

Analiza wybranych parametrów procesu megakariocytopoezy u myszy z mutacją c-Mpl w pokoleniu F2 z krzyżówki (BALB/cW x C57BL/6J-Mpl^{h1b219}/J)

STRESZCZENIE

Megakariocytopoeza obejmuje dwa główne etapy: różnicowanie i dojrzewanie megakariocytów oraz uwalnianie płytek krwi. W wyniku zaburzeń tych procesów rozwija się małopłytkowość i nadpłytkowość. Mechanizmy odpowiedzialne za rozwój małopłytkowości i nadpłytkowości nie zostały jak dotąd jeszcze w pełni poznane. Istotnym regulatorem megakariocytopoezy jest trombopoetyna (TPO). Receptor dla trombopoetyny (c-Mpl) występuje na płytkach krwi i progenitorach megakariocytów. Dostępne receptory c-Mpl znacząco wpływają na stężenie trombopoetyny w surowicy krwi obwodowej.

Celem pracy jest:

1. Scharakteryzowanie związku mutacji Mpl^{h1b219} w genie receptora dla trombopoetyny c-Mpl z wystąpieniem zaburzeń liczby płytek krwi w modelu mysim (myszy pokolenia F2 krzyżówki BALB/cW x C57BL/6J-Mpl^{h1b219}/J).
2. Określenie związku mutacji Mpl^{h1b219} ze stężeniem TPO, erytropoetyny (EPO) i interleukiny-11 (IL-11) w surowicy krwi obwodowej oraz poszukiwanie zależności między stężeniem cytokin a liczbą megakariocytów w szpiku kostnym i liczbą płytek we krwi obwodowej badanych myszy.
3. Scharakteryzowanie wpływu mutacji w genie c-MPL na stopień dojrzałości megakariocytów w szpiku kostnym.

Materiał i metody

Materiałem do badań była krew obwodowa pobrana od 100 myszy pokolenia F2 z krzyżówki (BALB/cW x C57BL/6J-Mpl^{h1b219}/J) oraz 29 myszy pokolenia F2 z krzyżówki (BALB/cW x C57BL/6W), fragment ogona do badań molekularnych i kości udowe do badań histologicznych i immunohistochemicznych. Wykonano pełną morfologię krwi obwodowej analizatorem automatycznym (Sysmex), oznaczano liczbę płytek krwi metodą manualną bezpośrednią, przeprowadzono genotypowanie metodą RT-PCR, przygotowano preparaty histologiczne szpiku kostnego barwione hematoksyliną i eozyną oraz wykonano barwienia immunohistochemiczne metodą EnVision przy użyciu przeciwciał CD34 i CD61, badano również stężenia TPO, EPO i IL-11 w surowicy krwi metodą ELISA. Ponadto wykonano badanie morfometryczne megakariocytów szpiku kostnego.

Otrzymane wyniki analizowano statystycznie z pomocą pakietów statystycznych SPSS w wersji 23.0, niektóre wykresy zostały wykonane z użyciem pakietu statystycznego Statistica w wersji 10.0.

Wyniki

Zwierzęta grupy eksperymentalnej zostały podzielone na cztery grupy, w zależności od liczby płytek krwi: grupa zwierząt z małopłytkowością, z nadpłytkowością, małopłytkowością cykliczną i z prawidłową liczbą płytek we krwi obwodowej. Myszy z małopłytkowością były homozygotami pod względem mutacji w genie receptora dla trombopoetyny: Mpl^{h1b219}. Myszy z nadpłytkowością, jak również myszy z małopłytkowością cykliczną były heterozygotami. Myszy z małopłytkowością cykliczną charakteryzowały się cyklicznie występującymi zmianami liczby płytek krwi. U wszystkich myszy z mutacją w Mpl^{h1b219} stężenie trombopoetyny oraz IL-11 w surowicy krwi było podwyższone w stosunku do kontroli. Myszy z nadpłytkowością charakteryzowały się wyższym stężeniem erytropoetyny w surowicy krwi.

Myszy z małopłytkowością i myszy z małopłytkowością cykliczną miały niższą liczbę megakariocytów w szpiku kostnym oraz mniejsze pole powierzchni cytoplazmy megakariocytów, niż obserwowane w grupie kontrolnej i u myszy z nadpłytkowością.

Podsumowanie i wnioski

1. Mutacja Mpl^{Hlb219} w genie receptora dla trombopoetyny skutkuje zaburzeniami liczby płytek we krwi obwodowej, zależnymi od tego, czy mutacja występuje w jednym, czy w obu allelach:

- u homozygot występuje małopłytkowość
- u heterozygot występuje małopłytkowość cykliczna lub nadpłytkowość.

Zmiany liczby płytek krwi u myszy heterozygotycznych pod względem mutacji Mpl^{Hlb219} zależą nie tylko od mutacji sprawczej, ale także od dodatkowych czynników.

W piśmiennictwie jak dotąd nie opisano występowania małopłytkowości cyklicznej u myszy z heterozygotyczną mutacją Mpl^{Hlb219} .

2. Mutacja $Hlb219$ w genie Mpl wywiera różny wpływ na wydzielanie cytokin, liczbę megakariocytów w szpiku kostnym i pole ich powierzchni, w zależności od występowania w postaci homozygotycznej lub heterozygotycznej:

- u myszy homozygotycznych z małopłytkowością zaobserwowano dwukrotny wzrost stężenia IL-11 i ośmiokrotny wzrost stężenia trombopoetyny w surowicy krwi obwodowej oraz zmniejszenie liczby i pola powierzchni megakariocytów w szpiku kostnym w stosunku do myszy grupy kontrolnej.
- u heterozygot z nadpłytkowością zaobserwowano istotny wzrost stężenia erytropoetyny, trombopoetyny i IL-11 w surowicy krwi obwodowej oraz nieznaczny wzrost pola powierzchni megakariocytów w szpiku kostnym w porównaniu do grupy kontrolnej.
- u heterozygot z małopłytkowością cykliczną zaobserwowano, że w okresach wzrostu liczby płytek krwi wraz ze wzrostem stężenia erytropoetyny w surowicy krwi obwodowej malało pole powierzchni megakariocytów.

3. W zależności od występowania mutacji Mpl^{Hlb219} w układzie homozygotycznym lub heterozygotycznym występują różnice w ekspresji markerów powierzchniowych CD34 i CD61 w megakariocytach, co wskazuje na istotny wpływ mutacji na stopień dojrzałości megakariocytów w szpiku kostnym:

- u homozygot oraz u heterozygot z małopłytkowością cykliczną stwierdzono wyższy stopień ekspresji CD34 w megakariocytach szpiku kostnego w porównaniu do myszy grupy kontrolnej oraz niższy stopień ekspresji CD61.
- u heterozygot z nadpłytkowością zaobserwowano, że ekspresja CD34 i CD61 w megakariocytach szpiku kostnego wyrażona jest na podobnym poziomie jak u myszy grupy kontrolnej.

Zmiany ekspresji markerów CD34 i CD61 mogą świadczyć o większej dojrzałości megakariocytów szpiku kostnego w grupie heterozygot z nadpłytkowością niż u heterozygot z małopłytkowością cykliczną i homozygot z małopłytkowością.

Słowa kluczowe: megakariocyt, płytki krwi, mutacja c-Mpl, myszy, małopłytkowość, nadpłytkowość

