

Polikistik Over Sendromu'nda HLA Antijenleri Dağılımı

Gökay BOZKURT¹, Fatih ÖĞÜÇ², H.Çetin EKERBİÇER³, Şükrü PALANDÜZ⁴, Çetin ALGÜNEŞ⁵

ÖZET:

Amaç: Bu çalışmada Polikistik Over Sendromu'nda immunogenetik orijini araştırmak amacıyla kontrol grubundaki ve hastalardaki HLA sistemi antijenleri değerlendirilmiştir.

Gereç ve yöntem: Bizim çalışmamız Kadın-Doğum klinigine gönderilen 30 Polikistik Over sendromlu vaka ve Sönmez G tarafından bildirilen 3731 kişilik kontrol grubunu içermektedir. Vakaların yaş ortalaması $20,67 \pm 4,16$ SD şeklindeydi. 30 hastamızda minimum 35 gün süren aralıklarla adet gören oligomenoreli ve hirsutizm olan vakalarda, 2-6 cm çapında ve en az 10 adet solikül kistine sahip olmak, Polikistik over sendromunun teşhisi için bir kriter olarak değerlendirildi.

Bulgular: HLA-A1 ($p < .00$), HLA-A2 ($p < .00$), HLA-A3 ($p < .00$), HLA-A11 ($p < .00$), HLA-A23 ($p < .00$), HLA-B14 ($p < .01$), HLA-B18 ($p < .00$), HLA-B51(S) ($p < .00$), HLA-S2(S) ($p < .00$), HLA-CW2 ($p < .00$), HLA-DR15 ($p < .00$) antijenlerinin varlığının Polikistik over sendromunun oluşumu için bir risk faktörü olabileceğinin belirlendi.

Sonuç: Coğu araştırmada hastalıkların etyopatogenezinde MHC antijenlerinin oldukça önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Biz de polikistik over sendromlu vakalar ile HLA antijenleri arasındaki ilişkiye dikkat çekmek istiyoruz.

Anahtar sözcükler: : Polikistik over sendromu, MHC, HLA, Histokompatibilite antijenleri.

SUMMARY

DISTRIBUTION OF HLA ANTIGENS IN CASES OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Purpose: Attempts were made in this study to evaluate the distribution of HLA system antigens in case and control groups for the purpose of investigating the immunogenetic origin in the assessment of the etiopathogenesis of polycystic ovary syndrome

Methods: Our study is comprised of 30 cases who referred to own Gynecology and Obstetrics clinic and a control group consisting of 3731 subjects who reported by Sönmez G. The mean age of cases is $20,67 \pm 4,16$ SD. 30 of our cases had oligomenore. Hirsutism and menstrual cycle interval with minimum of 35 days Having a minimum of 10 follicle cysts with 2-6 cm in diameter were used as a criterion for the diagnosis of polycystic ovary syndrome. The correlation between polycystic ovary syndrome and HLA antigens was evaluated statistically.

Results: HLA-A1 ($p < .00$), HLA-A2 ($p < .00$), HLA-A3 ($p < .00$), HLA-A11 ($p < .00$), HLA-A23 ($p < .00$), HLA-B14 ($p < .01$), HLA-B18 ($p < .00$), HLA-B51(S) ($p < .00$), HLA-S2(S) ($p < .00$), HLA-CW2 ($p < .00$), HLA-DR15 ($p < .00$) were assed as risk factors for the occurrence of polycystic ovary syndrome

Conclusions: Most investigations supposed that the role played by MHC in the pathogenesis of diseases is of considerable importance. So as a new finding, we want to point the importance of relationships between this antigens and the cases of polycystic ovary syndrome.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, MHC, HLA, Histocompatibility antigens.

¹ Yrd.Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

² Uzm.Dr. Özel Trakya Hastanesi

³ Araş.Gör.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.

⁴ Yrd.Doç.Dr. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik B.D.

⁵ Prof.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

HLA tiplemesi yeni teknolojilerin tip sektörüne girmesinden çok büyük oranda etkilenen bir laboratuar testidir. Bu alandaki moleküler tekniklerin tanıtımı, düzinelere yeni allellerin keşfine ve metodolojik gelişimlerde bir patlamaya yol açmıştır. Ilave olarak yeni HLA ve HLA benzeri gen ürünleri keşfedilmiş bulunmaktadır. Buna rağmen, HLA sistem antijenlerinin çoğunun fonksiyonu hala belirsizliğini korumaktadır. HLA antijenleri hücrelerin yüzeyinde expresse edilen glikoproteinlerdir. HLA antijenlerinin ana fonksiyonu hücrelere peptidleri prezente etmek, lenfositlerin stimulasyonunu ve killer-cell'lere transformasyonunu sağlamaktır. HLA antijenlerinin viruslara karşı, immun savunma yanında, kendinden olmayan yapıları ve hücreleri tanımda da rol oynadıkları bilinmektedir.

Sonuç olarak HLA sistem antijenleri allograftlarýn tanınması ve rejeksiyonunda majör bir rol oynamaktadır. HLA sisteminin çok geniş bir yelpazede polimorfizm gösterdiği bilinmektedir. İnsan genomundaki bilinen en polimorfik sistemdir. HLA tiplemesindeki en son rutin HLA laboratuarlarındaki çalışmaların kalitesini de etkilemiştir. HLA-Class II tiplemesi için moleküler metodlar standartlaşmaya başlamış, HLA Class I içinde uygulamalara hemen geçilmek üzeredir.(1,2,3)

Polikistik over sendromunda folikül kistlerinin anatomic lokalizasyonunu, hormonal etkilerini ve ayrıntılı fiziksel özelliklerini belirlemenin mümkün olmasına rağmen etiyolojisini tam olarak açıklamak mümkün değildir. Polikistik over sendromunun ortaya çıkmasına neden olan mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulduğu zaman önleyici ve radikal tedavinin de yolu açılmış olacaktır. Polikistik over sendromuna neden olan etiyolojik faktörler genetik ve endokrinolojik faktörler veya birden fazla faktörün etkileşiminin kombine bir rolünün söz konusu olabileceğinden bahsedilmektedir. Bu faktörleri veya bunların etkileşiminin sonuçlarını daha iyi açıklayabilmek için bu çalışmalarla ilgili immunogenetik araştırmaların arttırılmasının gerekliliği söz konusudur. Polikistik over sendromunun immunogenetik olarak etiyopatogenezini kontrol etme eforları daha geniş bir perspektif sağlayacaktır. Immunogenetik süreçlerin aydınlatılmasının önemi polikistik over sendromlu vakaların çokluğu ve Polikistik over sendromunun önlenmesi, teşhisi ve tedavisi gibi aktivitelerin

neden olduğu işgücü ve ekonomik seviye kaybı dikkate alındığında ortaya çıkacaktır. Moleküller seviyede çevrenin organizma üzerinde bir değişiklik yapabilmesi için öncelikle genetik faktörlerin kontrollü altındaki immun sistem ile etkileşime girmesi gerekmektedir. (4,5,6). Organizmanın reaksiyonu immun sistemin cevabıyla belirlenir. Bir başka deyiþle immun sistem organizmanın çevre ile etkileşiminde temel rol oynar. Bütün hastalıkların ya genetik veya çevre orijinli ya da bu ikisinin olumsuz etkileşimine bağlı olduğu düşünülecek olursa, immunogenetik araştırmaların arttırlarak, insanlığın ölümsüzlük sırları da dahil tüm hastalıkların çözümünün bu süreçlerin irdelenmesine bağlı olduğu ortadadır. Polikistik over sendromunun ortaya çıkışından hem genetik ve çevresel faktörler, hem de bu faktörlerin etkileşimi sorumludur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Sönmez G tarafından bildirilen, (7) 3731 kişiden oluşan kontrol grubunun HLA antijenleri ile T.Ü Tıp Fakültesi Kadın -Doðum Hastalıkları polikliniğinde Polikistik over sendromu tanısı almış 30 hastanın HLA tayinleri yapılarak istatistiksel metodlarla değerlendirilmiştir. HLA antijenlerinin tespitinde Terasaki mikrolenfosit toksisite metodu kullanılmıştır. Terasaki mikrolenfosit toksisite metodu aşağıda anlatıldığı gibidir.

Gerekli maddeler:

1. HBSS
2. Tavşan komplemanı
3. Eozine
4. Formaldehid
5. Sıvı parafin
6. Terasaki Plakları
7. Koyun eritrositleri

HLA-Class I Antijenlerinin tespiti:

1-Hastanın en az 12 saat aç olması ve herhangi bir ilaç kullanmamış olması gerekmektedir.

2-5 ml heparinize kan + 5 ml HBSS = 10 ml (Kan + HBSS)

3-6 ml kan (Kan + HBSS) santrifüj tüpünün kenarından 5 ml Lyomprep üzerine sızdırılır.

4-1500 rpm'de 30 dakika santrifüje edilir. Eritrositler santrifüj tüpünün alt kısmında toplanırken lenfositler Lyomprep'in üzerinde beyaz bir bant oluşturur.

5-Bu bant pasteur pipeti ile aspire edilir.

6-Üzerine 5 ml HBSS ilave edilir ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüje edilir.

POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA HLA ANTİJENLERİ DAĞILIMI

7-Süpernatant atılır. HBSS pelletin üzerine tekrar eklenir ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüje edilir.

8-Yıkama işlemi üç kez tekrar edilir.

9-Hücreler 2500-3500 hc/ml olacak şekilde dilue edilir.

Testin uygulanması:

1-Ede edilen lenfosit süspansiyonundan önceden hazırlanan Class I plağındaki her bir kuyucuğa 1 mikrolitre ilave edilir.

2-24°C'de 30 dakika inkübe edilir.

3-Class I plağındaki her bir kuyucuğa 5 mikrolitre tavşan komplemanı ilave edilir.

4-24°C'de 60 dakika inkübe edilir.

5- Plak üzerinde taşan fazla parafin pastör pipeti ile aspire edilir.

6- Class I plaginindaki her bir kuyucuğa 1 mikrolitre Eozin boyası ilave edilir.

7-20°C'de 10 dakika inkübe edilir.

8- Class I plaginindaki her bir kuyucuğa 3 mikrolitre Formaldehid boyası ilave edilir.

9- 3-5 dakika sonra faz kontrast mikroskop altında değerlendirilir.

10-Eozin ile boyanan hücreler ölü hücrelerdir ve (+) olarak değerlendirilirler.

HLA Class I antijenlerinin tespiti:

B-lenfositlerin E - rozet yöntemiyle izolasyonu

1. 5 ml HBSS üzerine 0.05 ml koynun eritrositi ilave edilir.

2. Class I plagi için elde edilen mikst lenfositlerin yeterli bir kısmı alındıktan sonra kalan kısmı üzerine koynun eritrositi + HBSS karışımı eklenir.

3. 1000 rpm'de 2 dakika santrifüje edilir.

4. 37°C'de 15 dakika inkübe edilir.

5. Çok hafif hareketlerle çalkalanır ve hücrelerin karışması sağlanır ve daha sonra 5 ml Lympoprep üzerine ilave edilir.

6. 1500 rpm'de 30 dakika santrifüje edilir.

7. Oluşan bant üzerinde sadece B-Lenfositler kalır. Geriye kalan işlemler Class I antijenlerinin tespitindeki gibidir.

Plakların hazırlanması:

1. Plaklar üzerine sıvı parafin dökülür.

2. Kuyucuklardan taşan parafin aspire edilir.

3. Class I veya Class II plaginindaki her bir kuyucuğa Hamilton pipeti ile 1 mikrolitre HLA antikorları ilave edilir.

4. Kullanıma hazır bekilde -20°C'de stoklanabilir.

Verilerimiz iki bağımsız grup içerisinde (kontrol ve vaka) alınan dikotom değişkenlerden oluşmaktadır. Bununla birlikte χ^2 testinin kullanımı uygun görülmüştür. Beklenen frekansın en az birisinin 5' den daha az olması durumunda ise Fischer' Exact testi kullanılmıştır.

HLA antijenlerinin varlığı ile polikistik over sendromu arasındaki korelasyonu ölçmek için Odds ratio ve %95 güven aralığı (CI) kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde bilgisayar SSPS paket programı kullanılmıştır (6,7)

BULGULAR:

Polikistik over sendromlu vakalarda hasta ve kontrol gruplarındaki HLA antijenlerinin dağılımı aşağıdaki Tablo I-V'de verilmektedir.

TABLO I. Vaka ve Kontrol Gruplarındaki HLA-A Antijenleri Dağılımı

Antigens	Vaka (n:30)		Kontrol (n:3731)		χ^2	P	OR*	%95 CI**
	Frekans	%	Frekans	%				
A1	12	40	203	20	6.93	0.00	2.59	1.17-5.68
A2	23	75	298	45	12.28	0.00	4.06	1.65-10.42
A3	12	40	618	22	5.34	0.02	2.32	1.20-4.32
A11	11	35	786	14		0.00***	3.67	1.63-8.16
A23	6	20	147	4	22	0.00***	6.10	2.20-15.9
A24	3	10	786	21		0.13	0.42	0.10-1.44
A28	3	10	618	17		0.46***	0.56	0.14-1.94
A30	3	10	298	8		0.72***	1.28	0.30-4.40
A31	3	10	203	5		0.22***	1.93	0.46-6.73

(* Odds Ratio

** Confidence Interval

*** Fisher Exact Test)

TABLO II. Vaka ve Kontrol Gruplarındaki HLA-B Antijenleri Dağılımı

Antigens	Vaka (n:30)		Kontrol (n:3731)		χ^2	P	OR*	%95 CI**
	Frekans	%	Frekans	%				
B7	5	16	346	9		0.19***	1.96	0.65-5.42
B13	3	10	278	7		0.48***	1.38	0.33-4.80
B14	5	16	172	5		0.01***	4.14	1.37-11.55
B15	3	10	196	5		0.20***	2	0.48-6.99
B16	3	10	268	7		0.47***	1.44	0.35-4.99
B17	2	6	242	6		1***	1.03	0.12-4.12
B18	12	40	356	10		0.00***	6.32	2.84-13.92
B27	2	6	230	6		0.70***	1.09	0.12-4.36
B35	11	37	1225	33	0.2	0.65	1.18	0.53-2.62
B51(5)	12	40	603	16		0.00***	3.46	1.56-7.59
B52(5)	6	20	67	2		0.00***	13.67	4.84-36.70

(* Odds Ratio

** Confidence Interval

*** Fisher Exact Test)

TABLO III. Vaka ve Kontrol Gruplarındaki HLA-C Antijenleri Dağılımı

Antigens	Vaka (n:30)		Kontrol (n:3731)		χ^2	P	OR*	%95 CI**
	Frekans	%	Frekans	%				
CW1	4	13	178	5		0.054***	3.07	0.90-9.38
CW2	9	30	300	8		0.00***	4.9	2.06-11.36
CW3	7	23	440	12		0.07***	2.28	0.88-5.62
CW4	14	46	1156	31	0.26	0.61	1.18	0.59-2.37

(* Odds Ratio

** Confidence Interval

*** Fisher Exact Test)

TABLO IV. Vaka ve Kontrol Gruplarındaki HLA-DR Antijenleri Dağılımı

Antigens	Vaka (n:30)		Kontrol (n:3731)		χ^2	P	OR*	%95 CI**
	Frekans	%	Frekans	%				
DR2	8	26	811	22	0.42	0.51	1.31	0.53-3.10
DR3	5	16	901	24	0.91	0.33	0.63	0.21-1.73
DR4	7	23	1157	31	0.82	0.36	0.68	0.26-1.66
DR7	6	20	1033	28	0.70	0.40	0.68	0.25-1.77
DR9	4	13	354	9		0.52***	1.47	0.43-4.45
DR11(5)	13	43	717	19	11.06	0.00	3.21	1.47-7

(* Odds Ratio

** Confidence Interval

*** Fisher Exact Test)

TABLO V. Vaka ve Kontrol Gruplarındaki HLA-DQ Antijenleri

Antigens	Vaka (n:30)		Kontrol (n:3731)		χ^2	P	OR*	%95 CI**
	Frekans	%	Frekans	%				
DQ1	7	23	657	18	0.67	0.41	1.42	0.55-3.51

(* Odds Ratio

** Confidence Interval

*** Fisher Exact Test)

TARTIŞMA :

Biz bu çalışmada HLA-A1 (p .00), HLA-A2 (p .00), HLA-A3 (p .00), HLA-A11 (p .00) HLA-A23 (p .00), HLA-B14 (p .01), HLA-B18 (p .00), HLA-B51(5) (p .00), HLA-52(5) (p .00), HLA-CW2 (p .00), HLA-DR15 (p .00) antijenlerinin varlığının Polikistik over sendromunun oluşumu için bir risk faktörü olduğunu bulduk.

Sonuç olarak HLA antijenlerinin çalışıldığı populasyonlarda HLA antijenlerinin heterojen bir dağılımı söz konusu olabilmektedir. (9,10). Her ne kadar bulgularımız istatiksel olarak anlamlı olsa da daha güvenilir sonuçlara ulaşabilmek için bu konuya ilgili farklı populasyonlarda yapılacak

çalışmalara ihtiyaç olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Aynı etnik grubun yaşadığı farklı bölgelerde HLA antijenleri ile yapılan çalışmalarla bile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu farklı sonuçlar, populasyon içi ve populasyonlar arasındaki genetik farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Polikistik Over Sendromu ve bazı HLA antijenleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunması Polikistik Over Sendromunun etyopatogenezinde immunogenetik faktörlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Polikistik Over Sendromu ve bazı HLA antijenleri arasındaki ilişkinin netleştirilmesi için bu konuya ilgili yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED:Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens.* 1995;46:1-8
2. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S. Survival of DNA - DR typed and matched cadaver kidney transplants. *Lancet.* 1991; 338: 461- 463
3. Mytilineos J, Scherer S, Opelz G. Comparison of RFLP-DR BETA and serological HLA-DR typing in 1500 individuals. *Transplantation.* 1990; 50: 870-873.
4. Colombe BW. Histocompatibility testing: in basic and clinical immunology. Stites DP, Terr AI, Parslow TG (Eds) Immunology. 8 th edit. New York; Appleton and Lange. 1994;16: 237-256.
5. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Pober JS (Eds) Basic Immunology.
- 2 th edit. Chicago; W.B. Saunder Company. 1994; 5: 96-115.
6. Ergün M. Bilimsel araştırmalarda bilgisayarla istatistik uygulamaları, SPSS for Windows. Ankara. Ocak yayınları. 1995 : 211-212.
7. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. Ankara. Hatipoğlu yayinevi. 1990:125-136.
8. Goodman JW. Antigen presentation and the major histocompatibility complex: in basic and clinical immunology. Stites DP, Terr AI, Parslow TG (Eds) Immunology. 8 th edit. New York; Appleton and Lange. 1994; 5: 58-65.
9. Keskinbora HK, Mudun AB, Ayoğlu Y, Sönmez G, Çarın MN, Arslan MO. Behçet hastalığında HLA doku antijenlerinin değerlendirilmesi. *Retinit.* 1995; 3: 170-176