



Н.Ю. Пшеничная, Г.В. Кузнецова

НЕКОТОРЫЕ ТРОМБОЦИТАРНЫЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

*Ростовский государственный медицинский университет,
Кафедра инфекционных болезней с курсами детских инфекционных болезней
и эпидемиологии ФПК ППС*

Россия, 344022, Ростов-на-Дону, пер Нахичеванский, д. 29. E-mail: galentinabk@mail.ru.

Цель: изучить частоту мутаций W 515K и W 515L в гене Mpl, кодирующем рецепторы тромбоцитов к тромбопоэтину, определить степень активности ферментов тромбоцитов: гликогена, α -нафтилацетатэстеразы (α -НАЭ) и аденозин-трифосфатазы (АТФ-азы) у больных хроническим гепатитом С (ХГС).

Материалы и методы: Мутации в гене Mpl (W 515K и W 515L) определяли с помощью РТ-ПЦР, степень активности ферментов тромбоцитов оценивали по цитохимическому коэффициенту в мазках периферической крови.

Результаты: у больных ХГС как с тромбоцитопенией, так и без таковой, сильная мутация W 515L регистрировалась значительно чаще, чем у здоровых лиц. Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении мутации W 515K. В группе больных ХГС с тромбоцитопенией уровень гликогена был существенно ниже, а активность α -НАЭ выше, чем в группе больных без таковой. Активность АТФ-аза в исследуемых группах существенных различий не имела.

Заключение: Выявленные сильные точковые мутации в рецепторах, а также нарушения ферментативной активности тромбоцитов, могут являться факторами прогностически неблагоприятного течения заболевания.

Ключевые слова: тромбоцитопения, хронический гепатит С, рецепторы к тромбопоэтину, ферментативная активность тромбоцитов.

N.Y. Pshenichnaya, G.V. Kuznetsova

SOME THROMBOCYTE FACTORS DEVELOPMENT OF THROMBOCYTOPENIA IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

*Rostov State Medical University,
Department of Infectious Diseases with Pediatric Infectious Diseases and Epidemiology Courses
in the Postgraduate Faculty*

29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: galentinabk@mail.ru.

Purpose: to examine the frequency of mutations W 515K and W 515L in the Mpl, the encoder receptors platelets to thrombopoietin and determine the degree of activity of enzymes of blood platelets - glycogen, alpha-naphthylthesterase (α ANAE) and adenosine triphosphatase (ATPase). at patients with chronic active liver disease.

Materials and methods. The RT PCR was used for research mutations in Mpl (W 515K and Mpl W 515L), to determine the degree of activity of enzymes studied the strokes of the peripheral blood.

Results: HCV-infected patients of both groups have demonstrated more high frequency of strong mutation in W515L than in healthy people. The same trend had been observed in regards to mutation in W515K. In the group of CHC patients with thrombocytopenia level of glycogen was lower and activity of α ANAE was higher than in the group of patients without thrombocytopenia. Essential difference of ATPase activity in both groups was not established.

Summary. Expressed point mutations in platelet thrombopoietin receptors and the identified violations of the enzymatic activity of platelets, may serve as prognostic aggravate factors of the course of CHC.

Keywords: thrombocytopenia, chronic hepatitis C, platelet thrombopoietin receptors, platelets enzyme activity.



Введение

В настоящее время многие аспекты развития тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С (ХГС) остаются неизученными.

Основным регулятором процесса образования тромбоцитов является тромбопоэтин, в основном вырабатываемый клетками печени. В плазме крови он частично связывается с рецепторами с-Mpl, расположенными на тромбоцитах, а оставшаяся его часть оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию мегакариоцитов в костном мозге. Синтез данных рецепторов кодируется геном Mpl[1]. У больных ХГС вследствие снижения функциональной активности гепатоцитов имеет место уменьшение выработки тромбопоэтина и снижение его активности [2]. С другой стороны, в гене Mpl описаны частые соматические мутации W515L и W515K, которые в гетерозиготном состоянии приводят к возникновению эссенциальной тромбоцитемии. Точковая мутация тромбопоэтинового рецептора встречается у 5-10% больных с эссенциальной тромбоцитопенией [3, 4]. Поэтому механизм развития тромбоцитопении у больных ХГС возможно связан не только со снижением синтеза тромбопоэтина в печени, но и с дефектом экспрессии рецептора с-Mpl на тромбоцитах. Роль рецепторов к тромбопоэтину в патогенезе развития тромбоцитопении при ХГС до настоящего времени еще не изучалась.

Работами многих авторов показано, что активация и изменение формы тромбоцитов являются энергозависимым процессом [5]. Значительную роль в функционировании сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, а именно в адгезии, активации и агрегации тромбоцитов в месте повреждения сосудистой стенки, играют ферменты тромбоцитов. При анализе ряда литературных данных нами было установлено, что наличие тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С может быть связано с функциональной несостоятельностью тромбоцитов, обусловленной их ферментопатией. К настоящему времени изучено более 30 различных ферментов тромбоцитов, среди которых выделяют ферменты, непосредственно участвующие в тромбообразовании, протеолизе, гидролизе, гликолизе, пентозофосфатном цикле, цикле лимонной кислоты и дыхательной цепи, а также АТФ-аза [6, 7, 8, 9]. В литературных источниках не удалось найти каких-либо сведений об изменении активности ферментов тромбоцитов при хронических гепатитах и, в частности, при ХГС. Оценка функциональной активности тромбоцитов, а именно состояния их рецепторов к тромбопоэтину, ферментативной активности позволила бы более углубленно оценить механизмы формирования тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С и расширить современные представления о патогенетических аспектах этого заболевания.

Цель исследования - определение выраженности мутаций в рецепторах тромбоцитов к тромбопоэтину, степени активности ферментов тромбоцитов, а также установление взаимосвязи исследуемых показателей с развитием тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С.

Материалы и методы

Объект настоящего исследования - больные ХГС, находившиеся на обследовании и лечении в условиях инфекционного боксированного отделения для взрослых №4 МБУЗ ГБУ №1 им. Н.А.Семашко г.Ростова-на-Дону.

В исследование на выраженность мутаций вошли 58 больных с ХГС (РНК HCV+), которые ранее не проходили лечение с использованием комбинированной противовирусной терапии, со степенью фиброза по данным непря-

мой эластомерии печени не выше F2 и отсутствием явных клинико-лабораторных признаков аутоиммунных заболеваний. Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от наличия ($n_1=29$) или отсутствия у них тромбоцитопении ($n_2=28$). По основным клинико-лабораторным параметрам (возраст, пол, активность АлАт и АсАт, генотип вируса, уровень виремии, степень выраженности фиброза) группы оказались практически идентичными, что позволило провести их дальнейший статистический анализ. В группу сравнения вошли практически здоровые лица в возрасте от 22 до 55 лет ($n_3=32$).

Во всех группах проводилось количественное определение частоты мутаций в гене Mpl (W 515L и 515K), кодирующего с-Mpl рецептор тромбоцитов к тромбопоэтину, с предварительным выделением ДНК тромбоцитов, осуществлялось с помощью количественной ПЦР в реальном времени (RQ-PCR) по технологии TagMAN с использованием MplW 515L и 515K-тестов, производства «ГеноТехнология». Определялось исходное число копий нормального гена и число копий гена с мутацией W 515L и 515K. Данные исследования выполнялись в лаборатории на базе ФБУН «Ростов-НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора.

В исследование на ферментативную активность тромбоцитов вошли 20 больных с ХГС (РНК HCV+), которые ранее не проходили лечение с использованием комбинированной противовирусной терапии, со степенью фиброза по данным непрямой эластомерии печени не выше F2 и отсутствием явных клинико-лабораторных признаков аутоиммунных заболеваний. Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от наличия ($n_1=10$) или отсутствия у них тромбоцитопении ($n_2=10$).

Во всех группах проводили исследование мазков периферической крови, в которых определяли:

1. уровень гликогена по методу McManus, активность альфа-нафтилацетатэстеразы (α -НАЭ) по методу Пирса
2. активность аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) по методу Вахштейна-Мейзеля.

Для анализа полученных результатов исследования использовали количественный метод оценки цитохимической реакции, по принципу L.S. Kaplow в модификации G.Astaldi и L.Verga [10]. Данный метод включал в себя подсчет в специально окрашенном мазке тромбоцитов и распределение их по степени окраски. Количественно интенсивность окраски клеток оценивалась на основании подсчета цитохимического коэффициента, рассчитываемого по формуле: $K = 0a + 16 + 2b + 3c / 100$, где цифры числителя - это степень интенсивности окраски, а буквы - число клеток определенной интенсивности окраски.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием критерия Манна-Уитни, данные представлены в виде Me (LQL- UQL).

Данное исследование проводилось на базе Центра клинической морфологии и генетики РостГМУ.

Результаты и обсуждение

Состояние с-Mpl рецепторов тромбоцитов к тромбопоэтину при ХГС

Функциональное состояние с-Mpl рецепторов тромбоцитов к тромбопоэтину оценивали по частоте и экспрессии соматических мутаций W515L и W515K в гене Mpl. В группе здоровых лиц так же, как и у больных ХГС обеих групп, точковые мутации W515L и W515K встречались практически с одинаковой частотой (Рис.1). Их выявление свидетельствовало о возможной предрасположенно-



сти к развитию тромбоцитопении. Доминировала во всех группах мутация W515L, составляя соответственно 69,2% от суммарной частоты встречаемости обеих мутаций у больных ХГС с тромбоцитопенией, 71,4% у больных ХГС

без тромбоцитопении 76,9% у здоровых лиц.

Таким образом, различий в частоте встречаемости и типе соматической мутации гена Mpl во всех исследуемых группах не обнаружено.

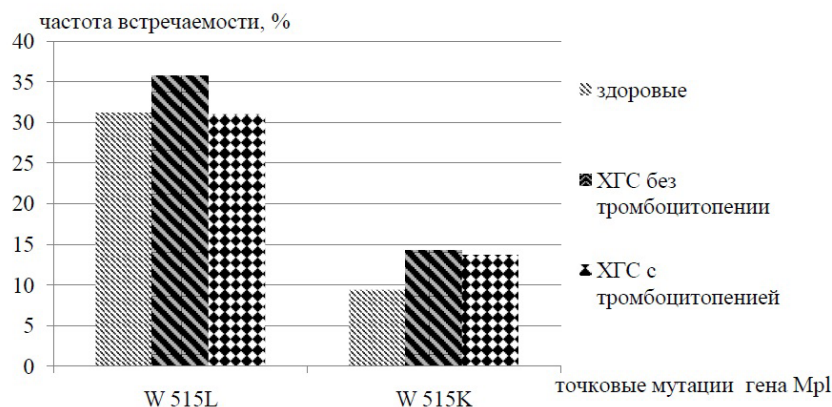


Рис.1. Частота выявления соматических точковых мутаций W 515L и W 515K гена Mpl в исследуемых группах.

Вместе с тем совершенно иные данные были получены при изучении степени экспрессии точковых мутации у здоровых лиц и больных ХГС. Интенсивность мутации оценивалась по частоте замены аминокислоты триптофан в положении W515 на лейцин (W515 L) или лизин (W515 K) и выражалась в процентах. Мутация в пределах 0,0001% - 1,0% считалась слабой, от 1,0-50% - средней и свыше 50% - сильной мутацией (Табл. 1).

Оказалось, что в обеих группах больных ХГС (как с тромбоцитопенией, так и без таковой), значительно чаще, чем у здоровых лиц, встречалась сильная мутация

W515L (46,1±14,3% и 42,8±13,7% против 7,7±7,7% соответственно, $p < 0,05$). В отношении мутации W515K прослеживалась та же тенденция, но, в связи с тем, что она встречалась значительно реже, достоверных отличий в исследуемых группах установить не удалось.

Полученные данные дают основание предполагать, что вирус гепатита С, попадая в организм человека, может усиливать мутацию гена Mpl, кодирующего рецепторы тромбопоэтина у лиц, уже имевших ранее точковые мутации W515L или W515K.

Таблица 1

Выраженность соматических мутаций гена Mpl у больных в исследуемых группах (абс./ $X \pm S$, %)

Больные исследуемых групп с мутациями гена Mpl	Выраженность мутации	W515L	W515K
Здоровые лица, n=13	0,0001% - 1,0% (1)	8/61,5±14,0	3/23,07±12,1
	<1,0-50% (2)	1/7,7±7,7	0/0±7,7
	>50% (3)	1/7,7±7,7	0/0±7,7
Б-е ХГС без тромбоцитопении, n=14	0,0001% - 1,0% (4)	1/7,14±7,14	0/0±7,14
	<1,0-50% (5)	3/21,4±11,3	1/7,14±7,14
	>50% (6)	6/42,8±13,7	3/21,4±11,3
Б-е ХГС с тромбоцитопенией n=13	0,0001% - 1,0% (7)	1/7,6±7,6	1/7,6±7,6
	<1,0-50% (8)	2/15,3±10,3	1/7,6±7,6
	>50% (9)	6/46,1±14,3	2/15,3±10,3
p 1-4		<0,05	>0,05
p 1-7		<0,05	>0,05
p 2-5		>0,05	>0,05
p 2-8		>0,05	>0,05
p 5-8		>0,05	>0,05
p 3-6		<0,05	>0,05
p 3-9		<0,05	>0,05



Под воздействием вируса слабая мутация может трансформироваться в выраженную и снижать опосредованное через с-Mpl рецептор связывание тромбоцитов с тромбопоэтином. В этом случае теоретически более значительное количество тромбопоэтина должно идти на стимуляцию пролиферации мегакариоцитов в костном мозге, но в связи с тем, что синтез тромбопоэтина в печени при ХГС снижен [7], стимулирующий эффект по принципу «обратной связи» практически оказывается нивелированным. Объяснимо и отсутствие разницы в частоте выявления выраженных мутаций в группе больных с тромбоцитопенией и без таковой. В данном случае вирус способствует увеличению количества клеток, несущих данные мутации, усиливая выраженность дефектов в рецепторном аппарате тромбоцитов к тромбопоэтину. Проявятся ли эти нарушения клинически, иными словами, разовьется ли у данного конкретного пациента с ХГС тромбоцитопения, зависит не только от выраженности

экспрессии данных точковых мутаций гена Mpl, но и от множества других эндогенных факторов, вносящих вклад в развитие тромбоцитопении.

Ферментативная активность тромбоцитов при наличии хронической HCV-инфекции.

В обеих группах больных ХГС выявлено достоверное снижение уровня гликогена по сравнению с нормой. У пациентов без тромбоцитопении его уровень составил 1,48 (1,45-1,50), с тромбоцитопенией - 1,43 (1,41-1,44), тогда как у здоровых лиц - 2,1 (2,01-2,14). Активность гликогена у пациентов с тромбоцитопенией была значительно ниже и по сравнению с пациентами без таковой. Активность АТФ-азы в обеих группах больных ХГС находилась в пределах 1,31(1,30-1,32), что также было существенно ниже нормы, составившей 1,60(1,45-1,60). Понижение уровня АТФ-азы в обеих группах больных ХГС было сопоставимо (рис. 2).

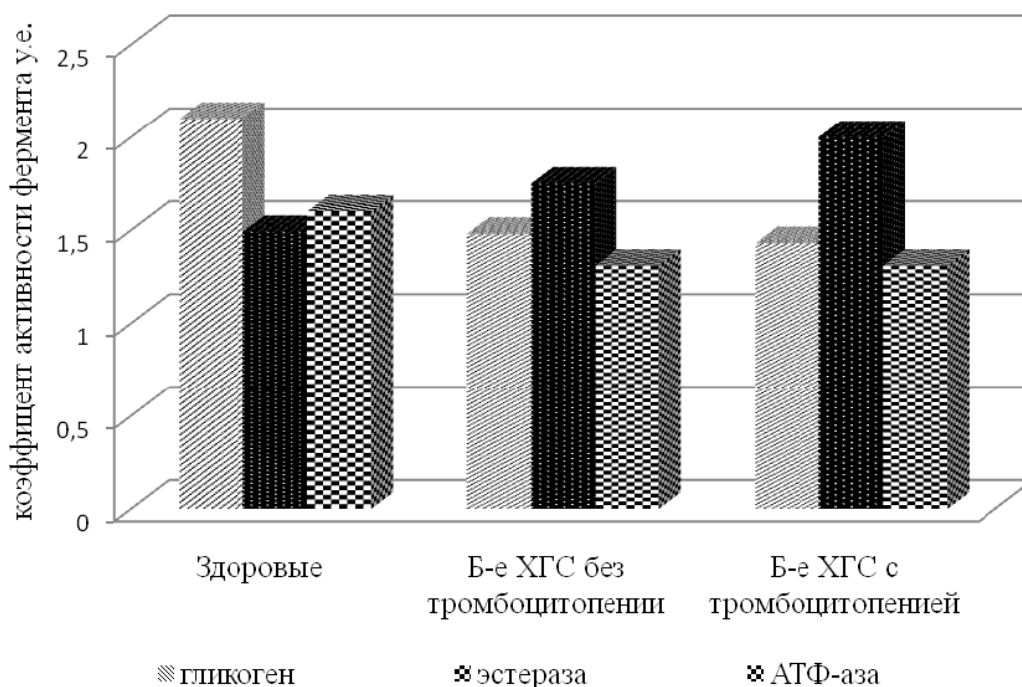


Рис. 2. Степень активности различных ферментов у здоровых людей, больных ХГС с наличием тромбоцитопении и у больных ХГС без таковой

Активность α -НАЭ оказалась повышенной у пациентов обеих групп, составив 1,75(1,73-1,80) - в 1-й, 2,0(1,99-2,03) - во 2-й и 1,49 (1,44-1,51) в группе здоровых лиц. Уровень α -НАЭ у пациентов с тромбоцитопенией достоверно превышал не только нормальные значения, но и показатели в группе больных без тромбоцитопении(рис. 2).

Заключение:

Под влиянием вируса гепатита С экспрессия точковых мутаций W515L и W515K гена Mpl может усиливаться, тем самым снижая тромбопоэтин-связывающую способность тромбоцитов посредством с-Mpl рецептора. Нали-

чие точковых мутаций в данном гене у больных ХГС является одним из прогностических факторов по развитию тромбоцитопении.

Выявленные дефекты ферментативной активности тромбоцитов при ХГС свидетельствуют о развитии тромбопатии при этой патологии. Более выраженные изменения показателей гликогена и α -НАЭ у больных с тромбоцитопенией свидетельствуют об усугублении функциональной несостоятельности тромбоцитов и могут служить в качестве прогностических критериев развития тромбоцитопении и прогрессирования нарушений тромбоцитарного звена гемостаза у больных ХГС.



ЛИТЕРАТУРА

1. Andrew I. Schafer Thrombocytosis/I.Andrew Schafer // N Engl J Med.- 2004.-№3.-P.1211.
2. Fujii H.Life-threatening severe immune thrombocytopenia during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C/H.Fujii ,T.Kitada, T.Yamada , et al// Hepatogastroenterology.- 2002.-№ 50.-P. 841-842.
3. Passamonti F. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden./F. Passamonti, E.Rumi // Haematologica. -2009.- Vol.9, №1.-P. 7-10.
4. Соколова Н. А. Изменения в представлении о патогенезе Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний / Н. А. Соколова, М. И. Савина // Молодой ученый. - 2011. - №5.- Т.2. - С. 216-219.
5. Волков М.А. Клиническая онкогематология./ М.А. Волков // 2001 г.- С.234-243
6. Marjorie B. Zucker, Jennie Borrelli A survey of some platelet enzymes and functions: the platelet as the source of normal serum acid glycerophosphatase / B.Marjorie ,Zucker, Jennie Borrelli// Annals of the New York Academy of Sciences. Enzymes in Blood – 1958. –P. 203–213.
7. Шитикова А.С.Тромбоцитарный гемостаз./ А.С.Шитикова//— 2000г.С. 101-135.
8. Бурячковская Л. И. Гетерогенность тромбоцитов человека и животных. Связь морфологических особенностей с функциональным состоянием: Автореф. дис. д-ра биол. наук. — М., 2007г.-С.116-156.
9. Anttinen H., Tuderman L., Oikarinen A. Kivirikko K.I. Intracellular enzymes of collagen biosynthesis in human platelets/H.Anttinen, L. Tuderman ,A. Oikarinen ,K.I. Kivirikko// Blood. – 1977.- Vol. 50, № 1.- P. 29-37.
10. Лойда З., Госсрай Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов./ Москва, Мир, 1982.-С.106-107.

ПОСТУПИЛА: 10.02.2013