

Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение - Государственный научный центр
Российской Федерации «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»
(ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

ГРУППА 12 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОФИЛАКТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ЗАЩИТЕ НАСЕЛЕНИЯ ОТ
ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ, ОХРАНЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ
И ОКАЗАНИЮ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОЙ ПОМОЩИ

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ И ПЕРСОНАЛА ПРЕДПРИЯТИЙ,
ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПО ОБРАЩЕНИЮ С ОТРАБОТАВШИМ
ЯДЕРНЫМ ТОПЛИВОМ И РАДИОАКТИВНЫМИ ОТХОДАМИ В УСЛОВИЯХ
КОМПЛЕКСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИОННЫХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 12.031 - 2020

Москва
2020

Оценка состояния здоровья населения и персонала предприятий, осуществляющих деятельность по обращению с отработавшим ядерным топливом и радиоактивными отходами в условиях комплексного воздействия радиационных и химических факторов
Методические рекомендации МР ФМБА России 12.031 – 2020 27 стр.

ПРЕДИСЛОВИЕ

1. Разработаны Федеральным государственным бюджетным учреждением - Государственный научный центр Российской Федерации «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России).

Генеральный директор – д-р. мед. наук, профессор РАН А.С. Самойлов,
заместитель генерального директора – д-р мед. наук Н.К. Шандала.

2. Исполнители: д-р биол. наук Л.П. Сычева, канд. биол. наук С.М. Киселев, С.В. Ахромеев, В.В. Шлыгин.

3. В настоящем документе реализованы требования следующих федеральных законов:
- от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;
- от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.1999.

4. Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством 14.07.2020

5. Введены впервые.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	2
Введение	4
1. Область применения	6
2. Нормативные ссылки.....	7
3. Термины и определения, сокращения.....	8
4. Принцип метода	9
5. Формирование групп обследуемых лиц	10
6. Проведение исследования	11
7. Анализ препаратов.....	12
8. Анализ данных БМЦТ	12
9. Интерпретация данных БМЦТ. Индивидуальная оценка цитогенетического статуса человека	14
10. Оценка влияния факторов производственной среды на цитогенетический статус персонала.....	15
Библиография	16
Приложение А	18
Приложение Б.....	19
Приложение В	20
Приложение Г.....	21
Приложение Д	22

Введение

В Российской Федерации проводятся работы по промышленной утилизации выведенных из состава Военно-Морского Флота кораблей, подводных лодок с ядерными энергетическими установками и судов атомного технологического обслуживания. Деятельность по утилизации атомного флота СССР проводится на территориях объектов бывшей военной инфраструктуры. Особенности производственной деятельности на этих предприятиях определяют комплексный характер воздействия на персонал вредных факторов рабочей среды. В процессе производственной деятельности по обращению с ОЯТ и РАО в ходе утилизации АПЛ персонал предприятий подвергается сочетанному воздействию облучения источниками ионизирующего излучения в малых дозах (1–5 мЗв/год), высокотоксичных химических веществ на уровнях, не превышающих ПДК, а также других факторов, источниками которых являются характер производственной деятельности и среда обитания. Для своевременного выявления влияния этих факторов осуществляется периодический контроль состояния здоровья персонала путем проведения профосмотров (обследований) в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ №302 от 12.04.2011. Учитывая особенности проводимых работ, представляется целесообразным расширение спектра диагностических методов, применяемых для контроля комплексного влияния факторов производственной среды на состояние здоровья контингента настоящих предприятий. Современное развитие медицинской науки и биомедицинских технологий позволяет предложить методы, позволяющие повысить информативность подобных исследований с целью своевременного выявления патологических процессов. Для оценки негативного действия факторов окружающей среды и для предотвращения/минимизации их влияния на здоровье населения Всемирная организация здравоохранения рекомендует использовать биомаркеры воздействия, чувствительности и эффекта [2].

В рамках настоящих Методических рекомендаций представлена методика контроля состояния здоровья персонала на основе оценки цитогенетического статуса работников с использованием неинвазивного буккального микроядерного цитомного теста (далее – БМЦТ).

К настоящему времени решены методические вопросы стандартизации протоколов БМЦТ, подготовки препаратов к исследованию, критериев выявления индикаторов воздействия, влияния сопутствующих факторов [12, 16-17]. Опубликованы обзоры данных, указывающие на повышение частоты микроядер у человека при генотоксическом действии различных факторов [1,7,17-18]. Этот подход признан перспективным в качестве инструмента исследований физиологических и патологических процессов в организме, связанных с повреждением генома, и в настоящее время реализуется в рамках диагностических исследований состояния здоровья населения в ряде международных и российских исследований [1, 5,7,9,11,15,19-22].

Описанный в МР цитомный анализ базируется на разработанных классификации и критериях оценки биологических маркеров (цитогенетических повреждений; нарушения пролиферации; клеточной гибели) [10]. В рекомендациях представлены оптимальные способы неинвазивного взятия биоматериала и подготовки препаратов для микроскопии, протокол микроскопического анализа, индивидуальная выписка по оценке цитогенетического статуса с учетом интегральных показателей цитогенетических нарушений, пролиферации и клеточной гибели, приведена оценка количественной интерпретации результатов, контрольные уровни исследуемых показателей. Методические особенности теста апробированы на значительном (более 500 человек) числе обследованных [3-4, 9, 12-14].

Учитывая постоянное обновление клеток буккального эпителия, БМЦТ может быть использован для мониторинга состояния здоровья персонала, а также населения, проживающего в районах расположения радиационных объектов.

Данное исследование может проводить цитолог, имеющий соответствующее оборудование: бинокулярный микроскоп (x1000), термостат (37°C). Преимуществом теста является возможность долгосрочного хранения подготовленных препаратов и их повторный анализ независимым экспертом.

Применение данной методики позволит расширить спектр диагностических методов в ходе профилактических осмотров и, учитывая небольшую численность работников рассматриваемых предприятий, реализовать «персонализированный» (индивидуальный) подход к оценке состояния здоровья персонала предприятий, задействованного при выполнении работ по обращению с ОЯТ и РАО в ходе утилизации АПЛ.



Группа 12 Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ И ПЕРСОНАЛА ПРЕДПРИЯТИЙ,
ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПО ОБРАЩЕНИЮ С ОТРАБОТАВШИМ
ЯДЕРНЫМ ТОПЛИВОМ И РАДИОАКТИВНЫМИ ОТХОДАМИ В УСЛОВИЯХ
КОМПЛЕКСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИОННЫХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 12.031 - 2020

1. Область применения

1.1. Методические рекомендации (далее – МР) предназначены для ранней диагностики патологических состояний персонала, работающего во вредных условиях труда, на основе определения риска цитогенетических нарушений.

1.2. МР распространяются на оценку состояния здоровья персонала в ходе проведения медико-санитарных мероприятий при профилактических осмотрах персонала предприятий, осуществляющих обращение с ОЯТ и РАО в ходе промышленной утилизации АПЛ, а также других радиационных объектов, характер деятельности которых связан с комплексным воздействием факторов производственной среды на здоровье человека.

1.3. МР могут распространяться на проведение оценки состояния здоровья населения, проживающего на территориях вблизи вышеописанных предприятий в ходе медико-санитарных мероприятий.

1.4. В МР представлен методический подход к проведению цитогенетического исследования, включающий сбор предварительной информации о состоянии здоровья пациента, формирование групп обследуемых лиц, забор биоматериала и его подготовку, анализ полученных результатов на основе критериев определения цитогенетических и цитотоксических показателей, подготовку заключения по результатам исследования.

1.5. МР предназначены для специалистов медицинских организаций ФМБА России, осуществляющих медико-санитарное обеспечение персонала предприятий, задействованного в работах по обращению с ОЯТ и РАО, а также других радиационных объектов, характер деятельности на которых связан с комплексным воздействием факторов производственной среды на человека.

При подготовке методических рекомендаций использованы опубликованные материалы, содержащие научное обоснование рекомендуемого подхода, а также результаты его практической апробации для оценки здоровья населения, проживающего в условиях загрязнения среды обитания [3-4,6,8,10,12-14,24].

2. Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы ссылки на нормативные документы.

- Приказ ФМБА России № 1793 от 30.12.2002 «Об организации социально-гигиенического мониторинга на объектах и территориях, обслуживаемых ФМБА России».

- Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации № 302 от 12.04.2011 «Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования), и порядка проведения обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров (обследований) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

- Р 1.1.001-96 Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации. Общие требования к организации разработки нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования;

- Р 1.1.002-96 Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации. Классификация нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования;

- Р 1.1.003-96 Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации. Общие требования к построению, изложению и оформлению нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования;

Примечание. При пользовании настоящими рекомендациями необходимо проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю "Национальные стандарты", который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно

издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменён (изменён), то при пользовании настоящим регламентом следует руководствоваться заменяющим (изменённым) документом. Если ссылочный документ отменён без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3. Термины и определения, сокращения

В настоящем документе применены следующие термины с соответствующими им определениями:

Апоптоз – процесс программированной гибели клеток. Обеспечивает, в том числе, элиминацию генетически поврежденных клеток.

Буккальный эпителий - эпителий слизистой оболочки щеки.

Двухъядерная клетка - клетка с двумя отдельно лежащими ядрами. Учитывают отдельно лежащие клетки без наложения друг на друга. Показатель нарушения пролиферации.

Интерфаза – период жизнедеятельности клетки между двумя делениями.

Кариолизис завершённый (полный) - деструктивное изменение клеточного ядра, сопровождающееся утерей способности хроматина к окрашиванию и полным его исчезновением. Считают клетки с сохраненной цитоплазмой и «тенью» ядра (полным отсутствием окраски ядра).

Кариолизис начальный – начальная стадия деструкции ядра, характеризующаяся появлением лизированных (обесцвеченных) зон хроматина.

Кариологический (цитомный) анализ – микроскопический анализ состояния ядра клеток.

Кариорексис – деструктивное изменение ядра, сопровождающееся распадом его на отдельные интенсивно окрашенные части с гомогенной структурой. Учитывают клетки с несколькими плотными гомогенно окрашенными фрагментами ядра в цитоплазме.

Микроядра – небольшие (не более 1/3 диаметра ядра) округлые с четким контуром ДНК-содержащие образования за пределами основного ядра, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом и/или отставших на стадии ана-телофазы хромосом.

Некроз – гибель клеток под воздействием различных факторов, генетически не контролируется, морфологически характеризуется разрушением ядерной оболочки, нитевидными выходами хроматина за пределы ядра, отсутствием четкого ядерного контура.

Пикноз - деструктивное изменение ядра, сопровождающееся уменьшением его размера в два и более раза, уплотнением, гомогенным интенсивным окрашиванием.

Промилле – одна тысячная доля (0.1 процента).

Протрузии ядра – шаровидные, нитевидные или иной формы ядерные структуры в цитоплазме, четко отграниченные от ядра и соединяющиеся с ним перемычкой. Показатели цитогенетического действия факторов.

Сдвоенные ядра – два ядра в клетке, соединенные между собой в одной из сторон. Другие названия: ядра с центральной перетяжкой, амитоз. Могут быть образованы в результате повреждения веретена деления и нарушения расхождения хромосом к полюсам. Показатель нарушения пролиферации.

Цитогенетический статус – качественная и количественная характеристика состояния генетического материала клеток (ядра), определяемая визуально при микроскопическом анализе.

Цитогенетический стресс - определяемое под микроскопом структурное изменение генома клетки в ответ на неблагоприятное действие эндогенных или экзогенных факторов.

Ядро атипичной формы - ядро, форма которого отличается от округлой, может быть гантелеобразной, иметь лопастевидные выступы в цитоплазму. В отличие от протрузий эти выступающие части не отделены видимой бороздой от ядра. Появление таких ядер отмечают в процессе канцерогенеза.

Эксфолиативные клетки слизистой оболочки щеки - естественно слущивающиеся поверхностные клетки эпителия слизистой оболочки щеки.

Сокращения, используемые в документе:

АПЛ - атомная подводная лодка

БМЦТ - буккальный микроядерный цитомный тест (неинвазивный)

ВОЗ - всемирная организация здравоохранения

ОЯТ - отработавшее ядерное топливо

ОНВ – ориентировочные нормативные величины

ПДК - предельно-допустимая концентрация

РАО - радиоактивные отходы

4. Принцип метода

БМЦТ предназначен для оценки цитогенетического статуса персонала на индивидуальном и групповом уровне.

Тест представляет собой количественный микроскопический анализ эксфолиативных клеток слизистой оболочки щеки (буккального эпителия).

Клетки собирают, наносят на предметное стекло, окрашивают и анализируют под микроскопом. У каждого индивида подсчитывают 1000/2000 отдельно лежащих клеток и определяют полный спектр состояния ядра клеток (Приложение Д). Каждую клетку относят к какой-либо категории: норма, клетки с цитогенетическими нарушениями, клетки с нарушениями пролиферации, клетки на разных стадиях гибели.

К показателям цитогенетических нарушений относят клетки с микроядром; клетки с протрузией ядра; клетки с ядром атипичной формы.

Показателями нарушения пролиферации являются клетки с двумя и более ядрами или со сдвоенными ядрами.

Показателями гибели клеток являются клетки с началом кариолизиса, конденсацией хроматина, пикнозом ядра, кариорексисом и завершенным кариолизисом.

Показатели нарушения пролиферации и клеточной гибели относятся к показателям цитотоксического действия.

К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о том, что активация гибели клеток приводит к снижению частоты клеток с цитогенетическими нарушениями, тогда как усиление пролиферации способствует воспроизведению клеток с цитогенетическими нарушениями.

Анализ соотношения показателей пролиферации и клеточной гибели дает дополнительную информацию о накоплении клеток с цитогенетическими нарушениями. Изменение соотношения этих процессов ведет либо к деструкции ткани, либо к развитию риска новообразований.

В качестве единого критерия количественной оценки уровня цитогенетических нарушений в клетках с учетом клеточной кинетики (соотношение интенсивности пролиферации и гибели клеток) разработан индекс накопления цитогенетических нарушений (I_{ac} -index accumulation) [12,24]. Этот индекс является основным показателем результатов оценки цитогенетического статуса с применением БМЦТ.

Индекс накопления цитогенетических нарушений определяется как произведение интегрального показателя цитогенетических нарушений (суммы клеток с микроядрами, ядерными протрузиями в промилле I_c – цитогенетический индекс) и интегрального показателя нарушенной пролиферации (суммы клеток с двумя и более ядрами в промилле I_p – пролиферативный индекс), деленное на интегральный показатель клеточной гибели (сумму всех клеток в апоптозе в промилле $I_{арор}$ - апоптотический индекс):

$$I_{ac} = (I_c \times I_p / I_{арор}) \times 100 \quad (1)$$

5. Формирование групп обследуемых лиц

Для оценки состояния здоровья персонала проводится обследование групп работников, подверженных воздействию факторов производственной среды (группа воздействия), и не имеющих контакта с такими факторами (группа сравнения).

При групповом исследовании объем выборки определяется целью исследования, интенсивностью и временем воздействия изучаемых факторов. Рекомендуется включать в исследование не менее 20 человек в каждую группу.

Для формирования групп рекомендуется учитывать стаж работы во вредных условиях, уровни воздействия факторов производственной среды, возраст [в соответствии с классификацией ВОЗ – молодой (19-44), средний (45-59), пожилой (60-74)].

Для корректной интерпретации результатов исследования следует учитывать влияние на цитогенетический статус следующих воздействий в течение последнего месяца, а именно: рентгенодиагностические, физиотерапевтические процедуры, вирусные заболевания, обострение хронических заболеваний, сильный эмоциональный стресс. Эта информация заполняется обследуемым в формате опросной карты (анкеты) перед проведением исследования (приложение Б).

6. Проведение исследования

6.1. Оборудование и материалы

Для исследования требуются:

Материалы:

- шпатели деревянные в индивидуальной упаковке;
- стаканчики одноразовые для полоскания рта;
- стекла предметные с матированным краем (по 2 на каждого обследуемого), обезжиренные, сухие;

Реактивы:

- 96% этиловый спирт;
- ледяная уксусная кислота;
- 2,5% раствор ацетоорсеина;
- 1% раствор светлого зеленого (Light green).

Приборы:

- термостат суховоздушный (37°C).
- бинокулярный микроскоп (увеличение 100, 400 и 1000, иммерсионное масло).

6.2. Взятие биоматериала, условия хранения

Перед приготовлением препаратов клеток слизистой оболочки щеки необходимо предложить обследуемому прополоскать рот питьевой водой (для удаления остатков пищи). Подписать препарат по матированному краю стекла. Выметающими движениями 4-5 раз провести вогнутым концом шпателя по внутренней стороне одной щеки, затем другим концом шпателя – по внутренней стороне другой щеки. Собранные клетки с одного конца шпателя распределить по всей поверхности предметного стекла, на которое предварительно нанесена маленькая капля воды. С другого конца шпателя также распределить клетки по поверхности второго стекла в капле воды. Стекла должны хорошо высохнуть в горизонтальном состоянии. После высыхания на поверхности стекла собранный биоматериал виден как серый пылевидный налет.

6.3. Фиксация и окрашивание препаратов

- Хорошо просушенные препараты погружают на 10 минут в свежеприготовленный фиксатор: смесь этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Высушивают на воздухе.

- Препараты окрашивают предварительно отфильтрованным 2,5% раствором ацетоорсеина при 37°C в течение 1,5-2 часов.
- Промывают в 2х сменах дистиллированной воды (37°C). Высушивают на воздухе.
- Докрашивают цитоплазму клеток 1% спиртовым раствором светлого зеленого в течение 10-30 секунд.
- Промывают в двух сменах дистиллированной воды.

Ядра приобретают бордовый цвет, цитоплазма – зеленовато-голубой.

6.4. Хранение препаратов

Окрашенные препараты можно хранить при комнатной температуре в течении длительного времени (несколько лет). Лучше - в специальных коробках для предметных стекол.

7. Анализ препаратов

Препараты анализируют с помощью светового микроскопа в проходящем свете, используя объектив с масляной иммерсией с матовым фильтром при увеличении 10x100. Анализируют 1000 эпителиальных клеток слизистой оболочки щеки от каждого человека. Для получения более четких результатов или при возникновении неоднозначных результатов рекомендуется увеличить количество исследуемых клеток в 2 раза. При проведении группового исследования анализируют зашифрованные препараты.

При микроскопическом анализе биоматериала учитывают отдельно лежащие неповрежденные клетки с хорошо окрашенной цитоплазмой и неповрежденной клеточной оболочкой. Исследуемые клетки должны быть без наложений, в единичных случаях - с минимальным наложением друг на друга.

В каждой пригодной для анализа клетке оценивают состояние ядерного материала. Классификация и диагностические признаки определения разных состояний ядра клетки представлены в Приложении Д. При микроскопическом анализе определяют четыре группы показателей, как описано в разделе 4 Принцип метода. Первичные результаты анализа вносят в Протокол исследования (Приложение В).

8. Анализ данных БМЦТ

Обработка данных проводится в два этапа. Первый этап заключается в анализе индивидуальных данных.

Каждый из 10 показателей состояния ядра клеток, зафиксированных в Протоколе анализа (Приложение В) выражают в промилле от общего количества анализированных клеток.

Вычисляют интегральные показатели в промилле в каждой из трех групп: I_c - интегральный показатель цитогенетических нарушений (сумма клеток с микроядрами, ядерными протрузиями в промилле); I_p -интегральный показатель нарушения пролиферации (сумма клеток с двумя и более ядрами в промилле), I_{apop} – апоптотический индекс (сумма всех клеток в апоптозе в промилле)

(Протокол 4). В том случае, когда у индивида не выявлены цитогенетические нарушения или дву-трехъядерные клетки, нулевое значение нужно изменить на единицу.

На основе вычисленных интегральных показателей определяют индекс накопления цитогенетических нарушений у каждого обследуемого по формуле (1) (см. раздел 4 Принцип метода).

Для оценки цитогенетического статуса обследуемых групп рекомендуется формирование электронной базы данных с внесением всех показателей (Приложение Г) наряду с анкетными данными каждого обследуемого (Приложение Б).

При межгрупповых сравнениях определяют средние значения и доверительные интервалы каждого показателя цитогенетического статуса, которые следует обобщить в виде таблицы (таблица 1).

Статистическую обработку результатов при групповом исследовании проводят с использованием пакета статистических программ (Excel, STATISTICA for Windows). Для сравнения групп используют непараметрические критерии χ^2 , Манна-Уитни. Различия считают значимыми при $P < 0.05$.

Таблица 1 - Цитомный анализ буккальных эпителиоцитов в двух сравниваемых группах ($x_{cp} \pm m$)

Показатели	Группа сравнения	Группа воздействия
1	2	3
Цитогенетические показатели		
Доля клеток с микроядрами		
Доля клеток с протрузиями		
Суммарная доля клеток с цитогенетическими нарушениями (I_c)		
Показатели нарушения пролиферации		
Доля клеток с двумя ядрами		
Доля клеток с тремя и более ядрами		
Доля клеток со сдвоенным ядром		
Суммарный показатель нарушения пролиферации (I_p)		
Показатели деструкции ядра		
Доля клеток с началом кариолизиса		
Доля клеток с конденсацией хроматина		

Доля клеток с кариопикнозом		
Доля клеток с кариорексисом		
Доля клеток с завершённым кариолизисом		
Апоптотический индекс ($I_{\text{апоп}}$)		
Индекс накопления цитогенетических нарушений ($I_{\text{ас}}$)		

9. Интерпретация данных БМЦТ. Индивидуальная оценка цитогенетического статуса человека

На каждого обследуемого заполняется индивидуальная выписка по оценке цитогенетического статуса при исследовании эпителия слизистой оболочки щеки (Приложение Г). В нее вносятся все показатели из Протокола микроскопического анализа препаратов эпителиальных клеток слизистой оболочки щеки человека (Приложение В) и заключение о его цитогенетическом статусе. Оценку проводят путем сравнения с ориентировочными нормативными величинами [6,12], представленными в индивидуальной выписке (Приложение Г).

Превышение доли клеток с микроядрами и/или протрузиями по сравнению с ориентировочными нормативными величинами указывает на цитогенетический эффект факторов (изменение структуры генетического материала клетки).

Изменение показателей пролиферации и/или деструкции ядра свидетельствует о цитотоксическом действии фактора.

Для характеристики состояния полости рта указывают наличие микрофлоры и лейкоцитов на препарате в терминах «единичная/ые», «умеренно», «много».

Оценка значимости цитогенетических показателей среди показателей БМЦТ является приоритетной.

Определяют три уровня цитогенетического стресса [12, 24].

1. Низкий. Данный уровень отражает отсутствие превышения ориентировочных нормативных величин всех исследованных показателей;
2. Допустимый - возможно превышение ориентировочных нормативных величин по показателям пролиферации и/или деструкции ядра;
3. Высокий (группа риска) при превышении ориентировочных нормативных величин по цитогенетическим показателям.

Количественную оценку цитогенетического статуса человека определяют по индексу накопления цитогенетических нарушений (см. раздел 4 Принцип метода). Определение индекса

накопления цитогенетических повреждений позволяет выделить три группы риска, определенные эмпирическим путем: низкий ($I_{ac} \leq 2$), умеренный ($2 < I_{ac} < 4$) и высокий ($I_{ac} \geq 4$) (Приложение Г).

В индивидуальной выписке (Приложение Г) следует указать отношение индивида к группе риска по показателю индекса накопления цитогенетических нарушений. При этом следует отметить уровень цитогенетического стресса, характеризующего вклад цитогенетических нарушений.

10. Оценка влияния факторов производственной среды на цитогенетический статус персонала

Оценка влияния факторов производственной среды проводится путем сопоставления средних значений показателей цитогенетического статуса в группах воздействия и сравнения.

Оценка наличия эффекта определяется по изменению одного или нескольких показателей в группе воздействия по отношению к группе сравнения.

Характеристика воздействия факторов производственной среды на обследуемый персонал проводится аналогично индивидуальной оценке цитогенетического статуса человека (см. раздел 9), только в качестве оцениваемых показателей используются средние групповые значения показателей цитогенетического статуса.

По результатам статистического анализа проводится следующая оценка:

- Сравнение средних значений в группах воздействия и сравнения с ОНВ и определение: характера эффекта (цитогенетического, цитотоксического), уровня эффекта (по индексу накопления цитогенетических нарушений).
- Сравнение средних значений в группах воздействия и сравнения между собой. Определение характера эффекта (цитогенетического, цитотоксического), уровня эффекта (по индексу накопления цитогенетических нарушений). Этот вид сравнения позволяет выявить возможное влияние производственного фактора на персонал.
- В группах воздействия и сравнения можно провести сравнение долей лиц с низким, допустимым и высоким уровнем цитогенетического стресса.
- Обследуемых лиц в группе можно ранжировать в соответствии с индексом накопления цитогенетических повреждений. Выделяют три группы: с низким, умеренным и высоким значением индекса накопления цитогенетических нарушений.

На основе вышеприведенного анализа можно дать заключение о характеристике возможного влияния производственной среды на здоровье персонала.

Библиография

- [1] Арутюнян Р.М., Туманян Э.Р., Ширинян Г.С. Анализ микроядер слюистой ротовой полости для оценки эффекта загрязнителей среды. //Цитология и генетика. 1990.Т.24. №2. С.57-60.
- [2] Биомаркеры и оценка риска: концепции и принципы (Гигиенические критерии состояния окружающей среды; 155) 1. Биологические маркеры 2. Воздействие факторов окружающей среды 3. Опасные вещества 4. Факторы риска. ВОЗ, Женева. 1996.96 с.
- [3] Бяхова М.М., Сычева Л.П., Журков В.С. и др. Кариологические и иммунологические показатели у детей в условиях различного загрязнения атмосферного воздуха.// Гигиена и санитария. 2010. №3. С. 9-11.
- [4] Джамбетова П.М. Молочаева Л.Г., Махтиева А.Б., Сычева Л.П. Оценка влияния загрязнения почв нефтепродуктами на цитогенетический статус и показатели апоптоза в клетках букального эпителия у детей. //Экологическая генетика. 2009. Т.7, № 4. С.34-40.
- [5] Маймулов В.Г., Китаева Л.В., Верещагина Т.В. и др. Цитогенетические нарушения в соматических клетках у детей, проживающих в районах с различной интенсивностью загрязнения окружающей среды. //Цитология. 1998. Т.40. № 7. С.686-689.
- [6] Методические рекомендации «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека». Научный совет РАМН и МЗ и СР РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды. М.2005. 37 с.
- [7] Нерсесян А.К. Микроядерный тест в эксфолиативных клетках человека как метод изучения действия мутагенов/канцерогенов. //Цитология и генетика. 1996.Т.30.№5. С.91-96.
- [8] Патент № 2292027 по заявке от 24.03.2005 «Способ неинвазивной диагностики цитогенетического и цитотоксического действия различных факторов на организм человека» (Сычева Л.П., Коваленко М.А., Рахманин Ю.А. и др.). 2005.
- [9] Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. (Под редакцией академика РАМН Ю.А.Рахманина и д.б.н. Л.П.Сычевой). //М.: Гениус, 2007.312 с.
- [10] Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. //Медицинская генетика. 2007. №11.С.3-11.
- [11] Сычева Л.П. Осипов А.Н. Неинвазивная диагностика клеточных поражений у пострадавших в результате техногенных аварийных ситуаций «Медицина экстремальных ситуаций». №2, 2017, с.168-174.
- [12] Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека. //Гигиена и санитария. 2012. №6. 68-72.

- [13] Сычева Л.П., Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Ахальцева Л.В., Россоловский А.П. Цитогенетический статус детей при гигиенической оценке загрязнения атмосферного воздуха веществами, обладающими запахом. // Гигиена и санитария. 2016. Т.95. №8. 765-768.
- [14] Сычева Л.П., Иванов С.И., Коваленко М.А. и др. Цитогенетический статус детей, проживающих вблизи целлюлозно-бумажного комбината. // Гигиена и санитария. 2010. № 1. С.7-10.
- [15] Andreassi M.G., Barale R., Iozzo P., Picanj E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. // *Mutagenesis*. 2011. V.26, N1. P.77-83.
- [16] Bolognesi C., Knasmueller S., Nersesyan A., Thomas P., 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. V.753, N2. P.100-113.
- [17] Fenech M., Holland N., Zeiger E., Chang W.P., Burgaz S., Thomas P., Bolognesi C., Knasmueller S., Kirsch-Volders M., Bonassi S. The HUMN and HUMNxl international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells - past, present and future. // *Mutagenesis*. 2011. V. 26, N1. 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. // *Mutat Res*. 2008. V.659, N1-2. P.93-108.
- [19] Lal A., Ames B. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. // *Mutagenesis*. V.26, N1. P. 57-62.
- [20] Migliore L., Coppede F., Fenech M., Thomas P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. // *Mutagenesis*. V.26, N1. P.85-92.
- [21] Mørck T.A., Loock K.V., Poulsen M.B. et al. Micronucleus frequency in Danish schoolchildren and their mothers from the DEMOCOPHES population. // *Mutagenesis*. 2016. V.31, N1. P.1-8.
- [22] Revazova J., Yurchenko V, Katosova L, Platonova V, Sycheva L, Khripach L, Ingel F, Tsutsman T, Zhurkov V. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. // *Chemosphere*. 2001. V.43, N4-7. P.999-1004.
- [23] Sarto F., Finotto S., Giacomelli L. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. // *Mutagenesis*. 1987. V.2. P.11-17.
- [24] Sycheva L.P. Diagnostics, correction and prophylaxis of prepathological states using the non-invasive cell technology is one of the ways of longevity. // *Frontiers in Genetics*. 2015. V.6. P.1-2.

Приложение А
(обязательное)
Информированное согласие

ФИО.....

- 1 **Я ознакомился с информацией об исследовании.** Мне была предоставлена возможность задать вопросы. Я понимаю, для чего проводится это исследование.
- 2 **Я понимаю, что участие в исследовании является добровольным и я могу отказаться от него без объяснения причин.**
- 3 **Я понимаю, что исследование проводится неинвазивным методом без забора крови путем получения отпечатков/мазков слизистой оболочки щеки.**
- 4 **Я согласен заполнить анкету.**

ФИО

Дата

Подпись

Приложение Б
(обязательное)
Анкета

Фамилия, имя, отчество		
Пол	М	Ж
Дата рождения		
Хронические заболевания		
да		нет
Если есть, по-возможности, указать какие		
Заболевания (обострение) на момент обследования		
да		нет
Сильный эмоциональный стресс в течение последнего месяца		
Да		нет
Аллергические проявления в течение последнего месяца		
да		нет
если есть, указать на какие факторы		
Лекарственная терапия или какие-либо процедуры (рентген, маммография, физиотерапия, солярий) в течение последнего месяца перед обследованием		
да		нет
Если есть, по-возможности, указать лекарственные препараты или процедуры		
Наличие профессиональных вредностей в настоящее время (обвести, указать какие)		
- химические препараты		
- физические факторы		
- инфекция		
Курение		
Да		нет

Подпись

Дата

Приложение Г

(обязательное)

Индивидуальная выписка по оценке цитогенетического статуса при исследовании эпителия слизистой оболочки щеки

Фамилия, имя, отчество _____

Дата взятия материала _____

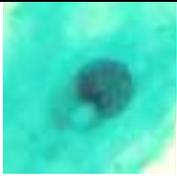
Исследуемые показатели	Значение показателя у обследуемого в ‰	Ориентировочные нормативные величины ‰
Цитогенетические показатели		
Клеток с микроядрами		0-2
Клеток с протрузиями		0-4
Сумма клеток с цитогенетическими повреждениями (микроядрами и протрузиями) (I_c)		0-5
Клеток с ядром атипичной формы		0-5
Показатели пролиферации		
Двухядерных клеток		0-5
Клеток со сдвоенными ядрами		0-6
Клеток с тремя и более ядрами		0-2
Сумма клеток с двумя и более ядрами (I_p)		0-8
Показатели деструкции ядра		
Клеток с началом кариолизиса		2-400
Клеток с конденсацией хроматина		2-400
Клеток с кариопикнозом		0-60
Клеток с кариорексисом		0-40
Клеток с кариолизисом (полным)		0-60
Индекс апоптотический ($I_{арор}$)		0-600
Индекс накопления цитогенетических повреждений I_{ac}		
Низкий ($I_{ac} \leq 2$)		
Умеренный ($2 < I_{ac} < 4$)		
Высокий ($I_{ac} \geq 4$)		
Уровень цитогенетического стресса		
Низкий – отсутствие превышения ориентировочных нормативных уровней исследованных показателей		
Допустимый – превышение по показателям деструкции ядра и/или пролиферации		
Высокий (группа риска) – превышение ориентировочного нормативного уровня по цитогенетическим		
Другие показатели		
Микрофлора		
Лейкоциты		
Заключение		

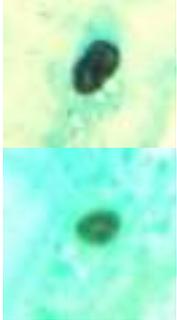
_____ /подпись исполнителя/

Приложение Д
(справочное)

Классификация и диагностические признаки полного спектра кариологических показателей клеток in vivo [3]

Кариологические показатели (экстрануклеарные структуры или состояния деструкции ядра клетки)	Расположение в клетке относительно основного ядра	Форма ядерной структуры	Размер ядерной структуры	Структура хроматина	Интенсивность окраски хроматина	Фото	
I. Цитогенетические показатели							
1	Микроядро	Расположено в клетке вне ядра и отдельно от него	Круглая или овальная	Не более 1/3 диаметра основного ядра	Соответствует основному ядру в клетке	Соответствует основному ядру в клетке	
2.1	Протрузия 1 типа («ядерная почка»)	Расположена в клетке вне ядра, находится с ним в тесном контакте	Круглая или овальная	Не более 1/3 диаметра ядра	Соответствует ядру в клетке	Соответствует ядру в клетке	
2.2	Протрузия 2 типа («разбитое яйцо»)	Расположена на небольшом удалении от ядра, соединена с ним тонким мостиком нуклеоплазмы	Округлая, может быть вогнута со стороны мостика нуклеоплазмы	Не более 1/3 диаметра основного ядра	Соответствует основному ядру в клетке	Соответствует основному ядру в клетке	
3	Мост	Две округлые части ядра расположены на расстоянии друг от друга, соединены тонким мостиком нуклеоплазмы	Каждая из частей ядра круглой или овальной формы	Две части ядра приблизительно равны по размеру	Соответствует структуре хроматина ядер в норме или при деструкции	Соответствует окраске ядер в норме или при деструкции	
4	Ядро атипичной формы (предполагаемый цитогенетический показатель)	Характеристика ядра	Форма ядра отличается от округлой: может иметь выступы, быть	Соответствует размеру ядер в норме или при деструкции	Соответствует структуре хроматина ядер в норме или при деструкции	Соответствует окраске ядер в норме или при деструкции	

			гантелеобразной, бобовидной и т.п.				
II. Косвенные показатели пролиферации (умножение генетического материала, незавершенный митоз)							
5	Два изолированных ядра в клетке	Два ядра расположены в клетке отдельно друг от друга	Форма каждого ядра круглая или овальная	Размер каждого ядра соответствует размеру диплоидного ядра одноядерной клетки	Структура хроматина обоих ядер одинакова, соответствует структуре хроматина ядер в норме или при деструкции	Окраска хроматина обоих ядер одинакова, соответствует окраске ядер в норме или при деструкции (как правило, изменения синхронны)	
6	Сдвоенные ядра в клетке (ядро с перетяжкой)	Два ядра расположены в клетке в тесном контакте друг с другом (два не разошедшихся ядра)	Форма обоих ядер круглая или овальная, место контакта - плоское	Размер каждого ядра соответствует размеру диплоидного ядра одноядерной клетки	Структура хроматина обоих ядер одинакова, соответствует структуре хроматина ядер в норме или при деструкции	Окраска хроматина обоих ядер одинакова, соответствует окраске ядер в норме или при деструкции	
7	Три изолированных ядра в клетке (увеличение генетического материала)	Три ядра расположены в клетке отдельно друг от друга	Форма каждого из ядер круглая или овальная	Ядра могут отличаться по размеру	Структура хроматина ядер может быть одинакова, соответствует структуре хроматина ядер в норме или при деструкции	Окраска хроматина ядер одинакова, соответствует окраске ядер в норме или при деструкции	
III. Показатели ранней стадии деструкции ядра							
8	Перинуклеарная вакуоль	Расположена сбоку от ядра образуя округлую выемку (вдавление), или над ядром	Округлая структура	Может достигать половины ядра	Гомогенная структура	Вакуоль по окраске бледнее цитоплазмы; если расположена над ядром, то сквозь нее очень слабо просматривается хроматин ядра	

9	Начало кариолизиса	Несколько вакуолей расположены внутри ядра	Ядро при вакуолизации имеет ровный гладкий край. Вакуоли округлые	Ядро немного увеличивается в размере («набухает»), вакуоли могут быть разного размера.	Структура хроматина ядра соответствует структуре ядер в норме. Вакуоли бесструктурны	Окраска ядра соответствует окраске ядер в норме или немного бледнее. Вакуоли бесцветны на фоне окрашенного хроматина.	
10	Конденсация хроматина	Характеристика ядра	Ядро при конденсации «сморщивается», имеет неровный край	Соответствует размеру ядер в норме или может немного уменьшаться в размере	Хроматин собирается в плотные четко очерченные тяжи и глыбки, между которыми образуются неокрашенные неровные полости, заполненные нуклеоплазмой	Отмечается интенсивная окраска глыбок и тяжей хроматина	
IV. Показатели завершения деструкции ядра (апоптоза)							
11	Кариорексис	Характеристика ядра	Ядро округлое, край ядра нечеткий	Соответствует размеру ядра на стадии конденсации хроматина	Хроматин собирается в плотные отдельно лежащие тяжи и глыбки с вакуолями между ними	Интенсивная окраска глыбок и тяжей хроматина	
12	Кариопикноз	Характеристика ядра	Ядро округлое, край ядра четкий	Размер ядра приблизительно в 2 раза меньше размера ядер в норме	Гомогенная	Интенсивная, очень плотная окраска хроматина	
13	Кариолизис	Характеристика ядра	Ядро округлой формы, периметр плохо просматривается	Размер ядра соответствует размеру ядра на стадии кариорексиса или на стадии	Хроматин лизирован, очень бледно гомогенно окрашен, остается лишь «тень ядра»	Ядро («тень ядра») очень бледно окрашено по сравнению с ядрами в норме основной клеточной	

				кариопикноза		популяции	
У. Дополнительные (фагоцитированные) ядерные структуры в клетке							
14	Апоптозные тела (всегда более 2 в клетке, чаще 5-10)	Расположены в клетке вне основного ядра и отдельно от него	Апоптозные тела в одной клетке могут иметь разную форму: круглую, овальную, бобовидную, гантелевидную	Апоптозные тела в одной клетке имеют разный размер, самые крупные из них не превышают 1/3 диаметра основного ядра	Хроматин апоптозных тел может быть как гомогенным, так и структурированным	Апоптозные тела в одной клетке могут иметь разную интенсивность окраски хроматина: от очень интенсивной до очень бледной.	

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное бюджетное учреждение - Государственный научный центр
Российской Федерации «Федеральный медицинский биофизический центр имени
А.И. Бурназяна»
(ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)

**Оценка состояния здоровья населения и персонала предприятий, осуществляющих
деятельность по обращению с отработавшим ядерным топливом и радиоактивными
отходами в условиях комплексного воздействия радиационных и химических факторов**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12 Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от
повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной
помощи

Методические рекомендации

МР ФМБА России 12.031 - 2020

Заместитель генерального директора
по науке и биофизическим технологиям,
заведующий отделом № 3, заведующий лабораторией
№ 14, д-р. мед. наук

Н.К. Шандала

Исполнители:

Ведущий научный сотрудник, д-р биол. наук

Л.П. Сычева

Заведующий лабораторией, канд. биол. наук

С.М. Киселев

Научный сотрудник

С.В. Ахромеев

Инженер

В.В. Шлыгин

