

Diyabetik Koroner Arter Hastalığında Monosit Kemotaktik Proteini (MCP-1) A-2518G ve CCR2 Reseptörü G190A Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

The Effects Of MCP-1 A-2518G And CCR2 G190A Gene Polymorphisms On Development Of Diabetic Coronary Artery Disease

Gökhan Bağcı¹, Zeynep Birsu Çinçin¹, Selçuk Daşdemir¹,
Abdullah Özdemircan¹, Zeynep Ermis Karaali², Bedia Çakmakoglu¹

¹İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul
²Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi 1. İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul

ÖZET

Bu çalışmanın amacı diyabetik koroner arter hastalığı gelişiminde MCP-1 A-2518G ve CCR2 G190A polimorfizmlerinin etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda 81 koroner arter hastalığı bulunan diyabetik hasta, 62 koroner arter hastalığı olmayan diyabet hastası ve 62 sağlıklı kontrol kullanılarak genotipleme yapılmıştır. Diyabetik koroner arter hastalığı bulunan hasta grubuyla kontrol grubu arasında MCP-1 A-2518G genotip ($p:0,01$ $\chi^2:9,11$) ve allel dağılımı ($p:0,01$ $\chi^2:6,53$) açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark vardır. MCP1 AA genotip frekansı KAH (+) DM'li hasta grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yükseken, MCP-1 G allel frekansının kontrol grubunda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın CCR2 G190A polimorfizmi dağılımı açısından hasta grupları ve kontrol grubu arasında herhangi bir anlamlı farklılık saptanmamıştır. Sonuç olarak MCP-1 -2518 AA genotipinin diyabetik koroner arter hastalığı gelişimine neden olurken, G allelinin hastalığa karşı koruyucu olduğu izlenimi edinilmiştir.

ABSTRACT

The aim of our study was to investigate the effect of the MCP-1 A-2518G and CCR2 G190A polymorphisms on the development of diabetic coronary heart disease. Eighty one diabetic patient with coronary heart disease, 62 diabetic patient without coronary heart disease and 62 disease free controls were genotyped. There were significant differences between diabetic patient with coronary heart disease and control groups in MCP-1 A-2518G genotype ($p:0,01$ $\chi^2:9,11$) and allele distribution ($p:0,01$ $\chi^2:6,53$). MCP-1 AA genotype was significantly increased in coronary artery patients compared with controls but MCP-1 G allele frequency was increased in controls. On the other hand, there is no significant difference for CCR2 G190A polymorphism between patients and controls. In conclusion, we found that MCP-1 2518 AA genotype may cause diabetic coronary artery disease susceptibility while G allele seems to be protective.

GİRİŞ

Kemokinler; inflamasyonun önemli göstergelerinden olup infeksiyon, doku hasarı, allerji, malign tümör patofizyolojisi, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabetle ilişkisi olduğu ileri sürülen geniş polipeptid ailesinden oluşmaktadır (1). Kemokinlerin bir üyesi olan monosit kemoatraktan protein - 1 (MCP-1), CCL2 geni tarafından kodlanır. MCP-1'in mononükleer hücrelerin aktivasyonu ve inflamasyon bölgesine getirilmesi, sitokin sentezi ve enflamatuvar süreçte etkili olduğu ve aterosklerozun başlamasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. (2)

MCP-1 geninin düzenleyici bölgesinde tanımlanan A-2518G polimorfizminin MCP-1'in transkripsiyon aktivitesini etkilediği ve tip 1 ve tip 2 diyabet, insülin direnci ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi olduğu bildirilmiştir (3). MCP-1'in reseptörü olan CCR2; CCL7, CCL8 ve CCL13 ligandlarına da afinite gösteren bir kemokin reseptörüdür(1). CCR2 reseptörünün aterosklerotik plaklara makrofajların göç ettirilmesinde rolü vardır. CCR2 gen ekspresyonunun varlığı makrofajlardan başka aterosklerotik plakların endotelial ve düz kas hücrelerinde de gösterilmiştir (4). CCR2 proteinini kodlayan genin 1. ekzonunun 190. pozisyonunda G'nin A'ya dönüşümüne neden olan bir polimorfizm bulunmaktadır. Bu nükleotid değişimi proteinin transmembran bölgesindeki valin (V)'in izölösün (I)'e (V64I) değişimiyle sonuçlanır. CCR2-64I polimorfizmine sahip olan bireylerin inflamatuvar hastalıklar için düşük bir risk taşıdığı bildirilmesine rağmen bu polimorfizmin koroner arter hastalığı (KAH) ile ilişkisine dair çelişkili raporlar bulunmaktadır (4).

Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda diyabetik koroner arter hastalarında inflamasyonun genetik rolünü araştırmak için MCP-1 ve reseptörü CCR2 gen polimorfizmlerini incelemeyi amaçladık.

YÖNTEMLER

Çalışma Grubu

Bu çalışmadaki örnek grubu Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi 1. Dahiliye kliniğince takip edilen koroner arter hastalığı bulunan 81 diyabetik hasta, koroner arter hastalığı olmayan 62 diyabet hasta olmak üzere toplam 143 hasta ve 62 sağlıklı kontrolden oluşmaktadır.

Polimorfizm Analizi

Steril EDTA'lı tüplere alınmış periferik kan örnekleri DNA saflaştırılması için en geç bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır(5). Genotipleme PZR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. MCP-1 A-2518G polimorfizminin ve

CCR2 G190A polimorfizmlerinin PCR ve RFLP yöntemleri Tablo I'de verildiği gibidir (6,7). Şekil I ve IF'de MCP-1 A-2518G polimorfizminin ve CCR2 G190A RFLP uygulaması sonrası agaroz jel görüntüleri verilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizinde SPSS 11.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Genotip ve ailelerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare ve Fisher testi kullanılmıştır. Gruplararası demografik verilerin karşılaştırılmasında Student's t-testi kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır.

SONUÇLAR

Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler Tablo 2'de verilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında vücut kitle indeksi ($p:0,03$) sistolik ve diastolik kan basıncı ($p:0,000$) ve kan glukoz seviyeleri ($p:0,000$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklıdır. KAH (+) ve KAH (-) DM li hasta grupları arasında kan glukoz seviyeleri ($p:0,000$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklıdır. KAH (+) DM li hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında sistolik ve diastolik kan basıncı ($p:0,000$), HDL kolesterol ($p:0,014$) ve kan glukoz seviyeleri ($p:0,000$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklıdır. KAH (-) DM li hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında vücut kitle indeksi ($p:0,04$) sistolik ($0,004$) ve diastolik kan basıncı ($p:0,012$), HDL kolesterol ($p:0,014$) ve kan glukoz seviyeleri ($p:0,000$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklıdır.

MCP-1 A-2518G genotip dağılımları KAH (+) DM'li hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olarak tespit edilmiş ($p:0,01$ $\chi^2:9,11$) ancak KAH (-) DM'li hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p:0,13$ $\chi^2:3,97$). Allel dağılımları KAH (+) DM'li hasta ve kontrol gruplarında arasında anlamlı olarak farklıdır ($p:0,01$ $\chi^2:6,53$) ancak KAH (-) DM'li hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p:0,50$ $\chi^2:0,44$) (Tablo 3).

MCP1 AA genotipinin KAH (+) DM'li hasta grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olduğu ve hastalık riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı tespit edilmiştir ($P:0.003$, $\chi^2:9.10$, OR:3.21 %95 Güven aralığı :1.48-6.93) MCP-1 G taşıma frekansı KAH (+) DM'li hasta grubunda kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p:0,002$ $\chi^2: 9,10$). Total hasta grubunda MCP-1 G alleli taşıma frekansı % 42.7 iken kontrolde % 62.3 olarak tespit edilmiş ve G alleli varlığının 2.21 katlık bir koruma gösterdiği izlenimi edinilmiştir ($p:0,013$ $\chi^2:6,13$, OR:0,45; % 95 Güven aralığı: 0,24-0,85)

CCR2 G190A genotip ve allel dağılımları açısından KAH (+) DM'li hasta, KAH (-) DM'li hasta ve kontrol gruplarında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. (p:0,78 χ^2 :0,48). Allel dağılımları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir (p:1,0 χ^2 :0,0) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, MCP1 AA genotipi frekansının KAH (+) DM'li hasta grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olduğu ve hastalık riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca total hasta grubunda MCP-1 G alleli taşıma frekansının kontrole göre azaldığı tespit edilmiş ve G alleli varlığının 2.21 katlık bir koruma gösterdiği bulunmuştur.

Literatürde farklı popülasyonlarda MCP-1 A-2518G polimorfizmini incelemek üzere yapılmış değişik çalışmalar bulunmaktadır. Jemaa ve ark. (8) G Allelini taşımakla MI arasında bağımsız bir ilişki olduğunu tespit etmişler. Simeoni ve ark. (9) G alleli taşımanın tip 2 diyabet ve insülin direncinden koruduğu ve MCP-1'in hiperinsülinemi ile ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Moon ve ark. (4) A allelini taşımanın tip 2 diabetes mellituslu hastalarda böbrek yetmezliğine yatkınlığı artırdığını bildirmişlerdir. Szalai ve ark. (7) MCP-1 -2518 GG genotipine sahip olan bireylerin koroner hastalığı açısından daha yüksek bir riske sahip oldukları, ayrıca MCP-1 -2518 GG genotipiyle artmış Lp(a) seviyeleri arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Yang ve ark. (10) A alleli yada AA genotipiyle tip 1 diyabet arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Kouyama ve ark. (1) MCP-1 A-2518G polimorfizmiyle tip 2 diyabet arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Cam ve ark. (11) MCP-1 A-2518G polimorfizmiyle prematüre KAH arasında bir ilişki saptanmadığını bildirmişlerdir. Cermakova ve ark. (12) G allelinin koroner arter hastalığına yatkınlıkla ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir. Bulgularımız Moon ve ark ve Yang ve ark.nın çalışmaları ile uyumludur.

Çalışmamızda CCR2 64I allel frekansı ve genotip frekansıyla koroner arter hastalığı arasında bir bağlantı bulunamamıştır. CCR2 G190A (V64I) polimorfizmi için literatürde yapılan çalışmalara baktığımızda ise Ortlepp ve ark. (13) CCR2 genotipiyle koroner ateroskleroz arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Buna karşın bu çalışmada 65 yaşından küçük bireylerde CCR2 190A allelini taşımakla miyokard infarktüsü arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Szalai ve ark (14) CCR2-I (AA) allelini taşıyanlarda koroner arter hastalığı gelişim riskinin daha az olduğunu bildirmişlerdir. Szalai ark. (14) 190A allelini diyabetik hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Voevoda ve ark. (15) CCR2 A allelinin akut koroner sendroma yatkınlığa yol açtığını bildirmişlerdir Valdes ve ark. (16) Kardiyovasküler risk faktörleriyle CCR2 genotipi arasında herhangi bir ilişki saptamamışlardır. Fakat geleneksel kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak

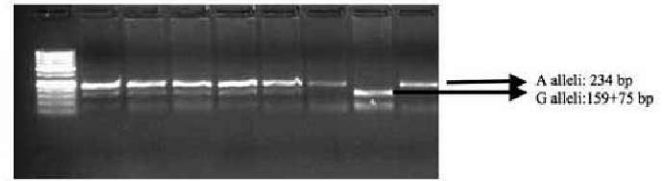
CCR2 AA genotipine sahip kişilerin koroner arterlerinde daha az kalsifikasyon olduğunu bildirmişlerdir. Apostolakis ve ark. (2). Bu çalışmada CCR2 64I allel frekansı ve genotip frekansıyla koroner arter hastalığı arasında bir bağlantı saptanmadığı bildirilmiştir. Yang ve ark. (10) CCR2 A alleliyle tip 1 diyabet arasında herhangi bir anlamlı ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir. Bjarnadottir ve ark. (17) hastalarla kontroller arasında CCR2 G190A polimorfizm ile MI arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık saptamamışlardır. Cha ve ark. (18) polimorfizmiyle koroner arter hastalığı arasında herhangi bir ilişki tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak çalışmamızda, MCP-1 -2518 AA genotipinin diyabetik koroner arter hastalığı için risk faktörü olduğu, MCP G allelinin varlığında diyabetik koroner arter hastalığı riskinin düştüğü izlenimi edinilmiştir. Genetik markerların tespit edilmesinin diyabetik koroner arter hastalığının erken tanısında klinik yönden oldukça yardımcı olacağına inanıyoruz. Ayrıca olgu sayısının artması ile sonuçların daha sonraki dönemlerde yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

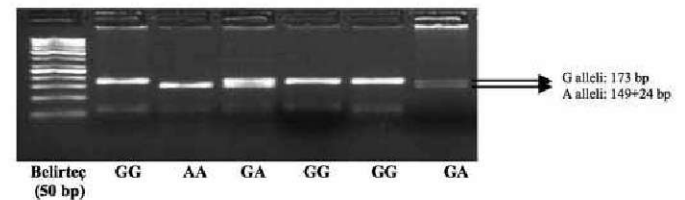
Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:2874

Tablo I: MCP-1 A2518G ve CCR2 V64I genlerinin PCR, RFLP yöntemleri ve beklenen ürünler

	Primerler (İleri ve Geri Primerler)	PCR Ürünü	Restriksiyon Enzimi	Restriksiyon Ürünleri
MCP-1 A2518G	5'-TCT CTC ACG CCA GCA CTG ACC-3' 5'-GAG TGT TCA CAT AGG CTT CTG-3'	234 bp	PvuII	AA: 234 bp AG: 234 bp, 159 bp, 75 bp, GG: 159 bp, 75 bp,
CCR2 V64I	5'-TTGGTTTGTGGGCAAGATGATGG-3' 5'-CATTGCATCCCAAGACCCACTC-3'	173 bp	BsaBI	GG: 173 bp GA: 173 bp, 149 bp, 24 bp, AA: 149 bp, 24 bp,



Şekil 1: MCP-1 geni A-2518G polimorfizmi genotipleme.



Şekil 2: CCR2 geni G190A polimorfizminin genotipleme.

Tablo 2: Çalışma gruplarına ait demografik bilgiler

PARAMETRELER	KAH (+) DM N=81	KAH (-) DM N= 62	TÜM HASTALAR N=143	KONTROL N=62
Cinsiyet (Kadın/erkek) %	30,2/69,8	62,5/37,5	47,9/52,1	30/70
Yaş (yıl)	59,21±12,25	58,08±12,53	58,56±12,37	57,85±12,3
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	26,85±3,14	27,68±4,24	27,18±3,61	25,54±4,05
Sigara içimi (%)	74,0	25,0	54,9	33,3
Hipertansiyon (%)	54,0	53,7	49,5	6,5
Trigliserid (mg/dl)	145,31±91,81	164,74±77,47	154,02±85,75	172,34±94,38
Total kolesterol (mg/dl)	205,94±54,05	197,54±53,685	202,17±57,73	199,34±48,53
HDL-kolestrol (mg/dl)	45,2±10,76	40,01±15,17	42,85±13,12	37,38±14,89
LDL-kolesterol (mg/dl)	125,32±32,32	123,64±42,66	124,56±37,15	130,34±48,71
VLDL-kolesterol (mg/dl)	27,43±13,97	33,97±15,85	30,43±15,12	31,48±18,83
Glikoz (mg/dl)	199,71±23,6	248,37±37	168,72±120,05	107,66±18,59
SBP (mmHg)	143,64±38,84	137,91±30,29	141,19±35,35	121,48±12,67
DBP (mmHg)	87,5±19,35	84,16±19,87	86,07±19,52	74,68±10,6

Tablo 3 KAH (+) DM'li Hasta, KAH (-) DM'li Hasta ve Kontrol gruplarında MCP-1 A-2518G genotip ve allel dağılımları

MCP-1 A- 2518G GENOTİP VE ALLELERİ	KAH (+) DM (N:53)	KAH (-) DM (N:64)	KONTROL (N:61)
Genotip			
AA	35 (%66)	32 (%50)	23 (%37,7)
AG	17 (%32,1)	27 (%42,2)	36 (%59)
GG	1 (%1,9)	5 (%7,8)	2 (%3,3)
Allel			
A	87 (%82)	91 (%71)	82 (% 67,2)
G	19 (%18)	37 (%29)	40 (% 32,8)

Tablo 4 KAH (+) DM'li Hasta, KAH (-) DM'li Hasta ve Kontrol gruplarında CCR2 G190A genotip ve allel dağılımları

CCR2 G190A GENOTİP VE ALLELERİ	KAH (+) DM (N:62)	KAH (-) DM (N:81)	KONTROL (N:62)
Genotip			
GG	47 (%75,8)	60 (%74,1)	46 (%74,2)
GA	13 (%21)	21 (%25,9)	15 (%24,2)
AA	2 (%3,2)	0(%0)	1 (%1,6)
Allel			
G	107 (%86,3)	141 (%87)	107 (%86,3)
A	17 (%13,7)	21 (%13)	17 (%13,7)

Kaynaklar

1. Kouyama K. Miyake K. Zenibayashi M., Hirota Y. Teranishi T. Tamori Y. ve ark. (2007) Association of Serum MCP-1 Concentration and MCP-1 Polymorphism with Insulin Resistance in Japanese Individuals with Obese type 2 Diabetes *Kobe J. Med. Sci.* Vol. 53, 6, 345-354
2. Apostolakis S. Baritaki S. Kochiadakis G. E. Igoumenidis N. E. Panutsopoulos D. Spandidos D.A. (2007) Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease *Thrombosis Research* 119, 63–71
3. Moon JY. Jeong L. Lee S. Jeong K. Lee T. Ihm CG. (2007) Association of Polymorphisms in Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promoter with Diabetic Kidney Failure in Korean Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Korean Med Sci* ; 22: 810-4
4. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988). Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
5. Abdi R, Tran TB, Sahagun-Ruiz A, Murphy PM, Brenner BM, Milford EL, McDermott DH. (2002). Chemokine receptor polymorphism and risk of acute rejection in human renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 13: 754– 8.
6. Szalai C. Duba J. Prohászka Z. Kalina A. Szabó T. Nagy B. Ve ark. (2001) Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients *Atherosclerosis* :158 233–239
7. Jemaa R. Rojbani H. Kallel. A. Ali S.B. Feki M. Chabrak S. ve ark. (2008) Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients. *Clinica Chimica Acta* 390 122–125
8. Simeoni E. Hoffmann MM. Winkelmann BR. Ruiz J. Fleury S. Boehm. BO. ve ark (2004) Association between the A-2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47:1574–1580
10. Yang B. Houlberg K. Millward A. Demaine A. (2004) Polimorphism of chemokin and receptors dabet and complications. *Cytokine* 26 114-121
11. Cam SF. Sekuri C. Sagcan A. Ercan E. Tengiz I. Alioglu E. Berdeli A. (2008). Effect of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism in *Turkish patients with premature coronary artery disease The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* Vol. 68, No. 8, December 801–805
12. Cermakova Z. Petrkova J. Drabek J. ve ark. (2003) CC chemokine receptor (CCR)2 polymorphism in Czech patients with myocardial infarction. *Immunol Lett*; 88:53–5.
13. Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, et al. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J Mol Med* 2003;81:363–7.
14. Szalai C. Csaszar A. Czinner A. Szabo T. Panczel P. Madacsy L. ve ark. (1999) Chemokine Receptor CCR2 and CCR5 Polymorphisms in Children with Insulin- Dependent Diabetes Mellitus. *Pediatric Research: Volume 46* (1) Temmuz 82-84
15. Voevoda MI. Ustinov SN. Yudin NS. Dolgikh MM. Kuznetsova TN Maksimov VN. (2002) Association of the CCR2 Chemokine Receptor Gene Polymorphism with Myocardial Infarction *Doklady Biological Sciences*, : 385, 367–370
16. Valdes AM, Wolfe ML, O'Brien EJ, Spurr NK, Geffer W, Rut A, Groot PH, Rader DJ. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2002 Nov 1;22(11):1924-8.
17. Bjarnadottir K, Eiriksdottir G, Aspelund T, Gudnason V. (2006). Examination of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 and CCR2 genes on MI in the Icelandic population. *Atherosclerosis* 188 341–346
18. Cha SH. Lee JK. Lee JY. Kim HT. Ryu HJ. Han BG. (2007). Association of CCR2 polymorphisms with the number of closed coronary artery vessels in coronary artery disease *Clinica Chimica Acta.* 382 129–133