

TROMBOSİT PIA² POLİMORFİZMİ İLE GENÇ HASTALARDA KORONER ARTER TROMBOZU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI ♦

Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA*, Müge AYDIN**, Aytaç ÖNCÜL***, Kemalettin BÜYÜKÖZTÜRK***, Uğur ÖZBEK**, Asım CENANİ**, Yüksel PEKÇELEN*

ÖZET

Trombosit glikoprotein (GP) IIb/IIIa kompleksi trombositin agregasyon fonksiyonunun sağlanmasında rol oynar. GP IIIa geninin 2. ekzonunda, 1565. pozisyonda gelişen mutasyon sonucu iki allelli bir polimorfizm ortaya çıkmaktadır (PIA¹/PIA²). Son yıllarda yapılan çalışmalarda PIA² polimorfizminin koroner arter trombozu açısından risk faktörü olduğu konusunda çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bu çalışmada normal sağlıklı bireylerde (n=119) ve koroner arter trombozlu genç hastalarda (median yaş 47, n=99) PIA² polimorfizminin sıklığı araştırılmıştır. PIA² allel sıklığı sağlıklı bireylerde %6.7, hasta grubunda ise %9 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak PIA² polimorfizmi ile koroner arter trombozu arasında istatistiksel yönden anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p=0.37, CI%95=0.68-2.79, OR=1.388).

Anahtar Kelimeler: Trombosit PIA² polimorfizmi, koroner arter trombozu, glikoprotein IIIa.

SUMMARY

Platelet PIA² polymorphism and its association with coronary artery thrombosis in young patients. The platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa complex plays a major role in the aggregation function of the platelets. A single transition at position 1565 in the exon 2 of the gene encoding GP IIIa leads to its diallelic polymorphism (PIA¹/PIA²). Some studies have reported higher prevalence of PIA² polymorphism in patients presenting with acute coronary syndrome or history of myocardial infarction but others have not confirmed these findings. In present study, we investigated the frequency of PIA² polymorphism in normal healthy population (n=119) and young patients with coronary artery thrombosis (median age=47, n=99). The PIA² allele frequency was 9% and 6.7% in cases and controls, respectively. We found no significant association between PIA² polymorphism and coronary artery thrombosis (p=0.37, CI 95% 0.68-2.79, OR=1.388).

Key Words: Platelet PIA² polymorphism, coronary artery thrombosis, glycoprotein IIIa.

GİRİŞ

Tromboembolik hastalıklar ve komplikasyonları tüm dünya ülkelerinde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Gelişmiş ülkelerde koroner arter hastalığına bağlı ölümlerin ilk sırada yer alması, arteriyel tromboz etyolojisi ile ilgili çalışmaların artmasına neden olmuştur. Anstabil angina pectoris veya miyokard infarktüsünün, koroner arterlerde mevcut olan aterosklerotik plağın rüptürü ve o bölgeye trombositlerin

toplanması ile oluştuğunun gösterilmesi, son yıllarda dikkatleri trombositlerin üzerine çevirmiştir. Özellikle trombosit adezyonu ve agregasyonunda rol oynayan glikoprotein (GP) yapısındaki reseptörler ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur ⁽¹⁾.

GP IIb/IIIa trombositin agregasyonunu sağlayan en önemli reseptördür. Bu reseptörün üzerinde bulunan ve PIA¹ olarak ifade edilen bir alloantijenin, reseptörün fonksiyonlarında önemli rolü olduğu gösterilmiştir ^(11,14).

Mecmuaya geldiği tarih: 04.08.1999

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul

** İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Çapa, İstanbul

*** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

♦ Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 977 090597

Newman ve arkadaşları PIA antijeninin iki farklı alleli olduğunu göstermiştir (PIA^{A1} ve PIA^{A2}). Yapılan çalışmalarda bu polimorfizmin GP IIIa geninin 2. ekzonunda 1565. pozisyonda sitozin yerine timidin gelmesi ile oluştuğu saptanmıştır (14). Weiss ve arkadaşlarının 1996'da yayınladıkları bir çalışmada, koroner arter trombozlu hastalarda kontrol gruba kıyasla PIA^{A2} polimorfizminin 2.1 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (19). Özellikle 60 yaşın altında koroner arter trombozu gelişen kişilerde PIA^{A2} polimorfizmi sıklığı artmış bulunmuştur. Weiss'in bu çalışmasının arkasından pek çok çalışma yayımlanmıştır. Bunların bir kısmında trombosit PIA^{A2} polimorfizminin koroner arter trombozu (1,4,5,20) ve koroner anjioplasti sonrası restenozun gelişimi ile ilişkisi olduğu belirtilirken (8), bir kısmında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (6,12,15,16).

Bu çalışmada toplumumuzda sağlıklı bireylerden alınan bir örnekte PIA^{A2} polimorfizminin sıklığı araştırılmış ve koroner arter trombozu ile PIA^{A2} polimorfizmi arasındaki ilişki incelenmiştir. İlerleyen yaş ve aterosklerozun başlı başına bir risk faktörü olması göz önüne alınarak 60 yaş altındaki koroner arter trombozlu hastalar değerlendirmeye alınmıştır. Nispeten genç koroner trombozlu hastalardan oluşan bu grup aynı yaş grubundaki normal sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada Mayıs 1997-Mayıs 1999 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalına başvuran ve WHO kriterlerine göre akut miyokard infarktüsü veya anstabil angina pectoris tanıları alan 60 yaş altındaki 99 hasta, PIA^{A2} polimorfizmi açısından değerlendirildi. Hastalar tipik öykü, enzim yüksekliği, elektrokardiyografi bulguları ile koroner yoğun bakım ünitesinde takip edilmiş ve anjiyografi bulguları ile koroner arter hastalığı ispatlanmış hasta grubundan seçildi. Hastalardan bilgilendirilmiş onay

alınarak demografik özellikleri kaydedildi. Hastaların 16'sı kadın, 83'ü erkek (K/E: 0.19); median yaş 47 (22-59 yaşları arasında) idi. Türk toplumunda PIA^{A2} polimorfizminin sıklığını araştırmak üzere 119 normal sağlıklı bireyden oluşan bir grup incelendi. Sağlıklı grup 33 kadın ve 86 erkek (K/E: 0.38) bireyden oluşmaktaydı; median yaş 41 (18-59 yaşları arasında) idi. Hasta ve sağlıklı bireylerden EDTA'lı steril tüplere alınan periferik venöz kandan DNA izolasyonu yapıldı. PIA polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) yöntemiyle belirlendi.

PCR Koşulları: Elde edilen genomik DNA, trombosit glikoprotein IIb/IIIa reseptörü, PIA^{A2} polimorfizmi bölgesine spesifik primerler (2) (primer-1: TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T; Primer-2: TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT) ile amplifiye edildi. 50 µl'lik reaksiyon için 100 ng genomik DNA, 10'ar pikomol primer-1 ve primer-2, 2.5 µmol/L dNTP karışımı, 10 µmol/L Tris HCl (pH: 8.3), 50 µmol/L KCl, 1.5 µmol/L MgCl₂ ve 2.5 U Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR cihazında 95 °C'da 4 dakika (ilk denaturasyon), 95 °C'da 45 saniye, 60 °C'da 30 saniye, 72 °C'da 60 saniye toplam 30 siklus yapıldı ve 72 °C'da 7 dakika ile tamamlandı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra iki alleli bir polimorfizm gösteren bu bölgedeki C→T değişimini tanıyan Msp I restriksiyon enzimi ile kesildi.

Enzim Kesimi Koşulları: 50 µl'lik reaksiyon için 10 U Msp-I enzimi, 0.1 mg/ml BSA, 10 µl DNA ve 10x Buffer (33 mM Tris-asetat, 10 mM Mg-asetat, 66 mM K-asetat) karıştırıldı. 37 °C'da 3 saat inkübasyon yapıldı. Enzim kesim ürünleri akrilamid jel elektroforezi ile görüntülendi.

İstatistiksel Analiz: Sonuçlar GraphPad InStat bilgisayar programı ile (GraphPad InStat, GraphPad Software) 'Fisher's exact test' kullanılarak değerlendirilmiştir.

SONUÇLAR

Türk Toplumunda PI^{A2} Polimorfizminin Sıklığı:

Çalışmamızda 119 normal sağlıklı bireyin DNA incelemesi sonucunda 104 kişinin A1A1, 14 kişinin A1A2 ve 1 kişinin A2A2 genotipini taşıdığı gösterildi. Allel sıklığı A1 için %93.3, A2 için %6.7 olarak hesaplandı (Tablo-1).

Koroner Arter Trombozu Olan Hastalarda PI^{A2} Polimorfizminin Sıklığı: Hasta grubunda 81 bireyde A1A1, 18 bireyde A1A2 genotipi saptandı, A2A2 genotipine rastlanmadı. Allel sıklığı A1 için %90.9, A2 için ise %9.1 olarak hesaplandı (Tablo-1).

Hasta ve sağlıklı bireylere ait veriler istatistiksel olarak incelendiğinde her iki grup arasında PI^{A2} polimorfizmi açısından anlamlı fark olmadığı görüldü (Hasta grubunda %9.0, sağlıklı bireylerde %6.7, p=0.37, %95 Confidence Interval (CI) = 0.68-2.79, Odds Ratio (OR) = 1.38). Hasta ve sağlıklı bireyler değişik yaş gruplarında ayrıldığında PI^{A2} polimorfizminin 41-50 ve 51-59 yaş grubundaki koroner trombozlu hastalarda, aynı yaş grubundaki sağlıklı bireylere kıyasla daha fazla olduğu görüldü (41-50 yaş grubu için %9.8'e karşılık %7.3 p= 0.78, OR= 1.37, %95 CI= 0.44-4.2, 51-59 yaş grubu için %13'e karşılık %3.4 p=0.13, OR= 4.2, %95 CI=0.8-2.8). Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Hasta ve sağlıklı bireylerde yaş gruplarına göre PI^{A2} polimorfizminin dağılımı Tablo-2'de verilmektedir.

Tablo 2. Hasta grubu ve sağlıklı bireylerin değişik yaş gruplarında PI^{A2} polimorfizmi açısından karşılaştırılması

Yaş	Hasta Grubu		Sağlıklı Bireyler		p
	N	A2 sıklığı	N	A2 sıklığı	
22-40	25	%4	56	%8	0.50
41-50	51	%9.8	34	%7.3	0.78
51-59	23	%13	29	%3.4	0.13
Toplam	99	%9.0	119	%6.7	0.37

TARTIŞMA

Trombosit membranında bulunan glikoprotein (GP) IIb/IIIa reseptörü integrin ailesinin bir üyesidir. Trombositin fibrinojen ve von Willebrand faktör aracılığıyla agregasyonunda reseptör görevi yapar. Weiss ve arkadaşlarının PI^{A2} polimorfizmi ile koroner arter trombozu arasında ilişki olduğunu göstermesinin ardından (19), GPIIb-IIIa reseptörü ve PI^{A2} polimorfizmi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Koroner arter hastalığı olan bireylerle ilişkili bireylerin karşılaştırıldığı çalışmaların bir kısmında PI^{A2} polimorfizminin özellikle 60 yaşın altındaki hastalarda güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (1,3,5). Bir grup çalışmada ise koroner anjiyografi yapıp, anjiyoplasti ve stent uygulanan hastalar sağlıklı kontrol ile karşılaştırılmıştır (4,8,18). PI^{A2} polimorfizmi taşıyanlarda restenoz oranının anlamlı olarak yüksek olduğu, homozigot A2 alleli taşıyanlarda daha da yükseldiği gösterilmiştir (8). Özellikle sigara kullanımı gibi ek risk faktörü olan bireylerde riskin daha da arttığı belirtilmiştir (1).

Bununla beraber PI^{A2} polimorfizmi ile koroner tromboz arasında ilişki olmadığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur (6,10,12,15,16).

Tablo 1. Sağlıklı bireylerde ve koroner arter trombozu olan hastalarda PI^{A2} polimorfizminin sıklığı

	Toplam Sayı	A1A1	A1A2	A2A2	A2 allel sıklığı
Sağlıklı Bireyler	119	104	14	1	%6.7
Hasta Grubu	99	81	18	0	%9.0

'Physician Health Study' verileriyle gerçekleştirilen, 14916 bireyin katıldığı prospektif bir çalışma sonucunda PIA² polimorfizmi açısından kontrol grubu, koroner arter trombozu grubu, serebral tromboz grubu ve venöz tromboz grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı belirtilmektedir (15). Laule ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise, akut koroner sendrom tanısıyla girişim yapılan 1000 hasta ile, yaş-cinsiyet uyumlu 1000 kontrol karşılaştırılmış, PIA² polimorfizminin bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir. İlginç olarak bu çalışmada PIA^{2/A2} homozigot olan sağlıklı bireylerde HDL kolesterol düzeyi yüksek bulunmuştur (10). Anjioplasti sonrası restenoz gelişen olgularda PIA² polimorfizminin anlamlı olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (12).

PIA² polimorfizmi ile ilgili çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmesi, karşılaştırılan vaka-kontrol gruplarının homojen olmaması ve değişik toplumlarda PIA² polimorfizminin sıklığının farklı olması ile açıklanmaktadır. PIA² polimorfizminin sıklığı İspanya'da %9 (4), Fransa'da %14.5 (6), İngiltere'de %19.4 (16), Amerika'da %14.8 (15), Almanya'da %27 (5), Avustralya'da %14 (12), Japonya'da %0.8 (7) olarak belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda Türk toplumundan alınan bir örnekte bu oran %6.7 olarak saptanmıştır. Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya kıyasla, Türkiye'de PIA² polimorfizminin sıklığı belirgin olarak düşük bulunmuştur.

PIA² polimorfizminin fonksiyonel düzeydeki etkisi de tartışmalıdır. Lasne ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PIA² polimorfizminin trombin aktivasyonuna karşı trombositlerin sekresyon cevabını etkilemediği ve agregasyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir (9). Akım sitometresi metoduyla trombositlerin fibrinojene bağlanma yeteneklerinin incelendiği bir çalışmada ise, PIA² alleli taşıyan trombositlerle PIA¹ allelini homozigot taşıyan trombositler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (13). Undas ve arkadaş-

larının normal deneklerde yaptığı bir çalışmada, PIA² polimorfizmi taşıyan bireylerde (PIA¹ taşıyanlara kıyasla) aspirin tedavisi sırasında trombin yapımında belirgin baskılanma saptanmamıştır. Bu bulgulara dayanılarak PIA² polimorfizminin aspirine cevapsızlık yarattığı ileri sürülmüştür (17). Bu durum özellikle orta yaş üzerindeki hastalarda profilaktik olarak aspirin kullanımının yaygın olması nedeniyle, koroner hastalık açısından önemli bir risk faktörü olabilir.

Tromboz gelişimi multifaktöriyeldir, çok sayıda edinsel ve kalıtsal neden etkili olmaktadır. Özellikle ilerleyen yaş, beslenme, hiperlipidemi, diyabet, sigara içme gibi edinsel nedenlerin önemli rol oynadığı ispatlanmış durumdadır. Çalışmamızda PIA² polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Hasta ve sağlıklı bireyler değişik yaş gruplarına ayrıldığında, bu polimorfizmin özellikle 50-59 yaş grubunda koroner trombozu açısından bir risk faktörü olabileceği izlenimi alınmışsa da, sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı değerlere ulaşamamaktadır. Bu durumun incelenen örneğin sayısı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu konuda daha geniş ve edinsel faktörler açısından randomize edilmiş hasta ve kontrol gruplarının kullanılması aydınlatıcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ardissino D, Mamucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetteau R, Tagliabue L, Tubaro M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J, Margaglione M: Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 94:46 (1999).
2. Bray PF, Jin Y, Kickler T: Rapid genotyping of the five major platelet alloantigens by reverse dot-blot hybridization. *Blood* 84:4361 (1994).
3. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ: Association of the platelet PIA polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen B β 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 96:1424 (1997).
4. Garcia-Ribes M, Gonzales-Lamuno D, Hernandez-Estefania R, Colman T, Pocovi M, Delgado-Rodriguez M, Garcia-Fuentes M, Revuelta JM: Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb Haemost* 79: 1126 (1998).

5. Gardeman A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W: Association of the platelet glycoprotein IIIa P1^{A1/A2} gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost* 80:214 (1998).
6. Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Emmerich J, Cambien F: The Leu33/pro polymorphism (P1^{A1}/P1^{A2}) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 77:1179 (1997).
7. Kario K, Shiga N, Ikeda U, Shimada K, Matsuo M: P1a1/a2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease. *Lancet* 349: 1100 (1997).
8. Kastrati A, Schomig A, Seyfart M, Koch W, Elezi S, Bottiger C, Mehilli J, Schomig K, von Beckerath N: PLA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of stenosis after coronary stent placement. *Circulation* 99: 1005 (1999).
9. Lasne D, Krenn M, Pingault V, Arnaud E, Fiessinger JN: Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of P1^{A2} polymorphism. *Br J Haematol* 99: 801 (1997).
10. Laule M, Cascorbi I, Stangl V, Bielecke C, Wernecke KD, Mrozikiewicz PM, Felix SB, Roots I, Baumann G, Stangl K: A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa and association with excess procedural risk for coronary catheter interventions. *Lancet* 353: 708 (1999)
11. Lefkowitz J, Plow E, Topol E: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332: 1553 (1995).
12. Mamotte CD, van Bockxmeer FM, Taylor RR: P1a1/a2 polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 82: 13 (1998).
13. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M: Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (P1^{A2}): No association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 105:664 (1999).
14. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH: The human platelet alloantigens, P1^{A1} and P1^{A2}, are associated with a leucine³³/proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 83: 1778 (1989).
15. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K: P1^{A1/A2} polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 349:385 (1997).
16. Samani NJ, Lodwick D.: Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 33: 693 (1997).
17. Undas A, Sanak M, Musiał J, Szczeklik A: Platelet glycoprotein IIIa polymorphism, aspirin, and thrombin generation. *Lancet* 353:982 (1999).
18. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM: Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 350: 1217 (1997).
19. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ: A Polymorphism of platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334:1090 (1996).
20. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz, Scharf RE: Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: Human platelet antigen 1b (HPA-1b/P1^{A2}) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 79: 731 (1998).