

Е.Н. ИЛЬИНСКИХ,
И.Н. ИЛЬИНСКИХ, А.Г. СЕМЕНОВ

Сибирский государственный медицинский университет, Томск
E-mail: infconf2009@yahoo.com

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗОМ



Известно, что среди биологических мутагенных факторов цитогенетические нарушения способны вызвать не только вирусы, но и некоторые бактерии. Цель настоящей работы заключалась в характеристике цитогенетического статуса больных острым иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ). В результате проведенных исследований установлено, что в культурах мононуклеарных клеток больных ИКБ, по сравнению с контролем, происходит значительный рост числа лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями анеугенного типа в виде появления клеток с полиплоидией, гипоплоидией и эндоредупликацией, а также кластогенного типа в виде хроматидных и, в меньшей степени, хромосомных разрывов при одновременном подавлении пролиферативного ответа на митоген и увеличении элиминации генетически поврежденных клеток путем апоптоза.

© Е.Н. ИЛЬИНСКИХ, И.Н. ИЛЬИНСКИХ,
А.Г. СЕМЕНОВ, 2013

Введение. Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — острое инфекционное трансмиссивное природно-очаговое заболевание, имеющее тенденцию к хроническому и рецидивирующему течению, поражающее различные органы и системы.

Установлено, что способностью вызывать цитогенетические нарушения обладают не только факторы физической (ионизирующее излучение) или химической природы (мутагенные соединения), но и инфекционные агенты. Начиная с 60-х годов прошлого столетия, благодаря работам многих исследователей стало очевидно, что вирусы могут индуцировать разнообразные нарушения ядерного аппарата клетки [2, 3]. Дальнейшие исследования показали, что цитогенетические нарушения способны вызвать не только внутриклеточные паразиты, такие как вирусы, но и внеклеточные возбудители различных инфекционных заболеваний, включая бактерии, простейшие и гельминты [4–8]. Предполагают, что в этом случае индукция хромосомных aberrаций носит опосредованный характер и ассоциирована с развитием воспалительных и иммунопатологических процессов в организме больного человека. Среди клещевых инфекций наиболее хорошо изучены цитогенетические нарушения у больных клещевым энцефалитом [7, 8]. Цель настоящей работы заключалась в характеристике цитогенетического статуса больных острым ИКБ.

Материалы и методы. Обследовано 12 больных с диагнозом серопозитивного варианта острого ИКБ, госпитализированных в клинику инфекционных болезней Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) на 2–3-й неделе заболевания (группа IA), а также 10 пациентов из этой же группы в период реконвалесценции через три месяца после эффективного курса антибиотикотерапии (группа IB). Выздоровление больных было подтверждено отсутствием клинической симптоматики и отрицательными результатами серологического обследования в течение одного года диспансерного наблюдения. Для исключения клещевого энцефалита и лабораторного подтверждения диагноза ИКБ использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в динамике. Контрольная группа (группа II)

состояла из 12 здоровых лиц, не болевших иксодовым клещевым боррелиозом, не подвергавшихся ранее укусам клещей и не имевших в крови специфических антител к антигенам боррелий.

При поступлении в стационар до назначения антибиотиков у всех обследованных лиц в пробирки с гепарином было взято 25 мл венозной крови. Мононуклеарные клетки выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Raque («Pharmacia», Швеция). Клетки инкубировали во флаконах (около $2 \cdot 10^6$ клеток/мл) в среде RPMI-1640 («ПанЭко», РФ) с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл бензилпеницилина) при 37 °С в присутствии 5 % CO₂. Для стимуляции мононуклеарных клеток использовали 10 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА) («ПанЭко», РФ).

Кроме того, в ряде экспериментов в условиях *in vitro* в культуры мононуклеарных клеток добавляли инактивированный корпускулярный антиген *Borrelia garinii*, который получили из коллекции штаммов боррелий отдела разработки и экспериментального производства препаратов НПО «Вирион» филиала ФГУП «НПО Микроген» МЗ РФ (Томск, РФ). Выбор вида боррелий *B. garinii* обусловлен его широким распространением на территории Западной Сибири [9]. Боррелии предварительно культивировали в среде Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK H, «Sigma») при 32 °С, затем инактивировали нагреванием. Максимальная концентрация боррелий в пробах составила около $2 \cdot 10^9$ спирохет/мл.

Для постановки спонтанной и ФГА-стимулированной реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) клетки культивировали в течение 72 ч. После окончания культивирования готовили мазки, которые фиксировали в этаноле и окрашивали азур II-эозином. При оценке РБТЛ применялся стандартный морфологический метод с анализом не менее 1000 клеток в препаратах [10]. Для изучения атипичных форм митоза в препаратах вначале подсчитывали общее количество митозов на 3000 просмотренных клеток, затем среди выявленных делений определяли частоту встречаемости различных типов патологических митозов [3, 11]. Кроме того,

в этих же препаратах осуществляли анализ клеток с кариопатологическими изменениями, включая появление бинуклеаров и многоядерных клеток, клеток с микроядрами, а также с деформацией ядер [7, 12].

Для получения препаратов хромосомного анализа культивирование ФГА-стимулированных клеток осуществляли в течение 52 ч. Колхицин добавляли за 2 ч до фиксации клеток в концентрации 0,5 мкг/мл культуральной смеси [13]. Гипотоническую обработку проводили, добавляя к осадку раствор 0,55 % хлорида калия. Фиксировали клетки в трех сменах охлажденного свежеприготовленного фиксатора (3 части этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты). В последней смене фиксатора клетки тщательно ресуспендировали, полученную взвесь раскапывали пипеткой на охлажденные предметные стекла и высушивали. Препараты окрашивали азур II-эозином. У каждого человека или варианта опыта в условиях *in vitro* анализировали не менее 200 метафаз. Изучение хромосом проводили при увеличении 10×90. Метафазные пластинки с цитогенетическими нарушениями фотографировали при помощи цифровой фотокамеры, переносили полученные изображения в компьютер. При изучении характера структурных aberrаций хромосом учитывали хроматидные и хромосомные разрывы, одиночные и парные фрагменты, обмены, центрические кольца, дицентрики и другие асимметричные транслокации. Пробелы («гепы») при анализе не принимали во внимание [14].

Для оценки числа клеток в состоянии апоптоза и уровня пролиферативного ответа лимфоцитов использовали метод лазерной проточной цитометрии с детекцией иммунофлуоресцентно окрашенных клеток, инкорпорировавших бромдезоксисуридин (БДУ) с использованием набора FITC BrdU Flow Kit («BD Pharmingen», США) [15]. Культуры клеток получены как описано выше с последующей инкубацией в течение 52 ч. БДУ добавляли в конечной концентрации 10 мкМ/мл культуры мононуклеарных клеток, стимулированных или не стимулированных ФГА (спонтанный уровень), в срок за 12 ч до конца инкубации. Подготовку проб для

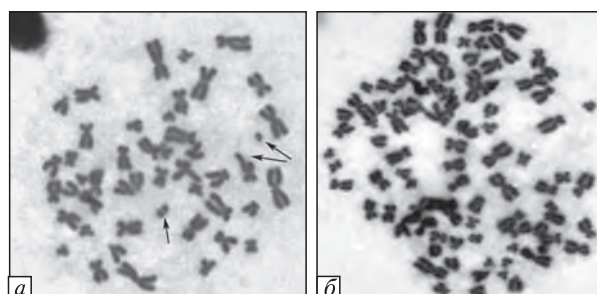


Рис. 1. Цитогенетические нарушения в культурах лимфоцитов больных острым ИКБ: *a* – метафазная пластинка со структурными aberrациями хромосом (хроматидная делеция, одиночный и парный фрагменты хромосом); *б* – полиплоидная клетка. Окраска азур II-эозином. Ув. $\times 900$

анализа проводили согласно инструкции производителя набора. Сначала меченные БДУ клетки, предварительно собранные в пробирки (10^6 клеток на пробу), подвергали трехкратной фиксации и обработке, приводящей к повышению проницаемости клеточных мембран, с использованием BD Cytotfix/Cytoperm и BD Cytoperm Plus буферов. После этого

ресуспендированные клетки в течение 1 ч при 37°C обрабатывали ДНКазой (30 мкг на пробу), чтобы выявить эпитопы инкорпорированного БДУ, а затем при комнатной температуре в течение 20 мин окрашивали анти-БДУ антителами, мечеными флюоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ), которые разводили в BD Perm/Wash буфере (1:50). Для выявления общего содержания клеточной ДНК использовали 7-амино-актиномицин D (7-AAD; 20 мкг на пробу). Анализ числа (%) клеток, одновременно окрашенных 7-AAD (канал FL3) и анти-БДУ ФИТЦ-мечеными моноклональными антителами (канал FL1), осуществляли с помощью проточного цитометра FACSCalibur («Becton Dickinson», США), оснащенного системой детекторов для 488 нм лазера, и программы CellQuest («Becton Dickinson», США). Поскольку аналог тимидина БДУ инкорпорируется в синтезируемую ДНК в течение фазы синтеза (S) клеточного цикла, то пул клеток, окрашенный анти-БДУ антителами, соответствует этой фазе клеточного цикла. Одновременная окраска клеток на об-

Таблица 1

Цитогенетические нарушения в лимфоцитах периферической крови больных острым ИКБ ($M \pm m$)

Показатель	Больные острым ИКБ (группа IA), $n = 12$	Реконвалесценты ИКБ (группа IB), $n = 10$	Контрольная группа (группа II), $n = 12$
Количество проанализированных метафаз	2883	2164	2465
Частота клеток со структурными нарушениями хромосом, %	$7,51 \pm 0,54^*$	$1,49 \pm 0,32^{**}$	$1,40 \pm 0,27$
В том числе			
хроматидные разрывы	$5,60 \pm 0,45^*$	$1,19 \pm 0,23^{**}$	$0,91 \pm 0,26$
хромосомные разрывы	$1,62 \pm 0,22^*$	$0,18 \pm 0,08^{**}$	$0,32 \pm 0,12$
обмены	$0,21 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,06$
Частота клеток с измененным числом хромосом в наборе, %	$8,96 \pm 0,85^*$	$2,61 \pm 0,74^{**}$	$1,82 \pm 0,35$
В том числе			
гипоплоидные	$3,90 \pm 0,50^*$	$1,71 \pm 0,31^{**}$	$1,32 \pm 0,14$
гиперплоидные	$0,16 \pm 0,10$	$0,20 \pm 0,13$	$0,25 \pm 0,13$
полиплоидные	$3,70 \pm 0,51^*$	$0,70 \pm 0,15^{**}$	$0,25 \pm 0,13$
эндоредупликации	$1,11 \pm 0,62$	0	0
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями, %	$16,45 \pm 1,73^*$	$4,10 \pm 0,97^{**}$	$3,22 \pm 0,28$

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – численность группы. * $p < 0,01$ – значимость различий между группами IA и II (контролем); ** $p < 0,01$ – между группами IA и IB.

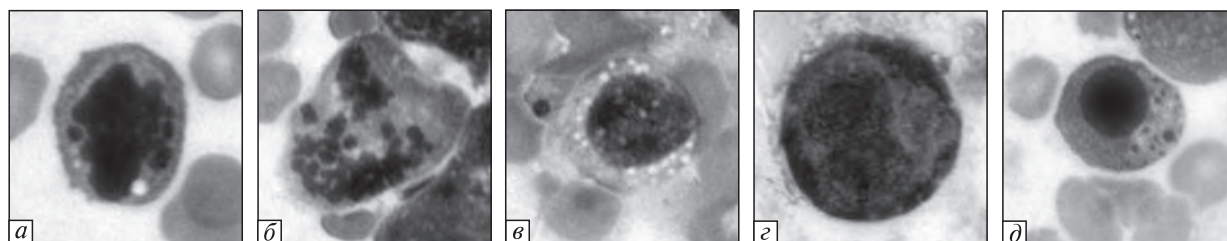


Рис. 2. Клетки с различными типами патологии митозов и кариопатологическими изменениями в культурах лимфоцитов больных острым ИКБ: *a* – клетка с отставанием хромосом в метафазе; *b* – клетка с многогрупповой метафазой; *в* – клетка с микроядром; *г* – бинуклеарная клетка с микроядром; *д* – клетка с кариопикнозом и кариорексисом. Окраска азури II-эозином. Ув. ×900

шее содержание ДНК с использованием 7-AAD позволяет с помощью двухцветной лазерной проточной цитометрии определить число мононуклеарных клеток *in vitro*, инкорпорировавших БДУ, которые находились в состоянии апоптоза (суб- G_0/G_1 -фаза) или в разных фазах клеточного цикла: в G_0/G_1 -фазах, в фазе синтеза или S-фазе, а также в фазах митоза и подготовки к митозу (G_2/M -фазы).

Кроме того, для более точного определения числа клеток в культурах, находящихся в фазе апоптоза, использовали набор Apo-BrdU Kit («BD Pharmingen», США), позволяющий выявлять последний этап апоптоза – фрагментацию ДНК вследствие активации эндонуклеаз [16]. Метод основан на использовании фермента дезоксиинуклеотидил транс-

феразы (TdT), который катализирует добавление бром-дезоксисуридин трифосфатов (BrdU-UTP) к 3'-гидроксильным группам в местах разрывов ДНК, после чего инкорпорированные BrdU-UTP выявляются с помощью ФИТЦ-меченных анти-БДУ антител. Подготовку проб для анализа осуществляли согласно протоколу производителя набора. Культуры ФГА-стимулированных клеток, выращенные как описано выше в течение 52 ч (без предварительного добавления БДУ в культуру), в концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток на пробу ресуспендировали и фиксировали на льду 1%-ным параформальдегидом в течение 50 мин, после чего обрабатывали охлажденным 70%-ным этанолом и замораживали при -20°C в течение 10 дней. Оттаявшие клетки, полу-

Таблица 2
Патологические митозы и частота клеток с кариопатологическими изменениями в лимфоцитах периферической крови больных острым ИКБ ($M \pm m$)

Показатель	Больные острым ИКБ (группа IA), $n = 12$	Реконвалесценты ИКБ (группа IB), $n = 10$	Контрольная группа (группа II), $n = 12$
Частота клеток с патологией митоза, %	$6,59 \pm 0,51^*$	$0,91 \pm 0,18^{**}$	$1,31 \pm 0,19$
В том числе			
отставание хромосом в метафазе	$2,98 \pm 0,50^*$	$0,25 \pm 0,06^{**}$	$0,4 \pm 0,23$
отставание хромосом в ана-телофазе	$1,12 \pm 0,24^*$	$0,21 \pm 0,15^{**}$	$0,3 \pm 0,16$
многогрупповая метафаза	$1,04 \pm 0,15^*$	$0,18 \pm 0,11^{**}$	$0,20 \pm 0,12$
многополюсный митоз	$0,96 \pm 0,11^*$	$0,16 \pm 0,09^{**}$	$0,22 \pm 0,08$
Число клеток с кариопатологическими изменениями, %			
микроядра	$4,82 \pm 0,41^*$	$1,19 \pm 0,23^{**}$	$0,75 \pm 0,08$
кариопикноз	$6,50 \pm 0,23^*$	$0,08 \pm 0,02^{**}$	$0,12 \pm 0,03$
кариорексис	$5,26 \pm 0,33^*$	$0,06 \pm 0,04^{**}$	$0,10 \pm 0,06$
бинуклеары	$3,90 \pm 0,62^*$	$0,14 \pm 0,09^{**}$	$0,11 \pm 0,04$

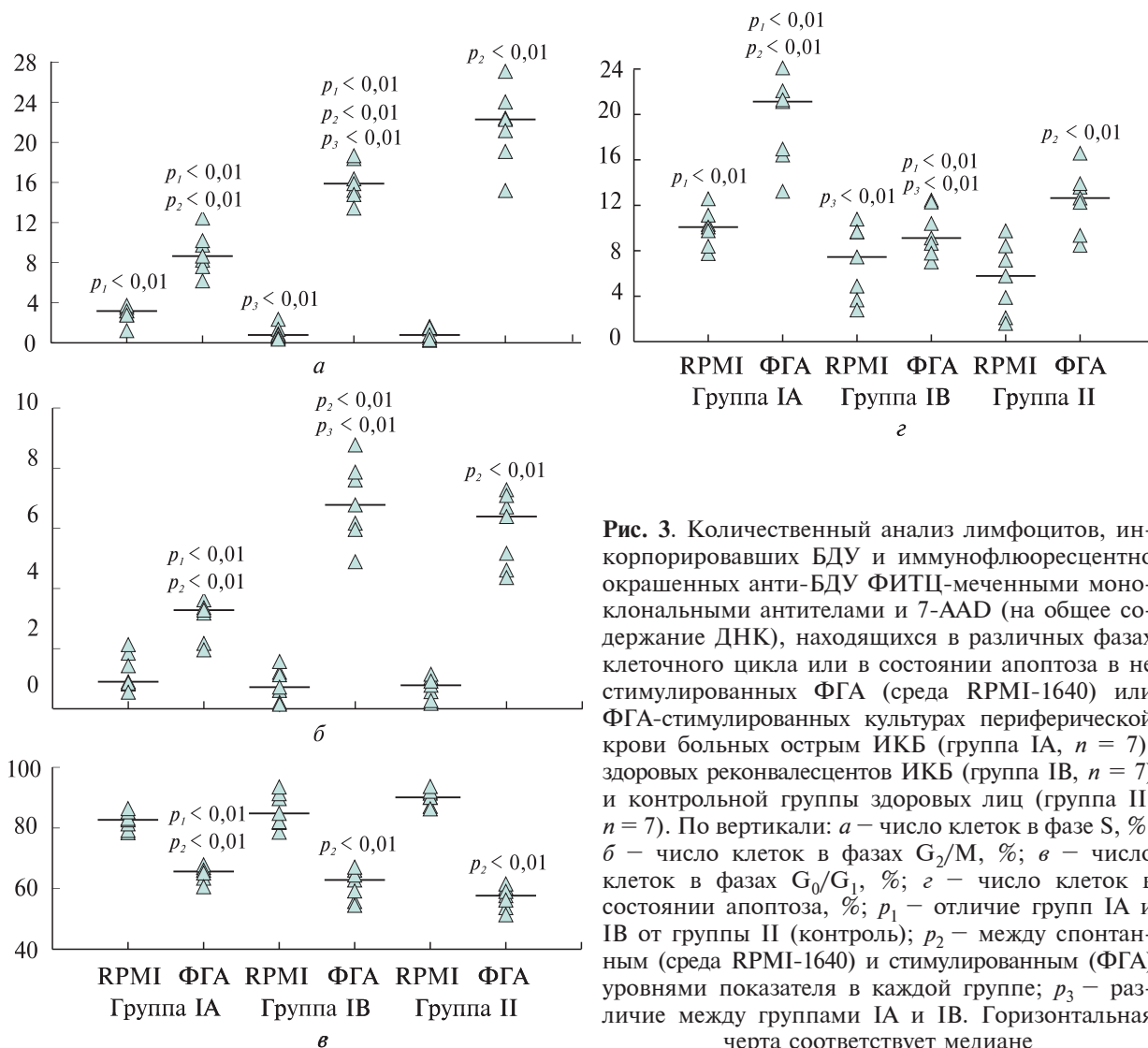


Рис. 3. Количественный анализ лимфоцитов, инкорпорировавших БДУ и иммунофлуоресцентно окрашенных анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами и 7-ААД (на общее содержание ДНК), находящихся в различных фазах клеточного цикла или в состоянии апоптоза в не стимулированных ФГА (среда RPMI-1640) или ФГА-стимулированных культурах периферической крови больных острым ИКБ (группа IA, $n = 7$), здоровых реконвалесцентов ИКБ (группа IB, $n = 7$) и контрольной группы здоровых лиц (группа II, $n = 7$). По вертикали: а – число клеток в фазе S, %; б – число клеток в фазах G_2/M , %; в – число клеток в состоянии апоптоза, %; p_1 – отличие групп IA и IB от группы II (контроль); p_2 – между спонтанным (среда RPMI-1640) и стимулированным (ФГА) уровнями показателя в каждой группе; p_3 – различие между группами IA и IB. Горизонтальная черта соответствует медиане

ченные от больных и контрольных людей, а также клетки позитивного и негативного контроля, которые поставляются вместе с набором, повторно ресуспендировали и промывали в BD Wash буфере, после чего клетки обрабатывали в течение 60 мин при 37 °С раствором для мечения ДНК, содержащим TdT фермент (0,75 мкл на пробу) и BrdUTP (8 мкл на пробу). Клетки повторно промывали специальным буфером и окрашивали в темноте в течение 30 мин анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами (5 мкл на анализ). Затем клетки обрабатывали пропидиум йодид/РНКаза-содержащим

окрашивающим буфером (0,5 мл на пробу) для определения общего содержания ДНК. Анализ числа (%) клеток, одновременно окрашенных пропидиум йодидом и ФИТЦ, проведенный с помощью проточного цитометра FACSCalibur и программы CellQuest («Vector Dickinson», США), позволяет идентифицировать клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, и отличить их от неапоптотически погибших клеток, которые не могут инкорпорировать BrdUTP.

Кроме того, провели ряд экспериментов с целью изучения способности инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* ин-

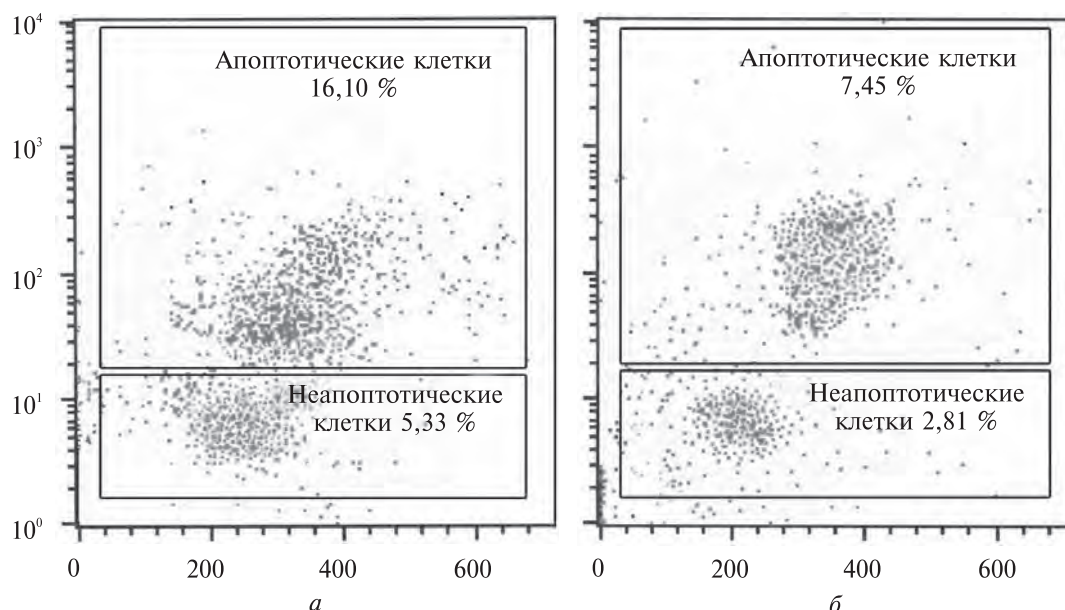


Рис. 4. Региональные гейты количественного анализа популяций лимфоцитов, иммунофлуоресцентно окрашенных пропидиум йодидом (PI) и анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами, который позволил идентифицировать число клеток, погибших путем апоптоза или некроза (неапоптотические клетки) в ФГА-стимулированных культурах периферической крови: *a* – больных острым ИКБ ($n = 9$); *б* – контрольной группы ($n = 9$)

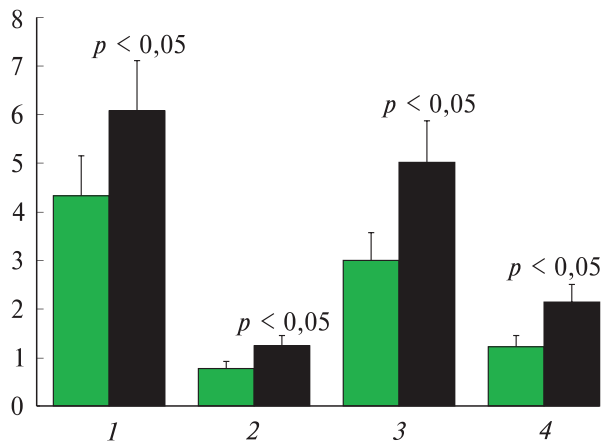


Рис. 5. Частота клеток с различными типами цитогенетических нарушений (по вертикали, %), индуцированных *in vitro* в результате добавления в ФГА-стимулированные культуры лимфоцитов периферической крови группы здоровых людей ($n = 10$) различных доз инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* с соотношением клеток и боррелий 1:10 (□) или 1:20 (■). По горизонтали – хроматидные (1) и хромосомные разрывы (2), гипоплоидия (3) и полиплоидия (4). Значимость различий между исследуемыми группами обозначена как p

дуцировать в условиях *in vitro* цитогенетические нарушения, различные патологии митоза или апоптоз в результате добавления этого антигена в культуры мононуклеарных клеток периферической крови здоровых людей (контрольной группы II). Для предварительного подбора оптимальной дозы антигена в культуры лимфоцитов боррелии добавляли в начале культивирования, смешивая клетки с антигеном в соотношениях 1:10, 1:20 или 1:50, в соответствии с методикой, описанной Perticarari et al. [17]. Для изучения числа клеток с цитогенетическими нарушениями или патологией митоза ФГА-стимулированные культуры с добавлением или без добавления (интактные) антигена боррелий культивировали в течение 52 ч. В результате проведенного эксперимента выбрали оптимальную концентрацию инактивированного антигена боррелий (соотношение клеток в культуре и боррелий 1:10).

Для изучения числа клеток в состоянии апоптоза с помощью проточной цитометрии и набора Apo-BrdU Kit («BD Pharmingen», США) стимулированные и не стимулированные (интактные) антигеном культуры моно-

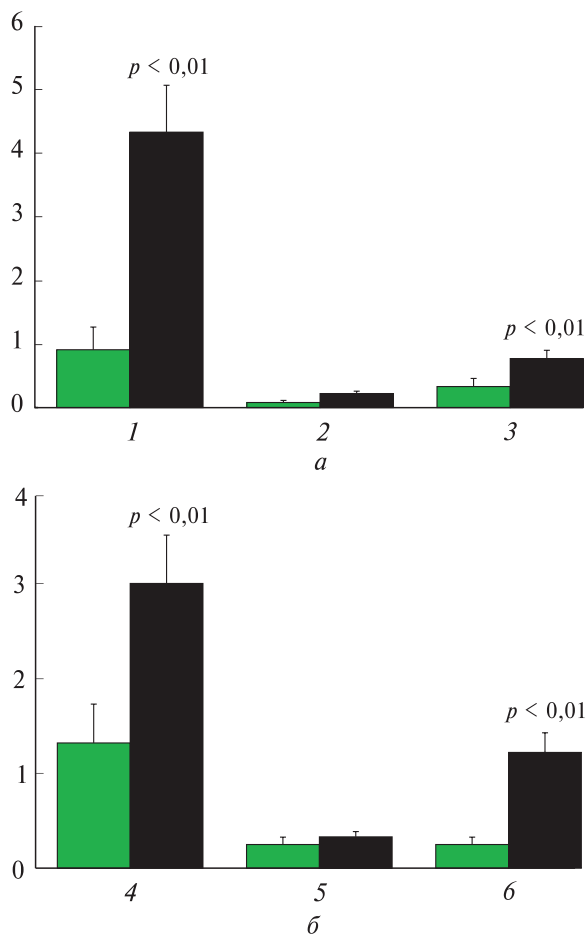


Рис. 6. Частота клеток с цитогенетическими нарушениями (по вертикали, %), индуцированными *in vitro* после введения в ФГА-стимулированные культуры лимфоцитов периферической крови группы здоровых лиц ($n = 12$) инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* с соотношением клеток и боррелий 1:10: *a* – частота клеток со структурными aberrациями хромосом; *б* – частота клеток с измененным числом хромосом в наборе; по горизонтали 1 – хроматидные разрывы; 2 – обмены; 3 – хромосомные разрывы; 4 – гипоплоидия; 5 – гиперплоидия; 6 – полиплоидия. ■ – в интактных культурах здоровых людей; ■ – в культурах здоровых людей после добавления инактивированного антигена боррелий *B. garinii*. Значимость различий между исследуемыми группами обозначена как *p*

нуклеарных клеток культивировали без добавления ФГА в течение 24 ч.

Для статистической обработки данных использовали стандартный пакет программ «Sta-

tistica 7.0». Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Для оценки различий между выборками в случае нормального распределения применяли *t*-тест Стьюдента или парный критерий Стьюдента (в случае зависимых групп). В остальных случаях для определения статистической значимости различий между независимыми или зависимыми группами использовали непараметрические критерии Манна–Уитни или Уилкоксона соответственно [18]. Полученные результаты представлены как выборочное среднее арифметическое (*M*) и ошибка среднего (*m*). Критический уровень значимости (*p*) при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение.

В табл. 1 приведены результаты оценки цитогенетического статуса у больных ИКБ. Установлено, что из структурных aberrаций хромосом (рис. 1, *a*) в культурах мононуклеарных клеток больных острым ИКБ наблюдается шестикратное по сравнению с соответствующими значениями в контрольной группе повышение числа лимфоцитов с хроматидными разрывами, среди которых преобладали хроматидные делеции и одиночные фрагменты, а также рост в 5,1 раза частоты клеток с хромосомными разрывами. Вместе с тем нами не были обнаружены более сложные хромосомные aberrации типа меж- и внутрихромосомных обменов.

Известно, что aberrации хромосомного типа возникают в G_0 - и G_1 -фазах клеточного цикла, в то время как хроматидные нарушения формируются в G_2 -фазе. Предполагают, что хроматидные aberrации связаны с нарушением процесса репарации разрывов двухцепочечной ДНК [19]. Хроматидные разрывы и фрагменты являются наиболее часто встречающимся типом хромосомных aberrаций, возникающих под действием различных инфекционных агентов, включая аденовирусы, вирусы простого герпеса, гриппа, клещевого энцефалита, кори, а также некоторых бактерий – микоплазм, шигелл и сальмонелл [3, 4, 7, 8].

Изучение частоты клеток с измененным числом хромосом (табл. 1) в культурах мо-

нонуклеаров периферической крови больных острым ИКБ показало существенное увеличение по сравнению со значениями в контрольной группе числа гипоплоидных и полиплоидных лимфоцитов (рис. 1, б), а также появление метафазных пластинок с эндоредупликацией. В период реконвалесценции у тех же больных через 3 мес после проведения эффективного курса антибиотикотерапии уровни клеток с перечисленными структурными aberrациями хромосом, а также с анеуплоидией и полиплоидией не имели достоверных отличий от значений в контроле.

Формирование анеуплоидии в культурах лимфоцитов, полученных от больных острым ИКБ, может быть связано с одновременным появлением отстающих хромосом в делящихся клетках. Анализ атипичных форм митозов (табл. 2) показал существенное повышение числа клеток с отставанием хромосом в метафазе (рис. 2, а) или в ана-телофазе, а также клеток с многогрупповой метафазой (рис. 2, б) или многополюсным митозом в культурах лимфоцитов, полученных от больных острым ИКБ, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) и реконвалесцентами ($p < 0,01$).

Анализ клеток с кариопатологическими изменениями (табл. 2) показал значительное увеличение в культурах больных острым ИКБ лимфоцитов с микроядрами (рис. 2, в) по сравнению с группами контроля ($p < 0,01$) и реконвалесцентов ($p < 0,01$). Кроме того, в культурах больных людей обнаружено значительное увеличение числа не только полиплоидных, но и бинуклеарных клеток, некоторые из которых имели микроядра (рис. 2, г).

Поскольку боррелии в отличие от вирусов не способны проникать в ядро, механизмы образования выявленных нами цитогенетических нарушений вероятнее всего носят опосредованный характер. Известно, что в ходе инфекционного процесса происходит активация образования эндогенных оксидантов, вызывающих окислительный стресс, повреждение ДНК и преждевременное старение клеток [20, 21]. Предполагают, что полиплоидизация клеток, патологический митоз, различные деформации ядра также могут быть связаны с

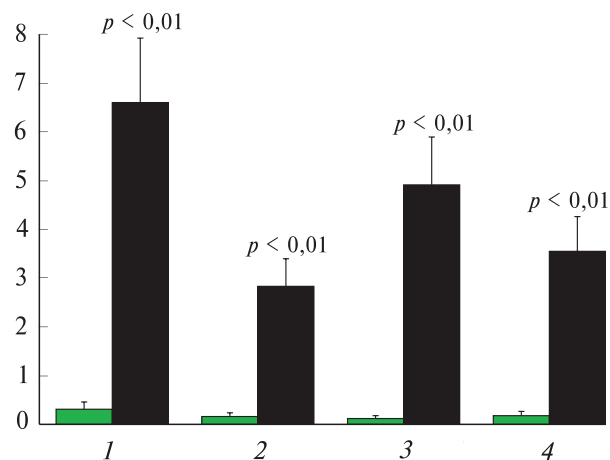


Рис. 7. Частота клеток с патологией митоза (по вертикали, %), индуцированной *in vitro* после введения в ФГА-стимулированные культуры лимфоцитов периферической крови группы здоровых лиц ($n = 12$) инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* с соотношением клеток и боррелий 1:10; по горизонтали 1 – отставание хромосом, 2 – в ана-телофазе, 3 – многогрупповая метафаза, 4 – многополюсный митоз. □ – в интактных культурах здоровых людей; ■ – в культурах здоровых людей после добавления инактивированного антигена боррелий *B. garinii*. Значимость различий между исследуемыми группами обозначена как p

повреждениями ДНК, индуцированными оксидативным стрессом [21–25]. Для стареющих и подвергнутых *in vitro* оксидативному стрессу клеток характерна дисфункция ряда генов, регулирующих клеточный цикл или митоз, особенно генов, которые вовлечены в процессы, связанные с проверочными пунктами в G_1 - и G_2 -фазах, что приводит к нарушению сегрегации хромосом между дочерними клетками в митозе, появлению бинуклеаров, накоплению полиплоидных клеток, а также клеток с кариопикнозом, кариорексисом и множественными микроядрами [21]. Одним из механизмов формирования полиплоидии, гипоплоидии, многогрупповых метафаз и многополюсных митозов при окислительном стрессе и старении является нарушение в числе centrosом [23, 24]. Кроме того, известно, что повреждения ДНК или нарушения в митотическом аппарате деления приводят к аресту клеточного цикла в прометафазе с последующим вхождением в митоз без расхож-

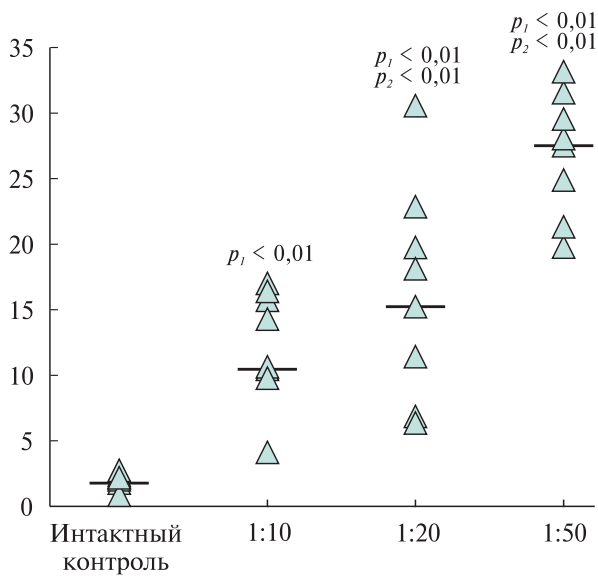


Рис. 8. Количественный анализ популяций клеток (иммунофлуоресцентно окрашенных пропидиум йодидом и анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами), находящихся в состоянии апоптоза (по вертикали, %) индуцированного *in vitro* в результате добавления в культуру лимфоцитов периферической крови группы здоровых людей ($n = 8$) различных доз инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* с соотношением клеток и боррелий 1:10, 1:20 или 1:50 (по горизонтали); p_1 – отличие каждой из групп от интактного контроля; p_2 – отличия между культурами с добавлением доз боррелий 1:50, 1:20 и 1:10

дения сестринских хроматид и образованием тетраплоидных клеток в G_1 -фазе [26, 27]. Как правило, в этих клетках вследствие повышения экспрессии генов супрессоров опухолей – p53 и pRb – заблокировано вхождение в S-фазу и активированы пути апоптотической гибели [20, 25]. На примере раковых клеток показано, что дефекты в p53-зависимых постмитотических путях и избежание ареста клеточного цикла в G_2/M -проверочной точке могут приводить к последующему образованию клеток с отставанием хромосом в митозе, эндоредупликации, недостаточности цитокинеза, в результате чего формируется спонтанная тетраплоидия и бинуклеары [25, 28, 29]. Таким образом, полиплоидизация может быть важным показателем, характеризующим ответ клеток на повреждение ДНК.

В результате определения методом проточной цитометрии числа иммунофлуоресцентно окрашенных клеток, инкорпорировавших БДУ, в ФГА-стимулированных культурах, полученных от больных острым ИКБ (группа IA), установлено достоверное уменьшение числа лимфоцитов в S- и G_2/M -фазах клеточного цикла (рис. 3, а, б) при одновременном существенном увеличении числа клеток в G_0/G_1 -фазах (рис. 3, в) по сравнению с соответствующими значениями в контроле (группа II) и группе реконвалесцентов (группа IB), что косвенно свидетельствует об аресте клеточного цикла в G_1 -фазе. Эти данные, а также результаты ФГА-стимулированной РБТЛ показывают, что в культурах больных острым ИКБ происходило существенное угнетение пролиферативной активности лимфоцитов ($58,90 \pm 1,81$ % по сравнению с $75,31 \pm 1,33$ % в контроле, $p < 0,01$).

Кроме того, в культурах больных ИКБ (табл. 2) отмечено существенное повышение частоты клеток с косвенными признаками апоптоза – кариопикнозом и кариорексисом (рис. 2, д). Как установлено с помощью метода проточной цитометрии, в ФГА-стимулированных культурах периферической крови больных острым ИКБ по сравнению с группами контроля и реконвалесцентов отмечался существенный рост числа лимфоцитов в состоянии апоптоза ($p < 0,01$), что может свидетельствовать об интенсивной элиминации генетически поврежденных клеток (рис. 3, в). Анализ клеток, инкорпорировавших BrdUTP, одновременно окрашенных пропидиум йодидом и анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами (рис. 4, а, б), позволил определить число клеток, находящихся в последней стадии апоптоза и имеющих фрагментацию ДНК вследствие активации эндонуклеаз, и отличить их от неапоптотически погибших клеток. У больных острым ИКБ в стимулированных ФГА культурах лимфоцитов число апоптотических клеток было в 2,1 раза больше, чем в соответствующих культурах здоровых людей ($16,10 \pm 1,14$ % по сравнению с $7,45 \pm 0,68$ %, $p < 0,001$). В то же время число неапоптотически погибших клеток в культурах, полученных от больных острым ИКБ,

было существенно ниже, чем апоптотических, и достоверно не отличалось от контрольных значений ($5,33 \pm 1,03$ % по сравнению с $2,81 \pm 0,72$ % в контроле, $p > 0,05$).

Кроме того, провели ряд экспериментов по изучению способности инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* индуцировать в условиях *in vitro* цитогенетические aberrации, различные патологии митоза или апоптоз в результате добавления этого антигена в культуры мононуклеарных клеток периферической крови здоровых людей (контрольная группа II). Для предварительного подбора оптимальной дозы антигена в стимулированные ФГА культуры лимфоцитов боррелии добавляли в начале культивирования, смешивая клетки с антигеном в соотношениях 1:10 или 1:20.

Из рис. 5 видно, что повышение дозы антигена, который вносили в культуры лимфоцитов здоровых людей, приводило к достоверному увеличению числа клеток с различными типами цитогенетических нарушений, включая хроматидные и хромосомные разрывы и фрагменты, а также гипо- или полиплоидию. На рис. 6, а, б показаны результаты изучения частоты клеток со структурными aberrациями хромосом и измененным числом хромосом в наборе после добавления в культуры лимфоцитов инактивированного антигена боррелий *B. garinii* в дозе 1:10. Среди различных типов цитогенетических нарушений добавление в культуры здоровых людей боррелиозного антигена индуцировало существенное повышение частоты клеток с хроматидными или хромосомными разрывами и фрагментами (рис. 6, а), а также достоверное увеличение числа гипоплоидных и полиплоидных клеток (рис. 6, б) по сравнению с интактными культурами. Кроме того, анализ различных типов патологий митоза (рис. 7) после добавления культуры антигена показал существенное повышение по сравнению с контролем частоты многогрупповых метафаз и многополюсных митозов, а также делений клеток с отставанием хромосом. Таким образом, индуцированные антигеном в условиях *in vitro* цитогенетические нарушения и патологии митоза были аналогичны тем, которые мы наблюдали в культурах лимфоцитов, полученных от больных острым ИКБ.

Более того, анализ с помощью метода проточной цитометрии числа клеток, инкорпорировавших Br-dUTP и находящихся в состоянии апоптоза (рис. 8), после добавления различных доз антигена боррелий (с соотношением клеток и боррелий – 1:10, 1:20 или 1:50) в культуры лимфоцитов, не стимулированных ФГА, показал, что повышение дозы антигена приводило к существенному росту частоты апоптотических клеток по сравнению с интактным контролем. Полученные нами данные в целом сходны с результатами других исследователей. В этих работах установлено, что стимуляция клеток антигенами боррелий *Borrelia burgdorferi* в условиях *in vitro* приводит не только к мощному усилению продукции провоспалительных цитокинов и повышению пролиферации лимфоцитов, но и к усилению апоптотической гибели Т-лимфоцитов и моноцитов [17, 30, 31]. Апоптоз активированных лимфоцитов, называемый активационно-индуцированной клеточной смертью, рассматривается как важный механизм иммунорегуляции, необходимый для снижения числа реактивных клеток [32].

Таким образом, на основании проведенных исследований нами выдвинуто предположение о том, что боррелии и их антигены способны за счет опосредованных механизмов вызывать структурные хромосомные aberrации, анеуплоидию и полиплоидию, а также индуцировать развитие апоптотической гибели лимфоцитов, что, по-видимому, имеет значение для развития инфекционного процесса и взаимодействия возбудителя ИКБ с иммунной системой хозяина.

Выводы. В культурах мононуклеарных клеток больных острым ИКБ происходит значительный рост числа лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями кластогенного и анеугенного типов, при одновременном подавлении пролиферативного ответа на митоген и увеличении элиминации генетически поврежденных клеток путем апоптоза. Из структурных aberrаций хромосом в культурах мононуклеарных клеток больных острым ИКБ установлено существенное повышение числа клеток с хроматидными и, в меньшей степени, хромосомными разрывами. В культурах мононуклеаров периферической крови

больных острым ИКБ показано значительное увеличение числа гипоплоидных, полиплоидных лимфоцитов, а также клеток с микроядрами, митозов с отставанием хромосом, многогрупповых метафаз или многополюсных митозов. Добавление в культуры мононуклеарных клеток здоровых людей инактивированного корпускулярного антигена *B. garinii* приводило к повышению апоптотической гибели, выраженным кластогенным и анеугенным эффектам, а также к увеличению числа клеток с теми же типами цитогенетических нарушений, что и в лимфоцитах больных острым ИКБ.

E.N. Ilyinskikh, I.N. Ilyinskikh, A.G. Semenov

CYTOGENETIC ABERRATIONS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN ACUTE LYME-BORRELIOSIS PATIENTS

It is known that among biological mutagenic factors the cytogenetic aberrations can be induced by not only intracellular parasites like viruses, but also some extracellular infectious agents including bacteria, protozoas and helminthes. The object of this work was to study the cytogenetic status of acute Lyme borreliosis patients. It was found that the acute Lyme borreliosis patients as compared with the control group showed significantly higher frequencies of lymphocytes with chromosome instability in the peripheral blood mononuclear cell cultures. Chromosome instability included the aneugenic type like polyploidy, hypoploidy or endoreduplication as well as the clastogenic type like chromatid and chromosomal breaks. In addition, high chromosome abnormality frequencies in the patients' cultures were associated with an increase in elimination of the abnormal cells by apoptosis.

K.M. Ілїнських, І.М. Ілїнських, А.Г. Семенов

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОРУШЕННЯ В МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИНАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ ГОСТРИМ ІКСОДОВИМ КЛІЩОВИМ БОРЕЛІОЗОМ

Відомо, що серед біологічних мутагенних факторів цитогенетичні порушення здатні викликати не тільки віруси, а й деякі бактерії. Мета цієї роботи полягала в характеристиці цитогенетичного статусу хворих гострим іксодовим кліщовим бореліозом (ИКБ). В результаті проведених досліджень встановлено, що в культурах мононуклеарних клітин хворих ИКБ, у порівнянні з контролем, відбувається значне зростання числа лімфоцитів з цитогенетичними порушеннями анеугенного ти-

пу у вигляді появи клітин з поліплоїдією, гіпоплоїдією і ендоредуплікацією, а також кластогенного типу у вигляді хроматидних і, меншою мірою, хромосомних розривів при одночасному пригніченні проліферативної відповіді на мітоген та збільшенні елімінації генетично ушкоджених клітин шляхом апоптозу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nichols W.W.* Relationship of viruses, chromosomes and cancerogenesis // *Hereditas*. — 1963. — **50**. — P. 53–80.
2. *Блюмкин В.Н., Жданов В.М.* Влияние вирусов на хромосомный аппарат клетки. — М.: Медицина, 1973. — 285 с.
3. *Бужиевская Т.И.* Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих. — Киев : Наук. думка, 1984. — 134 с.
4. *Чернова О.А., Волкова Е.Н., Чернов В.М.* Хромосомные aberrации, индуцированные микоплазменными инфекциями в лимфоцитах периферической крови человека // *Генетика*. — 1996. — **32**, № 6. — С. 810–813.
5. *Гершензон С.М., Александров Ю.М., Малюта С.С., Бужиевська Т.І., Карпова І.С., Ларченко К.А.* Мутагенна дія нуклеїнових кислот і вірусів. — Київ : Знання, 1999. — 29 с.
6. *Лукаш Л.Л.* Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // *Biopolym. Cell*. — 2004. — **20**, № 1/2. — С. 93–105.
7. *Ильинских И.Н., Новицкий В.В., Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н., Ткаченко С.Б.* Инфекционная кариопатология / Под ред. Н.Н. Ильинских. — Томск : Изд-во Том. ун-та, 2005. — 168 с.
8. *Пирогова Н.П.* Механизмы нарушений клеточного звена резистентности при клещевых природно-очаговых инфекциях : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Томск, 2003. — 46 с.
9. *Рябченко А.В.* Получение рекомбинантных белков западносибирских изолятов *Borrelia burgdorferi sensu lato* и изучение их антигенных свойств : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Новосибирск, 2009. — 21 с.
10. *Новиков Д.К., Новикова В.И.* Оценка иммунного статуса. — М., 1996. — 286 с.
11. *Алов И.А.* Морфологические и прикладные аспекты патологии митоза // *Арх. патологии*. — 1975. — **37**, № 12. — С. 3–14.
12. *Taatjes D.J., Sobel B.E., Budd R.C.* Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis // *Histochem. Cell Biol.* — 2008. — **129**, № 1. — P. 33–43.
13. *Moorhead P.S., Nowel P.C., Mellman W.J., Bat-*

- tips D.M., Hungerford D.A.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood // *Exp. Cell Res.* – 1960. – **20**. – P. 613–616.
14. *Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В.* Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // *Генетика.* – 1972. – **8**, № 5. – С. 133–141.
15. *Lacombe F., Beloc F., Bernard P., Boisseau M.R.* Evaluation of four methods of DNA distribution data analysis based on bromodeoxyuridine/DNA bivariate data // *Cytometry.* – 1988. – **9**, № 3. – P. 245–253.
16. *Krysko D.V., Vanden Berghe T., Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P.* Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance // *Meth. Enzymol.* – 2008. – **442**. – P. 307–341.
17. *Perticarari S., Presani G., Prodan M., Granzotto M., Murgia R., Cinco M.* Lymphocyte apoptosis co-cultured with *Borrelia burgdorferi* // *Microb. Path.* – 2003. – **35**, № 4. – P. 139–145.
18. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
19. *Bryant P.E., Mozdarani H., Marr C.* G2-phase chromatid break kinetics in irradiated DNA repair mutant hamster cell lines using calyculin-induced PCC and colcemid-block // *Mutat. Res.* – 2008. – **657**, № 1. – P. 8–12.
20. *Chen J., Ozanne S., Hales C.* Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle // *DNA Rep.* – 2005. – **4**, № 10. – P. 1140–1148.
21. *Ohshima S.* Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H₂O₂-induced premature senescence // *Cytometry A.* – 2008. – **73**, № 9. – P. 808–815.
22. *Gorla G.R., Malhi H., Gupta S.* Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells // *J. Cell Sci.* – 2001. – **114**, № 16. – P. 2943–2951.
23. *Lothschütz D., Jennewein M., Pahl S., Lausberg H.F., Eichler A., Mutschler W., Hanselmann R.G., Oberinger M.* Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi // *Inflamm. Res.* – 2002. – **51**, № 8. – P. 416–422.
24. *Ohshima S., Seyama A.* Cellular aging and centrosome aberrations // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2010. – **1197**. – P. 108–117.
25. *Chow J., Poon R.Y.* DNA damage and polyploidization // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – **676**. – P. 57–71.
26. *Ito D., Matsumoto T.* Molecular mechanisms and function of the spindle checkpoint, a guardian of the chromosome stability // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – **676**. – P. 15–26.
27. *Cao J.N., Shafee N., Vickery L. et al.* Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1 α /tubulin interaction is an important determinant of mitotic stability in cultured HT1080 human fibrosarcoma cells // *Cancer Res.* – 2010. – **70**, № 14. – P. 6004–6014.
28. *Normand G., King R.W.* Understanding cytokinesis failure // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – **676**. – P. 27–55.
29. *Walen K.H.* Genetic stability of senescence reverted cells: genome reduction division of polyploidy cells, aneuploidy and neoplasia // *Cell Cycle.* – 2008. – **7**, № 11. – P. 1623–1629.
30. *Grygorczuk S., Osada J., Swierzbinska R., Zajkowska J., Kondrusik M., Pancewicz S., Dąbrowska M.* Expression of Fas receptor on human T lymphocytes under stimulation with *Borrelia burgdorferi sensu lato* – preliminary results // *Adv. Med. Sci.* – 2010. – **55**, № 2. – P. 228–234.
31. *Thai P.T., Collins C.C., Fortner K.A., Koenig A., Hayes S.M., Budd R.C.* Increased caspase activity primes human Lyme arthritis synovial $\gamma\delta$ T cells for proliferation and death // *Hum. Immunol.* – 2011. – **72**, № 12. – P. 1168–1175.
32. *Budd R.C.* Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis // *J. Clin. Invest.* – 2002. – **109**, № 4. – P. 437–442.

Поступила 13.10.11