



Сычева Л.П., Киселев С.М., Шандала Н.К.

Применение буккального микроядерного цитомного теста для оценки состояния здоровья детского населения, проживающего в районе расположения объектов ядерного наследия

ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России», 123098, Москва, Российская Федерация

Введение. Важной задачей гигиены является оценка состояния здоровья населения, проживающего на территориях с неблагоприятными эколого-гигиеническими условиями.

Материалы и методы. Проведено изучение состояния здоровья 50 детей трёх возрастных групп посёлка городского типа (пгт) Дунай Приморского края, расположенного вблизи предприятия «Дальневосточный центр по обращению с радиоактивными отходами ДВЦ "ДальРАО"». Оценку состояния здоровья проводили с использованием буккального микроядерного цитомного теста (БМЦТ) с целью определения цитогенетического и цитотоксического действия факторов среды обитания.

Результаты. Установлено, что частота клеток с микроядрами в группах детей пгт Дунай варьировала в пределах 0,33–0,47 промилле, что не превышает контрольный уровень 1,1 промилле, определенный в рамках международного проекта HUMNxl. Уровень цитогенетического стресса определен как допустимый (но не низкий), что, по-видимому, связано с цитотоксическим действием факторов среды обитания. Определён низкий уровень цитогенетических нарушений без превышения ориентировочных нормативных величин, а также низкий индекс накопления цитогенетических нарушений, что свидетельствует об отсутствии мутагенного действия факторов среды обитания. Уровень цитогенетического стресса определен как допустимый, возможно, определяемый цитотоксическим действием факторов среды обитания. Учитывая индекс накопления цитогенетических нарушений, можно ранжировать исследуемые группы по цитогенетическому статусу в сторону ухудшения: дети детсада, старшие и младшие школьники.

Заключение. Предлагаемый в данном исследовании подход позволил количественно определить действие мутагенных и цитотоксических факторов на детское население, проживающее в районе расположения объектов ядерного наследия, и может быть рекомендован в качестве информативного метода оценки состояния здоровья населения при проведении социально-гигиенического мониторинга, в том числе на территориях расположения объектов ядерного наследия.

Ключевые слова: цитогенетический статус; ядерное наследие, буккальный микроядерный цитомный тест; частота клеток с микроядрами; донозологическая диагностика; здоровье детей

Для цитирования: Сычева Л.П., Киселев С.М., Шандала Н.К. Применение буккального микроядерного цитомного теста для оценки состояния здоровья детского населения, проживающего в районе расположения объектов ядерного наследия. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (4): 339–346. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-4-339-346>

Для корреспонденции: Сычева Людмила Петровна, доктор биол. наук, профессор, вед. науч. сотр. ФГБУ ГНЦ Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123098, Москва. E-mail: lpysheva@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Благодарность. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов: Сычева Л.П. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Киселев С.М. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; Шандала Н.К. — концепция и дизайн исследования; ответственность за целостность всех частей статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Поступила 11.11.2020 / Принята к печати 10.03.2021 / Опубликована 18.05.2021

Lyudmila P. Sycheva, Sergey M. Kiselev, Natalya K. Shandala

Buccal Micronucleus Cytome Assay for the assessment health status of population living in the area of nuclear heritage

State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 123098, Russian Federation

Introduction. An essential task of hygiene is assessing the health status of the population living in areas with adverse environmental and hygienic conditions.

Materials and methods. A study of the health status of 50 children of three age groups was carried out in Dunay city, Primorsky Krai, located near the enterprise "The Far Eastern Center for Radioactive Waste Management, Far East Center "DalRAO." Health status was assessed using the buccal micronucleus cytome assay (BMCA) to determine the cytogenetic and cytotoxic effects of environmental factors.

Results. The frequency of buccal cells with micronuclei in groups of children from the Dunay city varied within 0.33–0.47%, which does not exceed the control level of 1.1%, determined within the framework of the international project HUMNxl. The level of cytogenetic stress is defined as acceptable (but not low). Given the index of accumulation of cytogenetic damages, it is possible to rank the studied groups according to their cytogenetic status in the direction of deterioration: kindergarten children, older and younger schoolchildren.

Conclusion. The approach proposed in this study made it possible to quantitatively determine the mutagenic and cytotoxic effects of factors on the children's population of the Dunay city. It can be recommended as an informative method for the population health status assessment during socio-hygienic monitoring, including in the territories of nuclear (legacy) sites.

Keywords: cytogenetic status; nuclear legacy; buccal micronucleus cytome assay; micronuclei; preclinical diagnosis; children's health

For citation: Sycheva L.P., Kiselev S.M., Shandala N.K. Buccal Micronucleus Cytome Assay for the assessment health status of population living in the area of nuclear heritage. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2021; 100 (4): 339–346. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-4-339-346> (In Russ.)

For correspondence: Lyudmila P. Sycheva, Ph.D., DSci., Professor, Leading researcher of State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency (SRC-FMBC), Moscow 123098, Russian Federation. E-mail: lpsycheva@mail.ru

Information about authors:

Sycheva L.P., <https://orcid.org/0000-0002-7370-0169>; Kiselev S.M., <https://orcid.org/0000-0002-2613-2293>; Shandala N.K., <https://orcid.org/0000-0003-1290-3082>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contribution of the authors: Sycheva L.P. — concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing text, editing; Kiselev S.M. — concept and design of the study, writing text, editing, responsibility for the integrity of all parts of the article, approval of the final version of the article; Shandala N.K. — concept and design of the study. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article - all co-authors

Received: November 11, 2020 / Accepted: March 10, 2021 / Published: May 18, 2021

Введение

Оценка влияния факторов окружающей среды на здоровье населения — приоритетная задача гигиены. В основном здоровье оценивают по показателям заболеваемости, смертности, демографическим показателям, реже — по результатам оценки биохимического или иммунологического статуса. В настоящее время для этих целей интенсивно разрабатывается цитогенетический подход с использованием неинвазивного буккального микроядерного цитомного теста (БМЦТ).

Посёлок городского типа (пгт) Дунай Приморского края представляет особый интерес, поскольку он расположен вблизи радиационно опасных объектов, производственная деятельность которых связана с отработавшим ядерным топливом и радиоактивными отходами [1, 2]. В окрестностях населённого пункта в лесном массиве, используемом местным населением в рекреационных целях, существуют локально загрязнённые техногенным радионуклидом ^{60}Co участки территории, образовавшиеся в результате ядерной аварии в бухте Чажма в 1985 г. [3–5]. Радиационно-гигиеническая обстановка в пгт Дунай характеризуется фоновыми содержаниями техногенных радионуклидов в окружающей среде. Среднее значение мощности дозы гамма-излучения на территории посёлка составляет $0,11 \pm 0,05$ мкЗв/час, что не превышает фоновых значений по региону $0,14 \pm 0,06$ мкЗв/ч. Содержание техногенных радионуклидов ^{137}Cs (3 ± 1 мБк/л) и ^{90}Sr ($1,2 \pm 0,5$ мБк/л) в питьевой воде; ^{137}Cs ($1,6 \pm 0,8$ мБк/м³), ^{90}Sr ($3,9 \pm 0,9$ мБк/м³) в атмосферном воздухе на несколько порядков ниже нормируемых показателей [6]. Химическое загрязнение территории тяжёлыми металлами отражает особенность городской среды обитания и определяется в большинстве случаев выхлопными газами автотранспорта. В почве пгт Дунай выявлено превышение ПДК по свинцу (до 8 ПДК), а также локальные превышения региональных уровней содержания никеля, меди и марганца в 3–5 раз. Питьевая вода по содержанию тяжёлых металлов удовлетворяет требованиям гигиенических нормативов.

Общая характеристика отдельных факторов не вызывает особых опасений, однако их комбинированное, сочетанное и комплексное действие может оказывать негативное влияние на состояние здоровья населения, что и было отмечено в работах [7–9] при оценке показателей общей, первичной, хронической заболеваемости и репродуктивного здоровья, а также иммунного статуса. Предварительные данные указывают на повышенную частоту ВПР, а также более высокий уровень заболеваемости, инвалидности и смертности детей, проживающих в пгт Дунай, чем у детей группы сравнения. Эти данные послужили основанием для углублённого изучения состояния здоровья детей пгт Дунай с использованием современной клеточной технологии — БМЦТ [10]. Это единственный цитогенетический метод, который позволяет изучать цитогенетический статус детей неинвазивно. Для определения негативного действия комплекса факторов среды обитания обследование детей имеет значительные преимущества, поскольку они более уязвимы в связи с физиологическими особенностями организма в период формирования защитных систем. Дети не подвержены воздействию вредных привычек (курению, действию алкоголя) и в большей степени «привязаны» к месту проживания. Кроме

того, результаты таких «фоновых» исследований могут быть полезны в дальнейшем для мониторинга среды обитания и оценки, например, климатических или иных изменений на этой территории.

Микроядерный тест для обследования населения используется уже более 40 лет. Постепенно при проведении исследований отечественных и зарубежных учёных накапливались новые знания, метод усовершенствовали, расширился набор исследуемых показателей, появилась их классификация и сформировался БМЦТ [10–14]. В настоящее время ряд международных организаций, таких как Международное агентство по атомной энергии (МАГАТЭ), Международная сеть биодозиметрии («Running the European Network of Biological and retrospective Physical dosimetry», RENEB), Организация европейского сотрудничества и развития (OECD), Международная организация стандартизации (ISO) [10], рекомендуют микроядерный тест на лимфоцитах в качестве одного из основных методов исследований в генотоксикологии, биологической дозиметрии и биомониторинге. В публикациях Международных проектов по микроядрам у человека (HUMN и HUMNxl), объединяющих более 130 международных организаций, наряду с микроядерным тестом на лимфоцитах представлена широкая апробация БМЦТ. Установлена высокая корреляция результатов, полученных в этих тестах ($R = 0,74$) [13]. Возможность использования и алгоритм проведения цитогенетического мониторинга с использованием этого теста обоснованы и апробированы в ряде исследований [11, 12].

Цель работы — исследование состояния здоровья детского населения, проживающего в районе расположения объектов ядерного наследия, путём определения ранних предикторов неблагоприятных изменений на клеточном уровне, а именно — показателей цитогенетического статуса детей трёх возрастных групп (дети детсада, младшие и старшие школьники) с использованием БМЦТ.

Материалы и методы

В 2019 г. проведено исследование состояния здоровья детей пгт Дунай в соответствии с разработанным алгоритмом цитогенетического мониторинга [11, 15, 16]. Характеристика обследуемых групп детей приведена в табл. 1. Для каждого

Таблица 1 / Table 1

Характеристика обследуемых групп детей

Characteristics of the groups of surveyed children

Показатель Indices	1-я группа, детсад Group 1, kindergarten	2-я группа, 1–2-й классы Group 2, school grades 1–2	3-я группа, 6–7-й классы Group 3, school grades 6–7
Всего детей Total children	16	19	15
мальчики boys	6	6	6
девочки girls	10	13	9
Возраст, годы Age, years	5–6	6–9	11–14

Таблица 2 / Table 2

Цитогенетические и цитотоксические показатели буккального эпителия у детей пгт. Дунай, $x_{cp} \pm m$ (95% ДИ)**Cytogenetic and cytotoxic indices of buccal epithelium in children of the Dunay city, $x \pm m$ (95% CI)**

Показатели (ОНВ) Indices (indicative guideline values)	Частота клеток с исследуемыми показателями, % Frequency of cells, %		
	1-я группа, детсад Group 1, kindergarten	2-я группа, 1–2-й классы Group 2, school grades 1–2	3-я группа, 6–7-й классы Group 3, school grades 6–7
Цитогенетические показатели: Cytogenetic indices:			
частота клеток с микроядрами (0–2) frequency of cells with micronuclei (0–2)	0.33 ± 0.13 (0.06 ÷ 0.60)	0.47 ± 0.12 (0.23 ÷ 0.72)	0.40 ± 0.16 (0.05 ÷ 0.75)
частота клеток с протрузиями (0–4) frequency of cells with nuclear buds (0–4)	0.67 ± 0.27 (0.09 ÷ 1.25)	1.3 ± 0.4 (0.4 ÷ 2.1)	1.1 ± 0.7 (–0.3 ÷ 2.5)
интегральный показатель цитогенетических нарушений (<i>Icyt</i> ; 0–5) integral index of cytogenetic damages (<i>Icyt</i> ; 0–5)	1.0 ± 0.28 (0.41 ÷ 1.6)	1.7 ± 0.4 (0.8 ÷ 2.6)	1.5 ± 0.6 (0.1 ÷ 2.8)
частота клеток с ядром атипичной формы (0–5) frequency of cells with atypical nucleus (0–5)	0.67 ± 0.25 (0.13 ÷ 1.21)	1.5 ± 0.4 (0.6 ÷ 2.4)	1.6 ± 0.36 ^{*1–3} (0.82 ÷ 2.4)
Показатели пролиферации: Proliferation indices:			
частота клеток с двумя ядрами (0–5) frequency of binucleated cells (0–5)	4.1 ± 0.8 (2.3 ÷ 5.8)	2.3 ± 0.5 (1.4 ÷ 3.3)	2.3 ± 0.5 (1.3 ÷ 3.4)
частота клеток со сдвоенными ядрами (0–6) the frequency of cells with double nuclei (0–6)	2.9 ± 0.7 (1.4 ÷ 4.5)	2.0 ± 0.4 (1.0 ÷ 2.9)	3.1 ± 0.4 (2.1 ÷ 4.0)
интегральный показатель нарушения пролиферации (<i>Ipr</i> ; 0–8) integral index of impaired proliferation (<i>Ipr</i> ; 0–8)	7.0 ± 1.4 (3.9 ÷ 10.1)	4.3 ± 0.6 (3.1 ÷ 5.5)	5.2 ± 0.6 (3.8 ÷ 6.6)
Показатели ранней деструкции ядра: Indices of early destruction of nucleus:			
частота клеток с перинуклеарной вакуолью (0–50) frequency of cells with perinuclear vacuole (0–50)	10.4 ± 2.7 (4.7 ÷ 16.1)	5.7 ± 1.4 (2.9 ÷ 8.6)	4.4 ± 0.9 (2.5 ÷ 6.3)
частота клеток с повреждением ядерной мембраны (0–30) frequency of cells with damaged nuclear membrane (0–30)	1.4 ± 0.4 (0.5 ÷ 2.3)	2.3 ± 0.8 (0.6 ÷ 4.0)	1.3 ± 0.5 (0.3 ÷ 2.4)
частота клеток с конденсацией хроматина (2–400) frequency of cells with chromatin condensation (2–400)	258 ± 18 (219 ÷ 297)	188 ± 16 ^{***1–2} (155 ÷ 221)	242 ± 17 ^{*2–3} (206 ÷ 278)
частота клеток с началом кариолизиса (2–400) frequency of cells with initial karyolysis (2–400)	130 ± 24 (78 ÷ 182)	108 ± 18 (71 ÷ 145)	142 ± 23 (93 ÷ 192)
частота клеток с апоптотическими телами (0–10) frequency of cells with apoptotic bodies (0–10)	0.40 ± 0.16 (0.05 ÷ 0.75)	0.47 ± 0.23 (–0.02 ÷ 0.97)	0.67 ± 0.29 (0.05 ÷ 1.28)
Показатели поздней деструкции ядра: Indices of late destruction of nucleus:			
частота клеток с пикнозом (0–60) frequency of cells with pyknosis (0–60)	38.5 ± 3.6 (30.9 ÷ 46.2)	16.1 ± 1.8 ^{***1–2, 2–3} (12.3 ÷ 19.9)	38 ± 4 (29 ÷ 47)
частота клеток с кариорексисом (0–40) frequency of cells with karyorrhexis (0–40)	14 ± 6 (2 ÷ 26)	12.5 ± 3.0 (6.2 ÷ 18.9)	10.3 ± 2.7 (4.4 ÷ 16.1)
частота клеток с полным кариолизисом (0–60) frequency of cells with complete karyolysis (0–60)	29 ± 10 (7 ÷ 50)	63 ± 16 (30 ÷ 95)	31 ± 7 (15 ÷ 46)
апоптотический индекс (<i>Iapop</i> ; 0–600) apoptotic index (<i>Iapop</i> ; 0–600)	468 ± 37 (389 ÷ 548)	387 ± 27 ^{*1–2, 2–3} (330 ÷ 444)	463 ± 31 (397 ÷ 528)
Комплексные показатели цитогенетического статуса: Complex indicators of cytogenetic status:			
уровень цитогенетического стресса в баллах level of cytogenetic stress in points	1.26 ± 0.12 (1.01 ÷ 1.50)	1.32 ± 0.15 (0.99 ÷ 1.64)	1.33 ± 0.16 (0.99 ÷ 1.68)
индекс накопления цитогенетических нарушений (<i>Iac</i>), усл. ед. index of accumulation of cytogenetic disorders (<i>Iac</i>), conv. Units	1.49	1.90	1.65

Примечание. Различия статистически значимы при сравнении групп между собой по критерию Манна–Уитни: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (рядом со звездочкой указаны группы сравнения).

Note. The differences are statistically significant when comparing the groups according to the Mann – Whitney test: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ (comparison groups are indicated next to the asterisk).

Таблица 3 / Table 3

Показатели цитогенетического статуса детей разных регионов

Indices of the cytogenetic status of children from different regions

Группа Group	Частота клеток с микроядрами, ‰ Frequency of cells with micronuclei, ‰	Частота клеток с протрузиями ядра, ‰ Frequency of cells with nuclear buds, ‰	Индекс цитогенетических нарушений, ‰ Integral index of cytogenetic damages, ‰	Индекс нарушения пролиферации, ‰ Integral index of impaired proliferation, ‰	Апоптотический индекс, ‰ Apoptotic index, ‰	Индекс накопления цитогенетических нарушений, усл. ед. Index of accumulation of cytogenetic damages, conv. units
<i>пгт Дунай</i> <i>Dunay settlement</i>						
детсад, <i>n</i> = 15 kindergarten, <i>n</i> = 15	0.33	0.67	1.00	7.00	468.5	1.49
1–2-й классы, <i>n</i> = 19 school grades 1–2, <i>n</i> = 19	0.47	1.26	1.73	4.26	387.3	1.90
6–7-й классы, <i>n</i> = 15 school grades 6–7, <i>n</i> = 15	0.40	1.07	1.47	5.20	462.7	1.65
<i>г. Коряжма [23]</i> <i>Koryazhma city [23]</i>						
10-й класс, 1-я школа, <i>n</i> = 25 10 grade, 1 School, <i>n</i> = 25	0.36	2.12	2.48	7.88	565.4	3.46
10-й класс, 6-я школа, <i>n</i> = 25 10 grade, 6 School, <i>n</i> = 25	0.16	1.04	1.20	6.20	501.5	1.48
<i>г. Великий Новгород [12]</i> <i>Veliky Novgorod city [12]</i>						
детсад 1, <i>n</i> = 15 kindergarten 1, <i>n</i> = 15	0.53	1.93	2.46	3.26	344.2	2.95
детсад 2, <i>n</i> = 25 kindergarten 2, <i>n</i> = 25	0.32	0.96	1.28	3.48	363.4	1.75
<i>Бинь Зьонг (Вьетнам) [24]</i> <i>Binh Duong (Vietnam) [24]</i>						
дети 5–9 лет, <i>n</i> = 31 children 5–9 years old, <i>n</i> = 31	0.18	0.53	0.71	1.92	не определяли did not determine	не определяли did not determine

ребёнка получено информированное согласие родителей на проведение данного неинвазивного обследования и заполнена соответствующая анкета. В исследование не включали детей, подвергавшихся в течение месяца действию факторов, которые влияют на цитогенетический статус (рентген, ОРВИ, прививки и т. п.).

Микроскопические препараты клеток слизистой оболочки щеки готовили в соответствии с [12, 16]: стерильным деревянным шпателем делали соскоб с двух сторон с внутренней стороны щеки, наносили на предметные стёкла, высушивали. Препараты фиксировали этанолом-уксусной кислотой (3:1), окрашивали ацетоорсеином (2 ч) и светлым зелёным (30 с). Микроскопический анализ проводили на зашифрованных препаратах, считали по 1000 клеток от каждого индивидуума при увеличении $\times 1000$, оценивали показатели цитогенетического и цитотоксического действия. Биологическое значение, классификация и критерии определения этих показателей описаны ранее [14]. Каждую из 1000 анализируемых клеток относили к следующим категориям: клетки в норме; клетки с цитогенетическими нарушениями (микроядрами, протрузиями, ядрами атипичной формы); клетки с двумя ядрами (изолированными; двояными), которые являются показателями нарушения пролиферации; клетки на ранней стадии деструкции ядра (с перинуклеарной вакуолью; с повреждением ядерной мембраны; конденсацией хроматина; ранним кариолизисом) и на поздней стадии деструкции ядра (с кариорексисом, пикнозом; полным кариолизисом), которые являются показателями физиологической гибели клеток. Также определяли интегральный показатель цитогенетических нарушений (*Icyt*) — сумму клеток с микроядрами и протрузиями, интегральный показатель пролиферации — сумму клеток с двумя ядрами и

сдвоенными ядрами (*Ipr*) и апоптотический индекс, включающий клетки на ранней и поздней стадии деструкции ядра (*Iapop*), за исключением клеток с перинуклеарной вакуолью и повреждением ядерной мембраны.

Комплексную оценку цитогенетического статуса проводили по двум показателям: уровню цитогенетического стресса и индексу накопления цитогенетических повреждений. Уровень цитогенетического стресса определяли для каждого индивида в баллах в зависимости от превышения ориентировочных нормативных величин (ОНВ) [16]. Если у ребёнка нет превышения ОНВ — его показатель равен 1 (низкий уровень), при превышении какого-либо или нескольких показателей пролиферации или деструкции ядра клеток этот показатель равен 2 (допустимый уровень), если же выявлено превышение по цитогенетическим показателям (наиболее опасное) — показатель равен 3 (высокий уровень). В соответствии со среднegrupповыми значениями можно выделить следующие уровни цитогенетического стресса: 1 — низкий уровень (у всех детей в группе нет превышения ОНВ); ≤ 2 — допустимый уровень (у части детей в группе есть превышение ОНВ); > 2 — высокий (у большинства детей в группе есть превышение ОНВ, преимущественно по цитогенетическим показателям).

Индекс накопления цитогенетических повреждений, предложенный ранее (Index of accumulation of cytogenetic damages, *Iac*), рассчитывали по формуле $Iac = (Icyt \cdot Ipr / Iapop) \cdot 100$, где в числителе — интегральный показатель цитогенетических нарушений (*Icyt*) и интегральный показатель пролиферации (*Ipr*), а в знаменателе — апоптотический индекс (*Iapop*). Этот показатель позволяет охарактеризовать цитогенетический статус человека и в отличие от показателя «частота клеток с микроядрами» учитывает соотношение между частотой цитогенетических

нарушений и «интенсивностью» клеточной кинетики. На основании оценки индекса накопления цитогенетических повреждений определяют три группы риска — низкий ($Iac \leq 2$), умеренный ($2 < Iac < 4$) и высокий ($Iac \geq 4$) [11, 12].

Статистический анализ данных проводили с помощью программ Excel и Statistica 10.0 for Windows. Сравнение данных по группам проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты анализа представлены в табл. 2, 3 и рис. 1, 2.

Цитогенетические показатели. У каждого из обследуемых детей в трёх группах количество клеток с микроядрами на 1000 анализированных клеток не превышало 1, с протрузиями — 5, частота клеток с цитогенетическими нарушениями суммарно также не превышала 5 во всех группах, кроме двух исключений. У одной девочки 6 лет выявлено 14%, и у мальчика 12 лет — 10% таких клеток. Средние значения частот клеток с микроядрами составили 0,33; 0,47 и 0,4% в 1-й, 2-й и 3-й группах соответственно; с протрузиями — 0,67; 1,3 и 1,1%; интегральный показатель цитогенетических нарушений 1; 1,7 и 1,5%. Отличия между группами недостоверны. Доля детей детского сада, у которых не выявлены микроядра, составила 67%, младших классов — 53%; старших классов — 67%.

Интегральные показатели пролиферации варьировали в пределах 4,3–7%. Частота клеток с нарушением пролиферации у детей детского сада оказалась больше, чем у школьников, но отличия статистически недостоверны.

Показатели деструкции ядра. Среди девяти показателей деструкции ядра определено статистически значимое снижение средних значений показателей конденсации хроматина, пикноза и апоптотического индекса у детей младшей школьной группы по сравнению с двумя другими группами. Апоптотический индекс, суммирующий все стадии гибели ядра, составил 46,8; 46,3% у детей детского сада и старших школьников и 38,7% у младших школьников. Эти значения не выходят за пределы ОНВ [16].

Комплексные показатели. Средние значения уровня цитогенетического стресса оказались приблизительно одинаковыми в обследуемых группах и соответствовали 1,26; 1,32 и 1,33, то есть дети входят в группу допустимого риска.

Индекс накопления цитогенетических нарушений не превышал 2, то есть соответствовал низкому уровню. Ранжирование групп по этому показателю показывает, что в среднем цитогенетический статус лучше у детей детского сада, затем у старшекласников и хуже — у детей младших классов.

В то же время анализ доли детей с низким, умеренным и высоким индексом накопления цитогенетических нарушений указывает на определённое неблагополучие при оценке здоровья детей в данном регионе. Результаты анализа представлены на рис. 2. Доля детей с низким уровнем риска значительно меньше 100%: в детском саду она составила 62,5%, в младших классах — 57,9% и в старших классах — 53,3%.

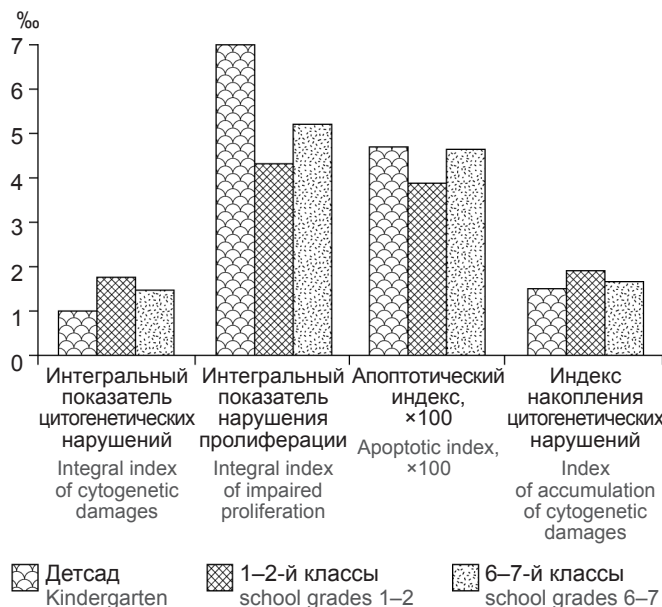


Рис. 1. Показатели цитогенетического статуса детей пгт Дунай трёх возрастных групп.

Fig. 1. Indicators of the cytogenetic status of children of the Dunay city of three age groups.

Умеренный уровень риска накопления цитогенетических нарушений определен у 4 детей в каждой группе (25; 21,1 и 26,7% детей). В группу с высоким уровнем риска выделены 2 ребёнка в детском саду, 4 детей в младших классах и 3 детей в старших классах (12,5; 21,05 и 20%). Отличия групп по доле детей в соответствии с индексом накопления цитогенетических нарушений незначительны.

Обсуждение

Данное исследование проведено в рамках донозологической диагностики с использованием БМЦТ, который для этого имеет определённые преимущества. Он характеризует морфологические изменения клеток и главное — патологию генетического аппарата. Цитогенетические нарушения по сравнению с молекулярными изменениями — это всегда «вредные» и опасные, не компенсированные изменения. Применённый подход позволяет количественно учесть возможные нарушения, оценить в динамике их накопление или, напротив, элиминацию.

При формировании групп обследования во внимание были приняты следующие обстоятельства. Пгт Дунай — это небольшой населённый пункт, в котором проживает около

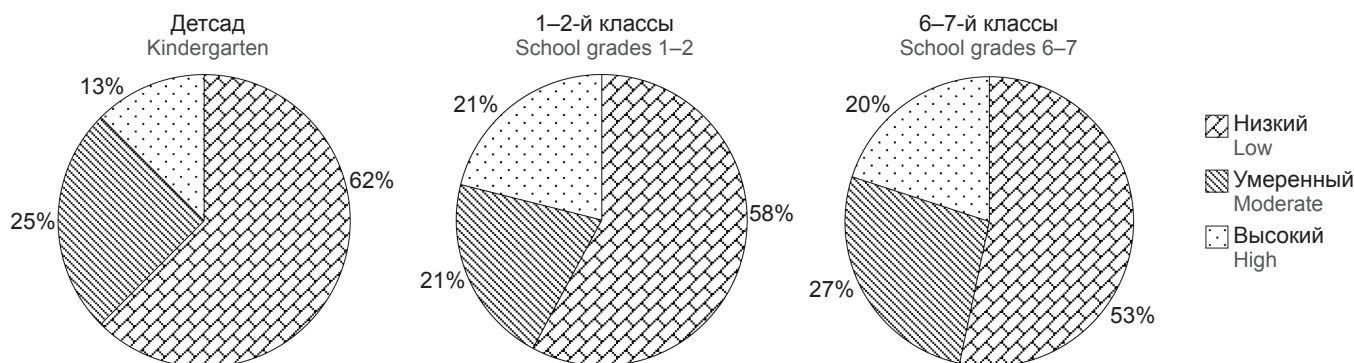


Рис. 2. Доля детей с различным индексом накопления цитогенетических нарушений в трёх обследованных группах детей.

Fig. 2. The proportion of children with different accumulation index of cytogenetic disorders in the three examined groups of children.

7 тыс. человек с приблизительно одинаковыми социальными условиями, условиями питания, водопотребления и проживания. В связи с этим выделить среди детей группы воздействия и сравнения (контроль) не представлялось возможным. В настоящем исследовании проведена оценка цитогенетического статуса детей трёх возрастных групп.

Основным в данной работе является вопрос о мутагенном действии факторов среды обитания. По нашим данным, показатели мутагенного действия (доля клеток с микроядрами и протрузиями) находятся в пределах нормы. Средняя частота клеток с микроядрами не превышает 0,47%, протрузий — 1,26%, индекс накопления цитогенетических повреждений — 1,9, что указывает на низкий уровень риска мутагенного действия (в пределах 2). В то же время нужно учесть, что если анализировать не средние показатели, а долю детей с разным уровнем риска накопления цитогенетических нарушений, то в группу с низким уровнем риска попадает около 60% детей. Другой интегральный показатель — уровень цитогенетического стресса — варьирует в пределах 1,26–1,33, что свидетельствует о среднегрупповых превышениях ОНВ по отдельным цитотоксическим показателям. Таким образом, комплексная оценка цитогенетического статуса детей указывает на отсутствие мутагенного действия факторов данной территории на организм детей. Эти результаты согласуются с данными о состоянии радиационно-гигиенической обстановки и с расчётами суммарного канцерогенного риска ($2 \cdot 10^{-5}$), обусловленного воздействием химического и радиационного факторов для населения исследуемой территории, который соответствует уровню «низкий» по классификации Всемирной организации здравоохранения [17].

Однако анализ всего комплекса показателей свидетельствует, что ситуация не столь благополучна и характеризуется цитотоксическим действием факторов, природа которых требует дальнейшего исследования. Сдвиги в сторону ухудшения цитогенетического статуса коррелируют с выявленными нами ранее негативными тенденциями детской заболеваемости на этой территории. Эти исследования показывают, что у детей пгт Дунай во все возрастные периоды отмечена заболеваемость, связанная с системами, отвечающими за адаптационные возможности детского организма — эндокринной и иммунной. Наряду с этим отмечена более высокая частота врождённых пороков развития [7–9].

Сравнение трёх групп детей между собой показывает, что частота клеток с цитогенетическими нарушениями выше у школьников по сравнению с детьми детского сада, однако отличия достоверны только для показателя «частота клеток с ядром атипичной формы». В целом, учитывая индекс накопления цитогенетических нарушений, показатели лучше у детей детского сада, хуже у старших и младших школьников. В последней из групп отмечена более высокая частота клеток с цитогенетическими нарушениями и более низкая — клеток в апоптозе. Это может быть связано с повышенным психологическим напряжением детей в первых классах школы, которое отражается на физическом состоянии организма детей, в том числе состоянии его клеток.

В настоящее время цитогенетический мониторинг с использованием БМЦТ активно развивается. Однако в основном исследователи анализируют один из наиболее важных биомаркеров цитогенетического стресса — частоту клеток с микроядрами. Средняя частота клеток с микроядрами, определённая в г. Москве (192 ребёнка), составила 0,42% [18]; в г. Санкт-Петербурге (170 детей) — 0,38–0,66% [19]; в Свердловской области (314 детей) — 0,2–1,2% [20]; в г. Калькутте (Индия) (269 детей) — 1,7–2,2% [21]; в г. Апулее (Италия) (462 ребёнка) — 0,66% [22]. По данным международного проекта HUMNxl [13], средняя частота буккальных эпителиоцитов с микроядрами в контроле, определённая при анализе 15 000 человек, составляет 1,1%. Интегральные и комплексные показатели мы можем привести только по нашим работам (см. табл. 3). Анализ данных показывает, что дети пгт Дунай занимают промежуточное положение по показателям цитогенетического статуса.

Для детей с высокими значениями интегральных показателей цитогенетического стресса желательно определить причины этих изменений. Напряжение клеточных систем может быть связано с пассивным курением, вакцинацией, приёмом лекарственных препаратов, перенесённым заболеванием, некачественным питанием, недостатком витаминов и минералов, рентгеновскими процедурами, избыточным ультрафиолетом и т. п. [18]. Дети из групп допустимого и повышенного цитогенетического риска нуждаются в устранении возможных причин и общеукрепляющих процедурах. Таким образом, метод оценки цитогенетического статуса детей по большому спектру показателей является одним из подходов донозологической диагностики и позволяет оценить состояние здоровья ребёнка на клеточном уровне, формализовано в количественных показателях.

Использованный подход имеет большое значение при характеристике среды обитания в плане воздействия на биологические объекты. В данном случае оценка проводится не на растениях или животных, а непосредственно при обследовании людей. Тест позволяет оценить комплексную, интегральную нагрузку на организм факторов разной природы (физических, химических и биологических) и учесть адаптационные свойства организма, понять, справляется ли организм с нагрузкой. Полный спектр состояния ядра клеток позволяет разделить цитогенетическое (мутагенное, наиболее опасное) и цитотоксическое действие факторов среды обитания. Важным аспектом предложенного подхода является использование двух комплексных оценочных критериев. Один из них — полуколичественный — определение уровня цитогенетического стресса в баллах, в зависимости от того, есть ли превышение ОНВ по цитогенетическим и/или цитотоксическим показателям. Второй — количественный, рассчитывается по формуле и характеризует накопление цитогенетических нарушений с учётом показателей пролиферации и апоптоза. Он рассчитывается как индивидуально, так и в среднем, по группам.

Цитогенетический статус организма не является постоянным и может изменяться со временем, так как клетки слизистой оболочки щеки постоянно заменяются новыми. Учитывая постоянное обновление эпителиальных клеток, этот показатель характеризует ситуацию в данный момент времени. Такие исследования желательно проводить в режиме мониторинга, с установлением периодичности в зависимости от внешних факторов и условий среды обитания. Поскольку собранный материал может храниться и использоваться для сравнительных оценок в течение длительного времени без потери информативности, существует возможность создания персонализированных информационных банков данных цитогенетического мониторинга.

Предлагаемый в данном исследовании подход может быть рекомендован в качестве дополнительного информативного метода оценки динамики изменения адаптивного потенциала организма человека при проведении социально-гигиенического мониторинга.

Заключение

1. Частота клеток с микроядрами у детей детского сада, 1–2-го и 6–7-го классов составляет 0,33; 0,47 и 0,4% соответственно, что не превышает уровня контроля 1,1%, определённого в рамках международного проекта HUMNxl [13].

2. Уровень цитогенетического стресса в соответствии с [16] определён как допустимый (в пределах 1,26–1,33), что указывает на наличие цитотоксического действия факторов среды обитания, природа которых требует дальнейшего исследования.

3. В целом данное исследование следует рассматривать как пилотное, соответствующее по классификации эпидемиологических исследований обсервационному одномоментному исследованию. Оно даёт первичные ориентиры в оценке цитогенетического статуса детей, проживающих на данной территории.

Литература (п.п. 10, 13, 21–22 см. References)

1. Шандала Н.К., Киселев С.М., Титов А.В., Коренков И.П. Радиационно-гигиенический мониторинг на объектах ядерного и уранового наследия. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(9): 813–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-9-813-818>
2. Шандала Н.К., Киселев С.М., Титов А.В. Научно-практический опыт надзорной деятельности в области обеспечения защиты населения и окружающей среды на объектах ядерного наследия России. *Радиационная гигиена*. 2019; 12(S2): 83–96. <https://doi.org/10.21514/1998-426X-2019-10-2s-83-96>
3. Киселев С.М., Старинский В.Г., Исаев Д.В., Бельских Ю.С., Шлыгин В.В., Титов А.В. и соавт. Оценка состояния природной среды на территориях, подвергшихся загрязнению в результате аварии в б. Чажма (Приморский край). 30 лет спустя. В кн.: *Седьмая международная конференция по радиации в различных областях исследования*. Херцег Нови; 2016.
4. Саркисов А.А., ред. *Радиологические последствия эксплуатации и утилизации объектов атомного флота в Дальневосточном регионе*. М.; 2010.
5. Сивинцев Ю.В., Вакуловский С.М., Васильев А.П. *Техногенные радионуклиды в морях, окружающих Россию: радиологические последствия захоронений радиоактивных отходов в арктическом и дальневосточном морях*. Белая книга. М.; 2005.
6. Ахромеев С.В., Киселев С.М., Титов А.В., Серегин В.А., Шлыгин В.В., Старинская Р.А. Исследование радиационной обстановки на объектах ядерного наследия в Дальневосточном регионе России. *АНРИ*. 2016; (1): 65–71.
7. Лягинская А.М., Шандала Н.К., Киселев С.М., Ермалицкий А.П., Петоян И.М., Ахромеев С.В. и соавт. Состояние здоровья детского населения, проживающего вблизи предприятия «Дальневосточный центр по обращению с радиоактивными отходами». *Гигиена и санитария*. 2019; 98(4): 428–36. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-4-428-436>
8. Лягинская А.М., Шандала Н.К., Киселев С.М., Ермалицкий А.П., Петоян И.М., Купцов В.В. и соавт. Состояние здоровья персонала предприятия по обращению с радиоактивными отходами утилизируемого атомного флота СССР. *Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра)*. 2019; 28(4): 73–87. <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2019-28-4-73-87>
9. Царев С.В., Ильина Н.И., Лусс Л.В., Швеи С.М., Присяжнюк В.Л., Никонова М.Ф. и соавт. Распространенность, структура и особенности аллерго- и иммунопатологии персонала предприятия по обращению с радиоактивными отходами. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2017; 62(3): 17–25.
11. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека. *Гигиена и санитария*. 2012; 91(6): 68–72.
12. Сычева Л.П., Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Ахальцева Л.В., Росоловский А.П. Цитогенетический статус детей при гигиенической оценке загрязнения атмосферного воздуха веществами, обладающими запахом. *Гигиена и санитария*. 2016; 95(8): 765–8. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2016-95-8-765-768>
14. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. *Медицинская генетика*. 2007; 6(11): 3–11.
15. Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Журков В.С., Шамарин А.А., Коваленко М.А., Гасимова З.М. и соавт. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека. Методические рекомендации. М.; 2005.
16. Оценка состояния здоровья персонала предприятий, осуществляющих деятельность по обращению с отработавшим ядерным топливом и радиоактивными отходами. Методические рекомендации; МР ФМБА России 12.031; 2020.
17. Зозуль Ю.Н., Киселев С.М., Лашенова Т.Н. Комплексная оценка риска для населения в районе расположения ЯРОО. В кн.: Удалова А.А., ред. *Техногенные системы и экологический риск. Тезисы докладов III Международной (XVI Региональной) научной конференции*. Обнинск; 2020.
18. Юрченко В.В., Подольная М.А., Ингель Ф.И., Кривцова Е.К., Беляева Н.Н., Недачин А.Е. и соавт. Микроядерный тест на буккальные эпителиоциты. В кн.: Рахманин Ю.А., Сычева Л.П., ред. *Полиорганый микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях*. М.: Гениус; 2007: 220–67.
19. Маймулов В.Г., Китаева Л.В., Верещагина Т.В. Цитогенетические нарушения в соматических клетках у детей, проживающих в районах с различной интенсивностью загрязнения окружающей среды. *Цитология*. 1998; 40(7): 686–9.
20. Сайченко С.П., Никонов Б.И., Плотко Э.Г., Гурвич В.Б., Баевский А.М., Борзунова Е.А. и соавт. О канцерогенной и мутагенной опасности продуктов хлорирования питьевой воды для населения Свердловской области. *Гигиена и санитария*. 1997; 76(6): 62–4.
23. Сычева Л.П., Иванов С.И., Коваленко М.А., Журков В.С., Беляева Н.Н., Анциферов Б.Н. Цитогенетический статус детей, проживающих вблизи целлюлозно-бумажного комбината. *Гигиена и санитария*. 2010; 89(1): 7–10.
24. Сычева Л.П., Можаяева Т.Е., Умнова Н.В., Жученко Н.А., Диен В.Х., Тует Х.А. Оценка цитогенетических и других кариологических показателей в эксфолиативных буккальных клетках вьетнамских детей из района применения диоксинсодержащих гербицидов. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2008; (1): 19–23.

References

1. Shandala N.K., Kiselev S.M., Titov A.V., Korenkov I.P. Radiation hygienic monitoring at legacy nuclear and uranium sites. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2017; 96(9): 813–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-9-813-818> (in Russian)
2. Shandala N.K., Kiselev S.M., Titov A.V. Scientific and practical experience of supervisory activities in the field of ensuring the protection of the population and the environment at nuclear heritage sites in Russia. *Radiatsionnaya gigiena*. 2019; 12(S2): 83–96. <https://doi.org/10.21514/1998-426X-2019-10-2s-83-96> (in Russian)
3. Kiselev S.M., Starinskiy V.G., Isaev D.V., Bel'skikh Yu.S., Shlygin V.V., Titov A.V., et al. Assessment of the state of the natural environment in the territories contaminated as a result of the accident in Bolshaya Chazhma (Primorsky Region). 30 years later. In: *Seventh International Conference on Radiation in Various Fields of Research [Sed'maya mezhdunarodnaya konferentsiya po radiatsii v razlichnykh oblastyakh issledovaniya]*. Khertseg Novi; 2016. (in Russian)
4. Sarkisov A.A., ed. *Radiological Consequences of Operation and Disposal of Nuclear Fleet Facilities in the Far East Region [Radiologicheskie posledstviya ekspluatatsii i utilizatsii ob'ektov atomnogo flota v Dal'nevostochnom regione]*. Moscow; 2010. (in Russian)
5. Sivintsev Yu.V., Vakulovskiy S.M., Vasil'ev A.P. *Technogenic Radionuclides in the Seas Surrounding Russia: Radioecological Consequences of Radioactive Waste Disposal in the Arctic and Far Eastern Seas. White Book [Tekhnogennye radionuklidy v moryakh, okruzhayushchikh Rossiyu: radioekologicheskie posledstviya zakhoroneniya radioaktivnykh otkhodov v arkticheskom i dal'nevostochnom moryakh. Belaya kniga]*. M.; 2005. (in Russian)
6. Akhromeev S.V., Kiselev S.M., Titov A.V., Seregin V.A., Shlygin V.V., Starinskaya R.A. Examination of radiation situation at the nuclear legacy sites in the Russian Far East. *ANRI*. 2016(1): 65–71. (in Russian)
7. Lyaginskaya A.M., Shandala N.K., Kiselev S.M., Ermalitskiy A.P., Petoyan I.M., Akhromeev S.V., et al. Health status of child population living in the vicinity of the far-eastern center for radioactive waste management (FEC Dal'RAO). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(4): 428–36. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-4-428-436> (in Russian)
8. Lyaginskaya A.M., Shandala N.K., Kiselev S.M., Ermalitskiy A.P., Petoyan I.M., Kuptsov V.V., et al. Physical condition of employees of the enterprise for radioactive waste management of the decommissioned USSR atomic fleet. *Radiatsiya i risk (Byulleten' Natsional'nogo radiatsionno-epidemiologicheskogo registra)*. 2019; 28(4): 73–87. <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2019-28-4-73-87> (in Russian)
9. Tsarev S.V., Il'ina N.I., Luss L.V., Shvets S.M., Prisyazhnyuk V.L., Nikonova M.F., et al. Prevalence, structure and features of allergy and immunopathology of the personnel of radioactive waste storage facility utilizing radioactive waste. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost'*. 2017; 62(3): 17–25. (in Russian)
10. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus assay: the state of art, and future directions. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(4): 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
11. Sycheva L.P. Cytogenetic monitoring for assessment of safety of environmental health. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2012; 91(6): 68–72. (in Russian)
12. Sycheva L.P., Budarina O.V., Sabirova Z.F., Akhal'tseva L.V., Rossolovskiy A.P. Cytogenetic status of children in the hygienic assessment of the air pollution by odorous substances. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2016; 95(8): 765–8. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2016-95-8-765-768> (in Russian)
13. Fenech M., Holland N., Zeiger E., Chang W.P., Burgaz S., Thomas P., et al. The HUMN and HUMNXL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis*. 2011; 26(1): 239–45. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq051>
14. Sycheva L.P. Biological value, scoring criteria and limits of a variation of a full spectrum karyological indexes of exfoliated cells for estimation of human cytogenetic status. *Meditinskaya genetika*. 2007; 6(11): 3–11. (in Russian)
15. Belyaeva N.N., Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Shamarin A.A., Kovalenko M.A., Gassimova Z.M., et al. Evaluation of cytological and cytogenetic status of the human buccal and nasal mucosa. Guidelines. Moscow; 2005. (in Russian)
16. Assessment of the state of health of the staff of enterprises engaging in the management of spent nuclear fuel and radioactive waste. Guidelines; 2020. (in Russian)
17. Zozul' Yu.N., Kiselev S.M., Lashchenova T.N. Comprehensive risk assessment for the population in the area of NNRO location. In: Udalova A.A., ed. *Technogenic Systems and Environmental Risk. Abstracts of the III International (XVI Regional) Scientific Conference [Tekhnogennye sistemy i ekologicheskiy*

- risk. *Tezisy dokladov III Mezhdunarodnoy (XVI Regional'noy) nauchnoy konferentsii*. Obninsk; 2020. (in Russian)
18. Yurchenko V.V., Podol'naya M.A., Ingel' F.I., Krivtsova E.K., Belyaeva N.N., Nedachin A.E., et al. Micronucleus assay on buccal epithelial cells. In: Rakhmanin Yu.A., Sycheva L.P., eds. *Multiorgan Micronucleus Assay in Ecological and Hygienic Research [Poliorgannyy mikroyadernyy test v ekologo-gigienicheskikh issledovaniyakh]*. Moscow: Genius; 2007: 220–67. (in Russian)
19. Maymulov V.G., Kitaeva L.V., Vereshchagina T.V. Cytogenetic damages in somatic cells in children living in areas with different intensities of environmental pollution. *Tsitologiya*. 1998; 40(7): 686–9. (in Russian)
20. Saychenko S.P., Nikonov B.I., Plotko E.G., Gurvich V.B., Baevskiy A.M., Borzunova E.A., et al. On the carcinogenic and mutagenic danger of chlorination products of drinking water for the population of the Sverdlovsk region. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 1997; (6): 62–4. (in Russian)
21. Lahiri T., Roy S., Basu C., Ganguly S., Ray M.R., Lahiri P. Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian J. Med. Res.* 2000; 112: 21–6.
22. Panico A., Grassi T., Bagordo F., Idolo A., Serio F., Tumolo M.R., et al. Micronucleus frequency in exfoliated buccal cells of children living in an industrialized area of Apulia (Italy). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17(4): 1208. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041208>
23. Sycheva L.P., Ivanov S.I., Kovalenko M.A., Zhurkov V.S., Belyaeva N.N., Antsiferov B.N. The cytogenetic status of children living in the vicinity of a pulp-and-paper mill. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2010; 89(1): 7–10. (in Russian)
24. Sycheva L.P., Mozhaeva T.E., Umnova N.V., Zhuchenko N.A., Diep V.Kh., Tuet Kh.A. Cytogenetic and other cariological parameters of exfoliative buccal cells in vietnamese children from areas where dioxin-containing herbicides were applied. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2008; (1): 19–23. (in Russian)