

МОНИТОРИНГ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ВЕСЕННЕ-ЛЕТНИМ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ

ИЛЬИНСКИХ Н.Н.^{1,2}, ИЛЬИНСКИХ Е.Н.²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, г. Томск, Россия

²ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

ORIGINAL ARTICLE

CYTOGENETIC PROFILING OF PATIENTS WITH SPRING-SUMMER TICK-BORNE ENCEPHALITIS

NIKOLAY N. ILYINSKIKH^{1,2}, EKATERINA N. ILYINSKIKH²

¹National Research Tomsk State University (38, Lenina Street, Tomsk, 634050), Tomsk, Russian Federation

²Siberian State Medical University (2, Moskovskiy Trakt, Tomsk, 634050), Tomsk, Russian Federation

Резюме

Цель. Настоящая работа посвящена мониторингу цитогенетических последствий у переболевших весенне-летним клещевым энцефалитом.

Материалы и методы. Использован стандартный метод цитогенетического анализа хромосом больных клещевым энцефалитом. Анализ хромосом проведен при госпитализации и через 30, 60 и 180 дней после выписки из больницы. Контролем послужила кровь здоровых доноров.

Результаты. Показано, что у больных клещевым энцефалитом происходит значимое увеличение числа клеток с хромосомными нарушениями в начале болезни. Полная нормализация наблюдалась только через 6 месяцев после клинического выздоровления. Большая часть анеуплоидных клеток были гипоплоидными. Анализ хромосом показал, что за образование гипоплоидных клеток ответственны определенные хромосомы генома. Наиболее часто

отсутствовали хромосомы групп D и G. Преобладающим типом структурных нарушений хромосом были хроматидные разрывы. Наибольшее число нарушений наблюдалось в хромосоме 2.

Заключение. Весенне-летний клещевой энцефалит сопровождается высоким уровнем цитогенетических нарушений на протяжении трех месяцев после клинического выздоровления. Полная нормализация кариотипа больных наблюдалась через 6 месяцев после болезни.

Область применения: Полученные результаты следует учитывать в работе медико-биологических консультаций, поскольку повышенный уровень цитогенетических нарушений, наблюдаемый у переболевших клещевым энцефалитом, может быть причиной рождения генетически дефектных детей.

Ключевые слова: весенне-летний клещевой энцефалит, хромосомные aberrации, мониторинг

English ►

Abstract

Aim: To perform a cytogenetic profiling of patients with spring-summer tick-borne encephalitis.

Materials and Methods: Cytogenetic profil-

ing of 22 patients with spring-summer tick-borne encephalitis was carried out using a conventional technique immediately after a hospital admission and 30, 60, and 180 days after a hospital discharge.

Control group included healthy blood donors.

Results: Frequency of cells with chromosomal abnormalities was significantly higher in patients with spring-summer tick-borne encephalitis compared to the controls, particularly at the early stage. Cytogenetic profile became normal only 6 months after hospital discharge. The majority of the aneuploid cells were hypoploid; the most frequently lacking chromosomes were of D and G groups. Chromatid breaks were the most frequent type of the structural chromosomal aberrations. The high-

est frequency of the structural chromosomal aberrations was observed in the chromosome 2.

Conclusions: Spring-summer tick-borne encephalitis is associated with a high frequency of cytogenetic abnormalities within 3 months after hospital discharge. Cytogenetic profile becomes normal only 6 months after hospital discharge.

Keywords: tick-borne encephalitis, chromosomal aberrations, cytogenetic profiling

Введение

В последние десятилетия клещевой энцефалит становится одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний практически во всех регионах Российской Федерации. Особенно серьезны последствия этой инфекции 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 и последствиях их мутагенного воздействия. Кроме того, неизвестна продолжительность периода жизни с состоянием цитогенетической нестабильности у человека, перенесшего инфекционное заболевание, что затрудняет давать какой-либо научно-обоснованный медико-генетический прогноз. Имеющиеся на сегодняшний день сведения о цитогенетических последствиях клещевых инфекций не позволяют ответить на основной вопрос, который возникает в процессе лечения и реабилитации больного: как быстро и в какие сроки происходит восстановление цитогенетического гомеостаза организма у переболевшего человека.

Настоящая работа посвящена мониторингу цитогенетических последствий у переболевших весенне-летним клещевым энцефалитом.

Материалы и методы

Всего обследовано 22 больных весенне-летним клещевым энцефалитом. Возраст больных был 24-38 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. У всех обследованных больных с помощью полимеразной цепной реакцией (ПЦР) подтверждено наличие РНК вируса клещевого энцефалита в плазме крови. Предварительно у каждого обследованного было взято информированное согласие на проведение цитогенетического исследования, одобренное этическим комитетом ГБОУ ВПО «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 «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Культивирование лейкоцитов крови, приготовление препаратов для анализа проводили стандартно 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. Для контроля использовали кровь здоровых доноров той же возрастной группы, что и больные.

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических 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

Основные результаты исследований приведены в **Таблице 1**. Установлено, что у больных клещевым энцефалитом (в начале болезни) число клеток с цитогенетическими нарушениями было в 3,9 раза выше, чем в контроле (соответственно $8,46 \pm 1,82$ и $2,18 \pm 0,49\%$, при $p < 0,01$). Показано возрастание числа анеуплоидных и полиплоидных клеток, а также клеток со структурными нарушениями хромосом. Число анеуплоидных клеток у больных в начале болезни равнялось $1,33 \pm 0,28$ (при $0,42 \pm 0,09\%$ – в контроле, $p < 0,01$). Среди анеуплоидных клеток преобладали гипоплоидные. Закономерно чаще отсутствовали хромосомы из группы D и G. Полиплоидные клетки были в основном тетраплоидными, в контроле они встречались очень редко ($0,21 \pm 0,10\%$), а у больных гораздо чаще ($0,69 \pm 0,14\%$, при $p < 0,01$). Клетки со структурными нарушениями хромосом у больных встречались с частотой $6,87 \pm 1,59$ при $1,99 \pm 0,39\%$ в контроле ($p < 0,01$). Всего обнаруже-

но 97 aberrаций. Более половины из них относятся к хроматидным разрывам. Хромосомные разрывы наблюдались только у некоторых больных. Наиболее часто поражалась хромосома 2, где было локализовано 54 нарушения при ожидаемой частоте 27,0 ($p < 0,01$). В обоих плечах хромосомы 2 избыток нарушений отмечен в теломерных и околоцентромерных районах. 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, D. Во всех перечисленных случаях различия между ожидаемой частотой нарушений и наблюдаемой достоверно отличаются ($p < 0,01$). В коротких плечах большинства хромосом нарушений не обнаружено. Повторное обследование переболевших клещевым энцефалитом, проведенное через 1 месяц после выписки из больницы, не выявило значимого снижения числа клеток с цитогенетическими нарушениями. Через 3 месяца наблюдается процесс нормализации кариотипа переболевших. Однако число клеток с хроматидными обменами и анеуплоидией остается значимо повышенным. Через 6 месяцев частота клеток с цитогенетическими нарушениями нормализуется до уровня контроля.

Таблица 1. Число лимфоцитов периферической крови с хромосомными нарушениями ($M \pm m$) у больных с клещевым энцефалитом в острую стадию болезни и в период реконвалесценции в сравнении с контролем (в %)

Table 1. Percentage of peripheral blood lymphocytes with chromosomal aberrations (%), mean \pm standard deviation) in patients with spring-summer tick-borne encephalitis compared to the healthy blood donors

ТИПЫ РЕГИСТРИРУЕМЫХ МЕТАФАЗ С НАРУШЕНИЯМИ	ЗДОРОВЫЕ ДОНОРЫ (КОНТРОЛЬ)	ПЕРИОД БОЛЕЗНИ И РЕКОНВАЛЕСЦЕНЦИИ			
		1-2 ДЕНЬ ПОСЛЕ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ	ВРЕМЯ, ПРОШЕДШЕЕ ПОСЛЕ ВЫПИСКИ ИЗ БОЛЬНИЦЫ		
			1 МЕС.	3 МЕС.	6 МЕС.
Всего с aberrациями хромосом	1,99±0,44	6,87±1,59*	6,44±0,73*	2,68±0,54	1,95±0,60
с одиночными фрагментами	1,39±0,39	4,54±0,78*	5,00±0,56*	1,36±0,39	1,41±0,44
с хроматидными обменами	0,26±0,08	0,91±0,13**	0,80±0,08*	0,74±0,06**	0,21±0,11
с двойными фрагментами	0,27±0,12	0,77±0,16**	0,55±0,12**	0,41±0,20	0,32±0,12
с хромосомными обменами	0,11±0,05	0,69±0,18**	0,64±0,10*	0,19±0,08	0,23±0,09
с анеуплоидным набором хромосом	0,42±0,09	1,33±0,28*	1,49±0,19*	0,94±0,08**	0,41±0,12
с полиплоидным набором хромосом	0,21±0,10	0,69±0,14**	0,80±0,11*	0,29±0,12	0,22±0,14
Всего с цитогенетическими нарушениями	2,18±0,49	8,46±1,82*	7,94±1,11*	3,61±0,50	2,36±0,68

Примечание: Значимые отличия от группы контроля отмечены: ** $p < 0,05$ и * $p < 0,01$.
** $p < 0,05$, * $p < 0,01$ when compared to the healthy blood donors.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что при клещевом энцефалите, 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]. В контроле, как и у больных клещевым энцефалитом, в гипоплоидных клетках отсутствовали хромосомы группы D и G. Известно, что это ядрышкообразующие хромосомы и агенты, тормозящие распад ядрышка при делении клетки могут повлиять на процессы расхождения этих хромосом в митозе [2, 3]. В лейкоцитах больных разрывы 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 [4]. 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 [2, 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

Весенне-летний клещевой энцефалит сопровождается значимо повышенным уровнем цитогенетических нарушений на протяжении первых трех месяцев после клинического выздоровления. Полная нормализация кариотипа больных наблюдалась через 6 месяцев после клинического выздоровления. Показано, что особенно высокий уровень цитогенетических нарушений наблюдался в начальный период болезни. Большая часть анеуплоидных клеток были гипоплоидными. Анализ хромосом показал, что за образование гипоплоидных клеток ответственны определенные хромосомы генома. Наиболее часто отсутствовали хромосомы групп D и G. Преобладающим типом структурных нарушений хромосом были хроматидные разрывы. Наибольшее число аберраций наблюдалось в хромосоме 2.

БЛАГОДАРНОСТИ: работа выполнена при финансовой поддержке грантов РГНФ 15-06-10190 и РФФИ 16-44-700149

Литература / References:

1. Ilyinskikh NN, Ilyinskikh IN. Effects of virus of tick-borne encephalitis on the chromosome apparatus of human cells. *Cytology and Genetics*. 1976; 10(4): 331-333. Russian (Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н. Влияние вируса клещевого энцефалита на хромосомный аппарат клеток человека // Цитология и генетика. 1976. Т. 10, №4. С. 331-333).
2. 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 p.
3. 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.
4. Ilyinskikh NN, Ksents AS, Ilyinskikh EN. Micronucleus analysis in assessment of cytogenetic instability. Tomsk: Tomsk State Pedagogical University Publishing, 2011. 312 p. Russian. (Ильинских Н.Н., Ксенц А.С., Ильинских Е.Н. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности. Томск: Изд-во Томского педагогического университета, 2011. 312 с.)
5. Sullivan KE, Stiehm ER. Stiehm's immune deficiencies. Amsterdam: Academic Press (an imprint of Elsevier), 2014. 456 p.

Authors:

Prof. Nikolay N. Ilyinskikh, PhD, Head of the Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Professor of Department of Environmental Management, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Contribution: conceived and designed the study; performed a cytogenetic analysis.

Prof. Ekaterina N. Ilyinskikh, MD, PhD, Professor of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Contribution: collected the biological specimens and performed a cytogenetic analysis.

Корреспонденцию адресовать:

Ильинских Николай Николаевич,
а/я 808, г.Томск, 634050,
Тел.: +79095408617; +7(3822) 413679
E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

Corresponding author:

Prof. Nikolay N. Ilyinskikh,
PO box 808, Tomsk-50, 634050, Russian Federation
E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

Acknowledgements: This study was financially supported by grants RHSF 15-06-10190 and RFFR 16-44-700149