Polymorfismy genů destiček spojované s aterotrombogenezí a jejich výskyt ve zdravé české populaci středního věku

Jan Kvasnička, Jaroslava Hájková, Petra Bobčíková, Daniela Dušková*, Šárka Poletínová*, Veronika Kieferová*, Zuzana Zenáhlíková, Ladislav Pecen

*Trombotické centrum, *Fakultní transfúzní oddělení, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika*

Kvasnička J, Hájková J, Bobčíková P, et al. **Polymorfismy genů destiček spojované s aterotrombogenezí a jejich výskyt ve zdravé české populaci středního věku.** *Cor Vasa* 2009;51(3):187–193.

Cíl: Cílem naší studie bylo zjistit frekvenci výskytu destičkových polymorfismů, které jsou spojovány s aterotrombogenezí u zdravých osob středního věku v české populaci.

Metody: K zjištění frekvence polymorfismů GP IIIa (HPA-1; rs5918), P2Y12 (H1/H2 haplotyp; rs2046934), P2Y12 (34C > T; rs6785930), COX-1 (-842A > G; rs10306114), PAR-1 (IVS -14A > T; rs168753), GP VI (13254T > C; rs1613662) a GP Ia (807C > T; rs1126643) bylo provedeno anonymní testování DNA od 1 450 dárců krve pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) a analýzy křivky tání na analyzátoru LightCycler 480 (ROCHE).

Výsledky: V testované skupině byly zjištěny tyto frekvence; GP IIIa (HPA-1): 27,38 % heterozygotů, 3,66 % homozygotů a 68,97 % „wild type“ homozygotů; P2Y12 (H1/H2 haplotyp): 25,93 % heterozygotů, 2,62 % homozygotů a 71,45 % „wild type“ homozygotů; P2Y12 (34C > T): 44,03 % heterozygotů, 9,69 % homozygotů a 46,28 % „wild type“ homozygotů; COX-1 (-842A > G): 12,00 % heterozygotů, 0,41 % homozygotů a 87,59 % „wild type“ homozygotů; PAR-1 (IVS -14A > T): 28,55 % heterozygotů, 4,41 % homozygotů a 67,03 % „wild type“ homozygotů; GP VI (13254T > C): 21,45 % heterozygotů, 1,79 % homozygotů a 76,76 % „wild type“ homozygotů; GP Ia (807C > T): 47,27 % heterozygotů, 16,70 % homozygotů a 36,02 % „wild type“ homozygotů.

Závěr: V České republice byla zjištěna 10–40% frekvence testovaných polymorfismů destiček v populaci zdravých osob středního věku, které jsou spojovány s náchylností k aterotrombogenezi nebo nedostatečnému účinku protideštičkové léčby.

Klíčová slova: GP IIIa (HPA-1; rs5918) – P2Y12 (H1/H2 haplotyp; rs2046934) – P2Y12 (34C > T; rs6785930) – COX-1 (-842A > G; rs10306114) – PAR-1 (IVS -14A > T; rs168753) – GP VI (13254T > C; rs1613662) – GP Ia (807C > T; rs1126643) – Frekvence ve zdravé populaci v ČR

Kvasnička J, Hájková J, Bobčíková P, et al. **Platelet gene polymorphisms related to atherothrombogenesis and their frequencies in the healthy middle-aged Czech population.** *Cor Vasa* 2009;51(3):187–193.

Aim: The aim of our study was to assess the frequencies of platelet gene polymorphisms associated with atherothrombogenesis in the healthy middle-aged Czech population.

Methods: Anonymous testing of 1,450 blood donor DNA by PCR followed by melting curve analysis using a LightCycler 480 analyzer (ROCHE) were used to determine the frequencies of GP IIIa (HPA-1; rs5918), P2Y12 (H1/H2 haplotype; rs2046934), P2Y12 (34C > T; rs6785930), COX-1 (-842A > G; rs10306114), PAR-1 (IVS -14A > T; rs168753), GP VI (13254T > C; rs1613662) and GP Ia (807C > T; rs1126643) polymorphisms.

Results: The frequencies of GP IIIa (HPA-1) were: 27.38% of heterozygotes, 3.66% of homozygotes, and 68.97% of “wild type” homozygotes; frequencies of P2Y12 (H1/H2 haplotype) were: 25.93% of heterozygotes, 2.62% of homozygotes, and 71.45% of “wild type” homozygotes; frequencies of P2Y12 (34C > T) were: 44.03% of heterozygotes, 9.69% of homozygotes and 46.28% of “wild type” homozygotes; frequencies of COX-1 (-842A > G) were: 12.00% of heterozygotes, 0.41% of homozygotes, and 87.59% of “wild type” homozygotes; frequencies of PAR-1 (IVS -14A > T) were: 28.55% of heterozygotes, 4.41% of homozygotes, and 67.03% of “wild type” homozygotes; frequencies of GP VI (13254T > C) were: 21.45% of heterozygotes, 1.79% of homozygotes, and 76.76% of “wild type” homozygotes; frequencies of GP Ia (807C > T) were: 47.27% of heterozygotes, 16.70% of homozygotes, and 36.02% of “wild type” homozygotes in the tested group of healthy persons.

Conclusion: The frequencies of tested platelets gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to atherothrombogenesis, or to failure of antiplatelet therapy, were 10–40% in the healthy middle-aged Czech population.

Studie byla provedena s podporou grantu MZO 0000064 165 (VFN 2005).

Key words: GP IIIa (HPA-1; rs5918) – P2Y12 (H1/H2 haplotype; rs2046934) – P2Y12 (34C > T; rs6785930) – COX-1 (-842A > G; rs10306114) – PAR-1 (IVS -14A > T; rs168753) – GP VI (13254T > C; rs1613662) – GP Ia (807C > T; rs1126643) – Frequencies in healthy Czech population

Adresa: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc., Trombotické centrum, VFN a 1. LF UK, U nemocnice 2, 128 08 Praha 2, Česká republika, e-mail: kvasnicka.jan@vfn.cz

Úvod

Je známo, že terminální komplikaci aterosklerotického procesu v koronárním řečišti – atherotrombózu – vyvolá v místě ruptury nestabilního plátu zvýšená aktivita krevních destiček a jejich agregace s tvorbou destičkové zátky.⁽¹⁾ S poněkud jiným mechanismem atherotrombogeneze, včetně tromboembolizace, musíme počítat v případě vzniku dalších atherotrombotických cévních příhod – při cévní mozkové příhodě nebo u ischemické choroby periferních tepen atherogenního původu. Ale i zde hraje primární úlohu v jejích etiopatogenezi zvýšená aktivita krevních destiček.⁽²⁾ Ve všech těchto příkladech atherotrombotického procesu se proto v rámci druhotné profylaxe snažíme působit protideštičkovými léky.^(3,4) Míra spontánní nebo vyvolané zvýšené aktivity krevních destiček na straně jedné a odpovědi na použitou protideštičkovou léčbu, zejména kyselinou acetylsalicylovou nebo thienopyridiny (clopidogrel, případně ticlopidin), na straně druhé však mohou být individuálně velmi rozdílné, což v některých případech může vést i k předčasnému vzniku atherotrombotických příhod, nebo třeba i k selhání protideštičkové léčby, které bývá také označováno jako rezistence na léčbu kyselinou acetylsalicylovou, popř. clopidogrelem.⁽⁵⁾ Vedle vlivu řady zevních příčin se přitom budou určitě uplatňovat i vlivy dědičné. V etiopatogenezi atherotrombogeneze to kromě poruch metabolismu, imunitní reakce, neuroendokrinních, reologických a jiných, které se primárně a/nebo sekundárně týkají stěny cévní (zejména endotelu), budou i poruchy hemostázy, a tedy i její významné složky – krevních destiček.⁽⁶⁾

V tomto sdělení se budeme zabývat oblastí zvýšené dispozice ke vzniku atherotrombotických příhod, odlišné reaktivity krevních destiček při laboratorním vyšetření a případné neodpovídatosti na protideštičkovou léčbu, která je spojena s některými polymorfismy genů povrchových glykoproteinů krevních destiček nebo jejich enzymů: receptoru pro fibrinogen – integrinu GP IIIa (HPA-1), receptoru pro ADP P2Y12 (haplotyp H1/H2 a mutace 34C > T), receptoru pro trombin PAR-1 (IVS -14A > T), enzymu cyklooxygenázy 1 (-842A > G) a 2 receptorů pro kolagen – genu α_2 (ITGA2) receptoru pro kolagen GP Ia/IIa (807C > T) a genu GP VI (13254T > C)⁽⁷⁻¹²⁾ s cílem zjistit nejprve, jaký je výskyt těchto již známých genových polymorfismů v naší populaci u zdravých osob.

Metody

Studie byla provedena v anonymních vzorcích krve od náhodně vybraných 1 450 zdravých osob bělošského původu, dárců krve, které zbyly po vyšetření povinných laboratorních testů prováděných před odběrem krve pro trans-

fuzní účely. Průměrný věk byl $34,87 \pm 9,4$ let (medián 33, 18–64 let), zastoupení podle pohlaví – 981 mužů (67,66 %) a 469 žen (32,4 %). Všichni splňovali předepsaná zdravotní kritéria dárců krve. Studie byla provedena v rámci programu řešení Výzkumného záměru, schváleného etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Genotypizace

Genomová DNA (deoxyribonukleová kyselina) byla extrahována z leukocytů periferní krve a izolována pomocí MagNA Pure LC nucleic acid extraction systému (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) se soupravou MagNA Pure DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) podle návodu výrobce. V získaných vzorcích DNA byly vyšetřeny tyto polymorfismy: haplotyp H1/H2 genu destičkového receptoru pro ADP P2Y12 (P2RY12), určený stanovením polymorfismu i-744T > C (rs2046934) a polymorfismus 34C > T (rs6785930) ve stejném genu. Dále byl vyšetřen polymorfismus HPA-1 (rs5918) genu pro glykoprotein (GP) IIIa (ITGB3), polymorfismus 807C > T genu (ITGA2) pro GP Ia (rs1126643), polymorfismus 13254T > C (rs1613662) genu pro GP VI (GP 6) a polymorfismus -842A > G (rs10306114) genu pro cyklooxygenázu (COX) – 1 (PTGS1). Polymorfismy byly stanoveny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) následované analýzou křivky tání se specifickými fluorescenčně značenými hybridizačními sondami, užitím procesu FRET (fluorescence resonance energy transfer). Vyšetření polymorfismů byla provedena na přístroji LightCycler 480 instrument™ s použitím kitů LightCycler 480 Genotyping Master® (vše Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) podle instrukcí výrobce. Toto zařízení umožňuje provést 96 reakcí PCR najednou. Sekvenčně specifické primery a fluorescenčně značené sondy byly navrženy ve spolupráci s firmou TIB MOLBIOL (Berlín, Německo), kde byly také na zakázku připraveny. Sekvence použitých primerů a sond je uvedena v *tabulce 1*.

Statistické metody

Údaje byly zpracovány ve statistickém programu Windows Excel 2007, frekvence zastoupení heterozygotů, homozygotů a běžného („wild“) genotypu byly vypočítány statistickým programem SAS.

Výsledky

Frekvence zastoupení jednotlivých polymorfismů ve sledovaném souboru 1 450 zdravých osob – dárců krve jsou uvedeny v *tabulce 2*.

Tabulka 1 Použité primery, proby a podmínky při PCR a analýze křivky tání

Gen	SNP	SNP ID	Oligonukleotidy	PCR-T ^a (°C)	melt.-T ^b (°C)
P2RY12	i-744T > C	rs2046934	5'-ATTATCTAAATATCTTTTACACGAA 5'-AAATAAAATATAGGTTATTACCACA 5'-AAAAGATTACAAACGTCATTTCAA--FI 5'-LCRed640-TTCCCAAGATGTAGATGCCATATAGCA--ph	54	40
P2RY12	34C > T	rs6785930	5'-AGCAATAATACTACCTTAGGCT 5'-GAAGATCAGAAATGACTGTGTTC 5'-CGCAGAGGTGAGATTGTCG--FI 5'-LCRed640-CGGCTTGCAATTTCTTGTTGTTACCTAGAG-ph	56	45
ITGB3	HPA-1	rs5918	5'-TGCTCCAATGTACGGGTAAAC 5'-CTGGGGCAGTTATCCTTCAG 5'-GACTTCTCTTTGGGCTCCTGTCTTACAGG--FI 5'-LCRed640-CCTGCCTCCGGGCTCAC--ph	55	50
ITGA2	807C > T	rs1126643	5'-AAT GAT TGT AGC AAC ATC CC 5'-TTT AAC TTT CCC AGC TGC C 5'-CTT GCA TAT TGA ATT GCT CCG AAT--FI 5'-LCRed640-TGT TTG TGA GGT CCC CAC CAT ATT GG--ph	58	50
GP6	13254T > C	rs1613662	5'-CAAATCTGTGAAAGAACCACT 5'-GATTTCCAGGAACCTCTGT 5'-GCACCAGAATGGACCCTGCAGAACCT--FI 5'-LCRed640-CCTGCTACCGAGGAAGGTGG--ph	55	50
PTGS1	-842A > G	rs10306114	5'-CCTTCCGATACTGAGAACCT 5'-TTTCTAGCCCTCAGTATTCTCAT 5'-CAATGAGGGAATGCACAAATCTCTGG--FI 5'-LCRed640-GCAGTGCCAGCATGTAG--ph	55	50
F2R	IVS-14A > T	rs168753	5'-GGTCTCTGAGAAGAAATGAC 5'-CGTTCACCTTTTACATTTAAGAXTT ^c (X=LCRed640) 5'-GATTCTGAAAAATAAAATAAAAA--FI	51	40

^a – annealingová teplota primerů, ^b – teplota ochlazení při analýze křivky tání,
FI – fluorescein, ph – phosphate, LCRed640 – LightCycler Red 640

Diskuse

Jako první byl zkoumán výskyt polymorfismu genu destičkového receptoru pro fibrinogen – integrinu GP IIIa (β3 integrin), který je integrální součástí dvou glykoproteinových receptorů: receptoru pro fibrinogen GP IIb/IIIa krevních destiček a receptoru pro vitronectin GP V/IIIa endoteliálních buněk a buněk hladké svaloviny cévní stěny. Zájem o studium vztahu polymorfismu PLA byl zvýšen zejména po zjištění, že u olympionika, který zemřel při sportovním utkání náhlou smrtí, byl zjištěn polymorfismus PLA2/A2. Dále bylo zjištěno, že PLA2 souvisí s vyšší agregabilitou krevních destiček, a tím pádem i s častějším nálezem okluze koronárních tepen nebo trombózy stentu, popřípadě s nižší reaktivitou na používané protideštičkové léky – kyselinu acetylsalicylovou, clopidogrel nebo inhibitory GP IIb/IIIa.⁽¹³⁾ Ve studii Helsinki Sudden Death Study byla provedena pitva u 700 osob středního věku, které zemřely náhlou smrtí při hospitalizaci. Výskyt komplikovaných lézí byl vyšší u mužů s alelou A2 (heterozygotů či homozygotů), pokud byl porovnán s nálezem u osob s „wild typem“ (homozygoti PLA1/A1). Fibrotické léze koronárních tepen byly zase častější u osob s nálezem PLA1/A1 v porovnání s nálezy u osob s alelou PLA2. Osoby s genotypem PLA1/A1 měly také častěji nález stenózy koronárních tepen v porovnání s osobami s alelou A2, nacházely se v časném, méně komplikovaném „stabilním“ stadiu aterosklerózy. Osoby s alelou

PLA2 zase více inklinovaly k trombotickým komplikacím. Byla tedy vyslovena hypotéza, že polymorfismus PLA je v procesu aterosklerózy spojen s poruchou funkce endotelií a/nebo buněk hladké svaloviny, resp. receptorů GP V/IIIa pro vitronectin, a vede k rozvoji cévních změn ve fázi časně aterosklerózy; polymorfismus PLA receptorů krevních destiček GP IIb/IIIa hraje zase hlavní roli při vzniku koronární trombózy.⁽¹⁴⁾ Zdá se tedy, že polymorfismus PLA se podílí na rozvoji ischemické choroby srdeční (ICHS) a infarktu myokardu. V další finské studii v souboru 300 mužů středního věku, kteří zemřeli náhlou smrtí, měly osoby s alelou PLA2 většinou ztenčenou stěnu koronární arterie s vulnerabilními pláty, a inklinovaly tak ke vzniku masivní, někdy i fatální trombózy. Na rozdíl od tohoto nálezu byly u osob s alelou PLA1 nalézány většinou stabilní pláty. Frekvence nálezu alely PLA2 byla signifikantně nižší u osob s větší než 50% koronární stenózou (18,3 %) než u osob, které měly nález menší než 25% stenózy (32,9 %). Přestože polymorfismus PLA nebyl přímo asociován s infarktem myokardu, alela PLA2 byla nalezena u 11 z 22 osob (50 %) s infarktem myokardu a koronární stenózou, ale pouze u 6 ze 47 (12,8 %) osob s infarktem myokardu, u nichž byla nalezena závažná stenóza, ale bez trombózy. Osoby s alelou PLA2 měly také větší oblasti s fisurami a ulceracemi v koronárních arteriích.⁽¹⁵⁾ Výskyt alely PLA2 je také spojován s vyšším rizikem vzniku rezistence na léčbu kyselinou acetylsalicylovou; tyto

Tabulka 2 Zastoupení jednotlivých polymorfismů krevních destiček ve sledovaném souboru zdravých osob středního věku (v České republice)

Polymorfismus		
GP1IIa (PIA1/PIA2)	Počet	%
HET	397	27,38
HOM	53	3,66
neg	1 000	68,97
P2Y12 (H1/H2 haplotyp)	Počet	%
HET	376	25,93
HOM	38	2,62
neg	1 036	71,45
P2Y12 (34C > T)	Počet	%
HET	627	44,03
HOM	138	9,69
Neg	659	46,28
GPVI (13254T > C)	Počet	%
HET	311	21,45
HOM	26	1,79
neg	1 113	76,76
PAR-1 (IVS _n -14A > T)	Počet	%
HET	414	28,55
HOM	64	4,41
neg	972	67,03
COX-1 (-842A > G)	Počet	%
HET	174	12,00
HOM	6	0,41
neg	1 270	87,59
GP1a (807C > T)	Počet	%
HET	685	47,27
HOM	242	16,70
neg	522	36,02
HET - heterozygot, HOM - homozygot, neg - "wild type" homozygot		

nálezů ale nejsou jednoznačné. Některé studie to však potvrzují.⁽¹⁶⁾ Vycházejí z poznatku, že u osob s výskytem alely PIA2 byl na povrchu destiček po přidání malých dávek ADP (*adenosindifosfát*) zjištěn nález vyšší exprese P-selektinu, vyšší koncentrace fibrinogenu vázaného na GP IIb/IIIa, a také vyšší výskyt aktivovaného GP IIb/IIIa ve srovnání s osobami s nálezem PIA1/A1. Největší rozdíl byl zjištěn mezi homozygoty PIA2/A2 ve srovnání s homozygoty „wild typu“ PIA1/A1 v expresi aktivovaného GP IIb/IIIa. U osob s polymorfismem PIA2 měl být tedy zjištěn nižší práh aktivace; destičky s PIA1 zase měly vyšší senzitivitu na kyselinu acetylsalicylovou a abciximab v testu *in vitro*; tedy obráceně – léčba osob s PIA2 kyselinou acetylsalicylovou, abciximabem, popř. clopidogrelem může být tedy méně účinná.⁽¹⁷⁾ Tento vztah se však nepodařilo vždy opakovat. Ve studii, kde byla studována vazba fibrinogenu, resp. hodnota maximální vazby a disociační konstanty K(d) této vazby s GP IIb/IIIa u PIA1 a PIA2 homozygotů a u PIA1/PIA2

heterozygotů, nebyl již prokázán vliv PIA2 na vyšší agregace destiček, či ovlivnění tvorby trombu při vyšetření s PFA-100. Autoři této studie se tedy domnívají, že zjištěné vztahy polymorfismů GP IIIa k výskytu kardiovaskulárních příhod nebudou vyvolány rozdíly ve funkci destiček GP IIb/IIIa, ale jinými mechanismy.⁽¹⁸⁾ To by mohlo potvrzovat i zjištění ve studii provedené u 1 340 osob v rámci Framingham Offspring Study. Vazba GP IIIa k fibrinogenu a vztahy mezi polymorfismy GP IIIa zde byly ovlivněny vyšší koncentrací fibrinogenu.⁽¹⁹⁾ Metaanalýza provedených 37 studií došla k názoru, že nález asociace „rezistence na kyselinu acetylsalicylovou“ s polymorfismem PIA2 GP byl převážně u zdravých osob, u osob s koronární chorobou byl ovlivněn a způsoben jinými vlivy.⁽²⁰⁾ Na vyšší rizika infarktu myokardu, popř. s restenózou stentu, se mimo polymorfismu PIA2 bude podílet i vliv kouření.⁽²¹⁾ Na základě další skandávské studie již byly učiněny vážné míněné návrhy na provádění genotypizace polymorfismu PIA2 při stratifikaci rizika infarktu myokardu (IM) u osob s angiograficky verifikovanou koronární nemocí. Autoři doporučení vycházejí z výsledků studie provedené u 1 019 nemocných s angiograficky prokázanou koronární chorobou s prodělaným infarktem myokardu nebo bez infarktu myokardu u 1 191 zdravých osob. Při výběru byly respektovány – rasa, věk a pohlaví v obou skupinách. PIA2 byl přítomen u 28 % zdravých kontrol a ve stejné frekvenci u pacientů s pozitivním nálezem angiografie, ale bez prodělaného IM. Pokud však pacienti s pozitivní angiografií infarkt myokardu již prodělali, byla u nich nalezena až 35% frekvence alely A2.⁽²²⁾

S rizikem atherotrombogeneze jsou také spojovány mutace genu receptoru destiček pro ADP P2Y12. Při sekvenční analýze zde byly nalezeny čtyři bodové mutace (i-139C > T, i-744T > C, i-ins801A a 52G > T), které se nacházejí ve vazebné nerovnováze (LD, „linkage disequilibrium“), a vytvářejí tak dva haplotypy, označované jako H1 a H2. U zdravých osob s minoritní alelou H2 pak byla nalezena zvýšená reaktivita destiček po přidání ADP.⁽²³⁾ Nález alely H2 byl tedy označen za možnou příčinu vyššího rizika atherotrombogeneze, zejména když zde byla prokázána vazba k ateroskleróze periferních tepen,⁽²⁴⁾ nebo ke vzniku ischemické kardiovaskulární příhody, paradoxně více u nekuřáků.⁽²⁵⁾ Tato asociace s vyšším výskytem koronární ischemické choroby nebyla vždy prokazována.⁽²⁶⁾ Jednoznačně nebyl u nosičů alely H2 potvrzen ani sklon k rezistenci vůči clopidogrelu při léčbě koronárního syndromu,^(27,28) zejména pokud byla použita vyšší nasycovací dávka 600 mg clopidogrelu.⁽²⁹⁾ Nebyl také potvrzen vliv přítomnosti alely H2 na možnou „rezistenci“ při současné léčbě kyselinou acetylsalicylovou.⁽³⁰⁾ Paradoxně se také alela H2 vyskytovala méně u osob s prodělanou žilní trombózou nebo plicním embolismem.⁽³¹⁾ Zajímavý je však výsledek studie GENDER, kdy byl u nemocných po perkutánní koronární angioplastice a zavedení stentu zjištěn nižší výskyt restenózy, resp. reintervence u nositelů běžných alel H1.⁽³²⁾ Druhá sledovaná mutace genu destičkového receptoru P2Y12 34C > T byla spojována s vyšším výskytem ischemické cévní mozkové příhody u osob s aterosklerózou periferních tepen. Přítomnost alely T představovala v této studii 4,02krát vyšší riziko

neurologických příhod proti přítomnosti alely C (95% CI, 1,08–14,9).⁽⁹⁾ Na definitivní rozhodnutí o klinickém významu obou mutací genu destičkového receptoru pro ADP P2Y₁₂ bude tedy třeba ještě vyčkat.

Mutace genu receptoru pro trombin PAR-1 (IVSn -14 A > T) je naopak spojována s nižší agregabilitou destiček a jejich prokoagulační aktivitou. Mohla by se tedy zdát z hlediska aterotrombózy spíše protektivní. Varianty genu destičkového receptoru pro trombin PAR-1 (protease-activated receptor-1) byly po přidání agonisty TRAP (thrombin receptor-activating peptide) spojeny se změnou hustoty tohoto receptoru a s následnou expresí P-selektinu na povrchu destiček. Vyšší odpověď byla zjištěna u osob s „wild type“ genotypem A/A.⁽¹⁰⁾ Ve studii PATHROS (Paris Thrombosis Study) byl zjištěn vztah dalšího polymorfismu PAR 1 (-506 I/D) k výskytu žilní trombózy. Bylo zjištěno, že alela I je méně častá u mužů s žilní trombózou než u mužů bez žilní trombózy. U homozygotů zjistili také menší koncentraci fragmentů protrombinu 1 + 2. Znamená to, že výskyt této alely může zase chránit před vznikem žilní trombózy.⁽³³⁾

O dalším testovaném polymorfismu enzymu cyklooxygenázy 1 (- 842A > G) se soudí, že ovlivňuje odpověď destiček na kyselinu acetylsalicylovou.⁽¹¹⁾ Pravděpodobně zde existuje nějaké spojení s další sledovanou mutací destičkového receptoru pro kolagen GP VI.⁽¹²⁾

Laboratorní nálezy rezistence na kyselinu acetylsalicylovou u osob s mutací (- 842 A > G)⁽³⁴⁾ však nebyly potvrzeny klinickou studií. U nemocných s ischemickou chorobou srdeční léčených nízkými dávkami 80 mg kyseliny acetylsalicylové nebyl výskyt polymorfismu 50C > T (je v LD s naším sledovaným polymorfismem -842 A > G) spojen se sníženou odpovědí na tuto léčbu.⁽³⁵⁾

Další polymorfismy byly identifikovány v genech dvou receptorů krevních destiček pro jejich vazbu s kolagenem – u integrinu GP Ia/IIa (ITGA) a GP VI.

Při genotypizaci integrinu GP Ia/IIa byl sledován polymorfismus 807C > T jeho řetězce $\alpha 2$. V laboratorních testech bylo zjištěno, že osoby s alelou 807T mají na povrchu destiček vyšší hustotu tohoto integrinu vázajícího kolagen.⁽³⁶⁾ Zpočátku byl vlivu této mutované alely přisuzován i výskyt nefatálního infarktu myokardu⁽³⁷⁾ u mladých osob. To se však v dalších studiích nepotvrdilo. Polymorfismus 807C > T GP Ia zde byl nalezen u 73,5 % sledovaných nemocných s koronární chorobou (heterozygotů CT 59,8 %, homozygotů TT 13,7 %). Genotyp CC byl nalezen u 26,5 % pacientů. Podobný nález však byl i u zdravých osob – mutovaná alela genu GP Ia byla zjištěna u 73,6 % vyšetřených (CT u 58,5 % a TT u 15,1 % osob). Genotyp CC „wild type“ byl zjištěn u 26,4 % osob. Nebyly také nalezeny žádné rozdíly u nemocných rozdělených podle jejich angiografického nálezu.⁽³⁸⁾ Vztah této mutace k infarktu myokardu nepotvrdila nakonec ani metaanalýza 19 studií sledujících vliv polymorfismu genu GP Ia (C807T), která zahrnovala údaje zjištěné v souboru až 13 835 vyšetřených osob.⁽³⁹⁾ Totéž bylo prokázáno i ve vztahu k ischemickému infarktu.⁽⁴⁰⁾ Vysvětlení, proč tato variantní alela nesouvisí s výskytem různých manifestací

aterotrombogeneze, patrně vyplývá i z našich nálezů frekvence mutované alely v populaci zdravých osob, která se zde téměř přibližuje výskytu „wild type“ alely (heterozygotů GP Ia 807 CT bylo 47,27 %, homozygotů GP Ia 807 TT 16,70 % a „wild type“ genomu GP Ia 807 CC 36,02 %). K podobnému nálezu došli i v rozsáhlé studii, provedené u zdravých osob v Německu, s nálezem 56 % heterozygotů variantní alely GP Ia 807 CT, 14,2 % homozygotů variantní alely GP Ia 807 TT a jen 29,8 % homozygotů s „wild type“ genomem GP Ia 807 CC.⁽⁴¹⁾

S rizikem aterotrombózy však patrně bude spojen polymorfismus destičkového receptoru pro kolagen GP VI; GP VI je důležitý pro aktivaci destiček při kontaktu s kolagenem v poškozené cévní stěně. Přispívá k tomu smykový stres, ke kterému zde dochází při průtoku krve v ateroskleroticky postiženém koronárním řečišti. Po styku GP VI s kolagenem pak dochází prostřednictvím části jeho molekuly k dalšímu přenosu signálu do nitra trombocyty. Bílkovina GP VI je složena z 339 aminokyselin a vytváří ve svém vyčnívajícím konci dvě imunoglobulinu (Ig) podobné domény, ke kterým se přichytí ligand. Ty pak mají jednu krátkou, vysoce glykosylovanou cytoplazmatickou část, která po styku s ligandem přenáší signál do nitra destičky. To je spojeno s fosforylací této části GP VI za spoluúčasti tyrosinové kinázy z rodiny Src. Uvedená část molekuly GP VI se také označuje jako ITAM (immunoreceptor tyrosine-containing activation motif). To vše pak vede k aktivaci další destičkové tyrosinové kinázy – enzymu Syk a k následné fosforylaci a aktivaci PLC $\gamma 2$, k uvolnění nitrodestičkových Ca^{++} iontů a k aktivaci receptorů GP IIb/IIIa a degranulaci destiček. K této aktivaci GP VI, který je patrně hlavním receptorem destiček pro kolagen, je ještě zapotřebí souhry destičkového receptoru GP Ia/IIa, který však přitom představuje spíše jen jakousi kotvu pro adhezi destičky k vláknům kolagenu.⁽⁴²⁾ Nejasná je zatím spojitost aktivace GP VI dalším ligandem, kterým je hormon adiponectin produkovaný adipocyty, který působí protiterogenně,⁽⁴³⁾ také i jeho role v procesu syntézy destičkového oxidu dusnatého (NO), pokud jsou destičky aktivovány kolagenem (via GP VI), nebo jejich dalšími agonisty ADP a tromboxanem TXA₂.⁽⁴⁴⁾ Je již také znám mechanismus, který usměrňuje aktivitu GP VI při trombogenezi *in vivo*. Je to aktivita destičkové metaloproteinázy ADAM 10, která se uvolní při aktivaci destiček a zpětně vazebně potlačí účinek GP VI. Proteázová aktivita ADAM 10 totiž způsobuje odloučení extracelulární části 90 % přítomných molekul GP VI na povrchu kolagenem aktivovaných destiček. Tím se asi docílí kontroly celého děje a přirozené inhibice možné diseminace trombotického procesu.⁽⁴⁵⁾

V naší studii jsme se zaměřili na výskyt polymorfismu genu GP VI 13254 T > C, který je spojen se záměnou aminokyseliny serinu za prolin (Ser 219 Pro) v pozici 219. V bělošské populaci se nachází asi 13–23 % osob s touto záměnou. Tato mutace GP VI je spjata s vyšším výskytem akutního infarktu myokardu, resp. koronární trombózou,⁽⁴⁶⁾ a také s výskytem častějších ischemických příhod u žen léčených hormonální kombinovanou substitucí v klimak-

tériu.⁽⁴⁷⁾ To však zde nebude patrně souviset s aktivitou receptoru GP VI, neboť ze studie s průtokovou cytometrií bylo na povrchu destiček osob s mutací GP VI 13254 T > C nalezeno méně receptorů GP VI než u osob s „wild“ genotypem ($3\,437 \pm 353$ vazebných míst u heterozygotů a $2\,598$ vazebných míst u homozygota, v porovnání s nálezem $3\,814 \pm 439$ vazebných míst u osob s „wild“ genotypem). Bylo to při kontaktu s kolagenem provázeno i nižší aktivitou destiček.⁽⁴⁸⁾ Mutace GP VI však nesouvisí pouze s vyšším výskytem koronárních příhod, ale také žilní trombózy. Leidenskou skupinou bylo v jejich studii MEGA prokázáno, že mutace GP VI 13254 T > C je také rizikovým faktorem pro vznik žilní trombózy.⁽⁴⁹⁾ To samozřejmě obrací naši pozornost k dalším pochodům, se kterými může být mutace destičkového GP VI spojena, a které by se pak podílely na pozorované vyšší aterotrombogenicitě u nosičů tohoto polymorfismu. Bude to i předmětem další etapy našeho studia.

Poděkování: Autoři děkují za pomoc při odběru vzorků krve a jejich vyšetření laborantkám Fakultního transfuzního oddělení a Trombotického centra Všeobecné fakultní nemocnice.

Literatura

- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227–34.
- Kvasnička J. Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Praha: Grada-Avicenum, 2003:299.
- Patrono C, Bachmann F, Baigent C, et al. European Society of Cardiology. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004;25:166–81.
- Hirsh J, Guyatt GH, Albrecht GW, et al. (eds.). Antithrombotic and thrombolytic therapy, 8th ed. ACCP Guidelines. *Chest* 2008;133: Suppl: 67S–968S.
- Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation* 2007;115:2196–207.
- Verstraete M, Fuster V, Topol EJ, eds. Cardiovascular thrombosis. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998:871.
- Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphism in venous and arterial thrombotic diseases. *Blood* 2000;95:1517–32.
- Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger J-N, Emmerich J, Reny J-L. P12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease. A case-control study. *Circulation* 2003;108:2971–8.
- Ziegler S, Schillinger M, Funk M, et al. Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y12, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease. *Stroke* 2005;36:1394–9.
- Smith SM, Judge HM, Peters G, et al. PAR-1 genotype influences platelet aggregation and procoagulant responses in patients with coronary artery disease prior to and during clopidogrel therapy. *Platelets* 2005;16:340–5.
- Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006;3:2340–5.
- Lepäntalo A, Mikkelsen J, Reséndiz JC, et al. Polymorphisms of COX-1 and GP VI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* 2006;95:253–9.
- Di Castelnuovo A, de Gaetano G, Benedetta Donati M, Iacoviello L. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism and coronary artery disease: implications for clinical practice. *Am J Pharmacogenomics* 2005;5:93–9.
- Mikkelsen J, Perola M, Penttilä A, Goldschmidt-Clermont PJ, Karhunen PJ. The GP IIIa (beta3 integrin) P1A polymorphism in the early development of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001;154:721–7.
- Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, et al. Glycoprotein IIIa P1(A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2573–8.
- Macchi L, Christiaens L, Brabant S, et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet P1A1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T (GP Ia/IIa) and C-5 T Kozak (GP Iba) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1115–9.
- Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, et al. Platelet GP IIIa P1(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2001;103:E33–4.
- Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, et al. Effect of the P1(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. *Blood* 2001;97:3093–9.
- Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, et al. Platelet glycoprotein IIIa P1(a) polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001;104:140–4.
- Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:222–32.
- Lopes NH, Pereira AC, Hueb W, et al. Effect of glycoprotein IIIa P1A2 polymorphism on outcome of patients with stable coronary artery disease and effect of smoking. *Am J Cardiol* 2004;93:1469–72.
- Grove EL, Ørntoft TF, Lassen JF, Jensen HK, Kristensen SD. The platelet polymorphism P1A2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J Intern Med* 2004;255:637–44.
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003;108:989–95.
- Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease. A case-control study. *Circulation* 2003;108:2971–3.
- Cavallari U, Trabetti E, Malerba G, et al. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease. *BMC Med Genet* 2007;8:59.
- Schettler IT, Pereira AC, Lopes NH, et al. Association between platelet P2Y12 haplotype and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease. *Thromb Res* 2006;118:679–83.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2005;116:491–7.
- Cuisset T, Frère C, Quilici J, et al. Role of the T744C polymorphism of the P2Y12 gene on platelet response to a 600-mg loading dose of clopidogrel in 597 patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Thromb Res* 2007;120:893–9.
- von Beckerath N, von Beckerath O, Koch W, Eichinger M, Schomig A, Kastrati A. P2Y12 gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:199–204.
- Bierend A, Rau T, Maas R, et al. P2Y12 polymorphisms and antiplatelet effects of aspirin in patients with coronary artery disease. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:540–7.
- Zee RY, Michaud SE, Diehl KA, et al. Purinergic receptor P2Y₁₂, G-protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism. *Atherosclerosis* 2008;197:694–9.
- Rudez G, Pons D, Leebeek F, et al. Platelet receptor P2RY12 haplotypes predict restenosis after percutaneous coronary interventions. *Hum Mutat* 2008;29:375–80.
- Arnaud E, Nicaud V, Poirier O, et al. Protective effect of a thrombin receptor (protease-activated receptor 1) gene polymorphism toward venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:585–92.
- Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* 2005;3:2340–5.
- Clappers N, van Oijen MG, Sundaresan S, et al. The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetyl salicylic acid. *Thromb Haemostas* 2008;100:70–5.
- Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, et al. Nucleotide polymorphism in the $\alpha 2$ gene define multiple alleles that are associated with difference in platelet $\alpha 2$ $\beta 1$ density. *Blood* 1998;92:2382–8.
- Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of platelet glycoprotein Ia C 807 T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999;93:2449–53.
- Lewandowski K, Swierczyńska A, Kwaśnikowski P, Elikowski W, Rzeźniczak M. The prevalence of C807T mutation of glycoprotein Ia gene among young

- male survivors of myocardial infarction: a relation with coronary angiography results. *Kardiol Pol* 2005; 63:107–13.
39. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Vaiopoulos G, Travlou A. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *Int J Cardiol* 2007;118:189–96.
40. Nikolopoulos GK, Tsantes AE, Bagos PG, Travlou A, Vaiopoulos G. Integrin, alpha 2 gene C807T polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Thromb Res* 2007;119:501–10.
41. Hoppe B, Tolou F, Dörner T, Kiesewetter H, Salama A. Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population. *Thromb Haemostas* 2006;465–70.
42. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GP VI the central receptor? *Blood* 2003;102:449–61.
43. Riba R, Hughes CE, Graham A, Watson SP, Naseem KM. Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GP VI-Fc receptor gamma chain complex. *J Thromb Haemost* 2008;6:1012–20.
44. Riba S, Sharifi M, Farndale R, Naseem KM. Regulation of platelet guanylyl cyclase by collagen: evidence that Glycoprotein VI mediates platelet nitric oxide synthesis in response to collagen. *Tromb Haemost* 2005;94:395–403.
45. Gardiner EE, Arthur JF, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK. Regulation of membrane levels of glycoprotein VI by a platelet – derived metalloproteinase. *Blood* 2004;104:3611–7.
46. Ollikainen E, Mikkelsen J, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ. Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2004;176:95–9.
47. Bray PF, Howard TD, Vittinghoff E, Sane DC, Herrington DM. Effect of genetic variations in platelet glycoproteins Iba and VI on the risk for coronary heart disease events in postmenopausal women taking hormone therapy. *Blood* 2007;109:1862–9.
48. Best D, Senis YA, Jarvis GE, et al. GP VI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* 2003;102:2811–8.
49. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2008;299:1306–14.
-
- Došlo do redakce 1. 12. 2008*
Přijato k otištění 28. 1. 2009