

# МОНИТОРИНГ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕТОДОМ МИКРОЯДЕРНОГО АНАЛИЗА КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ

Н.Н. Ильинских<sup>1,2</sup>, Е.Н. Ильинских<sup>1,2</sup>, Е.В. Замятина<sup>1</sup>, С.В. Ли<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

**Резюме.** Цель работы состояла в оценке динамики частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами в периферической крови и клеток буккального эпителия с микроядрами в течение полугода у больных острым клещевым энцефалитом в зависимости от носительства функционирующих и нефункционирующих вариантов генов глутатион-S-трансферазы (*GSTM1* или *GSTT1*) в генотипе больного. С использованием микроядерного анализа в иммунокомпетентных и не иммунокомпетентных клетках было проведено обследование 54 больных острым клещевым энцефалитом и 35 здоровых лиц (контроль), проживающих в Томской и Тюменской областях. В случае анализа частоты бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами материалом для получения фитогемагглютинин-стимулированных культур послужила венозная периферическая кровь, а с целью изучения числа буккальных клеток с микроядрами в качестве материала использовали соскобы эпителиальных клеток слизистой оболочки щек. Для обоих методик микроядерного теста получали цитологические препараты, которые окрашивали по методам Гимзе или Фельгена. Исследование проводили в динамике при госпитализации, а также через 1 неделю, 1, 3 и 6 месяцев. Для анализа вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* использовали полимеразную цепную реакцию. Результаты анализа показали существенное повышение частоты клеток с микроядрами у больных клещевым энцефалитом по сравнению с контролем, при этом уровни частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами были существенно выше по сравнению с клетками буккального эпителия с микроядрами. Наиболее значительное и длительное повышение частоты клеток с микроядрами было связано с мутантными нефункционирующими вариантами генов *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*. При наличии у больного неактивных форм этих генов цитогенетическая нестабильность в цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах крови могла сохраняться на протяжении до полугода. В буккальном эпителии нормализация частоты клеток с микроядрами была установлена уже через 1–3 месяца после лечения. **Вывод.** Установлено, что наиболее выраженное и длительное сохранение повышенной частоты клеток с цитогенетическими на-

---

**Адрес для переписки:**

Ильинских Николай Николаевич  
634050, Россия, г. Томск-50, а/я 808.  
Тел.: 8 909 540-86-17.  
E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

**Contacts:**

Nikolay N. Ilyinskikh  
634050, Russian Federation, Tomsk-50, POB 808.  
Phone: +7 909 540-86-17.  
E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Ильинских Н.Н., Ильинских Е.Н., Замятина Е.В., Ли С.В. Мониторинг цитогенетической нестабильности методом микроядерного анализа клеток у больных клещевым энцефалитом в зависимости от наличия вариантов генов глутатион-S-трансферазы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 600–606. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-600-606

**Citation:**

Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh E.N., Zamyatina E.V., Li S.V. Monitoring cytogenetic instability by micronucleus assay of immunocompetent and non-immunocompetent cells in patients with tick-borne encephalitis depending on glutathione-S-transferase genes genotype variants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 600–606. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-600-606

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 16-40-700149).

рушениями наблюдалось в цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах периферической крови больных клещевым энцефалитом, являющихся носителями генотипа с неактивными аллелями двух генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1*(0/0) и *GSTT1*(0/0).

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, микроядерный анализ, буккальный эпителий, цитокинез-блокированные лимфоциты, *GSTM1*, *GSTT1*.

## MONITORING CYTOGENETIC INSTABILITY BY MICRONUCLEUS ASSAY OF CELLS IN PATIENTS WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS DEPENDING ON GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE GENES GENOTYPE VARIANTS

Ilyinskikh N.N.<sup>a,b</sup>, Ilyinskikh E.N.<sup>a,b</sup>, Zamyatina E.V.<sup>a</sup>, Li S.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

<sup>b</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** Our study was aimed at assessing dynamic changes in frequency of micronuclei-bearing cytokinesis-blocked T cells in peripheral blood as well as buccal micronucleated epithelial cells during a six month follow-up in patients with acute tick-borne encephalitis, carriers of active and inactive glutathione-S-transferase gene (*GSTM1* and *GSTT1*) variants. Micronucleus assay was used to examine immunocompetent and non-immunocompetent cells isolated from 54 patients with acute tick-borne encephalitis and 35 healthy volunteers (control) residing in the Tomsk and Tyumen regions. Analyzing frequency of cytokinesis-blocked micronucleated T cells was performed by using venous peripheral blood for running phytohemagglutinin-stimulated cell cultures as well as examining percentage of buccal micronucleated cells collected by scraping buccal mucous membrane epithelial cells. Both techniques of micronucleus assay were conducted by preparing cytology slides stained according to Giemsa or Felgen method. Samples were dynamically investigated on hospital admission as well as at week 1, month 1, 3 and 6. Polymerase chain reaction was used to analyze prevalence of *GSTM1* and *GSTT1* gene alleles. The data obtained revealed a significantly increased frequency of micronucleated cells in tick-borne encephalitis patients compared to control group. In addition, percentage of cytokinesis-blocked micronucleated T cells was significantly higher than that of micronucleated buccal cells. Moreover, most prominent and long-lasting increase in frequency of micronucleated cells was associated with mutant inactive *GSTM1*(0/0) and *GSTT1*(0/0) gene variants. Patients carrying inactive genes variants were found to exhibit cytogenetic instability in cytokinesis-blocked blood T cells maintained for up to six months. In contrast, frequency of buccal micronucleated cells was close to the level in control group and detected as early as 1-3 months after completing therapy. Therefore, it was found that the prominent long-lasting frequency of cytogenetically unstable cells was observed in cytokinesis-blocked T cells in peripheral blood samples from patients with tick-borne encephalitis carrying inactive variants both of *GSTM1*(0/0) and *GSTT1*(0/0) glutathione-S-transferase genes.

**Key words:** tick-borne encephalitis, micronucleus analysis, buccal cells, cytokinesis-block lymphocytes, *GSTM1*, *GSTT1*.

Нами впервые было установлено, что вирус клещевого энцефалита (КЭ) в условиях *in vitro*, а также у больных людей *in vivo* способен индуцировать значительное повышение числа Т-лимфоцитов с абберациями в числе и структуре хромосом [2, 3, 14]. Поскольку известно, что в результате иммунного ответа при различных инфекционных заболеваниях, включая КЭ, клетки иммунной системы активно продуцируют реактивные формы кислорода и азота, которые могут повреждать ДНК и индуцировать генные и хромосомные мутации [1, 3], то можно предположить, что повышение частоты цитогенетических нарушений у больных КЭ связано с оксидативным стрессом, который приводит к повреждению хромосом в различных соматических клетках. Однако анализ цитогенетических нарушений в других типах клеток, кроме иммунокомпетентных, например, эпителиальных, у больных КЭ еще не проводился.

Глутатион-S-трансферазы способствуют защите организма от широкого круга химичес-

ких соединений, включая реактивные формы кислорода и другие потенциальные мутагены. Имеются исследования, свидетельствующие о связи между тяжестью инфекционного заболевания и наличием у больного мутантных аллелей генов ферментов глутатион-S-трансфераз [5, 7, 12, 15]. Установлено, что носительство мутантных неактивных вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* часто сопровождается цитогенетической нестабильностью и повышенной чувствительностью хромосомного аппарата человека к различным мутагенным факторам [16, 18].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении динамики частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами (МЯ) в периферической крови и частоты клеток буккального эпителия с МЯ в течение полугода у больных острым клещевым энцефалитом (КЭ) в зависимости от носительства активных и неактивных вариантов генов глутатион-S-трансферазы (*GSTM1* или *GSTT1*) в генотипе больного.

## Материалы и методы

В исследование были включены 54 больных лихорадочной формой острого КЭ (возраст  $38,3 \pm 4,3$  лет) и 35 здоровых лиц (возраст  $36,9 \pm 3,7$  лет), сопоставимых по возрасту и полу, проживающих в г. Томске, а также в Томской и Тюменской областях, которые были обследованы с использованием рутинных клинико-лабораторных и цитогенетических методов — микроядерного анализа в клетках буккального эпителия и в бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах периферической крови [3, 10, 11]. Диагноз КЭ был поставлен на основании клинико-эпидемиологических данных, включая сведения об укусах клещей, и подтвержден с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) на антиген вируса КЭ, а также на иммуноглобулины классов М и G к этому вирусу (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). С использованием ИФА иммуноглобулинов классов М и G к боррелиям иксодового клещевого боррелиоза (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) у всех больных было исключено это заболевание. Обследование больных проводилось на базе инфекционной клиники ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) МЗ РФ и инфекционных отделений ОГАУЗ Городская клиническая больница № 3 им. Б.И. Альперовича г. Томска, а также районных больниц Томской и Тюменской областей.

Исследование было одобрено Этическим комитетом СибГМУ (протокол № 4308 от 19.10.2015 г.), проводилось в соответствии с правилами «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (2002 г.) и «Правилами клинической практики в РФ» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.). Больные до госпитализации не получали лекарственной терапии и не подвергались рентгенологическим методам обследования. Все обследованные лица подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и получения от них биологического материала (проб крови и буккального эпителия).

Материал для исследования (пробы клеток буккального эпителия и периферической крови для получения культур Т-лимфоцитов) был получен в динамике при госпитализации в стационар, а также спустя 1 неделю, 1, 3 и 6 месяцев в острый и реконвалесцентный периоды болезни. Цитологические препараты клеток буккального эпителия получали с помощью двух однократных стерильных шпателей, делая соскобы со слизистой оболочки левой и правой щек выше линии смыкания зубов [3]. Полученные таким образом пробы буккальных клеток помещали в два контейнера, помеченных «левая щека» и «правая щека», которые содержали фиксатор Саккоманно (Diapath, Италия) [10, 11]. Суспензию клеток трижды центрифугировали

с последующим добавлением к осадку буферного раствора с pH 7,0, содержащего 1,6 г/л трис-HCl, 38,0 г/л тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 1,2 г/л хлорида натрия, растворенных в деионизированной стерильной воде. Клетки фиксировали с помощью смеси этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 и с помощью пипетки наносили на чистые и высушенные предметные стекла [10, 11]. Полученные препараты окрашивали по методу Фельгина и анализировали частоту клеток с МЯ в не менее чем 1000 эпителиоцитах в соответствии со стандартной методикой [10, 11].

Культуры мононуклеарных клеток получали *in vitro* инкубируя во флаконах 0,3 мл гепаринизированной крови (около  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл) в 4,7 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Москва, РФ) при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Цитогенетический анализ бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов в 72-часовых культурах мононуклеарных клеток проводился после добавления в начале инкубации 0,1 мл фитогемагглютинаина М (ФГА) при концентрации 10 мкг/мл в качестве стимулятора деления Т-лимфоцитов (ПанЭко, РФ), а также 100 мкл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) при концентрации раствора 300 мкг/мл за 28 ч до конца культивирования в качестве цитокинез-блокирующего агента в соответствии со стандартной методикой [10, 11]. Для фиксации клеток использовали свежеприготовленную смесь абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 5:1. Цитологические препараты окрашивали по методу Гимзы и анализировали частоту клеток с МЯ не менее чем в 1000 бинуклеарных Т-лимфоцитов у каждого человека с помощью микроскопа «PrimoStar» (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз [10, 11]. К основным критериям идентификации МЯ можно отнести следующие признаки: одинаковая структура и интенсивность окраски основных ядер и МЯ, диаметр МЯ варьировал от  $\frac{1}{16}$  до  $\frac{1}{3}$  диаметра одного из основных ядер, МЯ имели четкие границы и не были соединены с основными ядрами.

Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* могут иметь относительно протяженные делеции, приводящие к утрате функционирования этих генов, которые обычно обозначают как «нулевые» аллели *GSTM1(0/0)* или *GSTT1(0/0)* [4, 8]. Такие мутации ассоциированы с отсутствием продукции соответствующих ферментов — глутатион-S-трансфераз. Делеционные варианты генов *GSTM1* (GenBank № X68676) и *GSTT1* (GenBank № AP000351) были идентифицированы в мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4, 8]. ДНК выделяли из проб клеток буккального эпителия согласно стандартному протоколу. В амплификационную пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты

каждого из указанных генов. В данной работе использовали амплификаторы «Терцик» (ДНК-Технология, РФ). Разделение продуктов амплификации и продуктов рестрикции ампликонов проводили в 3% агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм) с применением камеры для горизонтального электрофореза ЕС 12–13 (Биоком, Россия). Нормальные аллели генов, обозначенные знаком «+» характеризуются присутствием ПЦР-продуктов. Такие доноры могут быть либо гетерозиготны [ $GSTM1(+/0)$  и  $GSTT1(+/0)$ ], либо гомозиготны [ $GSTM1(+/+)$  и  $GSTT1(+/+)$ ] по нормальному активному аллелю. Мутантный генотип  $GSTM1(0/0)$  или  $GSTT1(0/0)$  означает отсутствие на электрофореграмме фрагментов размером 271 и 480 пар оснований, в результате чего данные индивидуумы гомозиготны по делеции и имеют резкое снижение активности соответствующего фермента [4, 8].

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistica v. 10 (StatSoft Inc., США). Частоты гаплотипов рассчитывали с помощью программы «The EH Software Program» (Rockefeller University, США). Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и t-критерия Стьюдента для зависимых выборок, поскольку тестирование закона распределения при помощи критерия Колмогорова–Смирнова не выявило отличий от нормального. Различия сравниваемых результатов ( $\bar{X} \pm s_x$ , где  $\bar{X}$  — выборочное среднее, а  $s_x$  — стандартная ошибка) считались достоверными при достигнутом уровне значимости  $p > 0,05$ .

## Результаты

Результаты показали существенные повышение частоты как клеток буккального эпителия с микроядрами, так и бинуклеарных Т-лимфоцитов периферической крови с МЯ у больных КЭ по сравнению с контролем (табл.). Наиболее значительное повышение частоты клеток с МЯ было установлено у больных — носителей мутантных аллелей генов  $GSTM1(0/0)$  и  $GSTT1(0/0)$  по сравнению с группой больных, имевших активные варианты этих генов  $GSTM1(+)$  и  $GSTT1(+)$ . Так, например, при поступлении в стационар частота буккальных клеток с МЯ в группе больных КЭ, являвшихся носителями нулевых аллелей генов  $GSTM1(0/0)$  и  $GSTT1(0/0)$ , была значимо выше ( $5,11 \pm 0,18\%$ ), чем в группе больных с активными вариантами этих генов  $GSTM1(+)/GSTT1(+)$  —  $2,08 \pm 0,09\%$  ( $p > 0,001$ ).

Частота цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови у больных КЭ, имевших в своем генотипе мутантные неактивные ал-

лели  $GSTM1(0/0)$  и  $GSTT1(0/0)$  ( $8,08 \pm 0,21\%$ ), также была существенно выше, чем в группе больных с нормальными аллелями этих генов  $GSTM1(+)$  и  $GSTT1(+)$  ( $2,92 \pm 0,11\%$ ,  $p > 0,001$ ).

Аналогичные результаты были получены при сравнении частоты клеток с МЯ в буккальных клетках и Т-лимфоцитах между группами больных КЭ, имевших сочетание неактивной формы гена  $GSTM1(0/0)$  и активного аллеля гена  $GSTT1(+)$ , и группами больных с активными вариантами обоих генов  $GSTM1(+)/GSTT1(+)$  ( $p > 0,001$ ). Вместе с тем достоверных отличий частоты эпителиальных и иммунокомпетентных клеток с микроядрами между группами больных КЭ с генотипами  $GSTM1(+)/GSTT1(0/0)$  и  $GSTM1(+)/GSTT1(+)$  обнаружено не было ( $p > 0,05$ ).

Через неделю после курса терапии у больных КЭ было установлено существенное снижение частоты буккальных и лимфоцитарных клеток с микроядрами для всех четырех вариантов генотипов ( $p > 0,001$ ). Однако значение этих показателей оставалось существенно выше, чем в группе здоровых лиц. В группе больных КЭ, имеющих неактивные варианты обоих генов  $GSTM1(0/0)$  и  $GSTT1(0/0)$ , частота клеток буккального эпителия с микроядрами только через 3 месяца после курса лечения достоверно не отличалась от соответствующих показателей в контроле, а в группах больных КЭ, имеющих активную форму гена  $GSTM1(+)$  снижение уровня клеток с микроядрами до сопоставимого со значениями в контрольной группе было отмечено уже через 1 месяц.

Несколько иной характер цитогенетических последствий отмечен в Т-лимфоцитах периферической крови. В группах больных КЭ, имеющих четыре варианта генотипа, частота клеток цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с МЯ становилась достоверно неотличимой от соответствующих показателей в контроле только через 6 месяца после курса лечения.

## Обсуждение

Известно, что в результате инфекционного процесса при различных инфекционных заболеваниях, в том числе при КЭ, клетки иммунной системы активно продуцируют реактивные формы кислорода (ROS) и азота (RNS), такие как супероксид-ион радикал, перекись водорода, а также оксид азота и пероксинитрит [4, 17]. Установлено, что непропорционально высокая генерация этих высокореактивных соединений может повреждать клеточные макромолекулы, включая ДНК и ферменты [1, 17]. Таким образом, цитогенетические эффекты, которые обнаружены у больных КЭ, по-видимому, связаны с окислительным стрессом, вызванным внедрением инфекционного агента в организм и развитием иммунного ответа [1, 14]. Под влиянием реактивных форм кислорода в клетках происходит раз-

рушение тубулиновых волокон ахроматинового аппарата деления, что способствует аномальному расхождению хромосом в митозе и формированию МЯ в различных типах клеток, включая лимфоциты и буккальные клетки [3, 11].

Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* кодируют класс ферментов глутатион-S-трансфераз, которые катализируют присоединение трипептида глутатиона к электрофильному центру разнообразных соединений, что приводит образованию более гидрофильных и менее токсичных продуктов [9]. Глутатион-S-трансферазы явля-

ются важной частью системы защиты от широкого круга потенциально опасных химических соединений и участвуют в реакциях детоксикации канцерогенных промежуточных продуктов, лекарственных препаратов, тяжелых металлов, полиароматических углеводородов, а также супероксид-анион радикала кислорода и продуктов перекисного окисления липидов [9]. Установлено, что полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз может влиять на уровень повреждений ДНК, вызванных рядом мутагенных и/или канцерогенных соединений эндогенного и эк-

**Таблица. Частота клеток с микроядрами в мазках буккального эпителия и в культурах цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови (%) больных клещевого энцефалитом в зависимости от носительства активных (+) или неактивных (0) вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* ( $\pm$ ) в генотипе, полученных в динамике при госпитализации, через 1 неделю, 1, 3 и 6 месяцев**

Table. The frequency of micronucleated cells in buccal cell smears and in cultures of cytokinesis-blocked peripheral blood T-lymphocytes (%) of tick-borne encephalitis patients, depending on the burden of active (+) or inactive (0) variants of *GSTM1* and *GSTT1* glutathione-S-transferase genes in the genotypes ( $\pm$ ), obtained repeatedly during admission of patients to hospital, and also after 1 week, 1, 3 and 6 months

Типы клеток Types of cells	Группы Groups	Сочетания активных (+) или неактивных (0) вариантов генотипов <i>GSTM1/GSTT1</i> (%) Combinations of active (+) or inactive (0) variants of genotypes <i>GSTM1/GSTT1</i> (%)			
		<i>GSTM1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (0/0)	<i>GSTM1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (+)	<i>GSTM1</i> (+) <i>GSTT1</i> (0/0)	<i>GSTM1</i> (+) <i>GSTT1</i> (+)
Буккальные клетки Buccal cells	<b>Здоровые доноры (контроль)</b> Healthy donors (control)	0,26 $\pm$ 0,05 n = 8	0,40 $\pm$ 0,08 n = 9	0,31 $\pm$ 0,04 n = 7	0,19 $\pm$ 0,06 n = 11
	<b>Больные 1-2 день госпитализации</b> Patients 1 to 2 days after admission	*5,11 $\pm$ 0,18 <sup>##</sup> n = 12	3,34 $\pm$ 0,16 <sup>##</sup> n = 14	2,59 $\pm$ 0,05 <sup>#</sup> n = 13	2,08 $\pm$ 0,09 <sup>^</sup> n = 15
	<b>Через 1 неделю</b> In a week	1,69 $\pm$ 0,18 <sup>##</sup> n = 10	1,82 $\pm$ 0,23 <sup>##</sup> n = 12	0,79 $\pm$ 0,09 <sup>##</sup> n = 11	0,71 $\pm$ 0,20 <sup>^</sup> n = 15
	<b>Через 1 месяц</b> In a month	0,69 $\pm$ 0,05 <sup>##</sup> n = 10	0,59 $\pm$ 0,06 n = 14	0,40 $\pm$ 0,10 n = 10	0,21 $\pm$ 0,04 n = 13
	<b>Через 3 месяца</b> In 3 months	0,41 $\pm$ 0,08 n = 10	0,55 $\pm$ 0,10 n = 12	0,32 $\pm$ 0,05 n = 10	0,19 $\pm$ 0,08 n = 11
	<b>Через 6 месяцев</b> In 6 months	0,38 $\pm$ 0,03 n = 10	0,36 $\pm$ 0,04 n = 11	0,32 $\pm$ 0,03 n = 11	0,21 $\pm$ 0,06 n = 11
Цитокинез-блокированные Т-лимфоциты периферической крови Cytokinesis-blocked peripheral blood T-lymphocytes	<b>Здоровые доноры</b> Healthy donors (control)	0,36 $\pm$ 0,05 n = 10	0,34 $\pm$ 0,06 n = 10	0,42 $\pm$ 0,11 n = 10	0,24 $\pm$ 0,06 n = 11
	<b>Больные 1-2 день госпитализации</b> Patients 1 to 2 days after admission	8,08 $\pm$ 0,21 <sup>##</sup> n = 12	6,44 $\pm$ 0,40 <sup>##</sup> n = 14	3,01 $\pm$ 0,13 <sup>^</sup> n = 13	2,92 $\pm$ 0,11 <sup>^</sup> n = 15
	<b>Через 1 неделю</b> In a week	6,32 $\pm$ 0,43 <sup>##</sup> n = 10	4,56 $\pm$ 0,18 <sup>##</sup> n = 12	2,86 $\pm$ 0,19 <sup>^</sup> n = 11	2,54 $\pm$ 0,14 <sup>^</sup> n = 13
	<b>Через 1 месяц</b> In a month	3,22 $\pm$ 0,18 <sup>##</sup> n = 10	2,52 $\pm$ 0,21 <sup>^</sup> n = 14	2,08 $\pm$ 0,15 <sup>^</sup> n = 10	2,03 $\pm$ 0,12 <sup>^</sup> n = 13
	<b>Через 3 месяца</b> In 3 month	0,99 $\pm$ 0,05 <sup>##</sup> n = 10	0,90 $\pm$ 0,05 <sup>##</sup> n = 12	0,81 $\pm$ 0,05 <sup>^</sup> n = 10	0,70 $\pm$ 0,05 <sup>^</sup> n = 11
	<b>Через 6 месяцев</b> In 6 month	0,41 $\pm$ 0,04 <sup>#</sup> n = 10	0,27 $\pm$ 0,07 n = 11	0,32 $\pm$ 0,04 n = 11	0,21 $\pm$ 0,05 n = 10

**Примечание.** \*Значимые отличия частоты клеток с микроядрами отмечены одним символом при  $p < 0,05$  и двумя символами при  $p < 0,01$ : знаком (\*) групп больных клещевым энцефалитом от контроля, а знаком (#) групп больных клещевым энцефалитом с генотипами *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0) от группы больных клещевым энцефалитом с активными вариантами обоих генов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+).

Note. \*Significant differences in the frequency of micronucleated cells are marked with one symbol in case of  $p < 0.05$  and two symbols in case of  $p < 0.01$ : the sign of (\*) marks significant differences groups of tick-borne encephalitis patients as compared to the controls, and the sign (#) marks significant differences groups of the tick-borne encephalitis patients with genotypes *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) or *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0) as compared to the group of patients with active variants of both genes *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+).

зогенного происхождения, и тесно связан с индивидуальной восприимчивостью к этим веществам [4, 8, 16]. Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* могут иметь относительно протяженные делеции, приводящие к утрате функционирования этих генов, которые обычно обозначают как «нулевые» аллели *GSTM1(0/0)* или *GSTT1(0/0)* [4, 8]. Такие мутации ассоциированы с отсутствием продукции соответствующих ферментов, что приводит к значительному повышению повреждающего действия мутагенов, в том числе реактивных форм кислорода и оксида азота на ДНК. Встречаемость таких делеций в популяциях очень высока, поскольку установлено, что до половины европеоидного населения являются гомозиготами по делеции гена *GSTM1* и около 15% по делеции гена *GSTT1* [6, 13].

В настоящее время, показано, что полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1*, связанный с делецией этих генов играет важную роль в повышенном риске не только некоторых типов рака [13, 19], но и более тяжелого течения инфекционных заболеваний, таких как туберкулез, малярия, ВИЧ-инфекция и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [5, 7, 12, 15].

Во многих исследованиях, доказана связь между носительством делеций *GSTM1* и/или

*GSTT1* и значительным повышением уровня клеток с повреждениями ДНК и/или цитогенетических нарушений, включая частоту клеток с МЯ, что связывают как с эффектами некоторых мутагенов, так и с активацией окислительного стресса [16, 18].

## Заключение

Показано, что у больных лихорадочной формой КЭ в острый и реконвалесцентный периоды заболевания наблюдается существенное увеличение частоты встречаемости иммунокомпетентных (лимфоцитов) и неиммунокомпетентных (буккальных) клеток с МЯ, по сравнению со здоровыми людьми, что зависит от носительства в генотипе больного активных или неактивных (делеционных) вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*. Установлено, что наиболее выраженное и длительное (до 6 месяцев) сохранение повышенной частоты клеток с цитогенетическими нарушениями было обнаружено в цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах периферической крови больных КЭ, являющихся носителями генотипа с неактивными аллелями двух генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*.

## Список литературы/References

- Захарычева Т.А., Ковальский Ю.Г., Лебедько О.А., Мжельская Т.В. Оксидативный стресс у больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2012. Т. 20, № 8. С. 41–45. [Zaharicheva T.A., Koval'skii Yu. G., Lebed'ko O.A., Mzhel'skaya T.V. Oxidative stress in patients with tick-borne encephalitis in the Far East of The Russian Federation. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii = Far Eastern Journal of Infectious Pathology*, 2012, vol. 20, no. 8, pp. 41–45. (In Russ.)]
- Ильинских И.Н., Ильинских Е.Н., Новицкий В.В., Ильинских Н.Н., Ткаченко С.Б. Инфекционная кариопатология. Томск: Томский государственный университет, 2005. 168 с. [Il'inskih I.N., Novickij V.V., Il'inskih E.N., Il'inskih N.N., Tkachenko S.B. Infectious karyopathology. *Tomsk: Tomskij gosudarstvennyj universitet*, 2005. 168 p. (In Russ.)]
- Ильинских Н.Н., Васильев С.А., Кравцов В.Ю. Микроядерный тест в скрининге и мониторинге мутагенов. Saarbrücken (Deutschland): LAP LAMBERT Academic Publishen. GmbH&Co.KG., 2011. 216 с. [Il'inskih N.N., Vasil'ev S.A., Kravcov V.Ju. Micronuclear test in screening and monitoring of mutagens. *Saarbrücken (Deutschland). LAP LAMBERT Academic Publishen. GmbH&Co.KG.*, 2011, 216 p. (In Russ.)]
- Леготкин А.Н., Лопатина А.Б. Исследование генов GSTP1, GSTT1, GSTM1 // Успехи современной науки. 2016. Т. 2, № 9. С. 23–25. [Legotkin, A.N., Lopatina A.B. Study of genes of GSTP1, GSTT1, GSTM1. *Uspehi sovremennoj nauki = Successes of Contemporary Science*, 2016, vol. 2, no. 9, pp. 23–25. (In Russ.)]
- Степанова Н.А., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Синдром интоксикации у больных туберкулезом легких в зависимости от полиморфизма генов системы глутатионтрансфераз // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 2. С. 13–16. [Stepanova N.A., Kantemirova B.I., Galimzyanov Kh.M. Intoxication syndrome in patients with pulmonary tuberculosis in relation to the system glutathione transferase gene polymorphism. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 13–16. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-13-16 (In Russ.)]
- Филиппова И.Н., Хрунин А.В., Лимборская С.А. Анализ делеции гена GSTM1 в контексте гаплотипического разнообразия геномного кластера GSTM в трех русских популяциях // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 2. С. 8–12. [Filippova I.N., Khrunin A.V., Limborska S.A. Analysis of GSTM1 gene deletion in the context of the haplotype diversity of the GSTM genomic cluster in three Russian populations. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2014, no. 2, pp. 8–12. (In Russ.)]
- Хасанова Г.М., Тутельян А.В., Валишин Д.А., Хасанова А.Н. Прогностическая значимость полиморфизма генов ферментов детоксикации у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 73–78. [Hasanova G.M., Valishin D.A., Tutel'jan A.V., Hasanova A.N. Forecasting model of gene enzyme polymorphism detoxification in patients suffered from HFRS. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 73–78. (In Russ.)]
- Bigatti M.P., Santovito A. Glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and M1 (GSTM1) polymorphisms in a sample of the population in Northern Italy. *Russ. J. Genetics*, 2007, vol. 43, iss. 6, pp. 685–688.
- Board P.G., Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Acta Biochim. Biophys.*, 2013, vol. 1830, no. 5, pp. 3267–3288. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.019

10. Bolognesi C., Fenech M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol. Biol.*, 2013, vol. 1044, pp. 191–207. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3\_10
11. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surrallés J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, pp. 125–132. doi: 10.1093/mutage/geq052
12. Fernandes R.C., Hasan M., Gupta H., Geetha K., Rai P.S., Hande M.H., D'Souza S.C., Adhikari P., Brand A., Satyamoorthy K. Host genetic variations in glutathione-S-transferases, superoxide dismutases and catalase genes influence susceptibility to malaria infection in an Indian population. *Mol. Genet. Genomics*, 2015, vol. 290, no. 3, pp. 1155–1168. doi: 10.1007/s00438-014-0984-4
13. Hung R.J., Boffetta P., Brockmüller J., Butkiewicz D., Cascorbi I., Clapper M.L., Garte S., Haugen A., Hirvonen A., Anttila S., Kalina I., Le Marchand L., London S.J., Rannug A., Romkes M., Salagovic J., Schoket B., Gaspari L., Taioli E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*, 2003, vol. 24, no. 5, pp. 875–882. doi: 10.1093/carcin/bgg026
14. Il'inskikh N.N., Il'inskikh I.N. Effect of virus of tick-borne encephalitis virus on the chromosome apparatus of human cells. *Tsitol. Genet.*, 1976, vol. 10, no. 4, pp. 331–333.
15. Parsons M., Campa A., Lai S., Li Y., Martinez J.D., Murillo J., Greer P., Martinez S.S., Baum M.K. Effect of GSTM1-polymorphism on disease progression and oxidative stress in HIV infection: modulation by HIV/HCV co-infection and alcohol consumption. *J. AIDS Clin. Res.*, 2013, vol. 4, no. 9, pp. 248–252. doi: 10.4172/2155-6113.1000237
16. Priya K., Yadav A., Kumar N., Gulati S., Aggarwal N., Gupta R. Glutathione S-transferase gene polymorphisms: modulator of genetic damage in gasoline pump workers. *Int. J. Toxicol.*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 500–504. doi: 10.1177/1091581815603935
17. Saha S.K., Lee S.B., Won J., Choi H.Y., Kim K., Yang G.M., Dayem A.A., Cho S.G. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 7: e1544. doi: 10.3390/ijms18071544
18. Skjelbred C.F., Svendsen M., Haugan V., Eek A.K., Clausen K.O., Kure E.H., Tuimala J.T., Svendsen M.V., Norppa H., Hansteen I.L. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT1, NAT2, EPHX1, MTR and MTHFR polymorphism on chromosomal aberration frequencies in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 2011, vol. 32, no. 3, pp. 399–405. doi: 10.1093/carcin/bgq246
19. Zeng Y., Bai J., Deng L.C., Xie Y.P., Zhao F., Huang Y. Association of the glutathione S-transferase T1 null genotype with risk of gastric cancer: a meta-analysis in asian populations. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016, vol. 17, no. 3, pp. 1141–1148.

**Авторы:**

**Ильинских Н.Н.**, д.б.н., профессор, профессор кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия; профессор кафедры экологии, природопользования и экологической инженерии ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия;  
**Ильинских Е.Н.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия; профессор кафедры экологии, природопользования и экологической инженерии ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия;  
**Замятина Е.В.**, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия;  
**Ли С.В.**, студент 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия.

**Authors:**

**Ilyinskikh N.N.**, PhD, MD (Biology), Professor, Professor of Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Professor of Department of Ecology, Nature Management and Environmental Engineering, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation;  
**Ilyinskikh E.N.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Professor of Department of Ecology, Nature Management and Environmental Engineering, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation;  
**Zamyatina E.V.**, Assistant of Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;  
**Lee S.V.**, 5<sup>th</sup> year Student of the Pediatric Faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.