

ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ МИКСТ-ИНФЕКЦИЕЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗА ЧЕЛОВЕКА

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

²Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Ильинских Н.Н.^{1,2}, Ильинских Е.Н.^{1,2}, Талынев В.Д.², Портнова Н.А.², Анчинова А.М.²

Целью исследования была оценка цитогенетических последствий у переболевших микст-инфекцией клещевого энцефалита и гранулоцитарного анаплазмоза человека по сравнению с соответствующими моноинфекциями.

Материалы и методы. Всего обследовано 46 больных: 12 с микст-инфекцией, 10 с гранулоцитарным анаплазмозом человека и 24 с клещевым энцефалитом. Возраст больных был от 22 до 46 лет. При обследовании применен стандартный метод хромосомного анализа лимфоцитов крови.

Результаты. Установлено, что клещевые инфекции сопровождаются статистически значимым повышением уровня цитогенетических нарушений на протяжении первых трех месяцев после клинического выздоровления. Нормализация уровней цитогенетических нарушений у больных микст-инфекцией и моноинфекцией клещевого энцефалита наблюдалась через 6 месяцев после клинического выздоровления. У больных моноинфекцией гранулоцитарного анаплазмоза человека это происходило через 1 месяц после госпитализации. Показано, что особенно высокий уровень цитогенетических нарушений наблюдался в начальный период болезни. Большая часть анеуплоидных клеток были гипоплоидными. Наиболее часто отсутствовали хромосомы групп D и G. Преобладающим типом структурных нарушений хромосом были хроматидные разрывы.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, клещевой энцефалит, гранулоцитарный анаплазмоз человека, микст-инфекция.

The aim of the study was to assess the cytogenetic effects of mixed infection of tick-borne encephalitis and human granulocytic anaplasmosis compared to the corresponding mono-infections.

Materials and methods. In total, 46 patients were examined: 12 with mixed infection, 10 with human granulocytic anaplasmosis, and 24 with tick-borne encephalitis. The age of patients varied from 22 to 46 years. In the examination, a standard method of chromosomal analysis of blood lymphocytes was applied.

Results. It was found that tick-borne infections are accompanied by a statistically significant increase in the level of cytogenetic disorders during the first three months after clinical recovery. Normalization of levels of cytogenetic disorders in patients with mixed infection and mono-infection of tick-borne encephalitis was observed 6 months after clinical recovery. In patients with human granulocytic anaplasmosis mono-infection, it occurred 1 month after hospitalization. It is shown that a particularly high level of cytogenetic disorders was observed in the initial period of the disease. Most of the aneuploid cells were hypoploid. The most frequently missing chromosomes are those of groups D and G. Chromatid breaks were the predominant type of structural disorders of chromosomes.

Key words: chromosome aberrations, tick-borne encephalitis, human granulocytic anaplasmosis, mixed infection.

В последние десятилетия клещевые инфекции стали одним из наиболее актуальных инфекционных заболеваний практически во всех регионах Российской Федерации. Особенно серьезны последствия этих природно-очаговых инфекций для Сибири. В ранее проведенных нами исследованиях [1] впервые в нашей стране было установлено, что вирулентный штамм вируса клещевого энцефалита способен в условиях *in vitro* индуцировать существенное увеличение числа анеуплоидных клеток и клеток с хромосомными aberrациями. Если радиация и химические мутагены исследованы достаточно хорошо, то мутагенные последствия инфекций изучаются лишь спорадически. По этой причине отсутствуют четкие представления о механизмах их мутагенного воздействия. Кроме того, не изучены последствия этой цитогенетической нестабильности у чело-

века, перенесшего инфекционное заболевание, что делает затруднительным какой-либо научно обоснованный медико-генетический прогноз.

Имеющиеся на сегодняшний день сведения о цитогенетических последствиях клещевых инфекций не позволяют ответить на вопрос, который возникает в процессе реабилитации больного: как быстро и в какие сроки происходит восстановление цитогенетического гомеостаза организма у переболевшего человека.

Цель настоящей работы заключалась в оценке в динамике цитогенетических последствий у больных микст-инфекцией клещевого энцефалита и гранулоцитарного анаплазмоза человека по сравнению с соответствующими моноинфекциями.

Материалы и методы

Всего обследовано 46 больных, включая 12 больных с микст-инфекцией, 10 с моноинфекцией гранулоцитарного анаплазмоза человека и 24 с клещевым энцефалитом. Возраст больных варьировал от 22 до 46 лет. Забор крови проводили из локтевой вены сразу же после госпитализации. Кроме того, через 30, 60 и 180 суток после выписки из больницы проводили повторное взятие крови у тех же лиц. Больные до госпитализации не получали лекарственной терапии и не подвергались рентгенологическим методам обследования. Диагноз устанавливали на основании положительных результатов серологических тестов (иммуноферментный анализ), характерной клинической картины и эпидемиологических данных. Предварительно у каждого обследованного было взято информированное согласие на проведение цитогенетического исследования, одобренное этическим комитетом ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилам клинической практики в Российской Федерации», утвержденным Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. В качестве контроля был проведен хромосомный анализ у 14 здоровых доноров станции переливания крови, сопоставимых с основными группами по возрасту и полу. Культивирование лейкоцитов крови, приготовление препаратов для анализа проводили стандартным общепринятым методом. Анализ метафазных пластинок осуществляли при помощи микроскопа PrimoStar (Zeiss, Германия) при увеличении 15×90. У каждого больного изучали не менее 100 клеток. Все препараты предварительно зашифровывали. Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета программ Statistica v. 6.0. Частоты наблюдаемых кариопатологий рассчитывали в программе The EH Software Program, Rockefeller University, NY (США). Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок, поскольку тестирование закона распределения при помощи критерия Колмогорова-Смирнова не выявило отличий от нормального. Различия сравниваемых результатов ($M \pm m$, где M – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у больных микст-инфекцией в начале болезни (1-2 день госпитализации) число клеток с цитогенетическими нарушениями было в 5,6 раза выше, чем в группе здоровых

доноров ($12,2 \pm 2,3\%$ и $2,18 \pm 0,49\%$ при $p < 0,001$), а у больных клещевым энцефалитом в 3,9 раза выше, чем в контроле (соответственно $8,46 \pm 1,82$ и $2,18 \pm 0,49\%$, при $p < 0,001$). У больных анаплазмозом человека повышение числа клеток с хромосомными нарушениями по сравнению с контролем было наименьшим – в 1,8 раза ($3,92 \pm 0,22\%$, при $p = 0,032$). Во всех случаях показано существенное возрастание числа анеуплоидных и полиплоидных клеток, а также клеток со структурными нарушениями хромосом. Среди анеуплоидных клеток преобладали гипоплоидные. У больных клещевым энцефалитом и у больных с микст-инфекцией закономерно чаще отсутствовали хромосомы из групп D и G. Полиплоидные клетки были в основном тетраплоидными. В контроле они встречались очень редко.

У больных клещевым энцефалитом и у больных с микст-инфекцией более половины из всех хромосомных aberrаций относились к хроматидным разрывам. Хромосомные разрывы наблюдались только у некоторых больных. У больных клещевым энцефалитом и у больных с микст-инфекцией наиболее часто поражалась хромосома 2. Дефицит числа нарушений наблюдали в хромосомах групп C, D и E, при этом в хромосомах групп F и G вообще не было отмечено структурных нарушений хромосом. Повышенное число разрывов обнаружено в теломерных районах длинных плеч хромосом групп A, B, C и D. Во всех перечисленных случаях различия между ожидаемой частотой нарушений и наблюдаемой достоверны ($p < 0,001$). В коротких плечах большинства хромосом нарушений не обнаружено. Повторное обследование переболевших клещевым энцефалитом и больных с микст-инфекцией, проведенное через 1 месяц после выписки из больницы, не выявило значимого снижения числа клеток с цитогенетическими нарушениями. Через 3 месяца у большинства переболевших начинается процесс нормализации уровней цитогенетических нарушений по сравнению с контролем. Однако число клеток с хроматидными обменами и анеуплоидией у реконвалесцентов остается значимо повышенным ($p = 0,014$, $p = 0,027$, $p = 0,041$ соответственно). Через 6 месяцев частота клеток с цитогенетическими нарушениями во всех группах нормализуется до уровня контроля ($p > 0,05$). У больных анаплазмозом человека нормализация кариотипа была отмечена уже через 1 месяц после госпитализации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при клещевых инфекциях так же, как и при некоторых других инфекционных заболеваниях, возрастает число клеток с хромосомными нарушениями. Известно, что вирусы способны индуцировать образование анеуплоидных и полиплоидных клеток [2]. У больных клещевым энцефалитом в гипоплоидных клетках отсутствовали хромосомы групп D и G, относящиеся

к ядрышкообразующим хромосомам. Показано, что химические и инфекционные агенты, тормозящие распад ядрышка при делении клетки, могут повлиять на процессы расхождения этих хромосом в митозе [1, 3]. В лейкоцитах больных разрывы были локализованы в основном в теломерных и околоцентромерных районах, которые, как известно, сформированы гетерохроматином. Полученные сведения соответствуют общепринятому представлению, что гетерохроматиновые районы наиболее чувствительны к действию большинства мутагенных факторов [2]. Такая однотипность наблюдаемых поражений хромосом, индуцированных различными инфекционными агентами, позволяет предположить наличие каких-то общих механизмов в их возникновении.

В этом отношении наиболее апробирована гипотеза, связанная с деятельностью иммунной системы, одной из функций которой является устранение из организма генетически измененных клеток [4, 5], в связи с чем нормализации числа цитогенетически измененных клеток в организме переболевшего человека следует ожидать при восстановлении способности иммунной системы поддерживать цитогенетический гомеостаз организма.

Заключение

Установлено, что клещевые инфекции сопровождаются статистически значимым повышением уровня цитогенетических нарушений на протяжении первых трех месяцев после клинического выздоровления. Нормализация уровней цитогенетических нарушений у больных микст-инфекцией и моноинфекцией клещевого энцефалита наблюдалась через 6 месяцев после клинического выздоровления. У больных моноинфекцией гранулоцитарного анаплазмоза человека это происходило через 1 месяц после госпитализации. Показано, что особенно высокий уровень цитогенетических нарушений наблюдался в начальный период болезни. Большая часть анеуплоидных клеток были гипоплоидными. Наиболее часто отсутствовали хромосомы групп D и G. Преобладающим типом структурных нарушений хромосом были хроматидные разрывы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы:

1. Ильинских Н.Н., Ксенц А.С., Ильинских Е.Н. *Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности*. Томск: Томский педагогический университет, 2011: 312.
2. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н. Влияние вируса клещевого энцефалита на хромосомный аппарат клеток человека. *Цитология и генетика*. 1976;10(4): 331-333.

3. Ilyinskikh NN, Ilyinskikh IN, Ilyinskikh EN. *Infectious mutagenesis (Cytogenetic effects in human and animal cells as well as immunoreactivity induced by viruses, bacteria and helminthes)*. Saarbrücken (Germany): LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012: 218.

4. Sullivan KE, Stiehm ER. *Stiehm's immune deficiencies*. Amsterdam: Academic Press (an imprint of Elsevier); 2014: 456.

5. Tsuda YL, Mori Y, Abe T. Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50(3): 225-234.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Ильинских Екатерина Николаевна, д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней Сибирского государственного медицинского университета; профессор кафедры экологии, природопользования и экологической инженерии Национального исследовательского Томского государственного университета, г. Томск. 634050, г. Томск-50, а/я 808. Тел.: 89039548817. E-mail: infconf2009@mail.ru

Информация об авторах

Ильинских Николай Николаевич, д.б.н., профессор, профессор кафедры биологии и генетики Сибирского государственного медицинского университета; профессор кафедры экологии, природопользования и экологической инженерии Национального исследовательского Томского государственного университета, г. Томск. 634041, г. Томск, ул. Кирова, 14. Тел.: (3822) 903954. E-mail: ecol@green.tsu.ru

Талынев Владислав Дмитриевич, студент 1-го курса лечебного факультета Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск. 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. Тел.: (3822) 901101. E-mail: dekanat.lf@ssmu.ru

Портнова Наталья Александровна, студентка 4-го курса лечебного факультета Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск. 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. Тел.: (3822) 901101. E-mail: dekanat.lf@ssmu.ru

Анчинова Акмарал Маратовна, студентка 6-го курса педиатрического факультета Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск. 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. Тел.: (3822) 901101. E-mail: dekanat.pf@ssmu.ru