



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/Original research article

Analiza ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój przewlekłej małopłytkowości immunologicznej u dzieci



Gene expression analysis in the pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia in children

Monika Richert-Przygońska^{1,*}, Bing Zhang², James L. Zehnder²,
Mariusz Wysocki¹

¹Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, Polska

²Department of Pathology, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 26.07.2013

Zaakceptowano: 18.11.2013

Dostępne online: 28.11.2013

Słowa kluczowe:

- małopłytkowość immunologiczna
- geny
- ekspresja
- dzieci

Keywords:

- Immune thrombocytopenia
- Genes
- Expression
- Children

A B S T R A C T

Background: A complex multifactorial dysregulation of immune system, including cytokines and autoantibodies production, and also proteins modification underlay the primary mechanism of immune thrombocytopenia (ITP). Specific genetic profile of ITP patients is presumed, especially those with a long and complex natural history of the disease. **Aim of the study:** Gene expression analysis of *VNN1* and *PPAR γ* in children with immune thrombocytopenia. **Materials and methods:** Candidate genes were identified with microarray cDNA procedure. For the validation of *VNN1* and *PPAR γ* expression changes we used qRT-PCR performed comparatively in samples of newly diagnosed ITP (ndITP, $n = 16$), chronic ITP (cITP, $n = 8$) and patients without thrombocytopenia ($n = 5$). **Results:** We analyzed the data of patients, followed for at least 12 months after ITP diagnosis. No significant differences of *VNN1* expression profile were found in between groups ($p > 0.05$). Lower signatures of mean *PPAR γ* normalized expression values were noticed in chronic ITP patients in contrast to newly diagnosed ITP subjects ($p = 0.009$). Differences between *VNN1/PPAR γ* ratio values found in ndITP group comparing to subjects with progression to cITP were close to statistical significance ($p = 0.054$). **Conclusions:** Analysis of the *VNN1* and *PPAR γ* expression profiles utility in children diagnosed with ITP requires further investigation.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii CM UMK, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, Polska. Tel.: +48 52 585 4860, fax: +48 52 585 4867.

Adres email: monika_richert@yahoo.com (M. Richert-Przygońska).

Wstęp

Małopłytkowość immunologiczna (ITP) jest jedną z chorób, u podstaw których leży złożona dysregulacja układu immunologicznego. Pomimo istnienia wielu różnorodnych teorii etiopatogenetycznych nie udało się dotychczas ustalić jednoznacznego czynnika odpowiedzialnego za inicjowanie produkcji autoprzeciwciał oraz nadprodukcji cytokin i molekuł, odgrywających kluczową rolę w wewnątrzkomórkowych kaskadach reakcji u pacjentów z ITP.

Biorąc pod uwagę mnogość aktywowanych szlaków oraz opisywane przypadki rodzinnego występowania ITP, zakłada się istnienie swoistego profilu genetycznego odpowiedzialnego za zmienioną syntezę białek u chorych z ITP. Wśród ponad 170 genów mogących odpowiadać za rozwój małopłytkowości najistotniejszą rolę przypisuje się genom szlaków sygnałowych dla $IFN\gamma$ oraz genom odpowiedzialnym za modyfikację wytwarzania białek w warunkach stresu oksydacyjnego [1-5].

Spośród przebadanych genów najczulszym markerem stresu oksydacyjnego, odgrywającym niepodważalną rolę w przewlekłej, a zwłaszcza odpornej na leczenie ITP, jest gen *vmin-1* (VNN1), którego produkty wykazują aktywność prozapalną, dzięki antagonizmowi w stosunku do receptorów aktywowanych proliferatorami peroksydomów typu γ (PPAR γ). Wyraźnie zmienioną dystrybucję ekspresji VNN1 oraz genu PPAR γ obserwuje się w ludzkich komórkach krwi obwodowej u chorych zarówno z nowo rozpoznaną, jak i przewlekłą postacią ITP [5].

Cel

Celem pracy była porównawcza analiza ekspresji genów VNN1 i PPAR γ w ludzkich komórkach krwi obwodowej u dzieci z małopłytkowością immunologiczną o różnym klinicznie przebiegu oraz pacjentów grupy kontrolnej.

Materiał i metody

Badanie ekspresji genów VNN1 i PPAR γ przeprowadzono u pacjentów hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii CM UMK w latach 2009-2011 z powodu nowo rozpoznanej małopłytkowości immunologicznej (ndITP, grupa badana – grupa A), u pacjentów spełniających kryteria rozpoznania przewlekłej małopłytkowości (cITP; grupa kontrolna – grupa B) oraz pacjentów hospitalizowanych w Klinice z przyczyn niehematologicznych (grupa porównawcza – grupa N). Wśród pacjentów grupy B wyodrębniono ponadto chorych, u których po okresie 12-miesięcznej obserwacji stwierdzono progresję ndITP do cITP (grupa A-C) i chorych z cITP oporną na leczenie, o wieloletnim przebiegu (grupa RC).

Do badania kwalifikowano dzieci po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej UMK w Toruniu, przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy. Badanie prowadzono po uzyskaniu pisemnej świadomej zgody na udział w badaniu od prawnego opiekuna dziecka.

Geny kandydackie VNN1 i PPAR γ wytypowano na podstawie wyników wcześniejszych analiz, przeprowadzonych

metodą mikromacierzy cDNA u pacjentów z rozpoznaniem ITP, zgodnie z metodologią opisaną przez Zhang i wsp. [5].

Od wszystkich pacjentów grupy badanej pobierano materiał w postaci 2,5 ml krwi pełnej. Pozyskane próbki przesyłano następnie w suchym lodzie do *Department of Pathology, Stanford University* w USA celem przeprowadzenia analizy ekspresji genów VNN1 i PPAR γ z wykorzystaniem metody ilościowej RT-PCR, przy użyciu zaprojektowanych sond oligonukleotydowych TaqMan specyficznych dla wytypowanych wcześniej genów. Znormalizowane względem kontrolnego genu dehydrogenazy fosforanu aldehydu glicerynowego (GAPDH) wartości ekspresji badanych genów VNN1 i PPAR γ , określone u pacjentów poszczególnych grup, poddano analizie porównawczej pomiędzy grupami.

U pacjentów z ndITP próbki pobierano w okresie do 3 miesięcy od rozpoznania choroby. W celu uniknięcia interferencji lub wpływu na ekspresję badanych genów materiał pobierano przed wdrożeniem leczenia. Za dopuszczalne uznano również pobranie materiału w odstępie co najmniej 4 tygodni od ostatniej dawki stosowanego leku lub w krótszym odstępie przy stwierdzanym braku odpowiedzi na zastosowane leczenie. Przez kolejne 12 miesięcy oceniano okresowo liczbę płytek badaniem morfologii krwi obwodowej, wykonywanym co najmniej raz na 3 miesiące. Po upływie 12-miesięcznej obserwacji przypisywano pacjentom rozpoznanie ostateczne, odnotowując ewentualną progresję do postaci przewlekłej ITP.

Analizę statystyczną prowadzono z użyciem oprogramowania SPSS Statistics 17.0. Różnice pomiędzy badanymi zmiennymi uznano za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Badania przeprowadzono w grupie 29 pacjentów, w tym: 19 chorych, których okres obserwacji klinicznej od momentu rozpoznania ITP wyniósł co najmniej 12 miesięcy, 5 pacjentów z cITP, pozostających pod wieloletnią opieką Kliniki, oraz 5 pacjentów poddanych hospitalizacji z przyczyn niehematologicznych.

Pacjentów podzielono na podgrupy, uwzględniając rozpoznanie ostateczne choroby (Tab. I). We wszystkich 3 podgrupach przeważali chłopcy (19/29). Średni wiek w chwili rozpoznania wśród chorych z grupy A wyniósł 5,7 lat, a średnia liczba płytek w dniu pobrania materiału $62,56 \times 10^9/l$. W grupie dzieci z przewlekłą ITP (grupa B) podobnie kształtowała się średnia liczba płytek krwi ($62,62 \times 10^9/l$), a średnia wieku badanych chorych wynosiła 11,7 lat. W grupie porównawczej N znaleźli się pacjenci z prawidłową liczbą płytek krwi, o zbliżonym rozkładzie cech demograficznych w stosunku do pozostałych grup.

We wszystkich 29 próbkach metodą reakcji ilościowej RT-PCR oceniono ekspresję genów kandydackich VNN1 i PPAR γ i uzyskano znormalizowane względem GAPDH wyniki wartości ekspresji (Tab. II). Średnia wartość ekspresji w grupie chorych z nowo rozpoznaną ITP wynosiła 0,84 i była niższa w stosunku do średnich wartości uzyskanych w grupie z przewlekłą ITP. Nie wykazano jednak istotnych statystycznie różnic wartości ekspresji pomiędzy grupami rozpoznanych ($p > 0,05$) (Ryc. 1).

Tabela I – Dane demograficzne i kliniczne pacjentów grupy badanej
Table I – Demographic and clinical data of study group patients

Grupa/Liczebność	DGN	ID próbki	Wiek [lata]	Płeć [M/K]	PLT w dniu rozpoznania ITP	Liczba płytek w dniu pobrania materiału	Czas od rozpoznania ITP [dni]	Leczenie [T/N]	
<u>(A) Nowo rozpoznana ITP:(n = 16)</u>	ndITP	M2	7	M	4	78	2	N	
	ndITP	M4	2	M	4	154	90	T	
	ndITP	M5	1	K	34	34	0	N	
	ndITP	M6	5	M	4	4	1	N	
	ndITP	M7	6	M	37	41	61	T	
	ndITP	M8	13	M	7	90	60	T	
	ndITP	M9	2	M	4	133	71	T	
	ndITP	M11	3	K	10	10	0	N	
	ndITP	M13	4	M	14	39	1	N	
	ndITP	M14	13	K	19	19	3	N	
	ndITP	M15	12	K	0	3	1	N	
	ndITP	M16	7	M	1	28	14	T	
	ndITP	M17	7	M	22	78	1	N	
	ndITP	M18	1	M	21	14	3	N	
	ndITP	M19	1	K	47	272	16	N	
	ndITP	M20	7	M	4	4	0	N	
	<u>(B) Przewlekła ITP:(n = 8)</u>	cITP	M3	6	M	5	5	0	N
		cITP	M10	5	K	55	11	28	T
	A-C (n = 3)	cITP	M12	12	M	14	14	3	T
	RC (n = 5)	cITP	C1	14	K	91	3	>365	T
cITP		C2	16	M	11	1	>365	T	
cITP		C3	15	M	17	213	>365	T	
cITP		C4	10	M	24	57	>365	T	
cITP		C5	16	K	25	197	>365	T	
<u>(N) Grupa porównawcza:(n = 5)</u>	NF1	Z1	8	K		241		N	
	RMS*	Z2	5	K		313		N	
	Zap. płuc	Z3	3	M		343		N	
	SIRS	Z4	5	M		203		N	
	NF1	Z5	7	M		272		N	

ITP – małopłytkowość immunologiczna (*immune thrombocytopenia*); (A) – pacjenci z nowo rozpoznaną ITP (*newly diagnosed ITP patients*); (B) – pacjenci z przewlekłą ITP (*chronic ITP patients*); A-C – pacjenci z progresją do przewlekłej ITP (M3, M10 i M12) (*patients with progression to chronic ITP (M3, M10 i M12)*); RC – pacjenci z cITP oporną na leczenie, o wieloletnim przebiegu (C1-C5) (*cITP patients resistant to multiple treatments with long-term course of the disease (C1-C5)*); (N) – pacjenci bez rozpoznania małopłytkowości (*patients without thrombocytopenia*); ndITP – nowo rozpoznana ITP (*newly diagnosed ITP*); cITP – przewlekła ITP (*chronic ITP*); ID – numer identyfikacyjny (*identification number*); M2-M20/C1-C5/Z1-Z5 – nadane odpowiednio numery próbek (*samples codes*); K – dziewczynki (*girls*); M – chłopcy (*boys*); T – tak, zastosowano (*yes, treated*); N – nie, nieleczono (*no, untreated*); NF1 – neurofibromatoza typu 1 (*neurofibromatosis type 1*); RMS* – stan po leczeniu mięsaka prążkowanokomórkowego (*rhabdomyosarcoma status post treatment*); zap. płuc – zapalenie płuc (*pneumonia*); SIRS – zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (*systemic inflammatory response syndrome*)

Wyodrębniwszy wśród pacjentów z cITP grupę chorych o wieloletnim przebiegu, opornych na kilka linii leczenia, wykazano istotnie niższe wartości ekspresji genu PPAR γ w stosunku do chorych z ndITP (Ryc. 2).

Ponadto, rozpatrując współczynnik wartości ekspresji VNN1/PPAR γ , wykazano znamienne wyższe wartości współczynnika w grupie pacjentów bez małopłytkowości w stosunku do chorych z ndITP, jak również w stosunku do grupy chorych z cITP o wieloletnim przebiegu. Różnice wartości współczynnika VNN1/PPAR γ w grupie chorych z ndITP, w porównaniu z chorymi, u których doszło do rozwoju przewlekłej małopłytkowości, były bliskie istotności statystycznej ($p = 0,0544$) (Tab. III).

Omówienie

Poszukiwania swoistych biomarkerów mogących odpowiadać za zmienność przebiegu naturalnego ITP, jak również

wyniki wcześniejszych badań profilu genetycznego pacjentów z ITP zdecydowały o nieprzypadkowym wyborze genów kandydackich do niniejszego opracowania [3, 4].

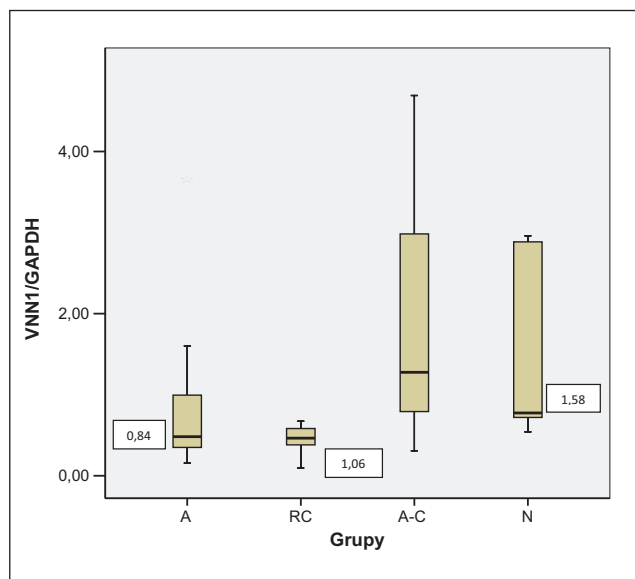
W etiopatogenezie ITP podkreśla się szczególną rolę genów wpływających na zmianę aktywacji szlaków sygnałowych, inicjujących produkcję cytokin i białek prozapalnych. Równolegle podkreśla się wpływ stresu oksydacyjnego, mogącego indukować zmiany na poziomie transkrypcyjnym, co prowadzi do progresji ITP [5, 6]. Według Zhang i wsp., modyfikacja ekspresji genu VNN1, będącego jednym z najczulszych markerów stresu oksydacyjnego u chorych z ITP, może mieć związek z predyspozycjami do rozwoju przewlekłej postaci małopłytkowości. Poza tym sugeruje się hamujący wpływ VNN1 na ekspresję genu PPAR γ w komórkach krwi obwodowej u chorych w różnym stadium ITP [5]. Udowodniono, że gen VNN1 działa jak swoisty regulator odpowiedzi tkankowej na stres oksydacyjny, ponieważ moduluje aktywność gammaglutamylosyntetazy (GCS) i magazynowanie glutationu zredukowanego (GSH) w komórkach. Nadmierna ekspresja genu

Tabela II – Znormalizowane wartości ekspresji genów VNN1 i PPAR γ
Table II – Normalized values of VNN1 i PPAR γ expression

Rozpoznanie	ID	VNN1	PPAR γ	
<u>Grupa A/ndITP</u>	M2	0,349	0,022	
	M4	3,648	0,071	
	M5	0,840	0,051	
	M6	0,156	0,013	
	M7	0,420	0,035	
	M8	0,935	0,022	
	M9	1,054	0,043	
	M11	0,883	0,049	
	M13	0,447	0,059	
	M14	1,602	0,047	
	M15	0,310	0,043	
	M16	0,383	0,060	
	M17	0,517	0,077	
	M18	0,172	0,028	
	M19	1,366	0,038	
	M20	0,350	0,038	
	<u>Grupa B/cITP</u>	C1	0,096	0,008
		C2	0,381	0,027
		C3	0,583	0,018
		C4	0,464	0,023
C5		0,673	0,022	
M3		1,276	0,033	
M10		4,691	0,048	
M12		0,308	0,086	
<u>Grupa N</u>	Z1	0,719	0,018	
	Z2	0,541	0,009	
	Z3	2,885	0,053	
	Z4	2,960	0,118	
	Z5	0,775	0,014	

ITP – małopłytkowość immunologiczna (*immune thrombocytopenia*); Grupa A – pacjenci z nowo rozpoznaną ITP (*newly diagnosed ITP patients*); Grupa B – grupa kontrolna, pacjenci z przewlekłą ITP (*control group, chronic ITP patients*); Grupa N – grupa porównawcza, pacjenci z prawidłową liczbą płytek krwi (*comparative group, normal platelet count patients*); ndITP – nowo zdiagnozowana ITP (*newly diagnosed ITP*); cITP – przewlekła ITP (*chronic ITP*); VNN1 – ekspresja genu VNN1 (*VNN1 expression*); PPAR γ – ekspresja genu PPAR γ (*PPAR γ expression*); M2-M20/C1-C5/Z1-Z5 – numery identyfikacyjne próbek (*samples identification numbers*)

VNN1 jest związana z nasilonym powstawaniem cytokin prozapalnych, katalizowaniem syntezy prostaglandyn i innych mediatorów zapalenia oraz aktywacją szlaków reakcji zależnych od cyklooksygenazy-2 (COX-2) [7]. Według Berruyer i wsp. [7, 8], w warunkach stresu oksydacyjnego, w odpowiedzi na pobudzenie układu odpornościowego, wzrasta ekspresja genu VNN1, a co za tym idzie, nasilają się reakcje hydrolizy pantoteiny, uwalniające cząsteczki cysteaminy, która następnie jest przekształcana w cystaminę. Cystamina blokuje działanie gammaglutamylsyntetazy będącej kluczowym enzymem w procesie syntezy glutationu. Wyczerpywanie się zapasów glutationu zredukowanego oraz wzrost stężenia glutationu utlenowanego (GSSG) nasilają zwrótnie produkcję reaktywnych cząsteczek tlenu. Powstająca pod wpływem zwiększonej ekspresji VNN1 cystamina blokuje ponadto punkty kontrolne w szlakach odpowiedzi przeciwzapalnej i antagonizuje działanie produktów genu PPAR γ (Ryc. 3).

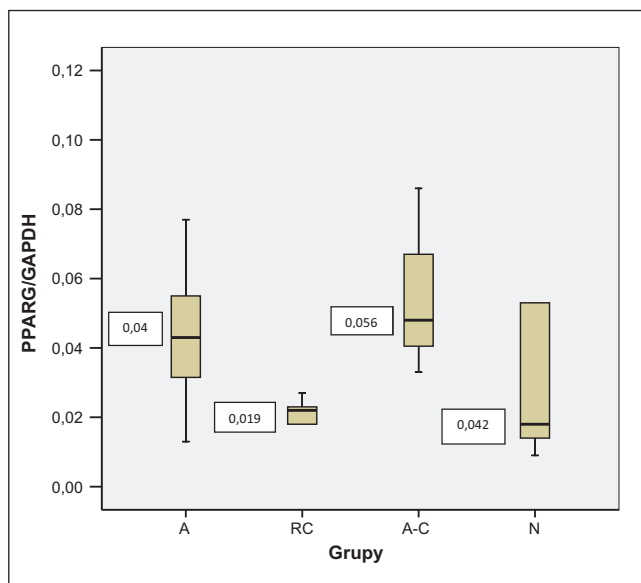


Ryc. 1 – Ekspresja genu VNN1 w badanych podgrupach VNN1/GAPDH- wartość ekspresji genu VNN1 znormalizowana względem GAPDH; A- pacjenci z nowo rozpoznaną ITP (grupa A, n=16); A-C- pacjenci z progresją do przewlekłej ITP (M3, M10, M12, n=3); RC- pacjenci z cITP oporną na leczenie, o wieloletnim przebiegu (C1-C5, n=5); N- pacjenci bez małopłytkowości (grupa porównawcza N, n=5)

Fig. 1 – Gene VNN1 expression in study subgroups VNN1/GAPDH – VNN1 expression values normalized to housekeeping gene of GAPDH; A – newly diagnosed ITP patients (group A, n = 16); A-C – patients with progression to chronic ITP (M3, M10, M12, n = 3); RC – cITP patients resistant to multiple treatments with long-term course of the disease (C1-C5, n = 5); N – patients without thrombocytopenia (comparative group N, n = 5)

Funkcję przeciwzapalną produktów genu PPAR γ , a także możliwość zastosowania agonistów PPAR γ w terapii schorzeń, u podstaw których leżą procesy immunologiczne, opisywano wielokrotnie. Dowiedziono, że PPAR γ ma wpływ nie tylko na różnicowanie i proliferację makrofagów, adipocytów i limfocytów, ponieważ oddziałuje na metabolizm wewnątrzkomórkowy. Prawidłowa lub zwiększona ekspresja PPAR γ zapewnia również homeostazę metaboliczną na poziomie transkrypcyjnym i bierze udział w hamowaniu procesów zapalnych, odpowiedzialnych za progresję chorób, takich jak cukrzyca, miażdżyca, stwardnienie rozsiane czy mukowiscydoza. Produkty genu PPAR γ wymienia się wśród supresorów wzrostu guzów mózgu, raka jelita grubego i wielu innych. Dlatego też oddziaływanie na aktywność i ekspresję PPAR γ leży w obszarze zainteresowań wielu badaczy [9–14].

Ekspresję genów kandydackich VNN1 i PPAR γ oceniono w próbkach krwi pełnej i uzyskano znormalizowane względem GAPDH wartości ekspresji obu badanych genów. Analizę przeprowadzono w reprezentatywnej grupie chorych z nowo zdiagnozowaną ITP, których poddano obserwacji klinicznej



Ryc. 2 – Ekspresja genu $PPAR\gamma$ w badanych podgrupach $PPAR\gamma/GAPDH$ –wartość ekspresji genu $VNN1$ znormalizowana względem $GAPDH$; A- pacjenci z nowo rozpoznaną ITP (grupa A, n=16); A-C- pacjenci z progresją do przewlekłej ITP (M3, M10, M12, n=3); RC- pacjenci z cITP oporną na leczenie, o wieloletnim przebiegu (C1-C5, n=5); N- pacjenci bez małopłytkowości (grupa porównawcza N, n=5)

Fig. 2 – Gene $PPAR\gamma$ expression in study subgroups $PPAR\gamma/GAPDH$ – $PPAR\gamma$ expression values normalized to housekeeping gene of $GAPDH$; A – newly diagnosed ITP patients (group A, n = 16); A-C – patients with progression to chronic ITP (M3, M10, M12, n = 3); RC – cITP patients resistant to multiple treatments with long-term course of the disease (C1-C5, n = 5); N – patients without thrombocytopenia (comparative group N, n = 5)

trwającej co najmniej 12 miesięcy, zgodnie z obowiązującymi kryteriami IWG definiującymi historię naturalną ITP. Ekspresję obu genów oceniono również w grupie dzieci z przewlekłą ITP o wieloletnim przebiegu oraz wśród pacjentów

z prawidłową liczbą płytek krwi. Jako odrębną grupę rozpatrywano pacjentów, u których doszło do progresji w kierunku przewlekłej ITP. Nie wykazano istotnych różnic w zakresie ekspresji $VNN1$ pomiędzy badanymi grupami. Potwierdzono natomiast istotnie niższe wartości ekspresji $PPAR\gamma$ u chorych z przewlekłą ITP o wieloletnim przebiegu i jednocześnie oporną na leczenie. Wyniki te różnią się od uzyskanych przez Zhang i wsp., którzy w swojej publikacji potwierdzili zwiększoną ekspresję $VNN1$ u chorych z przewlekłą postacią ITP, nie dokumentując jednocześnie zmienności ekspresji genu $PPAR\gamma$ u chorych w różnym stadium ITP [5].

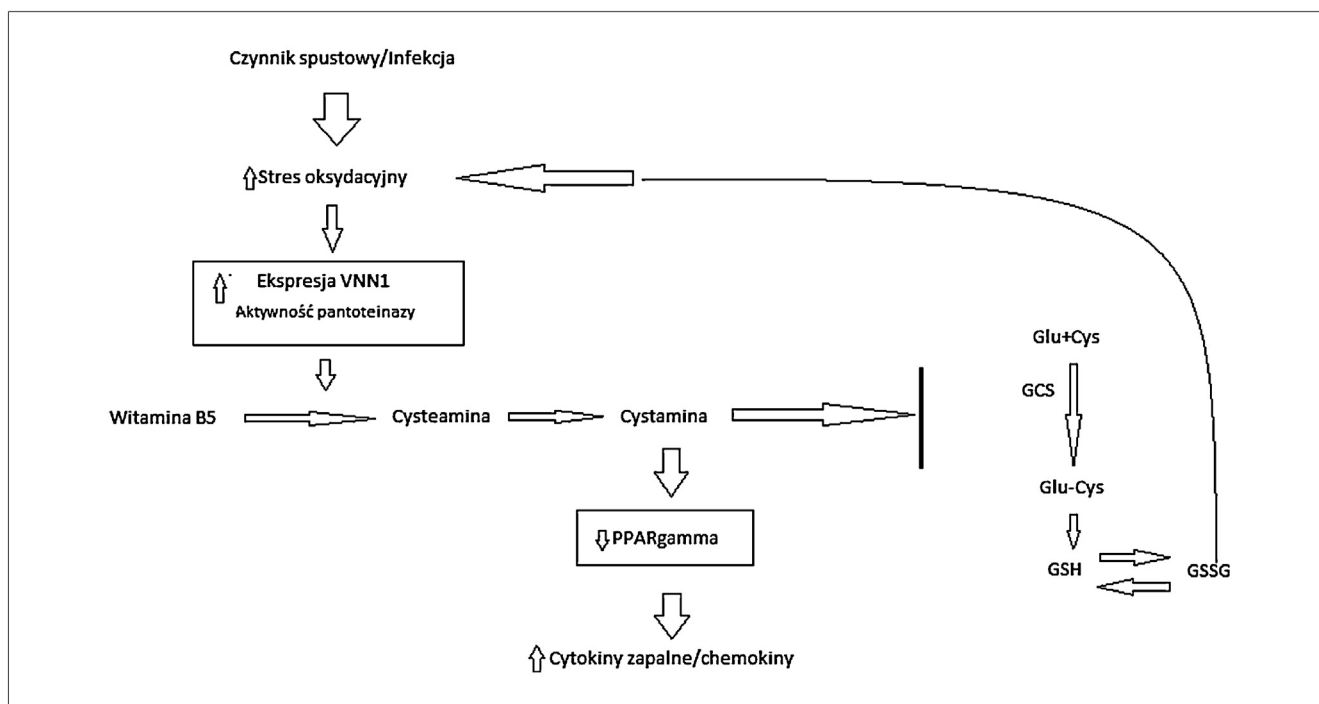
W badanej grupie uzyskana średnia znormalizowana wartość ekspresji genu $VNN1$ była najniższa u pacjentów z nowo zdiagnozowaną ITP. W porównaniu z grupą pacjentów z przewlekłą ITP nie wykazano znamienych różnic, jednak u chorych, u których zanotowano progresję do przewlekłej ITP, wartości średniej ekspresji $VNN1$ były ponad dwukrotnie wyższe. Również w grupie chorych z małopłytkowością przewlekłą wartości ekspresji genu $VNN1$ różniły się znacząco pomiędzy poszczególnymi pacjentami, co korelowało z potwierdzonym odmiennym przebiegiem klinicznym ITP. W grupie chorych z małopłytkowością oporną na leczenie, o wieloletnim przebiegu, stwierdzono natomiast średnie wartości ekspresji $VNN1$ prawie pięciokrotnie niższe niż u dzieci z progresją do cITP, z mniej nasiloną aktywnością choroby. Powyższe różnice wynikają najprawdopodobniej ze zmian ekspresji badanych genów, mogących zachodzić w czasie samoistnie, jak również pod wpływem czynników środowiskowych, do których przede wszystkim należy zaliczyć stosowane leczenie.

Najwyższe średnie wartości ekspresji $VNN1$ paradoksalnie dotyczyła dzieci z grupy kontrolnej N, czyli chorych bez rozpoznania małopłytkowości. Fakt ten należy prawdopodobnie powiązać z doбором pacjentów do tej grupy, którego jedynym kryterium włączenia była prawidłowa liczba płytek krwi i brak schorzenia hematologicznego. W związku z tym w grupie porównawczej N znalazły się również dzieci z infekcjami o ciężkim i powikłanym przebiegu (SIRS, zapalenie płuc), u podłoża których leży nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu. Należy zatem domniemać, że z powodu infekcji i/lub zapalenia mogło pośrednio dochodzić do zmian

**Tabela III – Porównanie ekspresji genów w badanych podgrupach
Table III – Comparison of genes expression in between study subgroups**

Analiza/Grupa badana	$VNN1$ (wartość p)	$PPAR\gamma$ (wartość p)	$VNN1/PPAR\gamma$ (wartość p)
A vs A-C	0,0963	0,3258	0,0544
A vs B	0,6520	0,2452	0,1865
A vs RC	0,3243	0,0092	0,6972
A vs N	0,1472	0,9356	0,0013
N vs A-C	0,6867	0,6694	0,9886
N vs B	0,5344	0,6386	0,2898
N vs RC	0,0769	0,3023	0,0112

$VNN1$ – ekspresja genu $VNN1$ ($VNN1$ expression); $PPAR\gamma$ – ekspresja genu $PPAR\gamma$ ($PPAR\gamma$ expression); p – poziom istotności statystycznej, za wartość istotną przyjęto $p < 0,05$ (p value, statistical significance at level of $p < 0.05$); A – pacjenci z nowo rozpoznaną ITP (grupa A) (newly diagnosed ITP patients (group A)); B – pacjenci z przewlekłą ITP (grupa B) (chronic ITP patients (group B)); A-C – pacjenci z progresją do przewlekłej ITP (patients with progression to cITP); RC – pacjenci z cITP oporną na leczenie, o wieloletnim przebiegu (cITP patients resistant to multiple treatment with long-term course of the disease (C1-C5)); N – pacjenci bez małopłytkowości (grupa porównawcza N) (patients without thrombocytopenia (comparative group N))



Ryc. 3 – Miejsce VNN1 w szlakach sygnałowych komórek krwi obwodowej w warunkach stresu oksydacyjnego wg Berruyer i wsp. [3, 4]

Glu – kwas glutaminowy; Cys – cysteina; GCS – enzym γ -glutamylsyntetaza; GSH – zredukowana forma glutationu; GSSG – utlenowana postać glutationu

Fig. 3 – The role of VNN1 in human blood cell signaling pathways in response to oxidative stress [3, 4]

Glu – glutaminian acid; Cys – cysteine; GCS – γ -glutamylcysteine synthetase; GSH – reduced form of glutathione; GSSG – oxidized form of glutathione

ekspresji genów, takich jak VNN1, i modyfikacji produkcji białek, zmieniającej się w warunkach stresu oksydacyjnego.

Najniższe znormalizowane wartości ekspresji PPAR γ zanotowano wśród chorych z oporną cITP. Były one istotnie niższe niż w grupie dzieci z nowo rozpoznaną ITP i co najmniej dwukrotnie niższe niż u pozostałych chorych z małopłytkowością. Na podstawie dostępnych danych literaturowych, dotyczących roli genu PPAR γ , można przypuszczać, że zmniejszenie ekspresji PPAR γ u pacjentów z ITP wiąże się z hamowaniem potencjału przeciwzapalnego jego produktów białkowych i wpływa pośrednio na wzrost syntezy cytokin zapalnych, co ma w konsekwencji przełożenie na historię naturalną małopłytkowości i nasilenie objawów klinicznych u poszczególnych chorych w grupie badanej.

Dla wyodrębnienia rzeczywistych biomarkerów ryzyka rozwoju cITP, jak i określenia swoistego profilu genetycznego chorych w różnych stadiach ITP istotne znaczenie może mieć zatem kontynuowanie badań genetycznych oraz dokonanie analizy w obrębie szerszej grupy pacjentów z rozpoznaniem ITP i konfrontacja danych z wynikami selektywnie dobranych grup porównawczych, w tym zupełnie zdrowych dzieci.

W obliczu uzyskanych wyników, świadczących o zmniejszonej ekspresji PPAR γ u dzieci z przewlekłą i oporną na leczenie ITP, konieczne jest rozważenie roli agonistów PPAR γ jako atrakcyjnej opcji terapeutycznej dla tej grupy chorych.

Podsumowanie

Analiza ekspresji genów VNN1 i PPAR γ nie potwierdziła zwiększonej ekspresji genu VNN1 w badanej grupie chorych, wykazano natomiast istotne obniżenie wartości ekspresji PPAR γ u pacjentów z przewlekłą ITP o wieloletnim przebiegu. Ocena użyteczności stwierdzonych zmian ekspresji genów VNN1 i PPAR γ u dzieci z rozpoznaniem ITP wymaga dalszych badań.

Wkład autorów/Authors' contributions

MR-P – koncepcja pracy, zebranie danych, analiza statystyczna, interpretacja danych, przygotowanie pracy, przygotowanie literatury. MBZ, JZ – koncepcja pracy, zebranie i interpretacja danych. MW – koncepcja pracy, interpretacja danych, przygotowanie pracy, przygotowanie literatury

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

- [1] Bergmann AK, Grace RF, Neufeld EJ. Genetic studies in pediatric ITP: outlook, feasibility, and requirements. *Ann Hematol* 2010;89(Suppl 1):S95–S103.
- [2] Nugent DJ. Immune thrombocytopenic purpura of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;97–103.
- [3] Sood R, Wong W, Jeng M, Zehnder JL. Gene expression profile of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(5 Suppl):675.
- [4] Sood R, Wong W, Gotlib J, Jeng M, Zehnder JL. Gene expression and pathway analysis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2008;140:99–103.
- [5] Zhang B, Lo C, Shen L, et al. The role of vanin-1 and oxidative stress-related pathways in distinguishing acute and chronic pediatric ITP. *Blood* 2011;117:4569–4579.
- [6] Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med* 2006;41:549–556.
- [7] Berruyer C, Pouyet L, Millet V, et al. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *J Exp Med* 2006;203:2817–2827.
- [8] Berruyer C, Martin FM, Castellano R, et al. Vanin-1-/- mice exhibit a glutathione-mediated tissue resistance to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2004;24:7214–7224.
- [9] Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:205–215.
- [10] Dekkers JF, van der Ent CK, Kalkhoven E, Beekman JM. PPARgamma as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Trends Mol Med* 2012.
- [11] Nguyen MT, Chen A, Lu WJ, et al. Regulation of Chemokine and Chemokine Receptor Expression by PPARgamma in Adipocytes and Macrophages. *PLoS One* 2012;7:e34976.
- [12] Podolak-Dawidziak M. Patogeneza immunologicznej plamicy małopłytkowej. *Act Haematol Pol* 2009;40:843–848.
- [13] Robbins GT, Nie D. PPAR gamma, bioactive lipids, and cancer progression. *Front Biosci* 2012;17:1816–1834.
- [14] Schnegg CI, Robbins ME. Neuroprotective Mechanisms of PPARdelta: Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Processes. *PPAR Res* 2011;2011:373560.