

Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure prognosis.

Doç. Dr. Nesligül Yıldırım

MMP-2, konjestif kalp yetersizliği (KY) seyrinde oluşan kardiyak yeniden şekillenmede görev alan proteolitik bir enzimdir. Bu çalışmadaki hipotez, MMP-2 genetik varyasyonlarının sistolik KY prognozunu etkileyebileceği idi. Hipotezi test etmek için, sistolik KY olan 605 hastaya takip çalışması uygulandı. MMP-2'nin 3 adet tek nükleotid polimorfizmi (TNP) (rs243864, rs243866, rs17859821), 'restriction fragment length polymorphism' (RELP) metodu ile analiz edildi. Çalışmanın sonucu; MMP-2 rs17859821 A alelinin sistolik KY'de daha iyi prognoz ile ilişkili olduğunu izlenimini uyandırmaktadır.

1. Giriş

Kalp yetersizliği (KY), değişken duyarlılık ve sonlanım noktaları olmasına rağmen, yüksek mortalite ve kötü prognoz ile ilişkili majör bir halk sağlığı sorunudur. Bazı ikiz çalışmaları veya KY'nin familial korelasyonu, genetik araştırmalardaki ilerlemeler ile birlikte KY'nde genetiğin rolünü aydınlatmıştır.

Teşvik eden uyarıcı farklı olsa da; miyokardiyal yeniden şekillenme, progresif KY olan hastalarda önemli bir yapısal kilometre taşıdır. Günümüzde miyokardiyal ekstraselüler matriksdeki (ESM) değişikliklerin ilerleyici yeniden şekillenme sürecine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir, ESM yeniden şekillenmesine katılan yollar arasında metalloproteinazlar (MMPs) olarak bilinen proteolitik enzim ailesinin aktivasyonu oldukça önemlidir. Bu proteolitik sistem, geniş bir ESM protein spektrumunu degrade eder ve miyokard da dahil olmak üzere pek çok hücre ve doku tipi tarafından ekspres edilir. Daha önceki çalışmalarda LV dilatasyon ve disfonksiyon progresyonu sırasında MMP-2 düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Araştırmalarda ayrıca artmış MMP-2 aktivitesinin iskemik reperfüzyon hasarında miyokardiyal stunning gelişimine ve miyokardiyal kontraksiyonun bozulmasına doğrudan katkıda bulunduğu saptanmıştır.

Önemli olarak, tanımlanmış polimorfizmler, MMP geninin promotör bölgesine etki etmektedir. Bu durum, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasıyla kritik basamakları veya transkripsiyonun yeterliliğini etkilemektedir. Günümüzde MMP gen polimorfizmleri, birçok MMP alt tiplerinde tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin; inme, diyabetik retinopati, kanser, anevrizma ve KY gibi belirli hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Vasku ve arkadaşları kronik KY olan hastalarda, kardiyovasküler hastalığa ait klinik belirtisi olmayan bireylere kıyasla -790T/G MMP-2 polimorfizminin T alel sıklığı ve -735C/T MMP-2 gen polimorfizmi C alel sıklığının daha yüksek olduğunu saptadılar. Ancak Çin populasyonunda MMP-2 polimorfizmleri ile sistolik KY prognozu arasındaki ilişki henüz belirginlik kazanmamıştır.

MMP-2 rs243866 (-1575G/A) gen polimorfizmi, genin 5' lokalizasyonunda, östrojen reseptörü bağlanma bölgesinde yarı-palindromik potansiyel içeren bir gendir. Östrojen reseptörü pozitif MCF-7 hücrelerinde; -1575G aleli, transkripsiyon aktivitesini arttıran, -1575A aleli ise azaltan role sahiptir. Transfac Matrix Tablosuna (MatInspector V2.2) göre T alel sekansında 3 transkripsiyon faktörü bulunabilir (GKLF-gut enriched Krueppel-like factor, S8, Evi1-ectopic viral integration site 1 encoded factor). -790 MMP-2 gen polimorfizmi G alelinde (rs243864) ve TNP referansı olarak kullanılan rs17859821 (-1059G/A) polimorfizminde transkripsiyon faktörlerinin bilinen bağlanma bölgeleri bulunmamaktadır.

Bu çalışmadaki hipotez, MMP-2 geninin promotör bölgesindeki polimorfizmlerin sistolik KY prognozu ile ilişkili olabileceği idi.

2. Materyal ve Metod

2.1. Çalışma grubu ve strateji

Aralık 2003-Aralık 2006 tarihlerinde çalışma merkezine sevk edilen ve geçirilmiş miyokard infarktüsü (n=387) veya idiyopatik dilate kardiyomyopati (n=218) nedeni ile ekokardiyografik sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (LVEF)≤45% olan ve birbirleri ile akrabalığı olmayan 605 ardışık hasta çalışmaya alındı. Akut miyokard infarktüsü, konjenital kalp hastalığı ve valvüler hastalığı olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Başvuru sırasında MMP-2 genotiplerini belirlemek amacıyla periferik kan alındı. Hastaların vital durumu ile ilgili bilgi; görüşme, telefon veya mektupla alındı. Fuwai Hastanesi Değerlendirme Kurulu, çalışma protokolünü onayladı. Çalışmaya katılan herkesten bilgilendirilmiş gönüllü onay formu alındı.

2.2. Primer ve sekonder sonlanım noktaları

Primer sonlanım noktası, takip sırasında advers kardiyovasküler olay gelişmesi idi. Advers kardiyovasküler olay; tüm sebeplere bağlı ölüm ve kardiyak ölüm (pompa yetersizliği, ani ölüm veya miyokard infarktüsü ölümü) olarak tanımlandı. Sekonder sonlanım noktası; kardiyak nedenlere bağlı hospitalizasyon (yeni başlayan veya kötüleşen KY semptomları), reinfarktüs ve revaskülarizasyon idi.

2.3. TNP seçimi

MMP-2 geni, 16. kromozomda q13-21'de lokalize, 27.049 bp uzunluğunda ve 13 ekzona sahiptir. Public NCBI TNP veri tabanında (dsSNP, build 126; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) MMP-2 geni için 283 TNP girişi mevcuttu. 3 adet MMP-2 TNP şu kriterler kullanılarak seçildi: Minör alel sıklığının≥5% ve promotörlerdeki sekans varyasyonlarının ekspresyonu etkilediğine dair kanıt olması.

2.4. Laboratuvar yöntemleri

2.4.1. Genotipleme

Kan numuneleri, EDTA içeren tüpler içerisine alındı. Standart 'phenol-chloroform' metodu kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı ve fırın genotipleme işlemine kadar -20°C'de bekletildi. Tüm TNP genotipleme işlemleri standart 'polymerase chain reaction' ve 'fragment length polymorphism' metodlarına göre yapıldı. Rastgele seçilen 96 bireye kalite kontrolü için genotipleme yapıldı ve sonuçları, çalışma grubu ile uyumlu bulundu.

2.4.2. MMP-2 düzeylerinin belirlenmesi

Ticari olarak bulunabilen ELISA kiti ile (GE Healthcare UK Limited, UK) MMP-2 öncüsü olan proMMP-2'nin serbest ve TIMP-2 ile kompleks oluşturmuş haldeki plazma düzeyleri ölçüldü. MMP-1,-3,-7,-8,-9 ve MT1-MMP ile çapraz reaksiyona girmiyordu.

3. Sonuçlar

526 hasta (86.9%) klinik olarak takip edilebildi, 79 hasta takip sırasında öldü. Ortalama 24 aylık takip süresince; 116 ölüm, 110 kalple ilişkili ölüm ve 102 KY'ye bağlı hastane tekrar başvurusu gözlemlendi. Takip edilen ve ölen hastaların bazal karakteristik özellikleri Tablo-1'de özetlenmiştir. Takip hastaları ile ölenlerin bazal özellikleri arasında önemli fark saptanmamıştır.

3.1. 'Tek Lokus' analizi

3 TNP genotip ve alel dağılımı ile tüm sebeplere bağlı ölüm oranı, KY ölüm oranı ve MACE oranı arasındaki ilişki Tablo-2'de özetlenmiştir. MMP-2 rs17859821 polimorfizmi ile yukarıda bahsedilen her bir sonlanım noktası arasında önemli ilişki olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). p 'nin 0.017 olarak (0.05/3) düzenlendiği Bonferroni düzeltmesinden sonra rs17859821'in halen tüm sebeplere bağlı ölüm, kardiyak ölüm ve MACE oranı ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Rs17859821 A alel taşıyıcıları (GA+AA vs GG) ile ilişkili sistolik KY için düzeltilmiş odds oranları, Şekil 1-4'de gösterilmiştir. Survey/Olay eğrileri, A alel taşıyıcısı hastalarda, GG genotipi olanlara kıyasla daha iyi sonlanım noktaları olduğuna işaret etmektedir. MMP-2 rs243864 ve rs243866'nin sistolik KY prognozu üzerine bir etkisi bulunamamıştır. Ayrıca hiçbir genotipin proMMP-2 plazma düzeyleri üzerine bir etkisi gösterilememiştir.

3.2. Dominant modelde MMP-2 rs17859821 Cox analizi

Rs17859821 polimorfizmlerinin survey üzerine bağımsız bir etkisi olup olmadığını değerlendirmek için; hem polimorfizmleri hem de klinik yardımcı değişkenleri (yaş, dal bloğu, LVEF ve NYHA statüsü) kapsayan cox analizi yapıldı. Sonuçlar aynı kaldı. Ayrıca rs17859821 (AG+AA vs GG) ile ilgili kardiyak mortalite ve MACE odds oranları sırasıyla 0.65 (0.43-0.98) ve 0.75 (0.57-0.99) ($p < 0.05$) idi.

3.3. Haplotip analizi

Rs243866 ile rs243864 arasında güçlü bir bağlantı dengesizliği mevcuttu ($r^2=0.748$, $D'=0.873$). Bu 3 TNP tarafından yapılandırılmış 4 haplotipin frekansı $>1\%$ idi ve Kuzey Han Çin popülasyonundaki tüm haplotiplerin 97%'sinden fazlasını oluşturmaktaydılar. Haplotip TAG (rs 243864-rs 17859821-rs 243866), sistolik KY prognozu ile yakından ilişkili bulundu. TAG taşıyıcılarının ölüm oranı, kardiyak ölüm oranı, KY ölüm oranı ve MACE oranının TGG taşıyıcılarına kıyasla daha düşük olduğu görüldü (Tablo-4).

4. Tartışma

Bu takip çalışmasında, MMP-2 geninin rs 17859821 A alelinin sistolik KY'de surveyi uzatan bağımsız bir TNP olduğunu saptandı.

MMP-2, kardiyomiyozitler, kardiyak fibroblastlar ve endokardiyal hücreler tarafından üretilir. Tip IV kollajen, laminin, elastin ve interstisyel fibriller kollajen gibi birçok substratın yıkımında görev alır. MMP-2 ayrıca endotelin, kalsitonin gen ilişkili peptid ve adrenomedullin gibi birçok ESM ile ilişkili olmayan substratın da yıkımında rol oynar.

Birçok patofizyolojik durumda, MMP-2 ekspresyonunda ve aktivitesinde değişiklik olduğu gösterilmiştir. KY durumunda MMP-2, miyokardiyal fibrozis, artmış miyokardiyal sertlik ve bozulmuş kardiyak kontraktileteye sebep olduğu hususunda suçlanmıştır. Kardiyak spesifik MMP-2 ekspresyonu, esasen kontraksiyonu bozmakta ve inotropik uyarana cevabı azaltmaktadır. Bu bulgular, üzerine eklenen hasar olmadığı durumlarda, ventrikül fonksiyonlarını direk olarak bozduğunu göstermektedir. KY olan hastaların miyokard örneklerinde artmış MMP-2 aktivitesi gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar, MMP-2 aktivasyonunun, miyokard disfonksiyonu ve kardiyak yeniden şekillenmede rolü olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle MMP aktivitesini etkileyebilecek polimorfizmlerin sistolik KY prognozu üzerine etkisi olabilir.

Rs17859821; MMP-2 geninin promotör bölgesi transkripsiyon kısmında yer alır. Bu çalışmada rs17859821'in sistolik KY prognozu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. rs17859821 A alel taşıyıcılarının GG genotip taşıyıcılarına kıyasla survey oranlarının daha iyi olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar bu TNP, bugüne kadar yapılmış hiçbir gen fonksiyonu çalışmasında bulunmamış olsa da; kötü prognoza katkısı olan sebepsel bir varyasyon ile bağlantı dengesizliği ilişkisi olabilir veya MMP-2 aktivite regülasyonunda diğer TNP'ler ile birlikte çalışabilir. Bu çalışmada, MMP-2 rs17859821 A alelinin MMP-2 ekspresyonunu inhibe ettiği ve sistolik KY seyrine olumlu katkısına bulunduğu speküle edilmiştir.

Popülasyonda TNP'lerin sistolik KY prognozuna kombine etkilerini saptamak amacıyla ayrıca multilokus analizleri yapıldı. Haplotip spesifik skor testi, Hap-1 (T-G-G)'e kıyasla Hap-4 (T-A-G)'ün sistolik KY'de survey oranlarını iyileştirdiğini gösterdi. Bu sonuç, tek lokus sonucu ile uyumlu idi.

MMP-2 ekspresyonundaki farklılıklar, kısmen genotipik varyasyonun minör etkisi ile açıklanabilir. MMP-2'nin araştırılan TNP'leri genin promotör bölgesine yerleştiğinden polimorfizm ile protein ekspresyonu arasında korelasyon olması beklenebilir. Ancak bu çalışmada MMP-2 polimorfizmleri ile plazma protein düzeyleri arasında hiçbir ilişki saptanamamıştır. Bu durum MMP-2 için komplike düzenleyici mekanizmalar olmasından kaynaklanabilir. Birincisi; son kanıtlar ışığında DNA metilasyonu, kromatin yeniden şekillenmesi ve MMP mRNA yarı ömrünü uzatan posttranskripsiyonel mekanizmalar gibi epigenetik süreçler tümüyle MMP ekspresyonu kontrolünde rol alırlar. İkincisi; MMP aktivasyonu ve TIMP bağlanması, miyokardiyal interstisyumda gerçekleşen kompartmantalize süreçlerdir. Bu nedenlerle plazma düzeyleri, sistolik KY'li hastaların miyokardında cereyan eden ESM proteolitik aktivitesini yansıtmayabilir. Üçüncüsü; plazma MMP-2 düzeyleri, hem kardiyak hem de böbrekler ve damar sistemi gibi nonkardiyak kaynaklardan salınan MMP-2'nin tümünü gösterir ve nonkardiyak kaynaklardaki disfonksiyonlar da KY'ye eşlik edebilir.

Bu çalışmadan çıkan sonucun sistolik KY prognozu ile gerçekten sebep-sonuç ilişkisi içerisinde olup olmadığını kontrol etmek için replikasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada da yalancı pozitif sonuçları kontrol edebilmek için farklı yaklaşımlarda bulunuldu: Birincisi; çalışmaya sadece etnik homojen Kuzey Han Çinlileri dahil edildi. İkincisi; KY'nin iyi tanımlanmış ve önemli bir alt tipi olan sistolik KY'ye odaklanıldı. Üçüncüsü; çoklu istatistiksel testler nedeni ile potansiyel yalancı pozitif sonuçları kontrol etmek için 'Conservative Bonferroni Correction' yöntemi kullanıldı.

Bu çalışmanın 2 potansiyel eksikliği vardır: birincisi; çalışmaya hem miyokard infarktüsü hem de idiyopatik dilate kardiyomiyopatiye bağlı sistolik KY gelişen hastalar alındı. Ancak KY'de farklı etyolojiler, sonuçlarda da farklılıklara yol

açabilir. İkincisi; başka çalışmalarda sağlıklı bireylerde genotipler ile proMMP'nin plazma düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak önemli olacaktır. Sonuç olarak bu takip çalışması, MMP-2 genindeki genetik varyasyonların Kuzey Han Çin popülasyonunda sistolik KY prognozunu etkileyebileceğini göstermektedir. Bu bulgu, sistolik KY sürecinin ve tedavi mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir. MMP-2 geninin sistolik KY ile ilişkisini konfirme etmek için başka popülasyonlarda yapılacak benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.