

В.Ю.Кравцов^{1,2,3}
Н.В.Ибрагимова³
С.Н.Никонович⁴
Э.А.Надыров⁴
А.В.Рожко⁴

¹ Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина

² Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных

³ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, РФ, Санкт-Петербург

⁴ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Республика Беларусь, Гомель

Ключевые слова: рак щитовидной железы, аномалии ядер, межъядерные мосты, авария на ЧАЭС.

Надійшла: 22.10.2015

Прийнята: 30.11.2015

УДК [616.444.-052.2 : 614.876] : 613.9 (476.2)

МЕЖЪЯДЕРНЫЕ ХРОСОМНЫЕ МОСТЫ В ТИРОЦИТАХ ПРИ ПАПИЛЛЯРНОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЯМ РАДИОИЗОТОПОВ ЙОДА В ПЕРВЫЕ МЕСЯЦЫ ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АТОМНОЙ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ

Реферат. Аномалии ядер в виде межъядерных хромосомных мостов формируются из дицентрических хромосом, которые являются маркерами влияния радиационных факторов. Клеточные популяции тироцитов папиллярных раков щитовидной железы у жителей Гомельской области, пострадавших в результате выброса радиоактивных изотопов йода в первые месяцы после аварии на Чернобыльской АЭС, характеризуются повышенной частотой встречаемости межъядерных мостов по сравнению с группой сравнения из Ленинградской области. По-видимому, клоногенные клетки давшие начало злокачественным опухолям у гомельских пациентов могли оказаться генетически мультиаберрантными в результате воздействия радиоактивного йода и иметь повышенную геномную нестабильность, обусловленную циклами «разрыв-слияние-мост».

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 4. – С. 37-42.

© **В.Ю.Кравцов, Н.В.Ибрагимова, С.Н.Никонович, Э.А.Надыров, А.В.Рожко, 2015**

✉ natibr@yandex.ru

Kravtsov V.Iu., Ibragimova N.V., Nikonovich S.N., Nadyrov E.A., Rozhko A.V. Internuclear chromosome bridges in thyrocytes of papillary thyroid cancer in patients, subjected to radioactive iodine isotopes during first months after the accident at the Chernobyl nuclear power plant.

ABSTRACT. Background. Fallout from Chernobyl accident was primarily to iodine radioisotopes, with Iodine-131 (I-131) being the most predominant. Radioiodines accumulated following the accident could induce pathologic changes in thyrocytes. Internuclear chromatine bridges and “tailed” nuclei - broken bridge fragments - are considered like cytopathological effects of radiation exposure as these abnormalities are formed from dicentric chromosomes, which are established markers of radiation exposure. **Objective.** To test the possibility that internuclear bridges and tailed nuclei are cytological markers of radiation exposure of the thyroid. **Methods.** We investigated thyrocyte nuclear abnormalities in cytological samples from fine-needle aspiration biopsy in papillary thyroid cancer patients exposed to radioiodine after Chernobyl accident (35 subjects from Gomel region, Belarus) and in papillary thyroid cancer of unexposed patients (25 subjects from Leningrad region, Russia). Nuclear abnormalities included internuclear bridges and “tailed” nuclei were examined. **Results.** Cells in papillary thyroid cancer of irradiated patients are characterized by the high frequency of appearance of hole nucleoplasmic bridges as well as broken bridges in comparison with the control group. The average frequency of thyrocytes with bridges in irradiated patients was almost 4 times higher than that in the unexposed group (4,69±0,69% vs. 1,10±0,23 %, p<0.001). The same contrast was observed in parameter “frequency of thyrocytes with “tailed” nuclei” (12,40±1,82 % vs 3,68±0,39 %, (p<0.001)). **Conclusion.** Thyrocytes with internuclear bridges may be considered as markers of radiation effects on the thyroid gland.

Key words: thyroid cancer, nuclear abnormalities, chromosome bridges, Chernobyl accident.

Citation:

Kravtsov VIu, Ibragimova NV, Nikonovich SN, Nadyrov EA, Rozhko AV. [Internuclear chromosome bridges in thyrocytes of papillary thyroid cancer in patients, subjected to radioactive iodine isotopes during first months after the accident at the Chernobyl nuclear power plant]. *Morphologia*. 2015;9(4):37-42. Russian.

Введение

Межъядерные хромосомные мосты часто обнаруживаются в популяциях клеток злокачественных опухолей. Причиной возникновения клеток с мостами являются дицентрические и центрические кольцевые хромосомы, формирующие сначала мост в ана-телофазе митоза, который в последующем может сохраняться на протяжении всей интерфазы. Такой механизм возникновения мостов был убедительно доказан в серии работ Дэвида Гиссельсона, выполненных с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) широким спектром зондов на целые хромосомы и их локусы в опухолях мягких тканей и костного мозга [1, 2]. Важно отметить, что мосты отражают циклы «разрыв-слияние-мост» [3], неизбежно приводящие к нарастанию геномной нестабильности и кариотипической гетерогенности в клеточных популяциях злокачественных опухолей [4, 5].

Принципиально важно отметить, что дицентрические и центрические кольцевые хромосомы, являются надежными маркерами радиационных воздействий [6], а аномалии интерфазных ядер, возникшие после патологических митозов обусловленных дицентриками, могут учитываться в биоиндикации лучевых воздействий [7-9]. Частоты возникновения клеток с мостами и с «хвостатыми ядрами» имеют линейно-квадратичную зависимость от дозы облучения [10].

Среди жителей Гомельской области, подвергшихся в детском и подростковом возрасте облучению в первые месяцы после аварии на ЧАЭС, прослеживается устойчивая тенденция роста патологии щитовидной железы (ЩЖ), по всей видимости, обусловленной воздействием радиоактивного йода, выброшенного в период апрель-май 1986 г. [11]. В связи с этим, изучение аномалий ядер, обусловленных дицентриками (мостов), в клеточных популяциях тироцитов у лиц, находившихся в апреле-мае 1986 года в районах выпадения радиоактивных осадков, представляет особый интерес.

Целью настоящего исследования стало изучение аномалий ядер типа межъядерных хроматиновых мостов в тироцитах папиллярного рака ЩЖ у жителей Гомельской области. Исследуемую группу составили лица, которые в детском и подростковом возрасте, оказавшись на территориях выпадения радионуклидов в первые месяцы после аварии на ЧАЭС, подверглись «йодному удару» и у которых в последующем развился папиллярный рак ЩЖ. Группу сравнения составили пациенты с тем же диагнозом, проживающие в Ленинградской области.

Материалы и методы

Цитологические исследования проводили в мазках из биоптатов ЩЖ, полученных в результате диагностических пункций ЩЖ. Мазки сушили, фиксировали раствором Лейшмана,

затем докрашивали азур 2–эозином по Романовскому. Микроскопирование проводили под иммерсией (1000х). Частоту встречаемости тироцитов с межъядерными хроматиновыми мостами определяли на 500-1000 тироцитов в промилле (%).

Работу проводили ретроспективно в цитологических препаратах, по которым было сделано заключение о наличии в них клеток с признаками атипии предположительно папиллярного рака ЩЖ. Рассматривались только те случаи, которые в последующем были подтверждены патогистологическими исследованиями, и по которым был выставлен диагноз папиллярный рак ЩЖ.

Исследования проводили в двух группах пациентов. Первую группу составили 35 пациентов из Гомельской области. Принципиально важно отметить, что все пациенты из этой группы были облучены в детском и подростковом возрасте в апреле-мае 1986 года в результате аварии на ЧАЭС. В 1986 году после аварии на ЧАЭС всем 35 пациентам было проведено измерение мощности экспозиционной дозы над ЩЖ. Расчетная поглощенная доза облучения в группе варьировала от 0,2 Гр до 2,3 Гр и в среднем составила 1,2 Гр. Средний возраст на момент аварии в группе гомельских пациентов составил $8,9 \pm 1,7$ лет. Средний срок реализации заболеваемости раком в обследованной группе составил $13,8 \pm 1,8$ лет. В это время (в среднем через 13 лет) и были проведены диагностические пункции узлов ЩЖ. Цитологические исследования проводились ретроспективно в 2008-2009 г.г. в препаратах архива Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», (г. Гомель, Республика Беларусь).

Группу сравнения составили 25 пациентов из Ленинградской области проходивших лечение в ФГУ НИИ онкологии МЗ РФ им. Н.Н. Петрова Росмедтехнологий, Санкт-Петербург с патогистологически установленными диагнозами папиллярного рака ЩЖ. В отличие от пациентов гомельской группы пациенты группы сравнения не имели в анамнезе фактов каких-либо радиационных воздействий, за исключением медицинских диагностических. Средний возраст пациентов группы сравнения составил 45 лет (от 21 до 63 лет), из них женщин было 16, мужчин - 9 человек.

Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Межъядерные хроматиновые мосты в тироцитах обнаруживались преимущественно в двуядерных клетках, а также между одноядерными клетками, входящими в состав клеточных комплексов. Они представляли собой хроматиновые тяжи разной толщины и разной длины, которые

соединяли ядра между собой. Окраска и структура хроматина мостов соответствовали таковым ядер клеток, которые они соединяли. В наших наблюдениях выявлялись разные морфологические типы мостов (рис. 1).

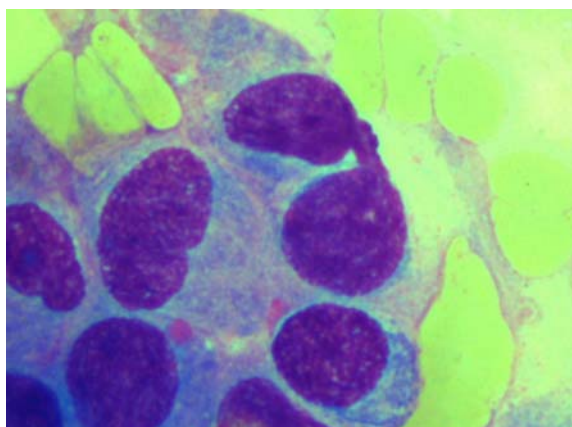


Рис. 1. Межъядерные хромосомные мосты между ядрами тироцитов. Цитологический препарат пунктата папиллярного рака щитовидной железы. Окраска азури II – эозином по Романовскому. $\times 1000$.

Среди них можно выделить мосты, начинающиеся от ядер конусовидно и утончающиеся к середине; мосты, имеющие одинаковую толщину на всем протяжении от ядра до ядра и мосты, на которых встречались утолщения в виде микроядер. Наблюдение более чем за 150 моста-

ми в тироцитах позволили нам обосновать следующее. Мосты в тироцитах бывают симметричными и ассиметричными, а также простыми и сложными. Под симметричными мостами мы подразумеваем такие, которые можно условно расщепить на два «полумоста», являющихся отражением друг друга. Простыми мостами можно назвать такие, толщина которых не изменяется на всем их протяжении от одного ядра до другого (при этом простые мосты всегда симметричные). Сложными мостами считаются все мосты, отличные от простых мостов (т.е. их форма изменяется на протяжении от одного ядра до другого). В свою очередь в отдельные категории можно выделить сложные мосты, на протяжении которых встречаются хроматиновые образования, напоминающие микроядра, нанизанные на хроматиновый тяж. Иногда в клеточных популяциях тироцитов встречались мосты аномально большой длины (более 20 мкм). Такие мосты имели несколько меньшую толщину, чем обычные, как правило, были симметричными, иногда сложными. В большинстве случаев в клетках наблюдалось по одному мосту, хотя очень редко, но, тем не менее, встречались тироциты с двумя хроматиновыми тяжами между ядрами. Случаи более чем с двумя мостами зарегистрированы не были.

На рисунке 2 представлены распределения пациентов изученных групп по частоте встречаемости тироцитов с межъядерными мостами.

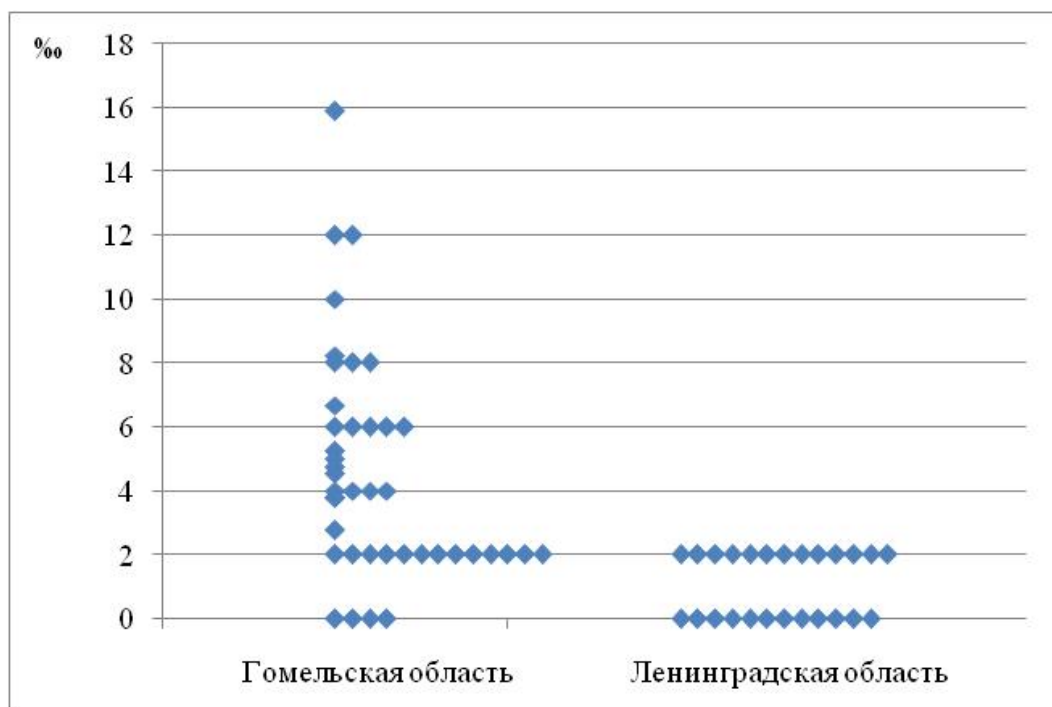


Рис. 2. Распределения пациентов из Гомельской и Ленинградской областей по показателю «частота встречаемости тироцитов с межъядерными мостами».

Тироциты с мостами были выявлены у 31 из 35 пациентов из Гомельской области. Большинство пациентов имели 2% тироцитов с мостами. Следует отметить представительную подгруппу, у которых мосты встречались в диапазоне от 6 % до 16%. Средняя величина показателя «частота тироцитов с мостами» в группе пациентов с папиллярными раками ЩЖ из Гомельской области составила $4,69 \pm 0,69\%$.

Напротив, в группе сравнения пациентов из Ленинградской области частота встречаемости тироцитов с межъядерными мостами не превышала 2%. Почти у половины пациентов из этой группы тироциты с мостами выявлены не были. Средняя частота встречаемости тироцитов с мостами в группе сравнения составила $1,10 \pm 0,23\%$.

Различие между выборками пациентов из Гомельской и Ленинградской областей по показателю «частота тироцитов с мостами» было статистически высокозначимым ($p < 0,0001$, по U-критерию Манна-Уитни).

Очень важно также отметить, что наряду с межъядерными хроматиновыми мостами, которые непрерывно соединяли ядра, мы наблюдали (и даже с не меньшей частотой встречаемости) очевидно разорвавшиеся мосты, - так называемые «хвостатые ядра».

«Хвостатые ядра» также как и мосты формируются в результате патологических митозов с мостами с тем отличием, что межъядерный мост не сохраняется, а разрывается [1-3]. «Хвосты» ядер имеют большую морфологическую схожесть с межъядерными мостами [12].

В наших наблюдениях "хвосты" ядер тироцитов представляли собой морфологические аномалии интерфазных ядер, которые выражались в том, что ядро имело тонкий вырост в цитоплазму (рис.3).

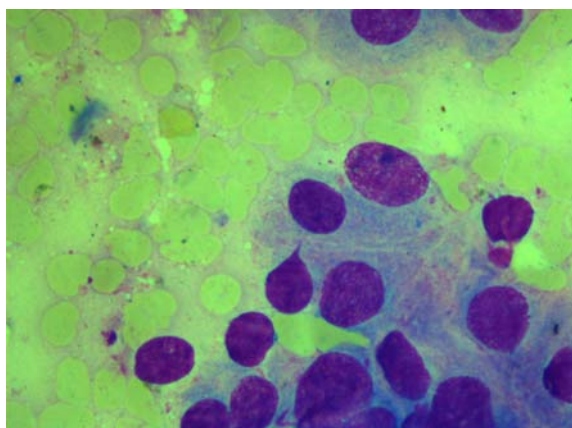


Рис. 3. «Хвостатое» ядро – разорвавшийся мост в двуядерном тироците. Цитологический препарат пунктата папиллярного рака щитовидной железы. Окраска азур II – эозином по Романовскому. $\times 1000$.

Иногда такой вырост завершался расширением тела "хвоста" на конце в виде овального

или круглого микроядра. Длина "хвостов" в наших наблюдениях варьировала от 2 мкм до 20 мкм. Цвет, хроматиновая структура и интенсивность окрашивания "хвостов", как правило, соответствовали таковым признакам ядер клеток, в которых они наблюдались. «Хвостатые» ядра встречались преимущественно в одно- и двуядерных клетках, реже – в клетках с большим количеством ядер. В целом можно отметить, что «хвостатые» ядра, как и хромосомные мосты, можно условно подразделить на простые и сложные, а сложные - на «хвостатые» ядра с комплексами и без них. Нельзя не отметить морфологическое сходство хромосомных мостов с «хвостатыми» ядрами в тироцитах, т.е. внешне хромосомные мосты представляли собой два «хвоста», связанных между собой, хотя столь же справедливо было бы сказать, что «хвостатые» ядра представляют собой разорванные мосты - «полумосты».

Распределения пациентов с папиллярными раками ЩЖ по показателю «частота встречаемости тироцитов с «хвостатыми» ядрами» в группах из Гомельской и Ленинградской областей представлены на рисунке 4. Средняя величина данного показателя в гомельской группе составила $12,40 \pm 1,82\%$, а в группе сравнения – $3,68 \pm 0,39\%$. Различия между этими группами по U-критерию Манна-Уитни также были статистически значимыми ($p = 0,003$).

Заключение

Таким образом, представленные результаты указывают на тот факт, что клеточные популяции тироцитов папиллярных раков щитовидной железы, у жителей Гомельской области, пострадавших в результате выброса радиоактивных изотопов йода в первые месяцы после аварии на ЧАЭС, характеризуются повышенной частотой встречаемости межъядерных мостов по сравнению с группой сравнения из Ленинградской области. По-видимому, клоногенные клетки давшие начало злокачественным опухолям у гомельских пациентов, могли оказаться генетически мультиабберрантными в результате воздействия радиоактивного йода и иметь повышенную геномную нестабильность, обусловленную циклами «разрыв-слияние-мост» [13, 14]. Нельзя исключить также, что среди тироцитов с мостами и «хвостатыми» ядрами были и клетки не вовлечённые в злокачественную прогрессию. Такое объяснение также представляется возможным, поскольку ранее мы установили достоверные различия по показателям «частота встречаемости клеток с мостами» и «частота встречаемости клеток с «хвостатыми» ядрами» в аспиратах узлов ЩЖ при одно- и многоузловых зобах между необлучавшимися жителями Ленинградской области и жителями Гомельской области, подвергшихся йодному удару в первые месяцы после аварии ЧАЭС [15].

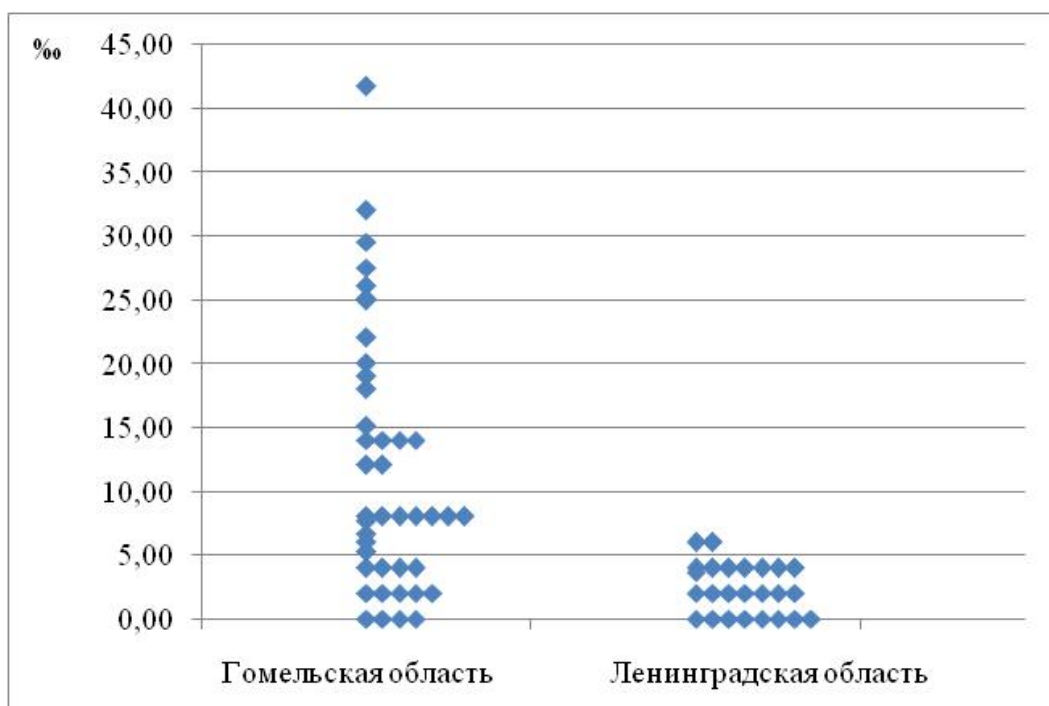


Рис. 4. Распределения пациентов из Гомельской и Ленинградской областей по показателю «частота встречаемости тироцитов с «хвостатыми» ядрами».

На наш взгляд, наряду с клинико-морфологическими особенностями рака ЩЖ у лиц, подвергшихся воздействию радиации в результате аварии на ЧАЭС в детском возрасте [16], отмечаются и цитопатологические особенности, проявляющиеся в повышении частот встречаемости тироцитов с аномалиями ядер, которые индуцируются радиационными факто-

рами.

Перспективы дальнейших исследований

По нашему мнению, тироциты с межъядерными мостами и «хвостатыми» ядрами, могут стать кандидатами на роль цитологических маркеров влияния радиации на ЩЖ, поиск которых в настоящее время продолжается [17-20].

Литературные источники

References

- Gisselsson D, Pettersson L, Höglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5357-62.
- Gisselsson D, Björk J, Höglund M, Mertens F, Dal Cin P, Akerman M, Mandahl N. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol*. 2001 Jan;158(1):199-206.
- Prokofieva-Belgovskaya AA. [Radiation-induced damage of chromosomes during the early development of Salmon]. *Tsitologiya*. 1961;3(4):437-45. Russian.
- Kravtsov VIu, Proshin SN, Iakovlev AF, Kaminskaia EV, Vakhtin IuB. [Bridges and multipolar mitoses in populations of rat rhabdomyosarcoma RA-23 cells]. *Biull Eksp Biol Med*. 1997 May;123(5):569-72. Russian.
- Proshin SN, Kravtsov VIu, Iakovlev AF,

- Kaminskaia EV, Vakhtin IuB. [Selection in vivo in cell populations of rat RA-23 rhabdomyosarcoma at the trait "frequency of cells with bridges"]. *Genetika*. 1996 Mar;32(3):406-10. Russian.
- Awa A. Mutation research at ABCC/RERF: cytogenetic studies of atomic bomb exposed populations. *Mutat Res*. 2003 Jan;543(1):1-15.
- Kravtsov VY, Fedortseva RF, Starkova YV, Yartseva NM, Nikiforov AM. Tailed nuclei and dicentric chromosomes in irradiated subjects. *Appl Radiat Isot*. 2000 May;52(5):1121-7.
- Anbumani S, Mohankumar MN. Nucleoplasmic bridges and tailed nuclei are signatures of radiation exposure in *Oreochromis mossambicus* using erythrocyte micronucleus cytome assay (EMNCA). *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015 Dec;22(23):18425-36. doi: 10.1007/s11356-015-5107-1.
- Anbumani S, Mohankumar MN. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellu-

lar abnormalities in the fish *Catla catla*. *Aquat Toxicol.* 2012 Oct 15;122-123:125-32. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.06.001.

10. Nikiforov AM, Fedortseva RF, Monosova EK, Iartseva NM, Kravtsov VIu. [Nuclei with protrusions--"tailed" nuclei--and radiation cytogenetic markers in a lymphocyte culture after x-ray irradiation]. *Radiats Biol Radioecol.* 2000 May-Jun;40(3):299-304. Russian.

11. Fridman MV, Savva NN, Krasko OV, Zborovskaya AA, Mankovskaya SV, Kurt Werner S, Demidchik YE. Clinical and pathologic features of "sporadic" papillary thyroid carcinoma registered in the years 2005 to 2008 in children and adolescents of Belarus. *Thyroid.* 2012 Oct;22(10):1016-24. doi: 10.1089/thy.2011.0005.

12. Kuzovatov SN, Kravtsov VYu, Vahtin YuB. [Internuclear chromosomal bridges and nuclei with protrusions in cellular populations of rat PA-23 rhabdomyosarcoma]. *Tsitologiya.* 2000;42(11):1097-102. Russian.

13. Abend M, Pfeiffer RM, Ruf C, Hatch M, Bogdanova TI, Tronko MD, Hartmann J, Meineke V, Mabuchi K, Brenner AV. Iodine-131 dose-dependent gene expression: alterations in both normal and tumour thyroid tissues of post-Chernobyl thyroid cancers. *Br J Cancer.* 2013 Oct 15;109(8):2286-94. doi: 10.1038/bjc.2013.574.

14. Abend M, Pfeiffer RM, Ruf C, Hatch M, Bogdanova TI, Tronko MD, Riecke A, Hartmann J, Meineke V, Boukheris H, Sigurdson AJ, Mabuchi K, Brenner AV. Iodine-131 dose dependent gene expression in thyroid cancers and corresponding normal tissues following the Chernobyl accident. *PLoS One.* 2012;7(7):e39103. doi: 10.1371/journal.pone.0039103.

15. Nadyrov E, Rozhko A, Kravtsov V, Mabuchi K, Hatch M, Nakamura N, Nikonovich S, Aleksanin S. Karyopathological traits of thyrocytes and

exposure to radioiodines in Belarusian children and adolescents following the accident at the Chernobyl nuclear power plant. *Radiat Environ Biophys.* 2012 May;51(2):187-93. doi: 10.1007/s00411-012-0407-z.

16. Iakovleva IN, Shishkov RV, Poliakov VG, Pankova PA. [Clinico-morphological peculiarities of thyroid cancer among children exposed to the Chernobyl disaster radiation]. *Vopr Onkol.* 2008;54(3):315-20. Russian.

17. Achille M, Boukheris H, Caillou B, Talbot M, de Vathaire F, Sabatier L, Desmaze C, Schlumberger M, Soria JC. Expression of cell cycle biomarkers and telomere length in papillary thyroid carcinoma: a comparative study between radiation-associated and spontaneous cancers. *Am J Clin Oncol.* 2009 Feb;32(1):1-8. doi: 10.1097/COC.0b013e3181783336.

18. Ito M, Bogdanova T, Zurnadzhy L, Saenko V, Rogounovitch T, Mitsutake N, Kondo H, Maeda S, Nakashima M, Tronko M, Yamashita S. Morphological difference in adult thyroid papillary carcinoma between Japan and Ukraine. *Endocr J.* 2014;61(12):1221-8. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0239.

19. Selmansberger M, Feuchtinger A, Zurnadzhy L, Michna A, Kaiser JC, Abend M, Brenner A, Bogdanova T, Walch A, Unger K, Zitzelsberger H, Hess J CLIP2 as radiation biomarker in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene.* 2015 Jul 23;34(30):3917-25. doi: 10.1038/onc.2014.311.

20. Takeichi N, Hoshi M, Iida S, Tanaka K, Harada Y, Zhumadilov Z, Chaizhunusova N, Apsalikov KN, Noso Y, Inaba T, Tanaka K, Endo S. Nuclear abnormalities in aspirated thyroid cells and chromosome aberrations in lymphocytes of residents near the Semipalatinsk nuclear test site. *J Radiat Res.* 2006 Feb;47 Suppl A:A171-7.

Кравцов В.Ю., Ібрагімова Н.В., Ніконович С.Н., Надиров Е.А., Рожко А.В. Між'ядерні хромосомні мости в тироцитах при папілярному раку щитоподібної залози у осіб, які зазнали впливу радіоізотопів йоду у перші місяці після аварії на Чорнобильській атомній електростанції.

Реферат. Аномалії ядер у вигляді між'ядерних хромосомних мостів формуються з дицентричних хромосом, які є маркерами впливу радіаційних факторів. Клітинні популяції тироцитів папілярних раків щитовидної залози у мешканців Гомельської області, які постраждали внаслідок викиду радіоактивних ізотопів йоду в перші місяці після аварії на Чорнобильській АЕС, характеризуються підвищеною частотою між'ядерних мостів в порівнянні з групою Ленінградської області. Мають, клоногенні клітини, що дали початок злоякісним пухлинам у гомельських пацієнтів, могли виявитися генетично мультиаберантними в результаті впливу радіоактивного йоду і мати підвищену геномну нестабільність, обумовлену циклами «розрив-злиття-міст».

Ключові слова: рак щитовидної залози, аномалії ядер, між'ядерні мости, аварія на ЧАЕС.