

УДК 616.36-089.884:616.155.294

## ВЗАИМОСВЯЗЬ НАРУШЕНИЙ В РЕЦЕПТОРНОМ АППАРАТЕ ТРОМБОЦИТОВ К ТРОМБОПОЭТИНУ И РАЗВИТИЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

<sup>1</sup>Пшеничная Н.Ю., <sup>1</sup>Кузнецова Г.В., <sup>2</sup>Колпаков Д.С.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: okt@rostgmu.ru;

<sup>2</sup>Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Ростов-на-Дону, e-mail: rostovniimp@mail.ru

Для установления взаимосвязи между развитием тромбоцитопении у больных с хроническим гепатитом С (ХГС) и дефектами рецепторного аппарата тромбоцитов изучена 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 ( $n = 32$ ). Определение мутации в гене Mpl (W 515K и W 515L) оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. 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. Сильные точковые мутации в рецепторах тромбоцитов к тромбопоэтину, вероятно, индуцированы воздействием вируса HCV.

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

## RELATIONSHIP BETWEEN DEFECTS IN PLATELET THROMBOPOIETIN RECEPTORS AND PROGRESSION OF THROMBOCYTOPENIA IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

<sup>1</sup>Pshenichnaya N.Y., <sup>1</sup>Kuznetsova G.V., <sup>2</sup>Kolpakov D.S.

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: okt@rostgmu.ru;

<sup>2</sup>Rostov-on-Don Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, e-mail: rostovniimp@mail.ru

The frequency of gene mutations in Mpl gene (W 515K and W 515L) which encode platelet c-Mpl receptors to thrombopoietin was studied for establishing of relationship between defects in platelet thrombopoietin receptors and progression of thrombocytopenia in patients with chronic hepatitis. The research was implemented in patients with HCV and thrombocytopenia ( $n = 29$ ), HCV without thrombocytopenia ( $n = 28$ ) and healthy people ( $n = 32$ ). The qRT-PCR was used for research mutations in Mpl (W 515K and Mpl W 515L). 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.

**Keywords:** thrombocytopenia, chronic hepatitis C, platelet thrombopoietin receptors

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 [5], однако роль рецепторов к тромбопоэтину в патогенезе развития тромбоцитопении при ХГС до настоящего времени еще не изучалась [1, 4, 6, 8].

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 [3]. У больных ХГС вследствие снижения функциональной активности гепатоцитов имеет место уменьшение выработки тромбопоэтина и снижение его активности [5]. С другой стороны, в гене Mpl описаны частые соматические мутации W515L и W515K, которые в гетерозиготном состоянии приводят к возникновению эссенциальной тромбоцитопении. Точковая мутация тромбопоэтинового рецептора встречается у 5–10% больных с эссенциальной тромбоцитопенией [2, 7]. 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 исследования

Объектом настоящего исследования явились больные ХГС, находившиеся на обследовании и лечении в условиях инфекционного боксированного отделения для взрослых № 4 МБУЗ ГБ № 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 виремии, степень выраженности фиброза) группы оказались практически идентичными, что позволило провести их дальнейший статистический анализ. В группу срав-

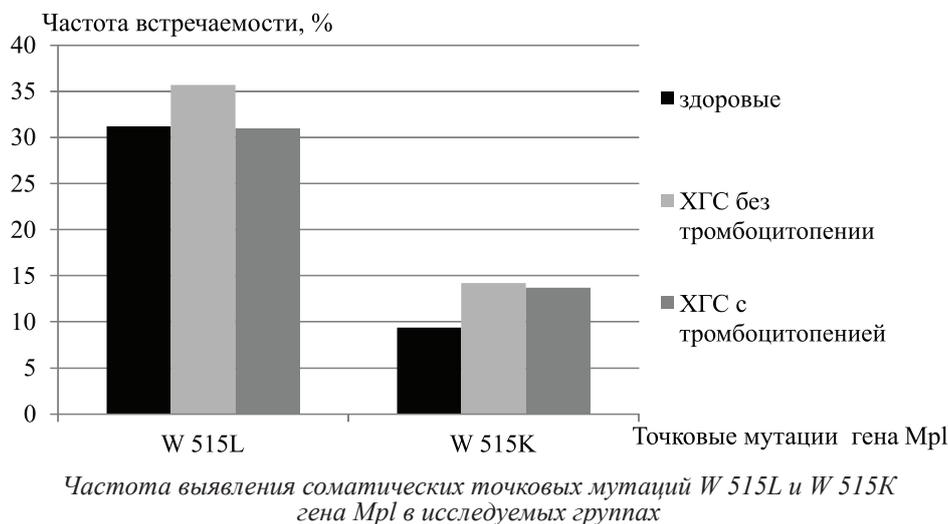
нения вошли практически здоровые лица в возрасте от 22 до 55 лет ( $n_3 = 32$ ).

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 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 исследования и их 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 (рисунок). 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. Вместе с тем совершенно иные данные были получены при изучении степени экспрессии точковых мутаций у здоровых лиц и больных ХГС. Интенсив-

ность 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 (таблица).

Выраженность соматических мутаций гена Mpl у больных в исследуемых группах (абс./  
X ± 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

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.

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 [5, 9], 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, усили-

вая 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 ± 6,52% случаев (25 больных) эти сдвиги проявлялись в виде удлинения протромбинового времени до 12,20 ± 0,37 с и в 41,38 ± 9,31% (12 больных) – снижения АЧТВ до 31,50 ± 0,54 с. 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 ± 7,90% (6 больных) и 14,29 ± 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. Де-

фект экспрессии рецептора с-Mp1 на тромбоцитах приводит к нарушению связывания тромбопоэтина, 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 литературы

1. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм / Е.Н. Воронина, М.Л. Филипенко, Д. Сергеевичев, И.В. Пикалов // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т. 10. – № 3. – С. 553–564.
2. Соколова Н.А. Изменения в представлении о патогенезе Ph-негативных миелолипролиферативных заболеваний / Н.А. Соколова, М.И. Савина // Молодой ученый. – 2011. – № 5. – Т. 2. – С. 216–219.
3. Andrew I. Schafer Thrombocytosis / I. Andrew Schafer // N Engl J Med. – 2004. – № 3. – P. 1211.
4. 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. – 2nd ed. – 1987. – P. 572–593.
5. 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.
6. Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors / R.O. Hynes // Cells. – 1987. – Vol 48. – P. 549–554.
7. Passamonti F. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden / F. Passamonti, E. Rumi // Haematologica. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 7–10.
8. 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.
9. Weksler B.B. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease // AlimentPharmacolTher. – 2007. – № 26. – P. 13–19.

#### References

1. Voronin E.N. Membrane receptors of platelets: functions and polymorphism / E.N. Voronina, M.L. Filipenko, D. Sergeevichev, I.V. Pikalov // Messenger ВОГиС. – 2006. – Vol. 10. – № 3. – P. 553–564.
2. Sokolova N.A. Changes in representation about pathogenesis Ph-negative myeloproliferative diseases / N.A. Sokolov, M.I. Savin // Young scientist. – 2011. – № 5. – T. 2. – P. 216–219.
3. Andrew I. Schafer Thrombocytosis // N Engl J Med. – 2004. – № 3. – P. 1211.
4. 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, 2nd ed. – 1987. – P. 572–593.
5. 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.
6. Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors / R.O. Hynes // Cells. – 1987. – Vol 48. – P. 549–554.
7. Passamonti F. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden / F. Passamonti, E. Rumi // Haematologica. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 7–10.
8. 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.
9. Weksler B.B. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease // AlimentPharmacolTher. – 2007. – № 26. – P. 13–19.

#### Рецензенты:

Харсеева Г.Г. д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии № 2, ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону;

Яговкин Э.А. д.м.н., с.н.с. заместитель директора Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 17.04.2013.