

УДК 616.441-055.26:576.315

## ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЯДЕР В ЭКСФОЛИАТИВНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

*А.А. Юнусов, Е.В. Галиуллина, Т.О. Бурканова*

Представлены данные изменения кариологических показателей эксфолиативных клеток у женщин репродуктивного возраста с аутоиммунным тиреоидитом, выражающиеся в повышенной частоте выявления микроядер в клетках, ядерных протрузий, пролиферации клеток и клеток с некротическими и апоптотическими телами, являющимися признаками цитогенетических нарушений и хромосомных aberrаций.

*Ключевые слова:* щитовидная железа; аутоиммунный тиреоидит; буккальный эпителий; микроядерный тест; кариологические показатели.

---

## FORMATION OF MICRONUCLEI IN EXFOLIATED CELLS IN REPRODUCTIVE-AGE WOMEN WITH IMMUNOLOGIC THYROIDITIS

*A.A. Yunusov, E.V. Galiulina, T.O. Burkanova*

The article presents the changes of karyological indicators of exfoliative cells in reproductive-age women with immunologic thyroiditis, which are expressed in the increased detection rate of micronuclei in cells, nuclear protrusions, cell proliferation, and necrotic and apoptotic bodycells, which are signs of cytogenetic damage and chromosome aberrations.

*Key words:* thyroid; immunologic thyroiditis; buccal cell; micronucleus test; karyological indicators.

**Актуальность.** Проблема хронического йодного дефицита является одной из наиболее актуальных в международном здравоохранении, а Кыргызская Республика представляет собой один из наиболее известных в мире йоддефицитных регионов. Дефицит йода наиболее часто приводит к развитию аутоиммунного тиреоидита (АИТ), а у женщин детородного возраста нарушается ряд эндокринных обменов с изменением эндокринной функции [1, 2]. Несмотря на достигнутые успехи в изучении данной проблемы, окончательно не изучены основные звенья патогенеза, взаимосвязи функционального состояния щитовидной железы (ЩЖ) и нарушений репродуктивной системы с развитием как первичного, так и вторичного бесплодия у женщин [3–5].

Обнаружение клеток, имеющих в составе микроядра (МЯ), может позволить использовать их в качестве своеобразного маркера патологических изменений в организме, с освещением цитогенетических, пролиферативных, деструктивных изменений в клетках [6, 7]. Образование МЯ свидетельствует не только об активации апоптоза, но и о наличии по-

вреждения хромосом, что ведет за собой потерю части генетического материала, а также генетической предрасположенности к заболеванию [8].

Однако исследования, посвященные изучению МЯ в клетках при АИТ у женщин репродуктивного возраста, отсутствуют, что и обусловило необходимость настоящих исследований.

Цель работы – определить кариологические показатели-эксфолиативных клеток у женщин репродуктивного возраста с АИТ.

**Материал и методы.** В качестве объекта исследования явились 87 женщин репродуктивного возраста, из которых: 30 здоровых женщин (контрольная группа); 57 женщин с АИТ (клиническая группа).

Для установления диагноза АИТ у женщин определяли содержание в плазме крови антител к тиреоглобулину (АТ к ТГ) и тиреоидной пероксидазе (АТ к ТПО) методом иммуноферментного анализа на анализаторе “Мультискан” наборами фирмы “АЛКОР-БИО” (Россия).

**Проведение МЯ теста.** Образцы буккального эпителия женщин получали шпательем, предвари-

тельно смоченным в буферном растворе (Tris-HCl, EDTA, NaCl с pH = 7,0), после чего шпатель ополаскивали в буферном растворе. Процедуру повторяли 4–5 раз с каждой стороны щеки до помутнения раствора. Клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин, надосадов отсасывали и буферным раствором доводили объем до 10 мл. Промывку проводили 3 раза. После третьей промывки осадок объемом 1 мл раскапывали на предметные стекла. Препараты фиксировали в ацетауксусном фиксаторе в течение 1 часа. Окрасивание цитоплазмы клеток проводили краской Романовского – Гимза. Анализ препаратов проводили на люминесцентном микроскопе “Олимпус” при увеличении  $100 \times 1,5 \times 1,0$ . Для анализа МЯ отбирали отдельно лежащие клетки с непрерывным гладким краем ядра. На каждом препарате анализировали 1000 клеток. МЯ идентифицировали как хроматиновые округлые тела размером не более 1/3 ядра, лежащие отдельно от основного ядра [9]. Кроме учета МЯ проводили регистрацию таких ядерных аномалий, как двуядерность, конденсированность хроматина, пикноз, кариорексис, протрузии ядра, ядра с круговой насечкой, с перинуклеарными и ядерными вакуолями, атипичной формы, с апоптозными телами [10]. Частоту клеток с МЯ, протрузиями, атипичной формы, с двумя ядрами, с круговой насечкой, с вакуолями выражали в промилле (‰). Клетки с конденсацией хроматина в ядре, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и апоптозными телами не подходит для учета МЯ, поэтому их частоту выражали как число клеток, найденных сверх 1000.

Статистическая обработка материала проводилась методом вариационной статистики с помощью компьютерных программных пакетов Statlab и Microsoft Excel. Вычислялось среднее значение ( $M$ ), ошибка средней величины ( $m$ ). Разницу средних величин оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента и вероятности  $P$ , которую признавали статистически значимой при  $P < 0,05$  [11].

**Результаты и обсуждение.** Определение антител к ТГ и ТПО у женщин клинической группы составило  $81,5 \pm 7,5$  МЕ/л и  $49,7 \pm 3,2$  МЕ/мл соответственно, что было достоверно выше контрольных значений, где значение АТ к ТГ составило  $44,8 \pm 5,71$  МЕ/л, а АТ к ТПО –  $19,4 \pm 2,6$  МЕ/мл ( $P < 0,001 - P < 0,01$ ).

Для проведения исследований МЯ в клетках самыми доступными для регистрации цитогенетических нарушений являются клетки многослойного неороговевающего эпителия человека, имеющие ряд преимуществ: нетравматичность, легкость получения материала, возможность повторных анализов,

возможность оценить не только общее, но и местное действие факторов окружающей среды. Подавляющее большинство цитогенетических исследований на эпителиоцитах выполнены с применением МЯ-теста. Данный метод позволяет судить о нарушениях, произошедших во время митоза. Основными механизмами образования МЯ является фрагментация хромосом в результате повреждения ДНК.

Как видно из данных таблицы 1, у женщин с АИТ наблюдается достоверное увеличение частоты клеток МЯ по сравнению с показателем контрольной группы ( $P < 0,01$ ). При этом частота клеток с протрузиями составила  $3,83 \pm 0,32$ , что значимо выше контрольного значения ( $P < 0,05$ ) и соответственно величина частоты клеток с протрузиями и МЯ достоверно выше и составила  $4,4 \pm 0,29$  ( $P < 0,01$ ). Показатель частоты клеток с атипичной формой ядра не достиг достоверных значений ( $P > 0,05$ ). Со стороны показателей пролиферации наблюдалось увеличение клеток с двумя ядрами ( $P < 0,05$ ) и суммарной пролиферации ( $P < 0,05$ ), а значения клеток с круговой насечкой остались в пределах значения контроля ( $P > 0,05$ ).

Показатели ранней стадии деструкции ядра свидетельствовали об увеличении клеток с некрозом, а именно, наблюдалось значимое повышение клеток с перинуклеарной вакуолью и вакуализацией ядра ( $P < 0,05$ ). При этом частота клеток с конденсацией хроматина становится меньше ( $P < 0,05$ ). При довершении деструкции ядра происходит увеличение клеток с кариопикнозом и апоптозными телами ( $P < 0,05$ ), а частота клеток с кариолизисом снижается ( $P < 0,05$ ). Результаты частоты клеток с конденсацией хроматина и лизисом ядра свидетельствуют о снижении интенсивности обновления буккального эпителия у женщин с АИТ.

Интегральным показателем генетических изменений в интерфазных ядрах может быть сумма наблюдаемых протрузий. Протрузии встречаются в виде “пузырьков”, “разбитого яйца” и типа “языка”. Протрузии, подобно МЯ, могут быть образованы фрагментами хромосом или отставшими при нарушении веретена деления целыми хромосомами, ядерная оболочка вокруг которых соединена с оболочкой основного ядра, а также образовывается путем почкования интерфазных ядер в связи с удалением из ядра и из клетки амплифицированной ДНК и элиминацией из ядра ДНК – репарационных комплексов. Двуядерные клетки образуются преимущественно в результате полиплоидирующего ацитокинетического митоза. Ядра с круговой насечкой, по-видимому, образуются в процессе незавершенного митоза, при этом нарушается не только цитотомия, но и кариотомия.

Таблица 1 – Кариологические показатели эксфолиативных клеток женщин с АИТ

Анализируемые показатели	Группа		Уровень достоверности, P
	контрольная, n = 30, M±m	клиническая, n = 57, M±m	
<b>Цитогенетические показатели клеток с:</b>			
МЯ	0,34±0,022	0,6±0,027	<0,01
протрузиями	2,34±0,28	3,8±0,32	<0,05
МЯ и протрузиями	2,68±0,291	4,4±0,29	<0,01
ядром атипичной формы	19,78±1,54	21,4±1,73	>0,05
<b>Показатели пролиферации клеток с:</b>			
двумя ядрами	1,95±0,35	3,2±0,27	<0,05
круговой насечкой	4,1±0,38	4,7±0,42	>0,05
суммарная частота	6,05±0,42	7,9±0,38	<0,05
<b>Показатели ранней деструкции ядра с:</b>			
перинуклеарной вакуолью	25,6±2,11	31,3±2,7	<0,05
конденсацией хроматина	251,4±15,74	215,2±12,4	<0,05
вакуолизацией ядра	11,25±1,08	17,1±1,12	<0,05
<b>Показатели завершения деструкции ядра с:</b>			
кареорексисом	4,31±0,67	5,2±0,71	>0,05
кариопикнозом	8,2±0,81	13,4±1,3	<0,05
кариолизисом	289,0±26,1	211,2±23,4	<0,05
апоптозными телами	0,17±0,01	0,28±0,012	<0,05

Оценка значимости апоптоза в клеточной гибели клеток проведена по значениям частот выявления апоптозных тел и пикнотических ядер. Апоптоз в первую очередь связан с нерепарируемыми или плохо репарируемыми повреждениями хромосом, такими как многочисленные разрывы ДНК, нарушение ее конфигурации, сшивки между цепями, а также с неправильной сегрегацией хромосом.

Тест на индукцию МЯ в клетках буккального эпителия позволяет оценивать 3 группы показателей:

- пролиферативную, репликационную и митотическую активность клеток;
- тип повреждения генома;
- варианты клеточной гибели – апоптоз и некроз.

Каждая группа этих показателей характеризуют неспецифические генетические изменения. Благодаря возможности одновременного выявления всего комплексов эффектов нестабильности генома, МЯ-тест является уникальным цитогенетическим методом. Поскольку индукция большинства генетических повреждений является неспецифическим ответом на действие генотоксичности, с помощью этого теста возможно верифицировать источник генотоксичной активности.

Таким образом, исследования показали, что АИТ у женщин оказывает выраженное влияние на

эксфолиативный эпителий ротовой полости, выражающееся в повышенной частоте выявления МЯ в клетках, ядерных протрузий, пролиферации клеток и клеток с некротическими и апоптозными телами, что отражает соответствие суммы цитогенетических нарушений и хромосомных aberrаций. С одной стороны, это говорит о том, что иммунная система уже не распознает и не элиминирует генетически поврежденные эпителиоциты, что способствует накоплению aberrантных клеток и нарушает стабильность генетической системы организма. С другой стороны, уровень повреждения хромосом и генома женщин становится различимы, что приводит к гибели отдельных клеток в результате включения механизмов некроза и апоптоза клеток. Следовательно, можно сделать общий вывод, что феномен генетической предрасположенности к заболеваниям ЩЖ, и в частности к АИТ, существует.

#### Литература

1. Муратова А.М. Клинико-патогенетические аспекты течения гиперпролактинемического гипогонадизма при первичном субклиническом гипотиреозе у женщин репродуктивного возраста: дис. ... канд. мед. наук / А.М. Муратова. Бишкек, 2009. С. 55–69.

2. Султаналиева Р.Б. Контроль и профилактика йоддефицитных заболеваний в Кыргызстане: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Р.Б. Султаналиева. Бишкек, 2006. 42 с.
3. Татарчук Т.Ф. Репродуктивная система женщин и нарушения функции щитовидной железы / Т.Ф. Татарчук, В.А. Олейник, Т.О. Мамонова // Вестник ассоциации акуш. и гинекол. Украины. 2000. № 4. С. 16–23.
4. Voitovich A.M., Afonin V.Y., Krupnova E.V. The level of organism // Tsitol. Genet. 2003. № 37 (4). P. 10–15.
5. Yen S.S.C. Neuroendocrinology of reproduction // Reproductive Endocrinology. 1999. P. 30–50.
6. Ильин Д.А. Аспекты формирования микроядер (Обзор литературы) / Д.А. Ильин // Естественное и гуманизм. 2006. Т. 3. № 3. С. 67–73.
7. Калаев В.Н. Частота встречаемости клеток с микроядрами в плоском эпителии, полученном из соскоба с шейки матки женщин детородного возраста при различных физиологических состояниях, в норме и при воспалении / В.Н. Калаев, А.К. Буторина, О.Л. Кудрявцева // Естествознание и гуманизм. 2006. Т. 3. № 2. С. 22–23.
8. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека / Л.П. Сычева // Медицинская генетика. 2007. № 11. С. 3–11.
9. Tolbert A.E., Shy C.M., Allen J.M. Micronuklei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development // Mut. Res. 1992. Vol. 271. P. 69–77.
10. Юрченко В.В. Использование микроядерного теста на эпителии слизистой оболочки щеки человека / В.В. Юрченко, Е.К. Кривцова, М.А. Подольская и др. // Гигиена и санитария. 2008. № 6. С. 53–56.
11. Боровиков В.П. Statistica®. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows® / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. М., 1998. 592 с.