

УДК 616.988.25-002.954.2:611-018.1:575.116.4

**В. В. Новицкий, О. Б. Жукова, Н. В. Рязанцева, А. В. Лепехин, Н. П. Пирогова,  
О. В. Михайлова, Н. Н. Плотникова, Н. В. Токарева, И. О. Наследникова, А. П. Хлапов**

## **ЦИТОГЕНЕТИКА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРСИСТЕНЦИЕЙ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск

---

Проведено исследование хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови у 20 пациентов с бессимптомным носительством вируса клещевого энцефалита и 12 больных с хронической антигенемией с минимальными клиническими проявлениями заболевания, сохранявшимися в течение 12 мес. с момента инфицирования. Контрольную группу составили 17 здоровых доноров. Показано, что персистенция вируса клещевого энцефалита сопровождается цитогенетической нестабильностью лимфоцитарных клеток: обнаружено достоверное увеличение доли клеток со структурными хромосомными aberrациями (одиночные и парные фрагменты), снижение активности системы эксцизионной репарации ДНК.

---

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, лимфоциты, хромосомные aberrации, ДНК-репарация

---

Персистирующие вирусные инфекции представляют собой актуальную проблему современной медико-биологической науки. В изучении патогенеза вирусной персистенции ключевое положение занимает вопрос о характере взаимодействия между вирусом и клеткой, так как исход инфекции, с одной стороны, определяется перmissивностью клеточной системы, с другой – патогенностью штамма [5]. К настоящему времени установлено, что одним из механизмов ускользания вируса от действия защитных факторов организма является интеграция вирусного генома в геном пораженной клетки, что может привести к ее генетической нестабильности [3, 5, 11]. Нарушения функциональной активности систем контроля и поддержания генетического гомеостаза на клеточном и молекулярном уровнях вследствие повреждающего действия вирусного агента обуславливают высокий риск возникновения хромосомных aberrаций и, как следствие,

развитие структурных и функциональных нарушений на различных уровнях организма [5, 14, 15].

К числу вирусов, способных к пролонгированному пребыванию в организме человека, относится РНК-содержащий вирус семейства Flaviviridae – вирус клещевого энцефалита (КЭ), поражающий, кроме нервных, и иммунокомпетентные клетки, функциональная неполноценность которых может явиться причиной длительного поддержания вирусного персистирования [14, 15].

Современный клинический патоморфоз КЭ с тенденцией к увеличению частоты стертых форм инфекции с хроническим течением и бессимптомного вирусоносительства обуславливает интерес исследователей к изучению цитогенетических последствий длительного персистирования вируса КЭ в клетках иммунной системы. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение

характера хромосомных aberrаций и состояния системы репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови у пациентов – носителей вируса КЭ.

**Методика.** В исследование были включены 32 пациента с вирусом КЭ (13 мужчин, 19 женщин) в возрасте от 23 до 50 лет. Диагноз клещевого энцефалита верифицировали на основании данных эпидемиологического анамнеза, оценки неврологического статуса, определения уровня специфических антител к антигену вируса клещевого энцефалита методами непрямой реакции гемагглютинации и иммуноферментного анализа, обнаружения вирусной РНК методом полимеразно-цепной реакции. В зависимости от особенностей клинических и лабораторных проявлений клещевой нейроинфекции была выделена группа из 20 пациентов с бессимптомным вирусносительством (субклиническая форма клещевого энцефалита). У лиц, отнесенных к данной клинической категории, при отсутствии клинических симптомов в крови обнаруживалась вирусная РНК. Вторую группу составили 12 больных с хронической полиомиелитической формой клещевого энцефалита (непрогрессирующее течение, стадия ремиссии). Основными проявлениями патологии были стойкий астеновегетативный синдром, упорные головные боли, бессонница, снижение памяти в течение 12 мес. после перенесенного острого клещевого энцефалита. Контрольную группу составили 17 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, стабилизированная гепарином (25 ЕД/мл).

Приготовление препаратов для хромосомного анализа лимфоцитов проводили по методу P.S. Moorhead и др. [13]. Для этого 1 мл гепаринизированной крови (25 ЕД/мл) смешивали с 3 мл питательной среды, состоящей из 90% RPMI-1640 ("Sigma", США), 10% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/мл L-глутамин, 5 мг/мл гентамицина с добавлением фитогемагглютинаина ("Difco", Германия) в концентрации 0,01 мг/мл культуральной среды. Культивирование лимфоцитов проводили в культуральных флаконах при 37°C в течение 52 ч. Для накопления клеток в стадии метафазы во флаконы с культурой лимфоцитов за 2 ч до окончания культивирования вводили по 0,25 мл 0,01% раствора колхицина ("Fluka", Швейцария). Полученные препараты окрашивали раствором азур II-эозина в течение 10 мин. У каждого обследованного анализировали 100 метафазных пластинок. Учитывали число клеток с хромосомными нарушениями, количество и типы хромосомных aberrаций в соответствии с классификацией [4].

Исследование активности эксцизионной репарационной системы ДНК лимфоцитарных клеток, индуцированной ультрафиолетовым облучением, проводили методом сцинтилляционной радиометрии [6]. В каждом случае 50 мкл цельной гепаринизированной крови облучали в течение 15 с двумя ультрафиолетовыми лампами ДБ-15 при дозе и мощности излучения 15 Дж/м<sup>2</sup> и 1,6 Дж/с/м<sup>2</sup> соответственно. В качестве контроля использовали необлученную кровь. Пробы инкубировали в течение 2 ч при 37°C в культуральной питательной среде, содержащей 10 мкКюри/мл среды (<sup>3</sup>H)-тимидина. Радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика Mark-3 (США). Об интенсивности репаративного синтеза ДНК судили по величине индекса стимуляции (ИС), представляющего собой отношение показателя радиоактивности (импульс/с) пробы после воздействия ультрафиолетовым светом к радиоактивности необлученных образцов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна–Уитни.

**Результаты.** Многочисленными исследованиями показано, что возбудители вирусных инфекций, попадая в организм, приводят к разнообразным перестройкам хромосомного аппарата лимфоцитарных клеток: от структурных изменений одной или нескольких хромосом до изменения их числа. Так, при полиомиелите у детей в лимфоцитах периферической крови было выявлено значительное увеличение доли хроматидных разрывов [10], вирус простого герпеса индуцировал хроматидные и хромосомные разрывы [5]. Цитогенетические нарушения иммунокомпетентных клеток обнаруживались у больных корью [1], гриппом [7], а также вирусным гепатитом [11, 14]. При этом какой-либо корреляции между спектром aberrаций хромосом и видом вируса установлено не было. Существенное увеличение числа цитогенетических aberrаций в лимфоцитах периферической крови при вирусных инфекциях может быть обусловлено интеграцией нуклеотидных последовательностей генома вируса в геном клетки [14], повреждающим действием протеаз вирусов, клеточных лизосомальных нуклеаз, цистеин-протеиназ [2], а также интенсификацией процессов свободнорадикального окисления белков, липидов и нуклеиновых кислот [9].

В проведенном нами цитогенетическом анализе лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистенцией вируса КЭ без явных клинических проявлений заболевания было установлено достоверное увеличение доли клеток со структурными aberrациями хромосомного аппарата (примечательно, что клетки с изменен-

ным количеством хромосом отсутствовали). Анализ спектра aberrаций хромосом выявил, что цитогенетические нарушения хроматидного типа были представлены одиночными фрагментами, а хромосомного типа – парными фрагментами (табл.). Увеличение числа лимфоцитов с одиночными и парными фрагментами у асимптоматических вирусоносителей и у хронических носителей вируса КЭ с минимальной клинической симптоматикой инфекции было статистически значимым по сравнению со средними значениями данных показателей у здоровых доноров. Однако достоверных различий спектра хромосомных aberrаций между группами пациентов с различными клиническими формами КЭ обнаружено не было (табл.).

Подобные нарушения цитогенетического статуса иммунокомпетентных клеток могут быть связаны как с генотоксическим эффектом вируса КЭ, так и с недостаточной функциональной активностью систем поддержания генетического постоянства [7]. Как известно, целостность генома контролирует система ДНК-репарации, “выявляющая” и “исправляющая” ошибки, которые приводят к изменениям последовательности нуклеотидов в ДНК [6, 7].

Учитывая важную роль репарационной системы ДНК в поддержании стабильности цитогенетического гомеостаза клетки, нами была проведена оценка активности системы эксцизионной репарации ДНК лимфоцитов периферической крови у больных с персистенцией вируса КЭ. Было выявлено достоверное снижение средних значений ИС как у пациентов с бессимптом-

ной хронической антигенемией ( $1,25 \pm 0,09$  у. е.;  $p < 0,01$ ), так и у хронических вирусоносителей с клиническими проявлениями КЭ ( $1,32 \pm 0,17$  у. е.;  $p < 0,05$ ) по сравнению со средними значениями данного показателя, зарегистрированного у здоровых доноров ( $1,91 \pm 0,15$  у. е.). Вероятно, снижение активности ДНК репарационной системы при пролонгированной персистенции вируса КЭ может обуславливать повышенный уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови. Подобные нарушения цитогенетического статуса иммунокомпетентных клеток могут явиться причиной их функциональных изменений [7, 8, 14, 15]. Вместе с тем наличие нерепарируемых повреждений ДНК вызывает усиление экспрессии гена p53, который индуцирует процесс апоптоза [12], что закономерно приводит к элиминации вирусинфицированных клеток. Усиление апоптотической гибели и функциональная неполноценность иммунокомпетентных клеток могут явиться причиной неадекватности иммунного ответа организма, что, не исключено, и является одним из факторов, способствующих длительной персистенции вируса КЭ.

**Заключение.** Таким образом, полученные нами данные показывают, что, несмотря на отсутствие явной клинической симптоматики инфекционного процесса, персистенция вируса клещевого энцефалита сопровождается цитогенетической нестабильностью лимфоцитарных клеток, регистрируемой как на молекулярном (ДНК-репарационный анализ), так и на клеточном (хромосомный анализ) уровнях.

Таблица

Уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови у пациентов с персистенцией вируса клещевого энцефалита ( $M \pm m$ )

Показатели	Характеристика групп обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Пациенты с бессимптомным вирусоносительством клещевого энцефалита	Хронические вирусоносители клещевого энцефалита с клиническими проявлениями заболевания
Доля aberrантных клеток, %	$1,28 \pm 0,35$	$2,86 \pm 0,34^{**}$	$3,13 \pm 0,40^{**}$
Количество aberrаций хроматидного типа, %	$0,66 \pm 0,19$	$1,42 \pm 0,30^*$	$1,75 \pm 0,37^{**}$
в том числе: одиночные фрагменты	$0,66 \pm 0,19$	$1,42 \pm 0,30^*$	$1,75 \pm 0,37^{**}$
изохроматидные обмены	Не обнаружены	Не обнаружены	Не обнаружены
Количество aberrаций хромосомного типа, %	$0,65 \pm 0,20$	$1,43 \pm 0,48^*$	$1,50 \pm 0,38^*$
в том числе: парные фрагменты	$0,65 \pm 0,20$	$1,29 \pm 0,26^*$	$1,24 \pm 0,22^*$
кольцевые хромосомы	Не обнаружены	не обнаружены	Единичные
дицентрические хромосомы	Не обнаружены	Единичные	Единичные

Примечание. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; статистически значимых отличий между изучаемыми показателями у пациентов с бессимптомным вирусоносительством и у хронических вирусоносителей клещевого энцефалита с клиническими проявлениями заболевания выявлено не было.

# CYTOGENETICS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PERSISTENCE BY TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

V.V. Novitsky, O.B. Zhukova, N.V. Ryazantseva, A.V. Lepekhn, N.P. Pirogova, O.V. Mikhaylova, N.N. Plotnikova, N.V. Tokareva, I.O. Naslednikova, A.P. Hlapov

A research of the chromosomal apparatus of peripheral blood lymphocytes in 20 patients with asymptomatic carrier state of tick-borne encephalitis virus and 12 patients with minimal clinical symptoms being kept during 12 months was carried out. 17 normal donors composed the control group. It has been shown that the tick-borne encephalitis virus persistence is followed with changes in cytogenetic indices of lymphocytes. A statistically significant increase in percentage of structural chromosome aberrations (single and double fragments), reduction of the excision DNA-repair activity was revealed.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авакова А.Н., Рапопорт Р.И. // Цитология. 1971. Т. 13. № 7. С. 830–836.

2. Айзензон М.Г., Александров Ю.Н., Бужиевская Т.И. Мутагенное действие природных и синтетических полинуклеотидов. Киев, 1990.
3. Антонов П.В., Цинзерлинг В.А. // Архив патологии. 2001. Т. 63. № 1. С. 47–51.
4. Бочков Н.П., Кулешов Н.П., Журков В.С. // Цитология. 1972. Т. 14. № 10. С. 1267–1273.
5. Букринская А.Г., Жданов В.М. Молекулярные основы патогенности вирусов. М., 1991.
6. Засухина Г.Д. Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды. М., 1979.
7. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск, 1992.
8. Исаева М.Л., Леонова Г.Н., Кожемяко В.Б. // Вопросы вирусологии. 1998. Т. 43. № 4. С. 182–186.
9. Маеда Х., Акаике Т. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 854–865.
10. Bhatnagar A., Rani R., Ghosh P. // Mutat. Res. 1984. Vol. 141. № 1. P. 55–58.
11. Jablonska M. // Cas. Lek. Cesk. 1997. Vol. 136. № 20. P. 619–623.
12. Jayaraman J., Prives C. // Cell. 1995. Vol. 81. № 7. P. 1021–1029.
13. Moorhead P.S., Nowell P.S., Mellman W.J. // Exp. Cell. Res. 1960. № 20. P. 613–618.
14. Sakakura C., Hagiwara A., Taniguchi H. et al. // Brit. J. Cancer. 1999. Vol. 80. № 12. P. 2034–2039.
15. Uehara T., Miyawaki T., Ohta K. // Blood. 1992. Vol. 80. № 2. P. 452–458.