

Genetické pozadie syndrómu lepivých doštičiek u pacientok s abortami

RNDr. Mária Škereňová¹, MUDr. Juraj Sokol, PhD.², RNDr. Jela Ivanková², MUDr. Juraj Chudej, PhD.²,
prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.², prof. MUDr. Ján Staško, PhD.²

¹Ústav klinickej biochémie Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine, Univerzity Komenského v Bratislave

²Klinika hematológie a transfuziológie Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine, Univerzity Komenského v Bratislave

Úvod: Spontánne potraty sú často zapríčinené anatomickými, hormonálnymi alebo genetickými abnormalitami. Podľa Bicka až 55 % je spôsobených defektmi koagulačných faktorov alebo krvných doštičiek, vyvolávajúcich trombotické infarkty placentárnych ciev. Vrodené a získané trombofilné stavy zvyšujú riziko výskytu venóznej trombózy počas gravidity a šestonedelia. Tiež bol dokázaný ich vzťah k syndrómu straty plodu, k ťažkej preeklampsii a k intrauterinnému úmrtiu plodu. K vrodenému trombofilnému stavu patrí okrem iných aj syndróm lepivých doštičiek (SPS). SPS je definovaný ako hyperagregabilita trombocytov po nízkych koncentráciách adenosíndifosfátu a/alebo adrenalínu. Po antifosfolipidovom syndróme predstavuje SPS druhý najčastejší trombofilný stav (21 %), zapríčiňujúci syndróm straty plodu.

Pacienti a metódy: Vyšetřili sme 27 pacientok so SPS a anamnézou spontánneho potratu a 42 zdravých žien. Diagnóza SPS bola stanovená svetelnou agregometriou (PACKS-4 aggregometer, Helena Laboratories, USA) pomocou metódy a kritérií vypracovaných Mammenom et al. Predmetom záujmu boli štyri jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) génu GAS6 (rs7400002, rs1803628, rs8191974, rs9550270), dva SNPs génu PEAR1 (rs12041331, rs12566888), dva SNPs génu MRV11 (rs7940646, rs1874445) a pätnásť SNPs génu GP6 (rs1654410, rs1671153, rs1654419, rs11669150, rs1613662, rs12610286, rs1654431, rs4281840, rs12981732, rs10417943, rs1671152, rs1654433, rs1671215, rs10418743, rs8113032).

Výsledky: Identifikovali sme šesť SNPs génu GP6 s vyššou frekvenciou výskytu u pacientok so SPS a potratom (rs1671153, rs1654419, rs1613662, rs1671152, rs1654433, rs1671215). Pri haplotypovej analýze sme rozpoznali štyri rizikové haplotypy génu GP6 vo vzťahu ku SPS ako nožnej príčine spontánnych potratov (CGATAG, CTGAG, CCGT, ACGG). Pri PEAR1 géne boli identifikované dva SNPs, pri GAS6 géne jeden SNP s vyššou frekvenciou výskytu u pacientok so SPS a potratom (PEAR1: rs12041331; rs12566888; GAS6: rs9550270).

Záver: Naše výsledky podporujú myšlienku, že genetická variabilita génov GP6, GAS6 a PEAR1 môže byť asociovaná s doštičkovou hyperagregabilitou. Štúdia zároveň poukazuje na možný polygénny (multifaktoriálny) typ dedičnosti pri SPS.

Kľúčové slová: jednonukleotidové génové polymorfizmy, hyperagregabilita trombocytov, syndróm straty plodu, trombofilné trombocytópatie

Genetic background sticky platelet syndrome in patients with abortion

Introduction: Spontaneous abortions are often caused by anatomical, hormonal or genetic abnormalities. According to Bick up to 55% of them are caused by defects in coagulations factors and platelets, which provoke thrombotic infarctions of placental vessels. Hereditary and acquired thrombophilia increase risk of venous thrombosis during pregnancy and puerperium. Their connection to foetal loss syndrome, several preeclampsia, and intrauterine foetal death has also been proven. One of hereditary thrombophilia is Sticky Platelet Syndrome (SPS). SPS is defined as platelet hyperaggregability after low concentrations of adenosine diphosphate and/or epinephrine. After antiphospholipid syndrome, it is the second most frequent thrombophilia (21%) and it causes foetal loss syndrome.

Patients and methods: We examined 27 female patients with SPS and history of spontaneous abortion, and 42 healthy women. SPS diagnosis was established by light transmission aggregometry (PACKS-4 aggregometer, Helena Laboratories, USA) according to methods and criteria developed by Mammen et al. We were interested in four single nucleotide polymorphisms (SNPs) of GAS6 gene (rs7400002, rs1803628, rs8191974, rs9550270), two SNPs of PEAR1 gene (rs12041331, rs12566888), two SNPs of MRV11 gene (rs7940646, rs1874445), and fifteen SNPs of GP6 gene (rs1654410, rs1671153, rs1654419, rs11669150, rs1613662, rs12610286, rs1654431, rs4281840, rs12981732, rs10417943, rs1671152, rs1654433, rs1671215, rs10418743, rs8113032).

Results: We identified six SNPs of GP6 gene with higher occurrence in patients with SPS and abortion (rs1671153, rs1654419, rs1613662, rs1671152, rs1654433, rs1671215). We also identified four high-risk haplotypes of GP6 gene in our haplotype analysis that are connected to SPS, a possible cause of spontaneous abortions (CGATAG, CTGAG, CCGT, ACGG). We identified two SNPs in PEAR1 gene and one SNP in GAS6 gene, both with higher occurrence in patients with SPS and abortion (PEAR1: rs12041331; rs12566888; GAS6: rs9550270).

Conclusions: Our results support the idea that genetic variability of GP6, GAS6 and PEAR1 genes can be associated with platelet hyperaggregability. The study also suggests a possible polygenic (multifactorial) type of SPS heredity.

Key words: single gene polymorphisms, platelet hyperaggregability, foetal loss syndrome, thrombophilic thrombocytopathies

Úvod

Syndróm lepivých doštičiek (SPS) po prvýkrát opísal v roku 1983 Holiday na 9. medzinárodnej konferencii o náhlej cievnnej mozgovej príhode (NCMP) a mozgovej cirkulácii v Arizone (1). Avšak vzťah medzi NCMP a doštičkovou hyperagregabilitou po prvýkrát zaznamenal Al-Mefty et al., už v roku 1979 (2). V rok 1984 Mammen liečil pacientku, u ktorej bol diagnostikovaný infarkt myokardu v treťom trimestri gravidity. Výsledky vyšetrenia hemostázy neukázali žiadne abnormality, s výnimkou in vitro zvýšenej agregácie po podaní adenosínodifosfátu (ADP) a adrenalínu (EPI) (3). Zároveň bola vyslovená aj domnienka o dedičnosti tohto hyperagregačného stavu, nakoľko matka pacientky mala IM počas tehotenstva a brat mal opakované záchvaty anginy pectoris, napriek normálnemu angiografickému nálezu v koronárnych artériách (3). V nasledujúcich rokoch Mammen et al., publikovali väčšie štúdie, v ktorých boli už definované laboratórne kritériá SPS a zároveň navrhli delenie SPS na dva podtypy, a to typ I a typ II. Neskôr Bick et al., pridali typ III (4).

Definícia, klasifikácia a diagnostika SPS

SPS je definovaný ako hyperagregabilita trombocytov po nízkych koncentráciách ADP a/alebo EPI, pričom agregácia po iných doštičkových induktorech je fyziologická (3, 5). Uvádza sa, že SPS je trombofilná trombocytopenia s familiárnym výskytom a autozomálne dominantným typom dedičnosti (6).

Aj keď sa uvádza, že SPS je dedičným ochorením, celá diagnostika je založená na klinických a laboratórnych parametroch. K dispozícii nemá žiaden genetický test.

Stanovenie diagnózy SPS sa opiera o vyšetrenie agregácie trombocytov po ich aktivácii ADP a EPI. Vyšetrenie sa realizuje pomocou agregometra. Agregometer pracuje na turbidimetrickom princípe. Sleduje zmenu transmisie svetla vo vyšetrovanej vzorke v závislosti od percenta agregovaných trombocytov v čase. V súčasnosti používame diagnostické kritériá navrhnuté Mammenom a Bickom (3, 4). Ako vzorka sa používa plazma bohatá na trombocyty. Pred meraním agregácie je potrebné vysadiť liečbu antitrombocytovými liekmi a nesteroidnými antiflogistikami minimálne na 10 dní. Testovanie by sa nemalo robiť v čase akútnej trombózy, ale malo by prebehnúť minimálne po troch mesiacoch od tromboembolickej príhody (5, 6, 7).

SPS klasifikujeme podľa toho, ktorý z doštičkových induktorov – ADP a/alebo EPI – vyvoláva

Tabuľka 1. Prehľad analyzovaných SNPs vybraných génov pravdepodobne súvisiacich s hyperagregabilitou trombocytov

Gén	SNP	Chromozóm	Pozícia	Major/Minor alela	SNP sekvencia
GAS6	rs7400002	13	114524944	T/C	TTTGC[C/T]GGCGG
	rs1803628		114530114	C/T	GGCTG[C/T]ATGAG
	rs8191974		114537517	G/A	TAGGC[A/G]GCCCT
	rs9550270		114575771	T/G	TTGCA[A/C]GGTTT
PEAR1	rs12041331	1	156869714	G/A	CTTCC[A/G]TCACC
	rs12566888		156869047	G/T	TCCAG[G/T]ATAGG
MRVI1	rs7940646	11	10669228	C/T	CTGTC[C/T]GGGTG
	rs1874445		10691721	C/T	CAAAA[C/T]TGAGT
GP6	rs1654410	19	55524813	C/T	TCTGT[C/T]TTCTG
	rs1671153		55527189	T/G	CATGG[G/T]GAGGC
	rs1654419		55535881	G/A	GAGAC[A/G]CAGGG
	rs11669150		55535972	T/C	TGACG[C/T]GTTTG
	rs1613662		55536595	A/G	TACCG[A/G]GGAAG
	rs12610286		55541399	A/G	TTAAC[A/G]TATTT
	rs1654431		55549758	G/A	TAGCC[A/G]GCTCC
	rs4281840		55516808	C/A	GGAAG[A/C]GTTTT
	rs12981732		55524375	C/T	GCAGC[C/T]GAGAA
	rs10417943		55525337	G/A	TGAGA[A/G]GGGTG
	rs1671152		55526345	G/T	CCCGT[G/T]TGATT
	rs1654433		55550312	G/A	AATTG[A/G]ACTGC
	rs1671215		55553019	A/C	TGAA[A/C]TGTC
rs10418743	55553368	G/A	AGAAC[A/G]CTTCC		
rs8113032	55554138	G/A	CGCAC[A/G]TGGTT		

Tabuľka 2. Klasifikácia a diagnostické kritériá SPS

	Agregácia doštičiek po stimulácii induktorom					
	ADP			EPI		
koncentrácia induktorov, $\mu\text{mol/l}$	0,58	1,17	2,34	0,55	1,1	11,0
normálny rozsah, % agregácie	0,0 – 12,0	2,0 – 36,0	7,5 – 55,0	9,0 – 20,0	15,0 – 27,0	39,0 – 80,0
Klasifikácia	TI	+		+		
	TII	–		+		
	TIII	+		–		

Diagnostické kritériá

Pravdepodobná diagnóza	anamnéza trombózy a hyperagregabilita len po 1 koncentrácii 1 aktivátora
	anamnéza trombózy a hyperagregabilita po 2 koncentráciách 1 aktivátora
Potvrdená diagnóza	anamnéza trombózy a hyperagregabilita po 1 koncentrácii 2 aktivátorov
	anamnéza trombózy a hyperagregabilita len po 1 koncentrácii 1 aktivátora, opakované testy

Vysvetlivky: ADP – adenosínodifosfát; EPI – adrenalín

zvýšenú agregáciu doštičiek (3, 4). Rozlišujeme teda 3 typy SPS:

- SPS I. typ – zvýšená agregácia po EPI aj ADP
- SPS II. typ – zvýšená agregácia len po EPI
- SPS III. typ – zvýšená agregácia len po ADP

Najčastejším typom SPS je typ II, naopak zriedkavým typom je III (6). Je dôležité uviesť, že táto klasifikácia je založená na laboratórnych pozorovaniach a nemá žiaden vzťah ku klinickej manifestácii, prognóze alebo liečbe ochorenia.

Cieľ práce

Analýza vybraných polymorfizmov génov GP6, GAS6, PEAR1 a MRVI1 (pozri tabuľku 1):

1. zhodnotiť frekvenciu výskytu vybraných jednonukleotidových polymorfizmov (SNP)

u žien so SPS a stratou plodu oproti zdravým kontrolám

2. realizovať haplotypovú a genotypovú analýzu vybraných polymorfizmov u žien so SPS a stratou plodu oproti zdravým kontrolám

Charakteristika populácie

Etická komisia JLF UK schválila realizáciu tejto štúdie pod číslom EK950/2011. Všetky účastníčky štúdie súhlasili s účasťou v projekte. Svoj súhlas potvrdili podpísaním informovaného súhlasu v súlade s Helsinskou deklaráciou.

Účastníčky štúdie v rámci diferenciálnej diagnostiky spontánneho potratu podstúpili skrining trombofilného stavu. Skrining prebiehal na Klinike hematológie a transfuziológie v Martine, kto-

rá je zároveň Národným centrom hemostázy a trombózy v Slovenskej republike. Pacientky, u ktorých bola potvrdená prítomnosť SPS a aspoň jedného spontánneho potratu, boli požiadané o účasť v ďalšom genotypovom testovaní. Stanovenie diagnózy SPS muselo byť v súlade s diagnostickými kritériami uvedenými v tabuľke 2 (3, 8) a muselo byť riadne zdokumentované aspoň dvoma meraniami s odstupom najmenej jeden mesiac. Prítomnosť iného trombofilného stavu alebo inej tromboembolickej udalosti bola dôvodom nezariadenia pacientky do štúdie.

Kontrolnú skupinu tvorili náhodne vybrané dárkyne krvi bielej rasy, ktoré pochádzali z rovnakého regiónu Slovenska ako pacientky so SPS. Navyše, všetky ženy v tejto skupine spĺňali nasledujúce kritériá:

- negatívna anamnéza spontánneho potratu
- neprítomné akútne alebo chronické ochorenie
- negatívna anamnéza venózne alebo artériovej trombózy
- normálna agregácia trombocytov po stimulácii EPI a/alebo ADP podľa metodiky vypracovanej Mammenom (3, 8)

Celkovo sme vyšetrili 27 žien so SPS a verifikovaným aspoň jedným spontánnym potratom s priemerným vekom $39,04 \pm 5,23$ rokov. Kontrolný súbor tvorilo 42 žien s priemerným vekom $42,24 \pm 12,99$ rokov.

Výsledky

Závažné tehotenské komplikácie (potrat, rasová retardácia plodu, preeklampsia a abrubcia placenty) sa vyskytujú u 1 % až 5 % tehotných žien (9). Úloha trombofilie pri tehotenských komplikáciách je stále predmetom diskusií. Väčšina žien s trombofiliou má fyziologické tehotenstvo. Avšak vysoké percento žien s tehotenskými komplikáciami má trombofiliu, hoci ich vzájomná asociácia a kauzalita je sporná (9).

Hlavným predmetom výskumu trombofilných stavov boli a sú predovšetkým koagulačné faktory a ich regulátory. Avšak veľmi dôležitú úlohu v hemostáze majú krvné doštičky. V našej práci sme sa venovali doštičkovej hyperagregabilite u žien s anamnézou spontánneho potratu. Skúmali sme variabilitu génov GP6, GAS6, PEAR1 a MRV11.

GPVI proteín je transmembránový glykoproteín, ktorý má kľúčové postavenie pri aktivácii, adhézii a agregácii krvných doštičiek (10). V súčasnosti sa objavujú štúdie o vplyve genetických zmien v géne GP6 na funkciu krvných doštičiek. Jahnsen et al., skúmali doštičkovú agregáciu po podaní induktorov (ADP, EPI a kolagé-

nu) a jej vzťah k prítomnosti až 2,5 milióna SNPs. Bolo identifikovaných 7 lokusov v blízkosti alebo priamo v géne GP6, ktoré sú spojené s doštičkovou agregáciou. Niektoré ďalšie štúdie poukázali na vzťah vybraných SNPs (rs1671153, rs1654419 a rs1613662) s tromboembolicou príhodou (11, 12). V našej práci sme sa zamerali na pätnásť vybraných SNPs (rs1654410, rs1671153, rs1654419, rs11669150, rs1613662, rs12610286, rs1654431, rs4281840, rs12981732, rs10417943, rs1671152, rs1654433, rs1671215, rs10418743, rs8113032) lokalizovaných v intrónovej alebo regulačnej časti génu GP6. Identifikovali sme šesť SNPs génu GP6 s vyššou frekvenciou výskytu u pacientov so SPS a spontánnym potratom (rs1671153, rs1654419, rs1613662, rs1671152, rs1654433, rs1671215). Pri haplotypovej analýze sme rozpoznali štyri rizikové haplotypy génu GP6 vo vzťahu k SPS ako novej príčine spontánnych potratov (CGATAG, CTGAG, CCGT, ACGG).

Ďalej sme sa zaoberali **variabilitou GAS6, PEAR1 a MRV11 génov**. GAS6 proteín patrí do rodiny vitamín K-dependentných proteínov. Vyznačuje sa vysokou štruktúrnou homológiou s PS, ktorý je prirodzeným inhibítorom koagulácie (13). GAS6 proteín je ligandom pre receptory zo subrodiny TAM. Väzba GAS6 proteínu a TAM receptora vyvoláva konformačnú zmenu GPIIb/IIIa receptora. Táto zmena umožňuje vznik väzby medzi Fg a GPIIb/IIIa receptorom na trombocytoch (14).

Druhým skúmaným génom bol PEAR1. **PEAR1 proteín** je transmembránový proteín nachádzajúci sa na povrchu doštičiek, kde plní úlohu receptora (15). Expresia receptora sa zvyšuje po aktivácii trombocytov. Na receptor sa viaže doteraz neidentifikovaný ligand, ktorý iniciuje tvorbu dimérov až oligomérov PEAR1 receptorov. Zároveň sa iniciuje signálna dráha, ktorá opäť končí aktiváciou GPIIb/IIIa (15). Tretím skúmaným génom bol MRV11. **MRV11 proteín** je 125 kDa membránový proteín, ktorého –COOH koniec sa nachádza v endoplazmatickom retikule. Jeho aktivácia vedie k uvoľneniu Ca^{2+} iónov z endoplazmatického retikula (16, 17).

V práci sme teda skúmali štyri SNPs génu GAS6 (rs7400002, rs1803628, rs8191974, rs9550270), dva SNPs génu PEAR1 (rs12041331, rs12566888) a dva SNPs génu MRV11 (rs7940646, rs1874445). Identifikovali sme dva SNPs v PEAR1 géne a jeden SNP v GAS6 géne s vyššou frekvenciou výskytu u pacientok so SPS a spontánnym potratom (pri PEAR1: rs12041331, rs12566888; pri GAS6: rs9550270). Avšak vo vyšetrovanom súbore nebol identifikovaný žiadny rizikový haplotyp. Výsledky

našej štúdie podporujú predpoklad, že SPS má potenciálne polygénny typ dedičnosti (18, 19, 20).

Záver

V našej práci sme venovali pozornosť ženám s anamnézou spontánneho potratu. Je známe, že približne 15 % tehotenstiev končí potratom. Existuje celý rad rizikových faktorov, ktoré môžu viesť k opakovanej strate plodu, napríklad anatomicke, hormonálne, imunologické, chromozomálne abnormality. Osobitnú pozornosť si však zaslúžia trombofilné stavy.

Cieľom tejto práce bolo upriamiť pozornosť na SPS u žien s anamnézou spontánneho potratu.

Výsledky našej štúdie podporujú predpoklad, že SPS má potenciálne polygénny (multifaktoriálny) typ dedičnosti. Dedičnosť teda nemusí byť obmedzená na jeden gén, ale v našom súbore pacientok súvisí s minimálne trom génmi (GP6, GAS6 a PEAR1). Napriek tomu, že tieto gény kódujú odlišné bielkoviny, ich zmena sa prejaví hyperagregabilitou doštičiek.

Literatúra

- Holiday PL, Mammen E, Gilroy J. *Sticky platelet syndrome and cerebral infarction in young adults*. Paper presented at: The Ninth International Joint Conference on Stroke and Cerebral Circulation, 1983; Phoenix, AZ, USA.
- Al-Mefty O, Marano G, Raiaraman S, et al. Transient ischemic attacks due to increased platelet aggregation and adhesiveness. Ultrastructural and functional correlation. *J Neurosurg*. 1979;50(4):449–453.
- Mammen EF. Sticky platelet syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25(4):361–365.
- Bick RL. Sticky platelet syndrome: A common cause of unexplained arterial and venous thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 1998;4:77–81.
- Kubisz P, Staško J, Dobrotová M, et al. Hematológia a transfuziológia. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. s. 323.
- Kubisz P, Staško J, Holly P. Sticky Platelet Syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:674–683.
- Bick RL, Hoppensteadt D. Recurrent miscarriage syndrome and infertility due to blood coagulation protein/platelet defects: a review and update. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005;11(1):1–13.
- Mammen EF. Ten years' experience with the "Sticky platelet syndrome". *Clin Appl Thromb Hemost*. 1995;1:66–72.
- Kujovic JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:412–424.
- Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:403–412.
- Kotuličová D, Chudý P, Škereňová M, et al. Variability of GP6 gene in patients with sticky platelet syndrome and deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012;23(6):543–547.
- Motovska Z, Kvasnicka J, Widimsky P, et al. Platelet glycoprotein GPVI 13254C allele is an independent risk factor of premature myocardial infarction. *Thromb Res*. 2009;125(2):e61–e64.
- Fernández-Fernández L, Bellido-Martin L, de Frutos PG. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). *Thromb Haemost*. 2008;100:604–610.

14. Foley JH, Conway EM. Gas6 gain entry into the coagulation cascade. *Blood*. 2013;121:570–571.
15. Kauskot A, di Michale M, Luyen S, et al. A novel mechanism of sustained platelet $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation via PEAR1. *Blood*. 2012;119:4056–4065.
16. Ammendola A, Geiselhoring A, Hofmann F, Schlossmann J. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*. 2001;276:24153–24159.
17. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*. 2000;404:197–201.
18. Sokol J, Biring K, Skerenova M, et al. Platelet aggregation abnormalities in patients with fetal losses: the GP6 gene polymorphism. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1170–1174.
19. Sokol J, Biring K, Skerenova M, et al. Different models of inheritance in selected genes in patients with sticky platelet syndrome and fetal loss. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(3):330–335.
20. Sokol J, Biring K, Skerenova M, et al. Activity of coagulation factor XI in patients with spontaneous miscarriage: The presence of risk alleles. *J Obstet Gynaecol*. 2014;17:1–4.

Korešpondujúci autor:**MUDr. Juraj Sokol, PhD.**

Klinika hematológie a transfuziológie
JLF v Martine a UK v Bratislave
Univerzitná nemocnica Martin
Kollárova 2, 036 59 Martin
juraj.sokol@jfmed.uniba.sk

