

МОНИТОРИНГ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ, ИМЕЮЩИХ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ



© Н.Н. Ильинских^{1,2*}, М.С. Костромеева^{1,2}, Е.Н. Ильинских^{1,2}

¹Томский государственный университет, Томск

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск

ОБОСНОВАНИЕ. Клещевой энцефалит (КЭ) – это острое вирусное заболевание, сопровождающееся активацией окислительного стресса и ростом цитогенетической нестабильности. Некоторые инфекционные заболевания протекают клинически более тяжело у больных сахарным диабетом 2 типа (СД2), в особенности в случае носительства в генотипе мутантных вариантов генов ферментов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*.

ЦЕЛЬ. Изучение динамики числа клеток с цитогенетическими нарушениями у больных острым КЭ, имеющих СД2, в зависимости от носительства активных и неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз (*GSTM1* и *GSTT1*) в генотипе больного.

МЕТОДЫ. С применением метода микроядерного анализа были обследованы 138 больных лихорадочной формой острого КЭ, у 64 из которых был диагностирован СД2 (группы 3 и 4). В качестве контрольных групп были обследованы 57 здоровых лиц (контроль 1) и 61 больной СД2 (контроль 2). Для микроядерного анализа были взяты пробы буккальных клеток в динамике на 1-й день, через 1 нед, а также через 1, 3 и 6 мес. Для анализа вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* использовали полимеразную цепную реакцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ. У всех больных КЭ в первые дни заболевания было обнаружено значительное увеличение частоты буккальных клеток с микроядрами (МЯ), по сравнению с контролями 1 и 2 ($P < 0,001$). В группах 3 и 4 больных КЭ – носителей неактивных вариантов генов *GSTM1(0)* и *GSTT1(0)* – было выявлено существенное увеличение числа буккальных клеток с МЯ по сравнению с соответствующими подгруппами больных КЭ, имеющих активные варианты этих генов ($P < 0,001$). Во всех подгруппах больных КЭ, имеющих СД2, число клеток с МЯ было значительно выше, чем в подгруппах больных КЭ без СД2 ($P < 0,001$). Изучение динамики числа буккальных клеток с МЯ, по сравнению с контролем, показало, что наиболее выраженные и длительные (в течение 6 мес) изменения сохранялись в группе больных КЭ с генотипом *GSTM1(0)/GSTT1(0)*, имеющих СД2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Наиболее выраженное и длительное сохранение повышенной частоты клеток с цитогенетическими нарушениями было установлено в группе больных острым КЭ с сопутствующим СД2, которые являлись носителями генотипа с неактивными вариантами генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1(0)* и *GSTT1(0)*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет 2 типа; клещевой энцефалит; микроядерный анализ; буккальный эпителий; *GSTM1*; *GSTT1*; глутатион-S-трансфераза

MONITORING OF CYTOGENETIC EFFECTS IN TICK-BORNE ENCEPHALITIS PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS, DEPENDING ON POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE GENES

© Nikolay N. Ilyinskikh^{1,2*}, Marina Kostromeeva^{1,2}, Ekaterina N. Ilyinskikh^{1,2}

¹Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

BACKGROUND: Tick-borne encephalitis (TBE) is an acute viral disease with activation of oxidative stress and increasing in cytogenetic instability. Clinical symptoms of infectious diseases usually more severe in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2), especially in the case of burden in the genotype of mutant variants of glutathione-S-transferase genes *GSTM1* and *GSTT1*.

AIMS: The aim of this study was to study the dynamics of the frequency of micronucleated cells in patients with acute TBE with concomitant DM2, depending on the burden of active and inactive variants of glutathione-S-transferase genes (*GSTM1* and *GSTT1*) in the patient's genotype.



MATERIALS AND METHODS: Totally, samples to make micronucleus assay were obtained from 138 patients with febrile illness of acute TBE, 64 of whom were diagnosed with concomitant DM2 (groups 3 and 4). As control groups, 57 healthy individuals (control 1) and 61 patients with DM2 (control 2) were examined. The samples of buccal cells for the micronucleus assay were repeatedly obtained from the individuals on the first day of admission, and also after 1 week, 1, 3 and 6 months. Polymerase chain reaction was used to analyze the variants of the GSTM1 and GSTT1 genes.

RESULTS: On the first days of the disease, significant increases in the frequency of micronucleated buccal cells were determined in all TBE patients as compared to controls 1 and 2 ($P < 0.001$). Significant increases in the frequency of micronucleated buccal cells was revealed in groups 3 and 4 of the TBE patients who were carriers of inactive variants of the GSTM1(0) and GSTT1(0) genes, as compared to the subgroup of TBE patients with active variants of these genes ($P < 0.001$). In all subgroups of TBE patients with concomitant DM2, the frequencies of micronucleated cells were significantly higher than in the subgroups of TBE patients without DM2 ($P < 0.001$). Study of the dynamics of the frequency of micronucleated buccal cells, as compared to the control, demonstrated that the highest and long-lasting (within 6 months) cytogenetical effects were maintained in the group of TBE patients with genotype GSTM1(0)/GSTT1(0) and concomitant DM2.

CONCLUSION: The most prolonged and highest increases in the frequencies of cytogenetically instable cells were determined in the group of acute TBE patients with concomitant DM2 who were carriers of the genotype with inactive variants of both GSTM1(0) and GSTT1(0) glutathione-S-transferase genes.

KEYWORDS: type 2 diabetes mellitus; tick-borne encephalitis; micronucleus assay; buccal cells; GSTM1; GSTT1; glutathione-S-transferase

Известно, что активные формы кислорода, например супероксид-анион радикал, способны повреждать биологические мембраны клеток и макромолекулы, в том числе белки и ДНК [1]. Установлено, что для больных сахарным диабетом (СД) характерны чрезмерная активация окислительного стресса и снижение антиоксидантной защиты, что ассоциировано с повреждением ДНК клеток, снижением эффективности репарации ДНК и повышенной восприимчивостью к мутагенам [2]. Накопление такого рода мутаций приводит к остановке клеточного цикла, а ошибки ферментов ДНК-репарации индуцируют одно- или двунитевые разрывы ДНК, результатом которых является рост количества клеток с хромосомными или хроматидными структурными aberrациями и микроядрами (МЯ) в хромосомных и цитологических препаратах, что принято называть увеличением цитогенетической нестабильности [3].

Кроме того, показано, что повышенный риск развития СД 2 типа (СД2) зависит от полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз, в особенности от носительства в генотипе больного нефункционирующих из-за делеции вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1*, что приводит к нарушению синтеза одной из важнейших групп ферментов антиоксидантной защиты [4]. Показано, что развитие у больных СД2 инфекционного процесса и/или действие дополнительных мутагенных факторов также могут сопровождаться существенной активацией окислительного стресса и связанной с ним цитогенетической нестабильностью [5]. Известно, что некоторые инфекционные заболевания, такие как лихорадка Западного Нила, как правило, протекают в клинически более тяжелой форме у больных, имеющих СД2 как фоновое заболевание [6, 7].

В настоящее время установлено, что многие вирусы, включая вирус клещевого энцефалита (КЭ), как в условиях *in vitro*, так и у больных людей в острый и хронический периоды инфекционного процесса способны вызывать существенное повышение по сравнению со здоровыми людьми числа соматических клеток с цитогенетическими нарушениями, включая лимфоциты периферической

крови и различные типы эпителиальных клеток с МЯ [8, 9].

К числу наиболее широко используемых и относительно простых цитогенетических тестов можно отнести определение количества клеток с МЯ в буккальном эпителии [10]. Прямая корреляционная зависимость между числом клеток с МЯ в буккальном эпителии и числом лимфоцитов с МЯ в периферической крови свидетельствует о том, что системные генотоксические эффекты в клетках крови находят свое отражение в эпителиоцитах полости рта [10]. Поэтому определение частоты встречаемости клеток с МЯ можно использовать как прогностический критерий тяжести некоторых воспалительных и инфекционных заболеваний, а также для оценки повышенного риска онкологических заболеваний [10, 11].

Клещевой энцефалит (КЭ) – это острое вирусное природно-очаговое заболевание, сопровождающееся активацией окислительного стресса и увеличением цитогенетической нестабильности [9, 11, 12]. Более того, проведенные нами исследования показали, что число клеток с цитогенетическими нарушениями может прямо зависеть от носительства в генотипе больного неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* [13].

ЦЕЛЬ

Цель исследования заключалась в изучении динамики числа клеток с цитогенетическими нарушениями у больных острым КЭ, имеющих СД2, в зависимости от носительства активных и неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз (*GSTM1* или *GSTT1*) в генотипе больного.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено поперечное выборочное клиническое обсервационное исследование.

Условия проведения

Исследование проведено среди больных острым КЭ, не имеющих или имеющих фоновую соматическую патологию – СД2 (группы 3 и 4). Участников исследования отбирали методом сплошной выборки среди взрослых пациентов, госпитализированных в инфекционные отделения городских и районных больниц Томской и Тюменской областей в весенне-летне-осенний периоды эпидсезонов клещевых нейроинфекций 2015–2017 гг. Группа здоровых лиц (контроль 1) была отобрана на базе поликлиники во время профилактического осмотра. Отбор больных СД2 (контроль 2) для исследования проводился в те же временные интервалы, что и в основные группы, с использованием метода сплошной выборки среди пациентов, находящихся на амбулаторном учете у эндокринолога по этой патологии на базах эндокринологических диспансеров Томской и Тюменской областей.

Отбор участников исследования проводился на базах инфекционных отделений ОГАУЗ «Городская клиническая больница №3 им. Б.И. Альперовича» (г. Томск), ОГАУЗ «Стрижевская городская больница» (г. Стрижевой Томской области), БУ Ханты-Мансийского автономного округа Югры «Кондинская районная больница» (пгт. Междуреченский, Кондинский район, Тюменская область), ГБУЗ ТО «Областная инфекционная клиническая больница» (г. Тюмень), амбулаторно-поликлинического эндокринологического отделения ОГАУЗ «Томская областная клиническая больница» (г. Томск), ГБУЗ ТО «Эндокринологический диспансер» г. Тюмени и отделения профосмотров ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1» (г. Тюмень).

Критерии соответствия

Критериями включения для групп больных острым КЭ в исследование служили: лихорадочная форма заболевания, отсутствие менингеальной и очаговой симптоматики, отсутствие микст-инфекции с иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) и/или анаплазмозом человека, обнаружение антигена и/или иммуноглобулинов IgM или одновременно IgM и IgG к вирусу КЭ в диагностических титрах методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови пациента; отрицательные результаты исследования ИФА на определение в сыворотке крови IgM или/и IgG к боррелиям ИКБ в сыворотке крови, постоянное место жительства на территории Томской или Тюменской областей, получение информированного согласия на участие в исследовании, отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний (инфаркта миокарда, мерцательной аритмии, острого нарушения мозгового кровообращения, гипертиреоза, эпилепсии, острых и обострения хронических воспалительных заболеваний, онкопатологии, туберкулеза, хронических вирусных гепатитов В и С, ВИЧ-инфекции, хронического алкоголизма и наркомании), а также исключение курения и профессиональной деятельности, связанной с ионизирующим излучением или вредными химическими веществами.

Критериями включения для больных СД2 были следующие параметры: получение информированного согласия на участие в исследовании, верификация диагноза СД2 с диспансерным наблюдением в течение не менее 2–3 лет, получение сахароснижающей терапии, уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) не более 7%,

отсутствие кетоацидоза, тяжелых сопутствующих заболеваний, а также исключение курения и профессиональной деятельности, связанной с ионизирующим излучением или вредными химическими веществами.

Критериями включения для контрольной группы 1 служили: отсутствие присасываний иксодовых клещей и/или заболевания КЭ или ИКБ в прошлом, отрицательные результаты исследования на маркеры КЭ и ИКБ в ИФА, получение информированного согласия на участие в исследовании, отсутствие СД и других соматических сопутствующих заболеваний средней или тяжелой степени тяжести, отсутствие инфекционных или обострения соматических заболеваний, а также исключение курения и профессиональной деятельности, связанной с ионизирующим излучением или вредными химическими веществами.

Критериями исключения из данного исследования были: отсутствие добровольного информированного согласия пациента на участие в исследовании, несоответствие критериям включения или отказ больного от взятия материала буккального эпителия на исследование.

Продолжительность исследования

Амбулаторное наблюдение за участниками исследования продолжалось на протяжении 1 мес для групп контроля и 6 мес для больных КЭ. Материал для исследования (пробы клеток буккального эпителия) был получен в динамике при обращении к врачу (в случае КЭ – в первые 1–2 дня при госпитализации в стационар), а также спустя 1 нед, 1, 3 и 6 мес. В связи с различными обстоятельствами у нескольких участников исследования повторное получение материала для цитогенетического анализа осуществить не удалось. В общей сложности через 6 мес из 74 участников, первоначально включенных в группу 3, были 19 человек, а из 64 лиц в группе 4 было исключено 17 пациентов.

Описание медицинского вмешательства

Пробы клеток буккального эпителия получали с помощью двух одноразовых стерильных шпателей, делая соскобы со слизистой оболочки левой и правой щек выше линии смыкания зубов [10, 11].

Основной исход исследования

В результате исследования в динамике на протяжении до 6 мес оценивали число буккальных клеток с МЯ (в %) в зависимости от присутствия в генотипе индивидуума (больного острым КЭ, имеющего или не имеющего фоновый СД2, больного СД2 или здорового участника исследования из контрольных групп) нормальных *GSTM1*(+) и *GSTT1*(+) или мутантных нефункционирующих генов – *GSTM1*(0) и *GSTT1*(0) ферментов глутатион-S-трансфераз.

Анализ в подгруппах

В зависимости от результатов ПЦР-анализа и определения носительства в генотипе активных или неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз каждая из четырех обследованных групп (группы 1, 2, 3 и 4) была, в свою очередь, подразделена на 4 подгруппы: *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+) и *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+).

Сравнение проводилось не только между основными группами больных КЭ, имеющих и не имеющих СД2 (группы 4 и 3) или между основными и контрольными группами 1 и 2, но и между подгруппами, когда оценивали число клеток с цитогенетическими нарушениями у лиц, имеющих активные варианты генов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+) и неактивные их сочетания – *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+).

Контрольные группы (контроль 1 и 2) были сопоставимы с основными группами (группы 3 и 4) по полу и возрасту. Кроме того, подгруппы участников, отличающихся друг от друга в зависимости от носительства в генотипе неактивных или активных вариантов генов *GSTM1*(0)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0), *GSTM1*(0)/*GSTT1*(+) и *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+), также были сопоставимы по возрасту и полу.

Курсы терапии у больных острым КЭ (группы 3 и 4) соответствовали методическим указаниям, утвержденным Департаментами здравоохранения Томской и Тюменской областей. Больные КЭ после госпитализации придерживались постельного режима на протяжении 1–2 нед.

Все пациенты с СД2, включенные в исследование, находились под диспансерным наблюдением по поводу этого заболевания в течение не менее 2–3 лет, диагноз СД2 в анамнезе был подтвержден тестами на гликемический контроль, уровень HbA_{1c} в крови и заключением консультации эндокринолога. Пациенты с СД2 из контрольной группы 2 были сопоставимы по показателям гликемического контроля с пациентами из группы наблюдения 4. Все больные СД2 получали терапию метформином или производными сульфонилмочевины. Контроль гликемического профиля проводился у всех участников исследования в течение всего периода наблюдения. Целью сахароснижающей терапии являлось достижение и поддержание уровня HbA_{1c} менее 7% путем использования метформина и производных сульфонилмочевины.

Методы регистрации исходов

Полученный материал проб клеток буккального эпителия использовали для выделения ДНК и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью определения вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе. Кроме того, для получения цитологических препаратов и микроядерного анализа пробы буккальных клеток помещали в два контейнера, помеченных «левая щека» и «правая щека», которые содержали фиксатор Саккоманно (Diapath, Италия) [10].

Известно, что гены глутатион-S-трансфераз *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) [14]. Делеционные варианты генов *GSTM1* (GenBank № X68676) и *GSTT1* (GenBank № AP000351) были идентифицированы в мультиплексной ПЦР [14]. 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. 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», РФ). Нормальные аллели генов, обозначенные знаком «+», характеризуются присутствием ПЦР-продуктов – фрагментов размером 271 и 480 пар оснований. Такие доноры могут быть либо гетерозиготны (*GSTM1* (+/0) и *GSTT1*(+/0)), либо гомозиготны (*GSTM1* (+/+) и *GSTT1*(+/+)) по нормальному активному аллелю и имеют функционирующие гены глутатион-S-трансфераз. Мутантный гомозиготный генотип *GSTM1*(0/0) или *GSTT1*(0/0) означает отсутствие на электрофореграмме вышеуказанных фрагментов генов в результате их делеции, что приводит к резкому снижению активности соответствующего фермента глутатион-S-трансфераз [14].

Для микроядерного анализа суспензию клеток буккального эпителия 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 Фельгена и анализировали частоту клеток с МЯ в не менее чем 1000 буккальных эпителиоцитах в соответствии со стандартной методикой [11] с помощью микроскопа PrimoStar (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз. К основным критериям идентификации МЯ отнесены следующие признаки: одинаковая структура и интенсивность окраски основных ядер и МЯ, диаметр МЯ варьировал от 1/16 до 1/3 диаметра одного из основных ядер, МЯ имели четкие границы и не были соединены с основными ядрами [11].

Для определения уровня HbA_{1c} применялся метод имунотурбидиметрии. Контроль глюкозы в сыворотке венозной крови проводился глюкозооксидазным методом.

Этическая экспертиза

Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 4308 от 19.10.2015 г.) и проводилось после получения информированного согласия на участие в исследовании в соответствии с правилами «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (2002 г.) и «Правилами клинической практики» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.03).

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки: минимальный размер выборки предварительно рассчитывался с помощью пакета статистических программ Statistica v.10 (StatSoft Inc., США) [15].

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistica v.10 (StatSoft Inc., США) [15]. 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 ($\bar{X}_{s_{\bar{x}}}$, где $\bar{X}$ – выборочное среднее, а $s_{\bar{x}}$ – стандартная ошибка) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

Контрольные группы 1 и 2 включали соответственно 57 здоровых лиц (26 мужчин и 31 женщина, средний возраст – $46,2 \pm 2,3$ года) и 61 больного СД2 (27 мужчин и 34 женщины, средний возраст – $47,8 \pm 3,1$ года). В группу 3 были включены 74 больных лихорадочной формой острого КЭ (33 мужчины и 41 женщина, средний возраст – $45,5 \pm 2,3$ года), без сопутствующего СД2. Группа 4 состояла из 64 больных лихорадочной формой КЭ, у которых был диагностирован СД2 (29 мужчин и 35 женщин, средний возраст – $49,3 \pm 2,7$ года). Основные группы были сопоставимы с группами контроля по полу и возрасту. Кроме того, пациенты с СД2 из контрольной группы 2 были сопоставимы по показателям гликемического контроля и HbA_{1c} с пациентами из группы наблюдения 4 и на момент начала исследования имели уровень HbA_{1c} не более 7%. В зависимости от результатов ПЦР-анализа каждая из четырех обследованных групп была дополнительно подразделена на 4 подгруппы, включавших от 10 до 22 лиц (табл. 1): *GSTM1(0)/GSTT1(0)*, *GSTM1(+)/GSTT1(0)*, *GSTM1(0)/GSTT1(+)* и *GSTM1(+)/GSTT1(+)*. В каждой из подгрупп обследованные лица также были сопоставимы по возрасту и полу.

Основные результаты исследования

Установлено, что в подгруппе больных СД2 (контроль 2), являющихся носителями нефункционирующих генов *GSTM1(0)* и *GSTT1(0)*, по сравнению с соответствующей подгруппой здоровых лиц (контроль 1) было обнаружено статистически значимое увеличение числа буккальных клеток с МЯ ($P = 0,016$) (см. табл. 1). Между остальными тремя подгруппами контроля 1 и 2, отличающимися в зависимости от геновариантов глутатион-S-трансфераз, достоверных различий в частоте клеток буккального эпителия обнаружено не было ($P > 0,05$). У всех больных КЭ, которые как имели, так и не имели сопутствующий СД2 (группы 4 и 3), вне зависимости от подгрупп, отличающихся друг от друга по вариантам генов *GSTM1/GSTT1*, в первые дни заболевания было обнаружено значительное увеличение числа буккальных клеток с МЯ по сравнению с соответствующими группами здоровых лиц (контролем 1) и больных СД2 (контролем 2) ($p < 0,001$ во всех случаях) (см. табл. 1).

Более того, при поступлении в стационар во всех подгруппах больных КЭ, отличающихся в зависимости от геновариантов глутатион-S-трансфераз, имеющих СД2 (группа 4), частота клеток с МЯ была значительно выше, чем в соответствующих подгруппах больных КЭ, которые не имели СД2 ($P < 0,001$). Оценка числа клеток с цитогенетическими нарушениями в динамике показала, что у боль-

ных КЭ (группа 3), имевших генотипы *GSTM1(0)/GSTT1(0)* или *GSTM1(0)/GSTT1(+)*, повышенное по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе 1 количество буккальных клеток с МЯ сохранялось в течение 3 мес после начала заболевания ($P < 0,001$ и $P = 0,012$). У больных КЭ из группы 3 с активными вариантами генов *GSTM1(+)/GSTT1(+)* число клеток с цитогенетическими нарушениями не отличалось от контрольных значений уже через 1 мес ($P > 0,05$). В группе 4 больных КЭ, имеющих СД2, с генотипами *GSTM1(0)/GSTT1(0)* или *GSTM1(0)/GSTT1(+)* существенное увеличение числа буккальных клеток с МЯ по сравнению с соответствующими значениями этого показателя в контроле сохранялось наиболее длительно – в течение 6 мес ($p < 0,001$ и $p = 0,004$).

Дополнительные результаты исследования

Сравнение частоты буккальных клеток с МЯ между 4 подгруппами больных СД2 в группе 2 с различными геновариантами глутатион-S-трансфераз показало, что наиболее высокие показатели микроядерного теста были зарегистрированы у носителей нулевых вариантов ($0,52 \pm 0,04$ ‰), а самые низкие – у больных с нормальными вариантами генов *GSTM1(+)/GSTT1(+)* ($0,19 \pm 0,06$ ‰, $p < 0,001$).

В группе 3 больных КЭ (см. табл. 1), не имеющих сопутствующего СД2 и являющихся носителями только неактивного варианта *GSTM1 (GSTM1(0)/GSTT1(+))* или нефункционирующих вариантов обоих генов (*GSTM1(0)/GSTT1(0)*), было выявлено существенное увеличение числа буккальных клеток с МЯ по сравнению с соответствующей подгруппой больных КЭ, имеющих активные варианты этих генов (*GSTM1(+)/GSTT1(+)*) ($P < 0,001$). Такая же закономерность отмечалась и для больных КЭ, имеющих сопутствующий СД2 в группе 4. У больных КЭ, имеющих сопутствующий СД2, и являющихся носителями неактивного *GSTM1(0) (GSTM1(0)/GSTT1(+))* или нефункционирующих вариантов обоих генов *GSTM1(0)/GSTT1(0)*, частота клеток с цитогенетическими нарушениями была существенно выше, чем в подгруппе больных КЭ, имеющих генотип *GSTM1(+)/GSTT1(+)* ($p = 0,006$).

Нежелательные явления

Нежелательных побочных явлений или осложнений при взятии материала на исследование установлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

Таким образом, показатель числа буккальных клеток с МЯ, отражающий цитогенетическую нестабильность, у пациентов с КЭ и фоновым СД2, по-видимому, связан с полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*. Больные КЭ, в особенности те из них, которые имеют сопутствующий СД2 и являются носителями неактивных вариантов генов *GSTM1(0)/GSTT1(0)* или сочетания *GSTM1(0)/GSTT1(+)* в генотипе, отличаются от остальных подгрупп участников исследования наиболее длительным (на протяжении до полугода) и наиболее выраженным увеличением частоты буккальных клеток с МЯ. В остальных обследованных подгруппах больных КЭ, в первую очередь тех из них, которые не имели СД2

Таблица 1. Динамика числа клеток буккального эпителия с микроядрами у больных острым клещевым энцефалитом, имеющих (группа 4) или не имеющих (группа 3) сахарного диабета 2 типа, в зависимости от полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* в сравнении с контролем ($\bar{X} \pm \bar{s}$)

Группы		Число клеток буккального эпителия с МЯ (в %) в подгруппах в зависимости от сочетания активных (+) или неактивных (0) вариантов генов глутатион-S-трансфераз <i>GSTM1/GSTT1</i>			
		0/0	+/0	0/+	+/+
Группа 1 Здоровые (контроль 1)		0,34±0,05 n=10	0,22±0,06 n=11	0,31±0,09 n=14	0,17±0,06 n=22
Группа 2 Больные СД2 (контроль 2)		0,52±0,04*## n=12	0,34±0,05 n=15	0,39±0,05 n=16	0,19±0,06 n=18
Группа 3 Больные КЭ без СД2	1–2-й день	3,98±0,14**^^## n=16	1,76±0,08**^^ n=18	3,22±0,12**^^## n=20	1,56±0,12**^^ n=20
	через 1 нед	2,12±0,18**^^# n=16	1,81±0,16**^^ n=17	2,15±0,11**^^## n=19	1,12±0,09**^^ n=20
	через 1 мес	0,79±0,09**^^# n=12	0,22±0,07 n=16	0,73±0,09*^^## n=20	0,20±0,08 n=16
	через 3 мес	0,62±0,08*## n=10	0,17±0,04 n=15	0,62±0,05*## n=16	0,18±0,07 n=12
	через 6 мес	0,38±0,04# n=10	0,18±0,05 n=16	0,32±0,08 n=16	0,17±0,05 n=16
	1–2-й день	6,18±0,15**^^## n=15	5,04±0,52**^^ n=16	6,33±0,62**^^## n=11	4,08±0,41**^^ n=22
Группа 4 Больные КЭ с СД2	через 1 нед	4,28±0,38**^^## n=15	3,00±0,26**^^ n=15	3,24±0,22**^^ n=11	3,01±0,24**^^ n=21
	через 1 мес	2,92±0,18**^^# n=13	1,59±0,21**^^ n=12	1,99±0,12*^^ n=11	1,12±0,12**^^ n=19
	через 3 мес	0,92±0,07*## n=12	0,38±0,07* n=11	0,96±0,05*## n=10	0,35±0,06** n=14
	через 6 мес	0,65±0,05*## n=10	0,27±0,07 n=12	0,68±0,05*## n=11	0,22±0,06 n=14

Примечания: КЭ – клещевой энцефалит; МЯ – микроядра; СД2 – сахарный диабет 2 типа. Значимые отличия числа клеток с микроядрами отмечены одним символом при $p < 0,05$ и двумя символами при $p < 0,01$: знаком (*) отмечены отличия в группах 2, 3 и 4 от контроля 1; знаком (^) отмечены отличия групп 3 и 4 от контроля 2; знаком (#) отмечены отличия в подгруппах, имеющих геноварианты *GSTM1(0)/GSTT1(0)*, *GSTM1(+)/GSTT1(0)*, *GSTM1(0)/GSTT1(+)*, от подгруппы с активным генотипом *GSTM1(+)/GSTT1(+)*; подчеркиванием отмечены отличия группы 4 от группы 3.

и обладали функционирующими вариантами генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*, число буккальных клеток с МЯ, которые, по-видимому, являлись отражением чрезмерной активации окислительного стресса, имели существенно менее выраженные и продолжительные изменения.

Обсуждение основного результата исследования

Известно, что гипергликемия при СД2 связана с повышением уровня повреждения ДНК и образования МЯ в различных типах клеток, что, по-видимому, обусловлено активацией окислительного стресса и подавлением системы ДНК-репарации [1, 5, 16]. Предполагают [17], что чрезмерная активация окислительного стресса при СД2 способствует разрушению глутатиона и снижению антиоксидантной и антимутагенной функций глутатион-S-трансфераз. Установлено, что острый КЭ сопровождается активацией окислительного стресса и существенным увеличением числа соматических клеток с цитогенетическими нарушениями [9, 12].

Более того, установлено, что количество клеток с МЯ может зависеть от носительства в генотипе человека неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* [13]. Поэтому результаты проведенного нами исследования впервые продемонстрировали, что сочетанное действие у больных КЭ нескольких факторов, включающих сопутствующий СД2 и носительство нефункционирующих генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*, приводит к наиболее выраженному и продолжительному повышению уровня клеток с цитогенетическими нарушениями.

Ограничения исследования

Вместе с тем наблюдаемые цитогенетические эффекты у больных СД2 и КЭ могут быть связаны не только с изменением активности генов глутатион-S-трансфераз, но и с нарушением функционирования систем ДНК-репарации, апоптоза и иммунитета, а также с их способностью устранять цитогенетически дефектные клетки [1]. Кроме того, в проведенном нами исследовании

у больных СД2 не было обнаружено различий между пациентами, относящимися к различным половым и возрастным группам. Мы постарались также минимизировать действие ряда других факторов, которые потенциально могли бы повлиять на результаты исследования, включая обострение воспалительных заболеваний, курение и воздействие ионизирующего излучения или вредных химических веществ. Все эти параметры являлись критериями исключения для участников данного исследования. Вместе с тем повышенная цитогенетическая нестабильность и чувствительность к генотоксическим факторам на работе или в быту больных СД потенциально могут существенно отражаться на состоянии их здоровья, способствовать развитию онкологических заболеваний и нарушению генетической полноценности генеративных клеток [18]. Все эти проблемы требуют более пристального изучения. Микроядерный анализ как экспресс-метод позволяет в первом приближении дать ответ на некоторые из этих вопросов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее выраженное и длительное сохранение повышенного числа клеток с цитогенетическими нарушениями было установлено в группе больных острым КЭ с сопутствующим СД2, которые являлись носителями генотипа с неактивными вариантами генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1(0)* и *GSTT1(0)*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-44-700149).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов. Ильинских Н.Н. – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка; Ильинских Е.Н. – анализ полученных данных, написание и редактирование текста; Костромеева М.С. – сбор и обработка материалов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность врачам медицинских учреждений Томской и Тюменской областей за помощь в отборе участников исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Sprung CN, Ivashkevich A, Forrester HB, et al. Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects. *Cancer Lett.* 2015;356(1):72-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.008>
2. Grindel A, Guggenberger B, Eichberger L, et al. Oxidative Stress, DNA Damage and DNA Repair in Female Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162082. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162082>
3. Khan FA, Ali SO. Physiological Roles of DNA Double-Strand Breaks. *J Nucleic Acids.* 2017;2017:6439169. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/6439169>
4. Amer MA, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, Abou-El-Ela SH. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):3722-3730. doi: <https://doi.org/10.4238/2011.October.31.14>
5. Nasif WA, Mukhtar MH, Nour Eldein MM, Ashgar SS. Oxidative DNA damage and oxidized low density lipoprotein in Type II diabetes mellitus among patients with *Helicobacter pylori* infection. *Diabetol Metab Syndr.* 2016;8:34. doi: <https://doi.org/10.1186/s13098-016-0149-1>
6. Knapp S. Diabetes and infection: is there a link? – A mini-review. *Gerontology.* 2013;59(2):99-104. doi: <https://doi.org/10.1159/000345107>
7. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M. Medical risk factors for severe West Nile Virus disease, United States, 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(1):179-184. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0113>
8. Reshi ML, Su YC, Hong JR. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int J Cell Biol.* 2014;2014:467452. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/467452>
9. Новицкий В.В., Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., и др. Цитогенетика лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистенцией вируса клещевого энцефалита // *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* — 2003. — Т. 23. — № 4. — С. 66-69. [Novitsky VV, Zhukova OB, Ryazantseva NV, et al. Cytogenetics of peripheral blood lymphocytes in patients with persistence by tick-borne encephalitis virus. *Bull Sib Otd Ross Akad Med Nauk.* 2003;23(4):66-69. (In Russ.)]
10. Bolognesi C, Fenech M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol Biol.* 2013;1044:191-207. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_10
11. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 2010;705(1):11-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.11.001>
12. 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. — № 20. — С. 41-45. [Zakharicheva TA, Koval'skiy YG, Lebed'ko OA, Mzhel'skaya TV. Oxidative stress in patients with tick-borne encephalitis in the Far East of the Russian Federation. *Far Eastern journal of infectious pathology.* 2016;(20):41-45. (In Russ.)]
13. Ильинских Н.Н., Ильинских Е.Н., Ударцев Е.Ю. Возрастные особенности цитогенетических нарушений в синовиальных клетках коленных суставов у жителей севера Сибири, больных артритом разной этиологии, в связи с полиморфизмом гена *GSTM1* глутатион-S-трансферазы // *Успехи геронтологии.* — 2017. — Т. 30. — № 6. — С. 868-872. [Ilyinskikh NN, Ilyinskikh EN, Udartsev EY. Age-related traits of cytogenetic abnormalities in synovial cells of knee-joint in residents of the north of Siberia with arthritis of different etiology depending on the *GSTM1* gene polymorphism of glutathione-S-transferase. *Adv Gerontol.* 2017;30(6):868-872. (In Russ.)]
14. Леготкин А.Н., Лопатина А.Б. Исследование генов *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*. // *Успехи современной науки.* — 2016. — Т. 2. — № 9. — С. 23-25. [Legotkin AN, Lopatina AB. Study of genes of *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*. *Uspekhi sovremennoy nauki.* 2016;2(9):23-25. (In Russ.)]
15. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. — М.: Горячая линия–Телеком; 2013. [Borovikov VP. *Populyarnoe vvedenie v sovremennyy analiz dannykh v sisteme STATISTICA.* Moscow: Goryachaya liniya–Telekom; 2013. (In Russ.)]
16. Corbi SC, Bastos AS, Orrico SR, et al. Elevated micronucleus frequency in patients with type 2 diabetes, dyslipidemia and periodontitis. *Mutagenesis.* 2014;29(6):433-439. doi: <https://doi.org/10.1093/mutage/geu043>
17. Calabrese V, Cornelius C, Leso V, et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(5):729-736. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.003>
18. Anand S, Nath B, Saraswathy R. Diabetes – increased risk for cancers through chromosomal aberrations? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(11):4571-4573. doi: <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.11.4571>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

***Ильинских Николай Николаевич**, д.б.н., профессор [Nikolay N. Ilyinskikh, PhD in Biology, Professor];
адрес: 634050, Томск, а/я 808 [address: a/ya 808, 634050 Tomsk, Russian Federation];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1014-1096>; eLibrary SPIN: 1204-3138; e-mail: infkafekat2018@mail.ru

Костромеева Марина Сергеевна, аспирант, ассистент [Marina S. Kostromeeva, PhD student, assistant];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8212-7181>; eLibrary SPIN: 2519-9281; e-mail: kostromeeva2018@mail.ru

Ильинских Екатерина Николаевна, д.м.н., доцент, профессор [Ekaterina N. Ilyinskikh, MD, PhD, assistant professor, Professor]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7646-6905>; eLibrary SPIN: 5245-5958;
e-mail: infconf2009@mail.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Ильинских Н.Н., Костромеева М.С., Ильинских Е.Н. Мониторинг цитогенетических последствий у больных клещевым энцефалитом, имеющих фоновый сахарный диабет 2 типа, в зависимости от полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз // *Сахарный диабет*. — 2019. — Т. 22. — №3. — С.225-232. doi: 10.14341/DM9715

TO CITE THIS ARTICLE:

Ilyinskikh NN, Kostromeeva MS, Ilyinskikh EN. Monitoring of cytogenetic effects in tick-borne encephalitis patients with type 2 diabetes mellitus, depending on polymorphism of glutathione-S-transferase genes. *Diabetes Mellitus*. 2019;22(3):225-232. doi: 10.14341/DM9715