DOI: 10.17117/na.2016.05.03.332

<http://ucom.ru/doc/na.2016.05.03.332.pdf>

Поступила (Received): 01.05.2016

Пшеничная Н.Ю., Гопаца Г.В.
Роль мутаций с-Mpl рецепторов тромбоцитов к
тромбопоэтину в развитии тромбоцитопении у
больных хроническим гепатитом С

Gopatsa G.V., Pshenichnaya N.Yu.
The role of mutations in the c-Mpl receptors to
thrombopoietin in development of thrombocytopenia
in patients with chronic hepatitis C

Для углубления представлений о патогенезе развития тромбоцитопении у больных с хроническим гепатитом С (ХГС) изучены частота мутаций W 515K и W 515L в гене Mpl, кодирующего рецепторы тромбоцитов к тромбопоэтину. Исследование выполнено у больных ХГС с наличием тромбоцитопении (n=29), у пациентов без таковой (n=28) и здоровых лиц (n=32). У больных ХГС обеих групп сильная мутация W 515L регистрировалась значительно чаще, чем у здоровых лиц – $46,1 \pm 14,3\%$ и $42,8 \pm 13,7\%$ против $7,7 \pm 7,7\%$, $p < 0,05$. Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении мутации W 515K, но без статистической значимости. Выраженные точковые мутации в рецепторах тромбоцитов к тромбопоэтину у больных ХГС являются свидетельством нарушений первичного гемостаза и могут служить прогностическим фактором развития тромбоцитопении. Сильные точковые мутации в рецепторах тромбоцитов к тромбопоэтину вероятно индуцированы воздействием вируса HCV

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

Пшеничная Наталья Юрьевна

Доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой

Ростовский государственный медицинский университет

г. Ростов-на-Дону, пер Нахичеванский, 29

In order to extend the conception on pathogenesis of thrombocytopenia development in patients with chronic hepatitis C (CHC) it was studied frequency of gene mutations in Mpl gene (W 515K and W 515L) which encode platelet c-Mpl receptors to thrombopoietin. The research was implemented in patients with HCV and thrombocytopenia (n=29), HCV without thrombocytopenia (n=28) and healthy people (n=32). The HCV-infected patients of both groups have demonstrated more high frequency of strong mutation in W515L than in healthy people ($46,1 \pm 14,3\%$ and $42,8 \pm 13,7\%$ against $7,7 \pm 7,7\%$, $p < 0,05$). The same trend had been observed in regards to mutation in W515K but without statistical evidence. Expressed point mutations in platelet thrombopoietin receptors in HCV-infected patients demonstrate the evidence of damage of primary hemostasis and can serve as prognostication criteria for developing thrombocytopenia. Expressed point mutations in platelet thrombopoietin receptors possibly could be induced by the HCV virus

Key words: thrombocytopenia, chronic hepatitis C, platelet thrombopoietin receptors

Pshenichnaya Natalia Yurievna

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Department

Rostov state medical university

Rostov-on-Don, lane Nakhichevanskiy, 29

Гопаца Галина Витальевна*Кандидат медицинских наук, ассистент
Ростовский государственный медицинский
университет
г. Ростов-на-Дону, пер Нахичеванский, 29***Gopatsa Galina Vitalievna***Candidate of Medical Sciences, Assistant
Rostov state medical university
Rostov-on-Don, lane Nakhichevanskiy, 29*

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия

Проблема хронических заболеваний печени, в особенности, хронического гепатита С (ХГС), в настоящее время привлекает пристальное внимание исследователей. Это обусловлено значительным ростом числа лиц, страдающих указанной патологией. В настоящее время в мире насчитывается более 170 миллионов человек, инфицированных вирусом гепатита С, что составляет около 3% населения Земли [2]. Особое коварство указанного заболевания заключается в том, что ХГС, характеризуясь выраженной склонностью к развитию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [2], приводит к инвалидизации и гибели больных нередко еще в трудоспособном возрасте

Известно, что вирус гепатита С не только вызывает поражение печени, но и вызывает многочисленные внепеченочные проявления, такие как, криоглобулинемию, нейропатию, гломерулонефрит, тромбоцитпению [11].

Тромбоцитопения также относится к одним из частых внепеченочных проявлений, а также наиболее выраженным побочным эффектом при проведении комбинированной противовирусной терапии у больных ХГС. Вышеуказанное обстоятельство в свою очередь является частой причиной отмены интерферонотерапии.

Многие аспекты патогенеза тромбоцитопении при ХГС остаются до конца не изученными. Так, например, уменьшение выработки тромбопоэтина и снижение его активности вследствие снижения функциональной активности гепатоцитов при ХГС является доказанным [6], однако роль рецепторов к тромбопоэтину в патогенезе развития тромбоцитопении при ХГС до настоящего времени еще не изучалась [1, 5, 7, 9].

Основным регулятором процесса образования тромбоцитов является тромбопоэтин, в основном вырабатываемый клетками печени. В плазме крови он частично связывается с рецепторами c-Mpl, расположенными на тромбоцитах, а оставшаяся его часть оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию мегакариоцитов в костном мозге. Синтез данных рецепторов кодируется геном Mpl [4]. У больных ХГС вследствие снижения функциональной активности гепатоцитов имеет место уменьшение выработки тромбопоэтина и снижение его активности [6]. 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, 8]. Поэтому, механизм развития тромбоцитопении у больных ХГС возможно связан не только со снижением синтеза тромбопоэтина в печени, но и с дефектом экспрессии рецептора c-Mpl на тромбоцитах.

Оценка функциональной активности тромбоцитов, а именно состояния их рецепторов к тромбопоэтину, позволила бы более углубленно оценить механизмы формирования тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С и расширить современные представления о патогенетических аспектах этого заболевания.

Целью исследования явилось определение выраженности мутаций в рецепторах тромбоцитов к тромбопоэтину, а также установление взаимосвязи исследуемых показателей с развитием тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С.

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

В исследование вошли 58 больных с ХГС (РНК HCV+), не леченных ранее с использованием комбинированной противовирусной терапии, со степенью фиброза по данным непрямой эластометрии 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 вирусемии, 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 *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 *Mpl* W 515L и 515K-тестов, производства «ГеноТехнология». Определялось исходное число копий нормального гена и число копий гена с мутацией W 515L и 515K. Все исследования выполнялись в лаборатории на базе ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора.

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, также как и у больных ХГС обеих групп точковые мутации W515L и W515K встречались практически с одинаковой частотой (Рис.1). Их выявление свидетельствовало о возможной предрасположенности 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 и 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

Оказалось, что в обеих группах больных ХГС (как с тромбоцитопенией, так и без таковой), значительно чаще, чем у здоровых лиц, встречалась сильная мутация W515L ($46,1 \pm 14,3\%$ и $42,8 \pm 13,7\%$ против $7,7 \pm 7,7\%$ 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.

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 [6, 10], 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.

У больных ХГС с тромбоцитопенией отмечались также изменения в коагулограмме. В $86,2 \pm 6,52\%$ случаев (25 больных) эти сдвиги проявлялись в виде удлинения протромбинового времени до $12,20 \pm 0,37$ сек. и в $41,38 \pm 9,31\%$ (12 больных) – снижения АЧТВ до $31,50 \pm 0,54$ сек. У всех этих пациентов выявлялись антитела к рецепторам тромбоцитов. Следует отметить, что у больных со сниженным АЧТВ зарегистрировано и удлинение протромбинового времени.

У больных ХГС без тромбоцитопении указанные изменения протромбинового времени и АЧТВ регистрировались соответственно в $21,42 \pm 7,90\%$ (6 больных) и $14,29 \pm 6,74\%$ (4 больных) случаях, что было существенно меньше, чем у пациентов с тромбоцитопенией ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно).

Заключение:

Под влиянием вируса гепатита С экспрессия точковых мутаций W515L и W515K гена Mpl может усиливаться. Дефект экспрессии рецептора c-Mpl на тромбоцитах приводит к нарушению связывания тромбopoэтина, что в свою очередь ведет к снижению образования тромбоцитов. Вследствие этого наличие точковых мутаций в данном гене у больных ХГС можно рассматривать как один из прогностических факторов по развитию тромбоцитопении.

Список используемых источников:

1. Воронина Е.Н., Филипенко М.Л., Сергеевичев Д., Пикалов И.В. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм // Вестник ВОГуС. 2006. Т. 10. № 3. С. 553-564.
2. Романова Е.Б., Амбалов Ю.М., Дубина Н.В. Морфологический мониторинг у больных хроническим гепатитом С на фоне комбинированной противовирусной терапии // Успехи современного естествознания. 2005. №10. С. 75-76.
3. Соколова Н. А., Савина М.И. Изменения в представлении о патогенезе Ph-негативных миелопрлиферативных заболеваний // Молодой ученый. 2011. №5. Т. 2. С. 216-219.
4. Andrew I. Schafer Thrombocytosis/I. Andrew Schafer // N Engl J Med. 2004. №3. P. 1211.
5. Fitzgerald L.A., Philips D.R. Platelet membrane glycoproteins/L.A. Fitzgerald, D.R. Philips, R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, E.W. Saizman // Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. JB Lippincott, Philadelphia. 1987. P. 572–593.
6. Fujii H. Life-threatening severe immune thrombocytopenia during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C/H. Fujii, T. Kitada, T. Yamada, et al. // Hepatogastroenterology. 200. № 50. P. 841-842.
7. Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors/R.O. Hynes // Cells. 1987. Vol 48. P. 549–554.
8. Passamonti F. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden./F. Passamonti, E. Rumi // Haematologica. 2009. Vol.9, №1. P. 7-10.
9. Smyth S.S., Joneckis C.C., Parise L.V. Regulation of vascular integrins. / S.S. Smyth, C.C. Joneckis, L.V. Parise // Blood. 1993. Vol. 81. P. 2827–2843.
10. Weksler B.B. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. / B.B. Weksler // Aliment Pharmacol Ther. 2007. № 26. P. 13-19.
11. Wang C.-S., Yao W.-J., Wang S.-T. et al. Strong Association of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and Thrombocytopenia: Implications from a Survey of a Community with Hyperendemic HCV Infection // Clin. Infect. Dis. 2004. №. 39. P. 790-796