

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

УДК 615.225-092.9

© Коллектив авторов, 2012

ЭФФЕКТИВНОСТЬ УБИДЕКАРИНОНА ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ EXPERIMENTAL EFFICIENCY UBIDECARENONE BY METABOLIC SYNDROME AND ARTERIAL HYPERSTHENES

М.А. Ковалева¹, А.И. Селезнева¹, М.Н. Макарова¹, В.Г. Макаров¹, А.А. Забозлаев², Г.И. Дьячук¹
М.А. Kovaleva¹, A.I. Selezneva¹, M.N. Makarova¹, V.G. Makarov¹, A.A. Zabozaev², G.I. Dyachuk¹

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

²ФАРМАСОФТ, Москва

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg

²FARMASOFT, Moscow

Контакт: М.А. Ковалесва, e-mail: kovaleva@ipharm.sp.ru

Изучена специфическая активность субстанции убидекаринона с повышенной биодоступностью. Концентрацию глюкозы измеряли в цельной крови; инсулина, холестерина, липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой плотности в плазме крови. Артериальное давление определяли неинвазивным методом. В ходе эксперимента было установлено наличие сахароснижающего действия убидекаринона, также субстанция способствовала нормализации липидного обмена и повышенного артериального давления. Убидекаринон может быть использован в качестве антиоксидантного средства в терапии начальных стадий заболеваний, сопровождающихся развитием окислительного стресса, например, в терапии метаболического синдрома и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: гипертензия, метаболический синдром, коэнзим Q10.

Specific substans ubidecarenone with increased bioavailability was studied. Concentration of glucose, insulin, cholesterol, low density lipoprotein and high-density lipoprotein in the blood plasma. Blood pressure is determined not invasive. Ubidecarenone effectively normalized metabolism and decreased blood pressure. Ubidecarenone can be used as a tool in antioxidant therapy initial stages of the diseases associated with oxidative stress, such as in the treatment metabolic syndrome and hypertension.

Key words: hypertension, metabolic syndrome, coenzyme Q10.

Введение

Как известно, гипертоническая болезнь (ГБ) и метаболический синдром (МС) играют ведущую роль среди причин заболеваемости, инвалидности и смертности в России. Среди комплекса средств для лечения и профилактики МС и ГБ особое место занимает антиоксидантная терапия, куда входят витамины, флавоноиды, а также коэнзим Q10 (Ко Q10).

Было установлено, что снижение восстановленного Ко Q10 в тканях приводит к снижению активности сукцинатдегидрогеназы-Q10 редуктазы [1]. При экзогенном поступлении Ко Q10 уровень его в тканях увеличивается, что приводит к существенному снижению артериального давления. Обобщая исследования последних 20 лет, можно заключить, что механизм гипотензивного действия Ко Q10 связан с его защитным действием на сосудистый эндотелий, антиоксидантными свойствами, улучшением диастолических функций сердца, снижением вязкости

крови, а также влиянием на секрецию ангиотензина и альдостерона [2].

В связи с тем, что Ко Q10 в восстановленной форме (убихинол) является эндогенным антиоксидантом, некоторые исследователи считают, что показатели окислительно-восстановительного статуса этого кофермента являются маркером патологий, в основе которых лежит окислительный стресс, в том числе при МС [3, 4].

В 2002 г. на основании данных клинических исследований по применению Ко Q10 у пациентов с сахарным диабетом (СД) и дислипидемией [3] сделали заключение об эффективности использования препарата для снижения уровня глюкозы. Через 12 недель терапии уровень глюкозы в периферической крови снижался на 30%. В исследованиях [5] доказана необходимость назначения препаратов Ко Q10 у больных с СД второго типа на фоне терапии статинами.

Цель исследования

Изучить гипогликемическое действие субстанции убидекаринона с повышенной биодоступностью в эксперименте. Оценить влияние исследуемой субстанции на показатели липидного обмена и артериальное давление.

Материалы и методы

Исследование специфической фармакологической активности препарата убидекаринон проводили на модели экспериментального МС, индуцированного однократным введением стрептозотоцина (Sidma-Aldrich, США) в дозе 60 мг/кг детенышам лабораторных крыс линии Wistar. Введение стрептозотоцина в неонатальном периоде приводит к избирательному повреждению островкового аппарата поджелудочной железы. Развивающаяся инсулинорезистентность активирует процесс липогенеза, что, в свою очередь, провоцирует увеличение массы животных. В связи с этим данная экспериментальная модель МС позволяет оценить эффективность препарата, как в отношении гипергликемии, так и в отношении других признаков метаболического синдрома (дислипидемия и ожирение).

Спустя 4 недели после индукции диабета проводили взвешивание детенышей, идентификацию пола и забор крови для измерения уровня глюкозы и инсулина. Животных без гипергликемии исключали из исследования. Животные, демонстрирующие гипергликемию, при относительно нормальном уровне инсулина в крови (допускали снижение уровня инсулина не более чем в 1,5–2 раза) включали в экспериментальные группы. Методом блочной рандомизации было сформировано 6 групп: интактные (группа 1) – животные без патологии; контроль (группа 2) – животные с индуцированной патологией без лечения; группа 3 – животные с индуцированной патологией, получавшие лечение препаратом Янувия, группа 4 – животные с индуцированной патологией, получавшие лечение убидекариноном 0,74 мг/кг; группа 5 – животные с индуцированной патологией, получавшие лечение препаратом убидекариноном 5,2 мг/кг; группа 6 – животные с индуцированной патологией, получавшие лечение препаратом убидекариноном 2,6 мг/кг.

На протяжении трех недель (до возраста 7 недель) животным перорально вводили исследуемый препарат (суспензия таблеток) в дозах 7,4; 5,2 и 2,6 мг/кг, плацебо (вода дистиллированная) и препарат сравнения – Янувия в дозе 10,7 мг/кг, в виде суспензии таблеток. По окончании введения веществ осуществляли забор крови для оценки уровня глюкозы и инсулина (Insulin rat EIA Kit, Cayman Chemical, США) в периферической крови, а также уровня холестерина (ХС), липопротеинов низкой плотности (LDL-ХС) и липопротеинов высокой плотности (HDL-ХС), с использованием соответствующих тест-наборов фирмы «Витал-Диагностик», Россия. По окончании эксперимента животных подвергали эвтаназии в CO₂-камере, с последующим обескровливанием. Осуществляли забор поджелудочной железы и прилегающей жировой ткани для дальнейшего гистологического исследования.

Так как одним из неотъемлемых составляющих МС является артериальная гипертензия, дополнительно было проведено отдельное исследование

антигипертензивной активности препарата убидекаринон в дозах 1,58 и 7,4 мг/кг. Исследование проводилось на крысах-самцах линии SHR (n = 30) со средним уровнем артериального давления (АД) 185/110 мм рт. ст. и массой 250–300 г.

Препарат вводили в виде суспензии таблеток с помощью атравматического зонда 3 раза в день через 4 часа в течение 5 дней. АД измеряли один раз в день перед первым введением, через 60 и 180 минут после 3-го введения в 1-й, 3-й и 5-й дни эксперимента. Измерение систолического и диастолического АД проводилось с помощью неинвазивной автоматизированной системы AD Instruments, Австралия.

Полученные результаты подвергались обработке в программе LabChart Reader 7. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Россия). Вероятность нулевой гипотезы принимали при 5% уровне значимости. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Однократное введение стрептозотоцина детенышам лабораторных крыс (самцов и самок) линии Wistar привело к развитию гипергликемии (табл. 1).

В динамике развития экспериментальной патологии на фоне повышения концентрации глюкозы в опытных группах отсутствовало снижение концентрации инсулина. Во всех экспериментальных группах содержание инсулина было не ниже, чем 0,5 нг/мл.

Убидекаринон проявил устойчивое сахароснижающее действие через две недели применения и корректировал липидный состав плазмы крови (табл. 2).

Через три недели курсового приема препарат нормализовал значения липопротеинов низкой плотности (LDL – ХС), что свидетельствует о снижении риска развития атеросклероза при дислипидемии.

Изменения концентрации липопротеидов высокой плотности в динамике экспериментальной патологии не выявлено.

Данные эффекты препарата могут быть связаны как с прямым действием на дыхательную цепь, поскольку убидекаринон является донатором Ко Q10 а значит, может предоставлять электроны для комплекса цитохрома-С, а также за счет антиоксидантного действия препарат способен нормализовать внутриклеточный метаболизм глюкозы.

В ходе эксперимента была установлена эффективная доза таблетированной формы нового лекарственного средства убидекаринон, которая составила 5,2 мг/кг.

Убидекаринон также снижал повышенный уровень САД и ДАД при внутрижелудочном введении в течение 5 дней в двух дозах (табл. 3).

На фоне применения исследуемого препарата наблюдалось уменьшение как систолического, так и диастолического артериального давления. САД наиболее выражено снижался через 60–180 мин после введения препарата (в среднем на 10–20 мм рт. ст.), при этом уменьшение АД было устойчивым и сохранялось к следующим суткам. Снижение ДАД было несколько менее выраженным, однако общие тенденции были те же.

Таблица 1

Динамика изменения уровня глюкозы в цельной крови крыс-самцов, ммоль/л, $M \pm m$ ($n = 6$)

Группа	Пол	Возраст животных, недели			
		4	5	6	7
Интактные	самцы	4,8±0,2	4,7±0,2	4,5±0,2	4,6±0,2
	самки	4,5±0,2	4,8±0,2	4,9±0,1	4,7±0,2
Контроль	самцы	12,8±1,1*	15,3±1,2*	14,7±1,3*	13,2±0,9*
	самки	9,4±0,7*	10,7±0,9*	12,1±1,1*	11,4±0,8*
Янувия	самцы	12,5±1,7*	10,0±1,3*	7,1±0,6*	6,1±0,3*
	самки	10,1±0,9*	8,4±1,1*	6,7±0,4*	5,9±0,3*
Убидекаринон 7,4 мг/кг	самцы	11,4±1,1*	10,3±1,0*	8,6±0,6*	7,2±0,3*
	самки	9,4±0,6*	8,9±0,7*	7,8±0,6*	6,8±0,3*
Убидекаринон 5,2 мг/кг	самцы	11,6±1,3*	9,6±1,0*	7,8±0,6*	6,6±0,2*
	самки	10,7±0,9*	9,6±0,8*	7,4±0,3*	6,7±0,3*
Убидекаринон 2,6 мг/кг	самцы	10,8±0,7*	10,3±0,8*	9,1±0,4*	8,1±0,5*
	самки	9,4±0,7*	8,9±0,6*	8,8±0,3*	8,1±0,4*

* — различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); * — различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Таблица 2

Концентрация LDL-ХС в сыворотке крови крыс, ммоль/л, $M \pm m$ ($n = 6$)

Группа	Крысы-самцы	Крысы-самки
Интактные	0,27±0,15	0,15±0,04
Контроль	2,80±0,37*	2,98±0,23*
Янувия	0,53±0,15	0,37±0,12
Убидекаринон 7,4 мг/кг	1,12±0,07*	1,28±0,14*
Убидекаринон 5,2 мг/кг	1,15±0,14*	1,28±0,16*
Убидекаринон 2,6 мг/кг	1,93±0,26*	1,60±0,25*

* — различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); * — различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Таблица 3

Уровень артериального давления при внутрижелудочном введении таблеток убидекаринон в дозах 1,58 и 7,4 мг/кг, мм рт. ст.

Время измерения	АД при введении убидекаринон, мм рт. ст., $M \pm m$			
	в дозе 1,58 мг/кг		в дозе 7,4 мг/кг	
	САД	ДАД	САД	ДАД
1-й день введения				
До введения (0 минут)	190,0±1,5	107,95±4,25	195,61±1,5	102,9±0,8
60 минут после введения	170,0±2,2 *	87,0±0,6 *	172,7±1,9 *	90,2±0,9 *
180 минут после введения	184,3±1,7 *	100,7±0,8 *	178,0±2,1 *	101,3±0,9
3-й день введения				
0 минут	187,6±1,2	104,2±0,6	188,3±1,5	101,8±0,8
60 минут после введения	174,7±1,7 *	88,3±0,9 *	169,2±1,9 *	86,6±0,6 *
180 минут после введения	183,3±3,4 *	102,9±0,7	185,0±1,4 *	99,2±0,7
5-й день введения				
0 минут	173,7±2,7	101,9±0,8	185,0±1,6	99,0±0,6
60 минут после введения	153,8±1,9 *	86,9±0,7 *	173,6±1,5 *	86,3±0,6 *
180 минут после введения	176,6±2,1	100,7±0,7	183,9±1,4 *	97,7±0,6 *

* — различия статистически значимы по сравнению с 0 минутой ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Таким образом, убидекаринон обладает способностью стойко снижать исходный уровень артериального давления, что позволяет подойти к лечению гипертензии не только с точки зрения симптоматической, но и с позиций патогенетической терапии. В связи с этим существует возможность не только поддерживать АД на стабильном уровне, но и лечить артериальную гипертензию, получая все более низкие цифры артериального давления с каждым днем приема.

По-видимому, механизм антигипертензивного действия убидекаринона связан с его антиоксидантной активностью. Исследуемый препарат оказывает влияние на свободно радикальные процессы в эндотелиоцитах, что способствует повышению содержания в них оксида азота и расслаблению сосудистой мускулатуры.

Выводы

1. Однократное введение стрептозотоцина детенышам лабораторных крыс линии Wistar привело к развитию экспериментальной патологии, ключевыми звеньями которой явились гипергликемия и дислипидемия.

2. В ходе эксперимента токсических эффектов убидекаринона не выявлено.

3. Убидекаринон может быть использован в качестве антиоксидантного средства в терапии начальных

стадий заболеваний, сопровождающихся развитием окислительного стресса, например, в терапии метаболического синдрома и артериальной гипертензии.

Литература

1. Yamagami T. Deficiency of activity of succinate dehydrogenase-coenzyme Q10 reductase in leukocytes from patients with essential hypertension / T. Yamagami, Y. Iwamoto, K. Folkers // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* — 1974. — V. 44. — P. 404–414.

2. Kumar A. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome / A. Kumar [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics.* — 2009. — V. 124. — P. 259–268.

3. Hodgson J.M. Coenzyme Q20 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes / J.M. Hodgson [et al.] // *Eur. Clin.Nutr.* — 2002. — V. 56, № 11. — P. 1137–1142.

4. Lagendijk J. Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress / J. Lagendijk, J.B. Ubbink, W.J. Vermaak // *J. Lipid. Res.* — 1996. — V. 37. — P. 67–75.

5. Mortensen S.A. Dose-related decrease of serum coenzyme Q10 during treatment with HMG-CoA reductase inhibitors / S.A. Mortensen [et al.] // *Mol. Aspects Med.* — 1997. — № 18. — P. 137–144.

УДК: 616.36-089.884:616.155.294

© Коллектив авторов, 2012

РОЛЬ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ И МУТАЦИЙ C-MPL РЕЦЕПТОРОВ К ТРОМБОПОЭТИНУ В РАЗВИТИИ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

THE ROLE OF PLATELET ANTIBODIES AND MUTATIONS IN THE C-MPL RECEPTORS TO THROMBOPOIETIN IN DEVELOPMENT OF THROMBOCYTOPENIA IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Н.Ю. Пшеничная¹, Г.В. Кузнецова¹, Е.Б. Романова¹, Т.И. Твердохлебова²N.Yu. Pshenichnaya¹, G.V. Kuznetsova¹, E.B. Romanova¹, T.I. Tverdokhlebova²¹Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону²Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Ростов-на-Дону¹Rostov State Medical University, Rostov-on-Don²Rostov Research Science Institute of Microbiology and Parasitology of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Rostov-on-Don

Контакт: Н.Ю. Пшеничная, e-mail: natalia-pshenichnaya@yandex.ru

Для углубления представлений о патогенезе развития тромбоцитопении у больных с хроническим гепатитом С (ХГС) изучены частота встречаемости и относительное содержание антител к мембранным рецепторам тромбоцитов (GP Ia/IIa, Ib/IX и IIb/IIIa) и частота мутаций W 515K и W 515L в гене Mpl, кодирующего рецепторы тромбоцитов к тромбopoэтину. Исследование выполнено у больных ХГС с наличием тромбоцитопении (n = 29), у пациентов без таковой (n = 28) и здоровых лиц (n = 32).

Определение антител к мембранным рецепторам тромбоцитов проводили методом ИФА, мутации в гене Mpl (W 515K и W 515L) оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Выявлена высокая частота встречаемости anti-GPIa/IIa и Ib/IX у больных ХГС с тромбоцитопенией по сравнению с остальными исследуемыми группами.

У больных ХГС обеих групп сильная мутация W 515L регистрировалась значительно чаще, чем у здоровых лиц – 46,1±14,3% и 42,8±13,7% против 7,7±7,7%, p<0,05. Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении мутации W 515K, но без статистической значимости.

Высокий уровень антител к мембранным рецепторам тромбоцитов GPIa/IIa и Ib/IX и выраженные точковые мутации в рецепторах тромбоцитов к тромбopoэтину у больных ХГС являются свидетельством нарушений первичного гемостаза и могут служить прогностическим фактором развития тромбоцитопении. Сильные точковые мутации в рецепторах тромбоцитов к тромбopoэтину, вероятно, индуцированы воздействием вируса HCV.

Ключевые слова: тромбоцитопения, хронический гепатит С, антитела к рецепторам тромбоцитов, рецепторы к тромбopoэтину.

In order to extend the conception on pathogenesis of thrombocytopenia development in patients with chronic hepatitis C (CHC) it was studied the level and relative content of antibodies to platelet membrane receptors (GP Ia/IIa, Ib/IX and IIb/IIIa) and 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 detection of platelet receptor antibodies was made by the ELISA technique, qRT PCR was used for research mutations in Mpl (W 515K and Mpl W 515L).

It was revealed the high frequency of detection anti-GP Ia/IIa/Ib/IX in HCV-infected patients with thrombocytopenia versus other investigated groups.

The HCV-infected patients of both groups have demonstrated more high frequency of strong mutation in W515L than in healthy people (46,1±14,3% and 42,8±13,7% against 7,7±7,7%, p<0,05). The same trend had been observed in regards to mutation in W515K but without statistical evidence.

High level of antibodies to platelet membrane receptors GP Ia/IIa and Ib/IX and 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 receptor antibodies, platelet thrombopoietin receptors.

Введение

В настоящее время многие аспекты развития тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С (ХГС) остаются неизученными. Лишь единичные исследования посвящены изучению роли в этом процессе антитромбоцитарных антител. Между тем мембранным рецепторам тромбоцитов — интегринам отводится одна из ключевых ролей в осуществлении гемостаза [1, 6, 9, 14].

Гликопротеид Ia/IIa обеспечивает адгезию тромбоцитов к волокнам коллагена в первые секунды после повреждения. На этапе агрегации другой поверхностный рецептор тромбоцитов — гликопротеид Ib/IX образует связь с фактором фон Виллебранда, который, в свою очередь, соединяется с субэндотелиальными волокнами коллагена, тем самым стабилизируя полученный субстрат [6, 13]. Существенную роль в процессе агрегации играет также рецептор фибриногена — гликопротеид IIb/IIIa, с помощью которого соседние тромбоциты связываются в агрегаты [1]. Связывание циркулирующих тромбоцитов с антителами, направленными против поверхностных рецепторов тромбоцитов, приводит к их ускоренной элиминации селезеночными макрофагами посредством Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза. Связывание же антител с мембраной развивающихся тромбоцитов может в определенной степени нарушать мегакариопоэз [5, 8, 11, 15]. Между тем роль антител к отдельным мембранным рецепторам тромбоцитов в развитии тромбоцитопении при этом заболевании, их взаимосвязь с другими показателями гемостаза остаются неясными.

Еще одним 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 [7]. 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 [2, 12]. 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. Роль рецепторов к тромбопоэтину в патогенезе развития тромбоцитопении при ХГС до настоящего времени еще не изучалась.

Оценка функциональной активности тромбоцитов, а именно состояния их мембранных антигенов и 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.

Цель исследования — определение уровня антител к мембранным рецепторам тромбоцитов (GP Ia/IIa, Ib/IX и IIb/IIIa) и 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 Городской больницы № 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 непрямои 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 сравнения вошли практически здоровые лица в возрасте от 22 до 55 лет ($n_3 = 32$).

Во всех группах проводилось исследование на наличие антител к поверхностным рецепторам тромбоцитов Ia/IIa, Ib/IX, IIb/IIIa методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы GTIDiagnostics (США). Оптическая плотность в пределах от 0 до 200 у.е. расценивалась как отрицательный результат определения антител («–»), от 201 до 400 у.е. — как сомнительный («±») и свыше 400 у.е. — как положительный («+»). Количественное определение частоты мутаций в гене Mpl (W 515L и 515K), кодирующем c-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 Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора.

Результаты и обсуждение

Роль антител к рецепторам тромбоцитов в развитии тромбоцитопении у больных хроническим гепатитом С

При изучении относительной частоты встречаемости антител к поверхностным антигенам тромбоцитов GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPIa/IIa в исследуемых группах выявлен ряд отличий (рис. 1). Наиболее существенная разница обнаружена при определении антител к антигену GPIa/IIa. Суммарно сомнительные и положительные результаты индикации этих

антител достоверно чаще встречались у пациентов с ХГС с наличием тромбоцитопении ($75,8 \pm 8,0\%$) по сравнению со здоровыми лицами ($43,7 \pm 8,7\%$), $p < 0,01$. Антитела к антигену GPIa/IIa (положительные результаты) чаще регистрировались у больных ХГС с тромбоцитопенией ($44,8 \pm 9,3\%$) по сравнению с больными ХГС без таковой ($3,6 \pm 3,5\%$), $p < 0,01$. Частота выявления антител (положительные резуль-

таты) к рецептору GPIb/IX также была более высокой у больных с ХГС с тромбоцитопенией ($55,2 \pm 9,3\%$) по сравнению как с группой здоровых лиц ($28,1 \pm 7,9\%$, $p < 0,01$), так и с группой больных ХГС без тромбоцитопении ($10,7 \pm 5,9\%$, $p < 0,05$). Каких-либо достоверных различий в частоте обнаружения антител к антигену тромбоцитов GPIIb/IIIa между всеми исследуемыми группами не выявлено.

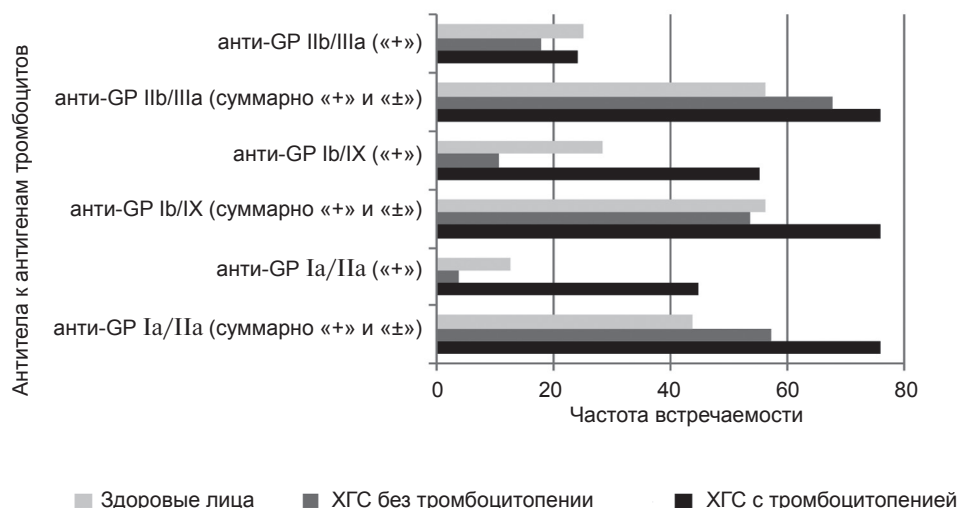


Рис. 1. Частота встречаемости антител к антигенам тромбоцитов GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa в исследуемых группах

Суммарная оптическая плотность антител к GPIa/IIa также оказалась существенно больше у больных ХГС с тромбоцитопенией по сравнению как со здоровыми лицами, так и с группой больных ХГС с нормальным количеством тромбоцитов: $0,331 \pm 0,035$ против $0,208 \pm 0,015$, $p < 0,01$ и $0,217 \pm 0,012$, $p < 0,01$ соответственно (рис. 2). Более высокая оптическая плотность отмечена у пациентов с тромбоцитопенией, чем у больных без таковой, и в отношении антител к рецептору GP Ib/IX ($0,280 \pm 0,025$ и $0,215 \pm 0,010$, $p < 0,05$). При сравнении со здоровыми лицами обеих групп больных ХГС различия в оптической плотности антител к этому рецептору не выявлено. Отличия в содержании антител к рецептору тромбоцитов GP IIb/IIIa были найдены только при сравнении групп больных ХГС со здоровыми лицами ($0,276 \pm 0,025$ и $0,303 \pm 0,033$ против $0,211 \pm 0,019$, $p < 0,05$ в обоих случаях). Наибольшая оптическая плотность содержания антител к рецептору Ia/IIa также была выявлена у больных ХГС с развитием тромбоцитопении в сравнении с 2 другими группами. Превалирование содержания антител к GPIIb/IIIa и GPIb/IX, оцененное по оптической плотности, также отмечено именно в этой группе пациентов.

Спленомегалия встречалась в 24,7% случаев ($n = 7$) только в группе больных с тромбоцитопенией, что оказалось статистически значимо по сравнению с больными ХГС без тромбоцитопении ($\chi^2 = 4,28$, $df = 1$, $p = 0,038$). У 6 из этих больных (85,7%) антитела выявлялись ко всем 3 рецепторам тромбоцитов и лишь у 1 (14,3%) — к 2.

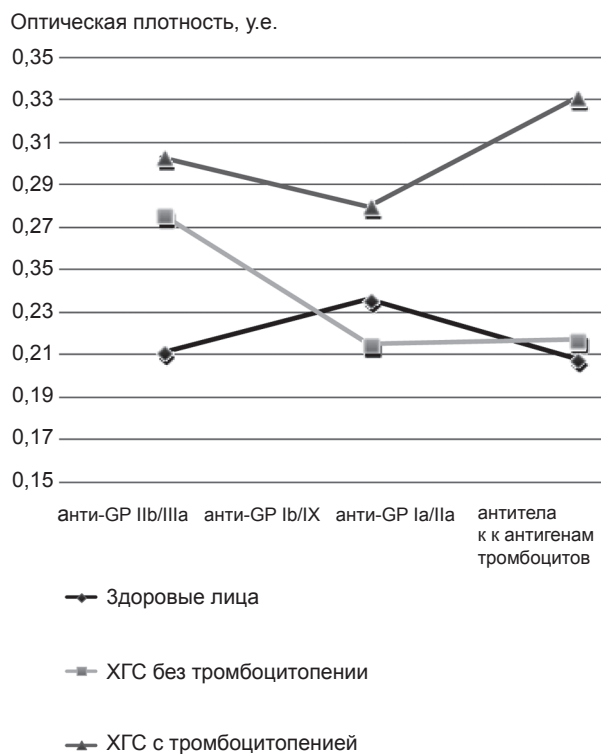


Рис. 2. Относительное содержание антител к антигенам тромбоцитов у больных с ХГС в зависимости от наличия или отсутствия у них тромбоцитопении и здоровых лиц

По всей видимости, селезенка у части больных с тромбоцитопенией начинает усиленно захватывать и секвенировать тромбоциты с расположенными на них антителами к мембранным рецепторам, распознавая их как чужеродные. Полученные данные согласуются с результатами, полученными S. Aref et al. (2009), которые установили сильную обратную коррелятивную связь между количеством тромбоцитов и уровнем гликопротеин-специфических антитромбоцитарных антител у больных ХГС и прямую — между размерами селезенки, также придя к выводу, что тромбоцитопения является критерием прогрессирования патологического процесса в печени [4]. Кроме того, M. Olariu et al. (2010) отмечают, что уже при умеренной тромбоцитопении антитела к тромбоцитам присутствуют у 85% больных ХГС [10].

Исследование корреляционных взаимосвязей между относительным содержанием антител к рецепторам тромбоцитов (оцененным по оптической плотности) и количеством тромбоцитов выявило умеренную обратную связь между уровнем как GPIIb/IIIa, так и GPIb/IX и средним числом тромбоцитов у больных ХГС с тромбоцитопенией. Умеренная обратная связь также прослеживалась между относительным содержанием антител к рецептору GPIb/IX и числом тромбоцитов у больных ХГС без тромбоцитопении. В группе здоровых лиц какой-либо

связи между исследуемыми параметрами установить не удалось (табл.1).

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 $12,20 \pm 0,37$ с и в $41,38 \pm 9,31\%$ (12 больных) — снижения АЧТВ до $31,50 \pm 0,54$ 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 $21,42 \pm 7,90\%$ (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).

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. 3).

Таблица 1

Коррелятивные взаимосвязи между уровнем тромбоцитов и оптической плотностью содержания антител к различным мембранным рецепторам тромбоцитов в исследуемых группах больных

Мембранные рецепторы тромбоцитов	Относительное содержание антител к рецепторам тромбоцитов (оптическая плотность) в исследуемых группах ($M \pm m$, у.е.) и коэффициент корреляции Пирсона (r)					
	Здоровые лица, n = 32 (I)		Больные ХГС без тромбоцитопении, n = 28 (II)		Больные ХГС с тромбоцитопенией, n = 29 (III)	
	$M \pm m$	r	$M \pm m$	r	$M \pm m$	r
GPIIb/IIIa (1)	$0,211 \pm 0,019$	0,02	$0,236 \pm 0,017$	-0,24	$0,208 \pm 0,015$	-0,14
GPIb/IX (2)	$0,276 \pm 0,025$	0,12	$0,215 \pm 0,010$	-0,32	$0,217 \pm 0,012$	-0,35
GPIIa/IIa (3)	$0,303 \pm 0,033$	0,10	$0,280 \pm 0,025$	-0,27	$0,331 \pm 0,035$	-0,32
Средний уровень тромбоцитов в группах ($M \pm m$, тыс.)						
	$193,3 \pm 4,6$		$205,8 \pm 7,3$		$125,3 \pm 2,8$	

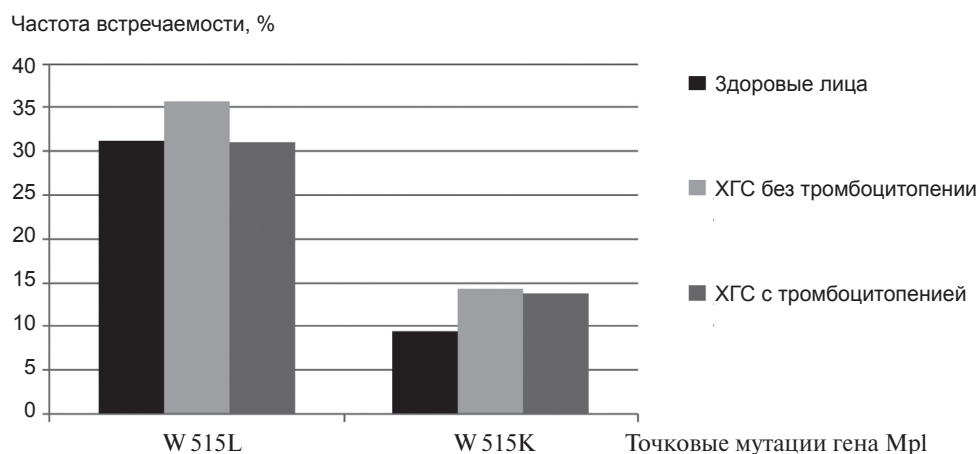


Рис. 3. Частота выявления соматических точковых мутаций W 515L и W 515K гена Mpl в исследуемых группах

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. 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. 2).

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 тромбо-

поэтина должно идти на стимуляцию пролиферации мегакариоцитов в костном мозге, но в связи с тем, что синтез тромбопоэтина в печени при ХГС снижен [7, 15], 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.

Заключение

Одним из компонентов многофакторного механизма развития тромбоцитопении является образование антител к мембранным рецепторам тромбоцитов (GPIa/IIa и GPIb/IX), приводящее к дефектам первичного этапа гемостаза и обуславливающее усиленное секвенирование тромбоцитов в селезенке. Определение антител к рецепторам тромбоцитов может быть использовано для прогнозирования риска развития или прогрессирования тромбоцитопении у больных ХГС.

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

Таблица 2

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

Больные исследуемых групп с мутациями гена <i>Mpl</i>	Выраженность мутации	W515L	W515
Здоровые лица, n = 13	0,0001% – 1,0% (1)	8/61,5 \pm 14,0	3/23,07 \pm 12,1
	<1,0 – 50% (2)	1/7,7 \pm 7,7	0/0 \pm 7,7
	>50% (3)	1/7,7 \pm 7,7	0/+7,7
Больные ХГС без тромбоцитопении, n = 14	0,0001% – 1,0% (4)	1/7,14 \pm 7,14	0/0 \pm 7,14
	<1,0 – 50% (5)	3/21,4 \pm 11,3	1/7,14 \pm 7,14
	>50% (6)	6/42,8 \pm 13,7	3/21,4 \pm 11,3
Больные ХГС с тромбоцитопенией, n = 13	0,0001% – 1,0% (7)	1/7,6 \pm 7,6	1/7,6 \pm 7,6
	<1,0 – 50% (8)	2/15,3 \pm 10,3	1/7,6 \pm 7,6
	>50% (9)	6/46,1 \pm 14,3	2/15,3 \pm 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

Литература

1. Воронина Е.Н. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм / Е.Н.Воронина [и др.] // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, № 3. — С. 553–564.
2. Соколова Н.А. Изменения в представлении о патогенезе Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний / Н.А. Соколова, М.И. Савина // Молодой ученый. — 2011. — Т.2, № 5. — С. 216–219.
3. Andrew I.S. Thrombocytosis / I.S. Andrew // N. Engl. J. Med. — 2004. — № 3. — P.1211.
4. Aref S. Antiplatelet antibodies contribute to thrombocytopenia associated with chronic hepatitis C virus infection / S. Aref [et al.] // Hematology. — 2009. — № 14 (5). — P. 277–281.
5. Doi T. Mechanisms for increment of platelet associated IgG and platelet surface IgG and their implications in immune thrombocytopenia associated with chronic viral liver disease / T. Doi [et al.] // Hepatol. Res. — 2002. — V. 24 (1). — P. 23–33.
6. Fitzgerald L.A. Platelet membrane glycoproteins / L.A. Fitzgerald [et al.] // Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. — 2nd ed. — Philadelphia: JB Lippincott, 1987. — P. 572–593.
7. Fujii H. Life-threatening severe immune thrombocytopenia during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C / H. Fujii [et al.] // Hepatogastroenterology. — 2003. — № 50. — P. 841–842.
8. Hernandez F. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection / F. Hernandez [et al.] // ActaHaematol. — 1998. — № 99. — P. 217–220.
9. Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors / R.O. Hynes // Cells. — 1987. — V. 48. — P. 549–554.
10. Olariu M. Thrombocytopenia in chronic hepatitis C / M. Olariu, C. Olariu, D. Olteanu // J. Gastrointest. Liver. Dis. — 2010. — № 19 (4). — P. 381–385.
11. Panzer S. Platelet autoantibodies are common in hepatitis C infection, irrespective of the presence of thrombocytopenia / S. Panzer, E. Seel, M. Brunner // Eur. J. Haematol. — 2006. — № 77. — P. 513–517.
12. Passamonti F. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden / F. Passamonti, E. Rumi // Haematologica. — 2009. — V. 9, № 1. — P. 7–10.
13. Ruggeri Z.M. Von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib complex / Z.M. Ruggeri [et al.] // Methods Enzymol. — 1992. — V. 215. — P. 263–275.
14. Smyth S.S. Regulation of vascular integrins / S.S. Smyth, C.C. Joneckis, L.V. Parise // Blood. — 1993. — V. 81. — P. 2827–2843.
15. Weksler B.B. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease / B.B. Weksler // AlimentPharmacolTher. — 2007. — № 26. — P. 13–19.