематический анализ методологических аспектов, влияющих на качество, объективность и доказательность исследований, посвященных изучению профессионального воздействия генотоксических факторов с использованием микроядерного теста.

Методика. Проведен поиск научных публикаций в PubMed/MEDLINE и eLIBRARY за 1973-2022 гг. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы Microsoft Excel 2016. Выявление взаимосвязи между переменными проводилось с применением корреляционно-регрессионного анализа, оценка значимости различий – t-критерия Стьюдента. Исходы генотоксического действия оценивались по фактору генотоксичности (ФГ)

Результаты. В большинстве публикаций размер выборки для подсчета микроядер (МЯ) составлял 2000 букальных клеток. До начала проекта HUMN_xL доля таких публикаций составляла 50,0%, а после завершения – 57,1%, несмотря на рекомендацию использовать 4000 клеток. Установлено, что при увеличении размера выборки клеток повышается точность (доказательность) микроядерного теста – снижается средняя частота МЯ ($p = 0,0553$) и средняя ошибка ($p = 0,0435$). Изучение влияния вмешивающихся факторов (возраст, пол и курение) выявило снижение средней частоты МЯ с увеличением возраста ($R^2 = 0,987$; $p = 0,074$). Установлено, что уровень МЯ у мужчин в 2,5 раза выше, чем у женщин ($p = 0,079$), а частот МЯ у курящих на 12,6% выше, чем у некурящих. Наблюдается высокая гетерогенность исходов генотоксического действия: максимальное значение ФГ превышает минимальное в 16,8 раза. Выявлено снижение ФГ при увеличении количества клеток для подсчёта МЯ ($R^2 = 0,991$; $p = 0,0046$).

Заключение. Качество включенных в обзор публикаций, несмотря на рекомендации международного проекта HUMN_xL, осталось прежним. Игнорирование рекомендаций ведет к высокой вариабельности частоты микроядер и, как следствие, к несопоставимости данных разных исследований. Недостаточно внимания уделяется изучению влияния вмешивающихся факторов.

Ключевые слова: микроядерный тест, профессиональное воздействие, генотоксические агенты, вмешивающиеся факторы

USING MICRONUCLEUS TEST FOR ASSESSING OCCUPATIONAL EXPOSURE: THE LEVEL OF EVIDENCE

Meshkov N.A., Valtseva E.A.

*National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology, 32, Novy Arbat St., 121099, Moscow, Russia**Abstract*

Objective. The purpose was to study and perform a systematic analysis of methodological aspects affecting the quality, objectivity and level of evidence of studies devoted to occupational exposure to genotoxic factors using the micronucleus test.

Methods. In search of relevant academic publications, we used PubMed/MEDLINE and eLIBRARY data for 1973-2022. Statistical processing was performed using Microsoft Excel 2016. We looked for correlations between variables using the correlation and regression analysis and chose Student's t-test for assessing the significance of difference. Also, we assessed the genotoxic outcomes by the Genotoxicity Factor (GF).

Results. In most of the publications we looked at the sample for calculating micronuclei (MN) included 2,000 buccal cells. Before the start of the HUMN_xL international project, such publications totaled

50.0%, while after completion they amounted to 57.1% despite the recommendation to use 4,000 buccal cells. We found that by increasing the number of sample cells we can improve the accuracy (level of evidence) of the micronucleus test: this results in lower average frequency of MN ($p = 0.0553$) and average error ($p = 0.0435$). Study of confounding factors (age, gender and smoking habits) showed that the average frequency of MN was lower in older patients ($R^2 = 0.987$; $p = 0.074$). We also found that the number of MN was 2.5 times higher in men than in women ($p = 0.079$), and the frequency of MN was 12.6% higher in smokers than in non-smokers. The heterogeneity of genotoxic outcomes was high: the maximum GF was 16.8 times higher than the minimum one. GF was found to be lower for higher number of cells taken for calculating MN ($R^2 = 0.991$; $p = 0.0046$).

Conclusion. The quality of publications included in the review remained unchanged despite the recommendations of the HUMN_xL international project. Ignoring the recommendations results in high variability in the frequency of MN, which makes data from different studies incomparable. Influence of the confounding factors has not been given enough academic attention.

Keywords: micronucleus test, occupational exposure, genotoxic agents, confounding factors

Введение

В эпидемиолого-гигиенических исследованиях (поперечных, ретроспективных, проспективных и случай-контроль) довольно часто используются биомаркеры [5], позволяющие объективно оценить воздействие изучаемых факторов риска, оказывающих неблагоприятное воздействие на организм человека. Выделяют биомаркеры экспозиции, биомаркеры восприимчивости организма к вредному воздействию и биомаркеры вредных эффектов [6].

Среди биомаркеров наиболее широкое распространение получил микроядерный анализ, ставший одним из популярных методов оценки генотоксичности различных химических и физических факторов [34]. Впервые методологические аспекты микроядерного теста (М-т) были приведены von Ledebur M, Schmid W. (1973) [39]. В 1983 г. Stich H.F. et al. [35] опубликовал более доступную для использования методику М-т в буккальном эпителии, ставшей наиболее популярной в связи с минимально инвазивной процедурой отбора проб и не требующей культивирования тканей.

Вместе с тем отмечается, что результаты исследований с применением биомаркеров характеризуются значительной индивидуальной вариабельностью, обусловленной расхождением в протоколах, наличием целого ряда вмешивающихся факторов, систематической ошибки и недостаточной статистической мощностью [7, 11].

С целью координации исследований с использованием микроядерного анализа был запущен новый проект – HUMN_xL (HUMAN MicroNucleus project buccal cells), посвященный консолидации различных баз данных, оценке роли вмешивающихся факторов (возраст, пол, курение), влияния ведущих факторов, рода занятий, образа жизни и особенностей протокола выявления микроядер (МЯ) (<http://www.humn.org>). В результате проекта выполнена стандартизация микроядерного теста в буккальном эпителии и показано влияние профессиональных воздействий. Средняя исходная частота МЯ в контроле, определённая по данным 15 000 человек, составила 1,10/1000 клеток (95% ДИ: 0,70–1,72) [8, 17]. Гармонизация процедуры микроядерного анализа в буккальном эпителии, выполненная международной группой HUMN_xL, позволяет повысить объективность и доказательность исследований по изучению неблагоприятного воздействия на организм человека факторов риска окружающей и производственной среды.

Вместе с тем все ещё остаются вопросы к качеству публикаций, посвященных оценке негативного влияния среды обитания и профессионального воздействия с использованием микроядерного анализа в буккальных клетках, результаты которых несопоставимы и отличаются противоречивостью, в частности, по диапазону частоты микроядер, статистической значимости различий этого показателя между экспонированными (Exposed group) и контрольными (Control group) группами, и при оценке зависимости частоты микроядер от возраста, пола и вредных привычек [11-15], [3, 15, 20, 22, 33].

Актуальность исследования заключается в анализе качества оригинальных исследований, основанных на микроядерном анализе буккального эпителия, с учетом информации систематических обзоров и рекомендаций проекта HUMN_xL [6-10], [7, 8, 11, 17, 18].

Целью исследования явилось изучение и систематический анализ методологических аспектов, влияющих на качество, объективность и доказательность исследований, посвященных изучению

профессионального воздействия генотоксических факторов с использованием микроядерного теста.

Методика

Проведен систематический поиск научных публикаций в базах данных PubMed / MEDLINE, eLIBRARY / РИНЦ и CyberLeninka за период 1973-2022 гг. Поиск проводился по предметным рубрикам (MeSH) и по ключевым словам (микроядерный тест, профессиональное воздействие, генотоксические агенты, вмешивающиеся факторы). Извлекаемые данные включали автора, год публикации, профессиональное воздействие, субъектов исследования, оценку воздействия, характеристики субъектов исследования (возраст, пол, курение и потребление алкоголя), размер выборки групп и основные результаты.

Критерии включения в обзор: дизайн исследований (поперечное, случай-контроль или когортное), в которых изучалась взаимосвязь между воздействием производственных факторов на рабочем месте и частотами МЯ; изложение методологических аспектов использования микроядерного анализа для определения частоты МЯ в буккальных эпителиоцитах; наличие средних групповых значений (M) со стандартным отклонением (SD), стандартной ошибкой среднего (SE) или достаточных данных для их расчета.

Критерии исключения: небольшой размер выборки, недостаточная информация о воздействии факторов и о результатах исследования, а также статьи, в которых данные выражены в виде медианы или средней частоты МЯ без указания SE или SD.

По названию и аннотации было отобрано 105 исследований, из которых критериям включения соответствовало 37 исследований, в том числе 34 зарубежных и 3 отечественных.

Систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов выполнялась в электронных таблицах Microsoft Excel 2016. Стандартная ошибка (SE) в исходных статьях была преобразована в стандартное отклонение (SD), а частота МЯ в % – в ‰ и наоборот [13].

Для оценки уровня генотоксичности рассчитывали фактор генотоксичности (ФГ) – критерий Agenzia regionale per la protezione ambientale (ARPA ER, 1997-2001), определяемый как отношение средней частоты МЯ в экспонированной группе к аналогичному показателю в контрольной группе, используемый как мера величины эффекта, на которую не влияет межлабораторная изменчивость [24].

Для выявления взаимосвязи между зависимыми и независимыми переменными применялся корреляционно-регрессионный анализ. Оценка значимости различий проводилась при помощи t-критерия Стьюдента. Различия показателей считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

Для оценки доказательности микроядерного теста из 37 исследований, соответствующих критериям включения, были отобраны 30 исследований, в которых изучалось воздействие производственных факторов на организм работающих с использованием М-т в буккальных клетках, включавших в целом 1964 обследованных, и приведенные данные были пригодны для статистической обработки и сравнительного анализа (табл. 1).

Как видно из табл. 1, разброс средних значений частоты МЯ в большинстве исследований, изучавших воздействие одинаковых факторов, достигал статистически значимых различий. При сравнении результатов исследования генотоксичности бензина повышенная частота МЯ выявлена в [28, 31], наибольший эффект воздействия формальдегида отмечен в работе [38], мышьяка – в [40], сварочной аэрозоли (Cr(VI), Ni) и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) – соответственно в [36] и в [32].

Размер выборки буккальных клеток для подсчета микроядер колеблется от 500 до 5000 клеток при среднем значении $2116,67 \pm 887,49$ (95%ДИ: 1785,27; 2448,06).

Таблица 1. Частота микроядер в буккальных эпителиоцитах в зависимости от воздействия факторов производственной среды

Факторы	Количество обследованных	Количество клеток на человека	Частота МЯ на 1000 клеток (M±SD)	Источник
Бензин	25	1000	1,14±0,30	Celik A., 2003 [10]
	62	3000	7,7±6,3**	Butt F., 2017 [9]
	30	1000	6,83±1,87 ¹	Rehani S., 2021 [28]
	30	500	29,8±8,2 ¹	Shahsavari, 2022 [31]
	30	2000	6,85±1,33	da Rosa J.C., 2013 [14]
Формальдегид	80	2000	0,88±1,69	Viegas S., 2010 [38]
	30	2000	1,27±1,55 ¹	
	50	2000	0,64±1,74	Ladeira C., 2011 [22]
	56	2000	0,96±2,07**	Ladeira C., 2013 [23]
	54	2000	1,00 ±1,98**	
Мышьяк	72	2000	0,98±0,76	Lewińska D., 2007 [25]
	200	2000	15,20± 5,80 ¹	Vuyyuri S.B., 2006 [40]
Свинец	30	2000	4,20±2,69	Singh Z., 2013 [33]
	200	5000	3,79±0,97	Chinde S., 2014 [12]
Пестициды	54	3000	0,777±1,39	Valencia-Quintana R., 2021 [37]
	28	2000	6,7 ±6,35**	Илюшина Н.А., 2021 [2]
	50	2000	1,45±1,58	Pastor S., 2001 [27]
	228	3000	1,03±1,36	Pastor S., 2003 [26]
Cr(VI), Ni	20	2000	13,0±6,2*	Danadevi K., 2004 [15]
	66	3000	40,6±9,3** ¹	Sudha S., 2011 [36]
	30	2000	6,83± 1,92** ¹	Koutsoumplias D., 2022 [21]
	22	2000	0,07±0,30	do Vale L.D.O., 2017 [16]
ПАУ	34	3000	0,7±0,5*	Karahalil B., 1999 [19]
	17	3000	1,2±0,5*	
	15	3000	1,0±0,5*	
	28	2000	4,5±1,64 ¹	Singaravelu S., Sellappa S., 2013 [32]
Оксид этилена (C ₂ H ₄ O)	75	1000	3,9±2,4	Ribeiro L.R., 1994 [29]
	9	3000	0,48±0,47	Sarto F., 1990 [30]
Медицинские работники, источники ионизирующего излучения	42	2000	5,3±3,9**	Aguiar Torres L., 2019 [4]
	27	1000	6,63±2,13**	Бондаревский-Колотий В.А., 2022 [1]

Примечание: * – %МЯ в исходных статьях преобразован в %МЯ; ** – SE преобразована в SD; ¹ – p < 0,05

Средняя частота МЯ составляет 5,83±8,94 (95%ДИ: 2,49; 9,17) в диапазоне от 0,07 до 40,60. Диапазон средней частоты МЯ различается в зависимости от размера выборки клеток для подсчета МЯ. При размере выборки 1000 клеток он составляет от 0,07 до 6,8 МЯ/на 1000 клеток – средняя частота МЯ 3,14±3,30 (95%ДИ: -0,96; 7,24), при выборках 2000 и 3000 клеток – соответственно 0,07-15,2 и 1,0-40,6 МЯ/на 1000 клеток, средняя частота МЯ при подсчете в этих выборках составляет соответственно 3,03±3,84 (95%ДИ: 0,98; 5,07) и 11,00±13,68 (95%ДИ: -1,65; 23,66). Достоверных различий между средними значениями МЯ не выявлено.

На рис. 1 представлен разброс значений средней частоты МЯ в приведенных публикациях при сравнении с референсным значением [17].

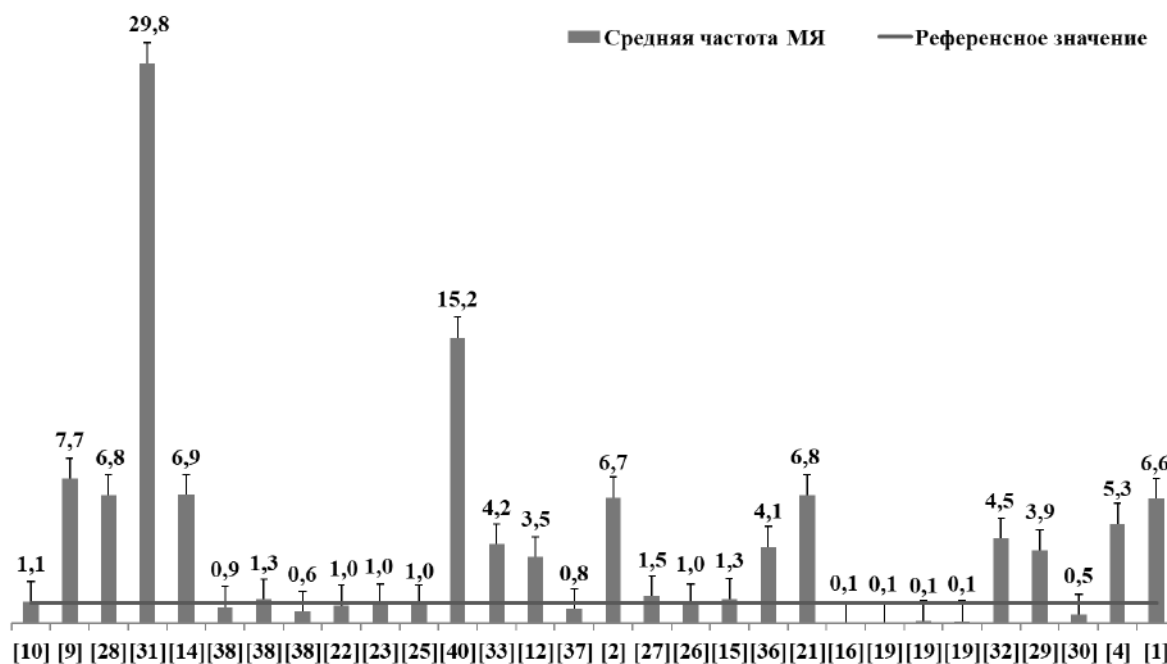


Рис. 1. Сравнение средней частоты МЯ с референсным значением, МЯ/на 1000 клеток

На рис. 1 видно, что средняя частота МЯ в 41,4% исследований не превышала референсный уровень [17]. Существенное влияние на качество микроядерного теста оказывает количество клеток для подсчета микроядер [11]. В рассматриваемых публикациях (табл. 1) размер выборки на человека варьировался от 500 до 5000 клеток. Количество клеток для подсчёта микроядер в исследованиях, проводившихся до и после завершения проекта HUMN_xL [7, 11], представлено в табл. 2.

Таблица 2. Распределение статей с различным размером выборок клеток буккального эпителия для подсчёта микроядер, опубликованных до и после завершения проекта HUMN_xL.

Количество клеток буккального эпителия для подсчёта микроядер	Количество статей до и после завершения проекта HUMN _x L [7, 11], %		Всего, %
	1990-2011 гг.	2013-2022 гг.	
500	-	7,14	6,67
1000	12,50	14,29	13,33
2000	50,00	57,14	53,33
3000	37,50	14,29	26,67
5000	-	7,14	3,33

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что до и после завершения проекта HUMN_xL подсчёт микроядер чаще осуществлялся в 2000 клеток, доля этих выборок составила 53,3%. Количество публикаций с таким размером выборки после завершения проекта увеличилось в 1,14 раза ($p=0,696$), а с размером выборок в 3000 уменьшилось в 2,63 раза ($p = 0,152$). Изучали влияние независимых переменных (количество обследованных, количество буккальных клеток для анализа) на среднюю частоту МЯ (M), разброс данных (SD) и стандартную ошибку среднего значения (SE). Результаты представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, связи между количеством обследованных и средней частотой МЯ не обнаружено. Наблюдается тенденция к снижению SD и SE с увеличением числа обследованных. Между средней частотой МЯ и размером выборки клеток для их подсчета обнаружена близкая к статистически значимой ($p = 0,0553$) причинно-следственная связь, но объяснённая этой переменной доля дисперсии составляет всего 12,5%. Стандартная ошибка среднего значения МЯ достоверно уменьшается ($p = 0,0435$) при увеличении количества клеток, отобранных для анализа, приближаясь к фактическому среднему значению генеральной совокупности, что повышает точность (доказательность) микроядерного теста, однако доля дисперсии, объясненная этой переменной, составляет лишь 13,8%.

Таблица 3. Влияние независимых переменных на среднюю частоту микроядер (МЯ), стандартное отклонение (SD) и среднюю ошибку (SE)

Показатели	Уравнение регрессии	Итоговые статистики		
		r	R ²	p
Количество обследованных				
Средняя частота МЯ	$y = 3,8267 + 0,0056 \cdot x$	0,0524	0,0027	0,7834
Среднее SD	$y = 2,5459 - 0,0014 \cdot x$	0,0307	0,0009	0,8722
Средняя SE	$y = 0,3985 - 0,001 \cdot x$	0,1690	0,0286	0,3720
Количество буккальных клеток для анализа				
Средняя частота МЯ	$y = 9,1333 - 0,0024 \cdot x$	0,3536	0,125	0,0553
Среднее SD	$y = 3,0557 - 0,0003 \cdot x$	0,1004	0,0101	0,5977
Средняя SE	$y = 0,6379 - 0,0001 \cdot x$	0,3711	0,1377	0,0435

Средний возраст обследованных, подвергавшихся воздействию профессиональных факторов, составил $37,15 \pm 1,37$ (95% ДИ: 34,31; 39,98). Для изучения влияния возраста на частоту МЯ данные, приведенные в публикациях, разделили на 3 группы. Средний возраст в группах составил $30,17 \pm 2,96$ (95% ДИ: 22,57; 37,77) лет, $36,73 \pm 0,55$ (95% ДИ: 35,49; 37,97) и $43,72 \pm 1,16$ (95% ДИ: 40,88; 46,57) лет. Между этими величинами выявлены статистически значимые различия.

Средняя частота МЯ в возрастных группах составила соответственно $8,73 \pm 4,41$ (95% ДИ: -2,62; 20,08)%, $6,45 \pm 3,98$ (95% ДИ: -2,55; 15,46) и $4,83 \pm 0,91$ (95% ДИ: 2,60; 7,06)%. Снижение уровня генотоксичности на 98,7% обусловлено возрастом ($p = 0,074$) и на 45,6% – размером выборки клеток для подсчета МЯ ($p = 0,528$).

Средняя частота МЯ у мужчин – $7,08 \pm 9,94$ (95% ДИ: 2,97; 11,18) в 2,53 раза выше ($p = 0,079$), чем у женщин – $2,80 \pm 2,80$ (95% ДИ: -0,68; 6,28). Отношение средней частоты МЯ у курящих – $14,72 \pm 19,02$ (95% ДИ: -2,83; 32,35) к аналогичному показателю у некурящих – $11,43 \pm 13,44$ (95% ДИ: -0,97; 23,86) составляет 1,27 ($p > 0,05$).

Фактор генотоксичности варьировался в диапазоне от 0,58 до 9,77 при среднем значении $3,37 \pm 2,10$ (95% ДИ: 2,59; 4,15). Среднее значение ФГ при выборке 1000 клеток составило $2,71 \pm 1,58$ (95% ДИ: 1,64; 3,77), 2000 и 3000 клеток – соответственно $4,02 \pm 2,56$ (95% ДИ: 2,66; 6,39) и $2,34 \pm 1,09$ (95% ДИ: 1,34; 3,35). Статистически значимые различия выявлены между средним ФГ во 2-й и 3-й выборках – $p = 0,038$. Результаты оценки гетерогенности исходов воздействия генотоксических веществ по величине ФГ в зависимости от количества клеток для анализа представлены на рис. 2.

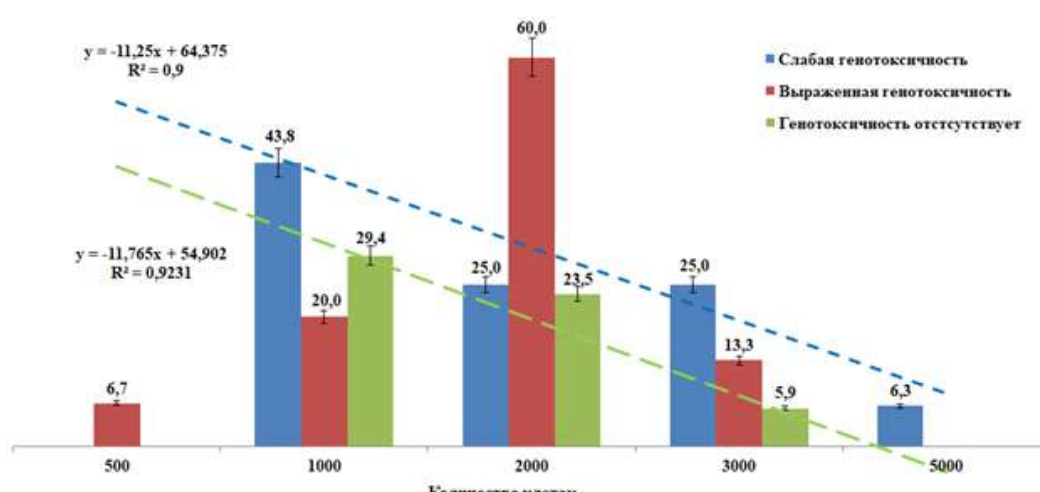


Рис. 2. Эффект генотоксичности (ФГ) в зависимости от размера выборки клеток буккального эпителия, %

Как показано на рис. 2, выраженность генотоксического эффекта снижается по мере увеличения количества клеток для анализа. Точность аппроксимации, описывающей распределение ФГ, характеризующего отсутствие или слабую выраженность генотоксичности, достигает

соответственно 92,3 и 90,0%. Коэффициент аппроксимации распределения ФГ, соответствующего критерию выраженной генотоксичности, составляет $R^2 = 0,1041$ (10,4%). Эффект генотоксичности, соответствующий выраженному критерию ФГ, в 60% определяется при анализе 2000 клеток. Связь уровня ФГ от количества клеток для анализа представлена в табл. 4.

Таблица 4. Зависимость фактора генотоксичности от размера выборки клеток буккального эпителия для анализа

Критерии ФГ	Уравнение регрессии	Итоговые статистики		
		r	R ²	p
Отсутствие генотоксичности	$y = 43,1373 - 0,0118 \cdot x$	-0,9608	0,9231	0,1789
Слабая генотоксичность	$y = 48,5714 - 0,0086 \cdot x$	-0,9954	0,9909	0,0046
Выраженная генотоксичность	$y = 15,8311 + 0,0056 \cdot x$	0,2608	0,068	0,7392

Из табл. 4 видно, что уровни воздействия генотоксических агентов, характеризующиеся по критериям ФГ как отсутствующая и слабая генотоксичность, снижаются при увеличении количества клеток для анализа. Объясненная этой переменной дисперсия составляет соответственно 92,3% ($p = 0,1789$) и 99,1% ($p = 0,0046$). Причинно-следственные отношения между выраженной токсичностью и независимой переменной не обнаружены – доля объясненной дисперсии составляет всего 6,8% ($p = 0,7392$).

Среднее значение ФГ в возрастных группах составило соответственно $2,53 \pm 0,38$ (95%ДИ: 1,56; 3,49), $4,70 \pm 0,72$ (95% ДИ: 3,06; 6,34) и $2,15 \pm 0,43$ (95% ДИ: 1,11; 3,19). Связь ФГ с возрастом не обнаружена ($R^2 = 0,0244$; $p = 0,900$). Выявлена тенденция к росту эффекта генотоксичности с увеличением размера выборки клеток для подсчета МЯ ($R^2 = 0,5032$; $p = 0,498$).

Не обнаружено статистически значимых различий между ФГ у мужчин – $3,16 \pm 2,96$ (95%ДИ: 1,94; 4,39) и у женщин – $4,71 \pm 3,34$ (95% ДИ: 0,56; 8,85).

ФГ у некурящих – $6,97 \pm 8,52$ (95%ДИ: -0,91; 14,85) в 3,6 раза выше, чем у курящих $-1,92 \pm 0,76$ (95%ДИ: 1,21; 2,63), но при сравнении этих показателей статистически значимых различий не выявлено ($p = 0,145$).

Обсуждение результатов исследования

Анализ буккального микроядерного цитома человека является одним из наиболее широко используемых методов оценки генетических повреждений при изучении влияния неблагоприятных факторов окружающей среды, профессионального воздействия, образа жизни, других генотоксических агентов и вмешивающихся факторов (возраст, пол, курение). Впервые выводы о практическом использовании микроядерной тест-системы и обоснование процедуры подсчета микроядер были сделаны в работе von Ledebur M. et al. и адаптированы Stich H.F et al. [35, 39]. Опыт использования микроядерного теста выявил значительную вариабельность частоты МЯ, что создавало проблемы при сравнительном анализе результатов, полученных разными авторами. Причина этих проблем в отсутствии единых критериев оценки и стандартизированного подхода к регистрации, анализу и представлению полученных результатов, что существенно сказывается на качестве статей о микроядерном анализе [7, 8, 11, 17, 18]. Решению этой проблемы был посвящен международный проект HUMN_xL, в котором на основе анализа отобранные в разных регионах публикации, было установлено, что количество клеток на одного человека варьировалось от 500 до 4000, а выборки в 1000 и 2000 клеток составили соответственно 26,1 и 39,1%. В настоящем обзоре в большинстве публикаций (табл. 1) размер выборки буккальных клеток для подсчета микроядер колебался от 500 до 2000 клеток, доля таких выборок составила 73,3%, а выборки в 2000 клеток – 53,3%, доля последних сопоставима с данными [11] – 52,4%. По данным международного проекта HUMN_xL подсчет микроядер в 2000 клеток производился в 81% представленных баз данных [7, 11]. Для уменьшения изменчивости средних значений частоты МЯ рекомендуется минимальное количество 4000 клеток, так как средняя фоновая частота составляет 1 клетка с МЯ на 1000 буккальных клеток [11].

В публикациях используется разный диапазон контрольных значений, в частности, в работе Butt F. et al. [9] средняя частота МЯ $9,8 \pm 0,7\%$ сравнивалась с базовым диапазоном 0,05-11,5‰ [18], хотя в проекте рекомендуется исходная частота МЯ 1,10/1000 клеток (95% ДИ: 0,70; 1,72), так как низкий

исходный фоновый уровень МЯ в буккальных клетках позволяет более эффективно выявлять воздействие генотоксических факторов [8, 17].

Анализ по периодам до начала проекта HUMNxL и после его завершения показал (табл. 2), что количество включенных в обзор публикаций с размером выборки в 2000 клеток до завершения проекта составляло 50,0%, а после – возросло в 1,14 раза, достигнув 57,1% ($p = 0,696$), доля публикаций с размером выборок в 3000 уменьшилось в 2,63 раза с 37,5% до 14,3% ($p = 0,152$). Для уменьшения изменчивости средних значений частоты МЯ и повышения точности оценок проектом HUMNxL рекомендовалось использовать для подсчета микроядер не менее 4000 клеток. Выявлено (табл. 3), что при увеличении размера выборки клеток повышается точность (доказательность) микроядерного теста – снижается средняя частота МЯ ($p = 0,0553$) и SE ($p = 0,0435$).

Существенное влияние на точность МЯ-теста оказывают вмешивающиеся факторы, такие как возраст, пол и курение, о влиянии которых сообщалось в 98,4, 85,7 и 90,5% баз данных HUMNxL [11]. Показано [9], что частота МЯ выше в старшей возрастной группе ($p < 0,05$). Однако в большинстве исследований влияние возраста выявлено не было [17]. В нашем исследовании искажающее влияние возраста изучалось в 90,0% публикациях, пола и курения – соответственно в 100,0 и в 23,3%. Статистически значимых различий между возрастными группами не обнаружено. Выявлено снижение средней частоты МЯ с увеличением возраста ($R^2 = 0,987$; $p = 0,074$). По данным [17] средняя частота МЯ у женщин на 19,0% выше по сравнению с мужчинами, по нашим – уровень МЯ у мужчин в 2,5 раза выше, чем у женщин ($p = 0,079$). Курение является дополнительным фактором, увеличивающим образование микроядер при профессиональном воздействии [9]. Сравнение средней частоты МЯ у курящих и у некурящих показало, что у первых эта величина на 12,6% выше ($p = 0,715$).

При оценке исходов генотоксического действия в исследованиях, включенных в обзор, установлено, что максимальный ФГ в 16,8 раза выше минимального. Наиболее высокая гетерогенность исходов отмечена при подсчете МЯ в 1000 и 2000 клеток (рис. 2) – соответственно 41,2 и 60,0%. Обнаружено, что фактор генотоксичности снижается при увеличении размера выборки клеток для подсчета МЯ ($R^2 = 0,991$; $p = 0,0046$).

Заключение

В обзоре рассмотрены методологические аспекты исследований, основанных на микроядерном анализе буккального эпителия, оказывающие влияние на их качество и точность (доказательность) полученных результатов. Систематическая оценка статей, опубликованных до начала международного проекта HUMNxL и после его завершения показала, что качество включенных в обзор зарубежных и отечественных публикаций осталось прежним, так как авторы исследований проигнорировали рекомендации, разработанные в ходе выполнения проекта HUMNxL. В большинстве публикаций подсчет микроядер по-прежнему осуществляется в 1000-2000 клетках, доля таких выборок после завершения проекта увеличилась на 8,9%, несмотря на то, что рекомендуемое число клеток для микроядерного анализа должно быть не менее 4000. Игнорирование этой рекомендации ведет к высокой индивидуальной вариабельности частоты микроядер и, как следствие, к несопоставимости данных разных исследований. Недостаточно внимания уделяется изучению влияния вмешивающихся факторов: возраста, пола и вредных привычек, что может привести к искажению результатов исследования профессионального воздействия производственных факторов.

Литература (references)

1. Бондаревский-Колотий В.А., Ластков Д.О. Генотоксические и цитотоксические эффекты в буккальном эпителии медицинского персонала, работающего в условиях действия малых доз ионизирующих излучений // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2022. – Т.19, № 4. – С. 30-34. [Bondarevskiy-Kolotii V.A., Lastkov D.O. Buccal epithelial cell micronuclei: Sensitive, non-invasive biomarkers of occupational exposure to low doses of ionizing radiation // Volgogradskii nauchno-meditsinskii zhurnal. Volgograd scientific medical journal. – 2022. – V.19, N4. – P. 30-34. (in Russian)]
2. Илюшина Н.А., Демидова Ю.В., Макарова М.А., Илюшин А.Г., Егорова О.В., Березняк И.В., Ревазова Ю.А. Цитоморфологический анализ эксфолиативных клеток буккального эпителия у работников,

- имеющих контакт с пестицидами. Токсикологический вестник. – 2021. – Т.29, №4. – С. 22-29. [Ilyushina N.A., Demidova Yu.V., Makarova M.A., Ilyushin A.G., Egorova O.V., Bereznyak I.V., Revazova Yu.A. Tsitomorfoloicheskiy analiz eksfoliativnykh kletok bukkal'nogo epiteliya u rabotnikov, imeyushchikh kontakt s pestitsidami. Toksikologicheskii vestnik // Toksikologicheskii vestnik. Toxicological review. – 2021. – V.29, N4. – P. 22-29. (in Russian)]
3. Моргуль Е.В., Белик С.Н., Аветисян З.Е., Квасов А.Р., Чеботарева Ю.Ю., Евдокимова Е.П., Моргуль А.Р. Взаимосвязь уровня поражения генетического аппарата клеток со степенью нарушения репродуктивного здоровья в условиях вредного производства. Медицинский вестник Юга России. – 2020. – Т.11, №4. – С. 113-120. [Morgul E.V., Belik S.N., Avetisyan Z.E., Kvasov A.R., Chebotareva Yu. Yu., Evdokimova E.P., Morgul A.R. Vzaimosvyaz' urovnya porazheniya geneticheskogo apparata kletok so stepen'yu narusheniya reproduktivnogo zdorov'ya v usloviyakh vrednogo proizvodstva // Meditsinskii vestnik Yuga Rossii. Medical herald of the South of Russia. – 2020. – V.11, N4. – P. 113-120. (in Russian)]
 4. Aguiar Torres L., Dos Santos Rodrigues A., Linhares D., Camarinho R., Nunes Páscoa Soares Rego Z.M., Ventura Garcia P. Buccal epithelial cell micronuclei: Sensitive, non-invasive biomarkers of occupational exposure to low doses of ionizing radiation // Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis. – 2019. – N838. – P. 54-58.
 5. Au W.W. Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer // International journal of hygiene and environmental health. – 2007. – V.210, N3-4. – P. 239-46.
 6. Biomarkers and human biomonitoring. Children's Health and the Environment // WHO Training Package for the Health Sector World Health Organization. – 2011. URL: www.who.int/ceh/capacity/biomarkers.pdf (accessed: 12.04.19).
 7. Bonassi S., Biasotti B., Kirsch-Volders M., Knasmueller S., Zeiger E., Burgaz S., Bolognesi C., Holland N., Thomas P. Fenech M.; HUMNXL Project Consortium. State of the art survey of the buccal micronucleus assay – a first stage in the HUMN(XL) project initiative // Mutagenesis. – 2009. – V.24, N4. – P. 295-302.
 8. Bonassi S., Coskun E., Ceppi M., Lando C., Bolognesi C., Burgaz S., Holland N., Kirsh-Volders M., Knasmueller S., Zeiger E., Carnesoltas D., Cavallo D., da Silva J., de Andrade V.M., Demircigil G.C., Domínguez Odio A., Donmez-Altuntas H., Gattas G., Giri A., Giri S., Gómez-Meda B., Gómez-Arroyo S., Hadjidekova V., Haveric A., Kamboj M., Kurteshi K., Martino-Roth M.G., Montero Montoya R., Nersesyan A., Pastor-Benito S., Favero Salvadori D.M., Shaposhnikova A., Stopper H., Thomas P., Torres-Bugarín O., Yadav A.S., Zúñiga González G., Fenech M. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol // Mutation research. – 2011. – V.728, N3. – P. 88-97.
 9. Butt F., Cheema K., Nisar N., Qureshi J. Cytogenetic bio-monitoring in fuel station attendants of Gujrat, Pakistan through buccal micronucleus cytome assay // The Journal of the Pakistan Medical Association. – 2017. – V.67, N7. – P. 1039-1044.
 10. Celik A., Cavaş T., Ergene-Gözükara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells // Mutagenesis. – 2003. – V.18, N5. – P. 417-421. DOI: 10.1093/mutage/geg022.
 11. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues // Mutation research. – 2010. – V.705, N1. – P. 11-19.
 12. Chinde S., Kumari M., Devi K.R., Murty U.S., Rahman M.F., Kumari S.I., Mahboob M., Grover P. Assessment of genotoxic effects of lead in occupationally exposed workers // Environmental science and pollution research international. – 2014. – V.21, N19. – P. 11469-11480.
 13. Cochrane Evidence Synthesis and Methods / Cochrane Handbook for Systematic Reviews. URL: <https://www.cochrane.org/ru/search/site>
 14. da Rosa J.C., Fiegenbaum M., Soledar A.L., Claus M.S., de Souza Nunes A.D., Cardoso V.V. Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms of the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX // Environmental monitoring and assessment. – 2013. – V.185, N7. – P. 5883-90.
 15. Danadevi K., Rozati R., Banu B.S., Grover P. Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays // Mutagenesis. – 2004. – V.19, N1. – P. 35-41.
 16. do Vale L.D.O., da Silva V.H.P., de Almeida F.R., Ribeiro D.A., da Silva D.M. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in buccal mucosa cells of welders in the cities of Cubatão and Santos, state of São Paulo, Brazil // Revista brasileira de medicina do trabalho: publicação oficial da Associação Nacional de Medicina do Trabalho-ANAMT. – 2017. – V.15, N4. – P. 303-309.
 17. 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. – N26. – P. 239-245.
 18. Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmueller S., Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps // Mutation research. – 2008. – V.659, N1-2. – P. 93-108.

19. Karahalil B., Karakaya A.E., Burgaz S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation research.* – 1999. – V.442, N1. – P.29-35.
20. Konopacka M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells // *Neoplasma.* – 2003. – V.50, N5. – P. 380-382.
21. Koutsoumpias D., Damati A., Thanasias E., Vlastos D., Halkos G., Matthopoulos D., Makropoulos V. Evaluation of the genetic damage to workers in a Greek shipyard // *Industrial health.* – 2022. – V.60, N1. – P. 47-61.
22. Ladeira C., Viegas S., Carolino E., Gomes M.C., Brito M. The influence of genetic polymorphisms in XRCC3 and ADH5 genes on the frequency of genotoxicity biomarkers in workers exposed to formaldehyde // *Environmental and molecular mutagenesis.* – 2013. – V.54, N3. – P. 213-221.
23. Ladeira C., Viegas S., Carolino E., Prista J., Gomes M.C., Brito M. Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde – the case of histopathology laboratories // *Mutation research.* – 2011. – V.721, N1. – P. 15-20.
24. Leonardi S., Poma A.M., Colafarina S., D'Aloisio F., Scatigna M., Zarivi O., Mastrantonio R., Tobia L., Fabiani L. Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: a cross-sectional study in L'Aquila, Italy // *Ecotoxicology and environmental safety.* – 2020. – N203. – P. 110989.
25. Lewińska D., Palus J., Stepnik M., Dziubałtowska E., Beck J., Rydzyński K., Natarajan A.T., Nilsson R. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure // *International archives of occupational and environmental health.* – 2007. – V.80, N5. – P. 371-380.
26. Pastor S., Creus A., Parrón T., Cebulka-Wasilewska A., Siffel C., Piperakis S., Marcos R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers // *Mutagenesis.* – 2003. – V.18, N3. – P. 249-258.
27. Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., Xamena N., Piperakis S., Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells // *Mutagenesis.* – 2001. – V.16, N6. – P. 539-45. DOI: 10.1093/mutage/16.6.539.
28. Rehani S., Raj N., Jeergal P., Sharma M., Bishen K.A., Nagpal R. Genotoxicity in Oral Mucosal Epithelial Cells of Petrol Station Attendants: A Micronucleus Study // *Journal of cytology.* – 2021. – V.38, N4. – P. 225-230.
29. Ribeiro L.R., Salvadori D.M., Rios A.C., Costa S.L., Tates A.D., Törnqvist M., Natarajan A.T. Biological monitoring of workers occupationally exposed to ethylene oxide // *Mutation research.* – 1994. – V.313, N1. – P. 81-87.
30. Sarto F., Tomanin R., Giacomelli L., Iannini G., Cupiraggi A.R. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide // *Mutation research.* – 1990. – V.244, N4. – P. 345-351.
31. Shahsavari F., Mikaeli S., Ghorbanpour M. Micronucleus assay in the exfoliated cells of buccal mucosa of gasoline station workers in Tehran // *Journal of cancer research and therapeutics.* – 2022. – V.18, N4. – P. 1030-1035.
32. Singaravelu S., Sellappa S. Assessment of genotoxicity in exfoliated buccal epithelial cells of foundry workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* – 2013. – V.6, N2. – P. 334-337.
33. Singh Z., Chadha P., Sharma S. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in battery manufacturing workers occupationally exposed to lead // *Toxicology international.* – 2013. – V.20, N1. – P. 95-100.
34. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions // *International journal of molecular sciences.* – 2020. – V.21, N4. – P. 1534.
35. Stich H.F., San R.H., Rosin M.P. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1983. – N407. – P. 93-105.
36. Sudha S., Kripa S.K., Shibily P., Joseph S., Balachandar V. Biomonitoring of genotoxic effects among shielded manual metal arc welders // *Asian Pacific journal of cancer prevention.* – 2011. – V.12, N4. – P. 1041-1044.
37. Valencia-Quintana R., López-Durán R.M., Milić M., Bonassi S., Ochoa-Ocaña M.A., Uriostegui-Acosta M.O., Pérez-Flores G.A., Gómez-Olivares J.L., Sánchez-Alarcón J. Assessment of Cytogenetic Damage and Cholinesterases' Activity in Workers Occupationally Exposed to Pesticides in Zamora-Jacona, Michoacan, Mexico // *International journal of environmental research and public health.* – 2021. – V.18, N12. – P. 6269.
38. Viegas S., Ladeira C., Nunes C., Malta-Vacas J., Gomes M., Brito M., Mendonca P., Prista J. Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production // *Journal of occupational medicine and toxicology.* – 2010. – V.5, N1. – P. 25.
39. von Ledebur M., Schmid W. The micronucleus test. Methodological aspects // *Mutation research.* – 1973. – V.19, N1. – P. 109-117.

40. Vuyyuri S.B., Ishaq M., Kuppala D., Grover P., Ahuja Y.R. Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic // Environmental and molecular mutagenesis. – 2006. – V.47, N7. – P. 562-570.

Информация об авторах

Мешков Николай Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач Российской Федерации, главный научный сотрудник, Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России. E-mail: professor12@yandex.ru

Вальцева Елена Алексеевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России. E-mail: altay21c@mai.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.05.2023

Принята к печати 28.09.2023