

Orijinal Araştırma

Ankilozan Spondilit Düşünülen Olgularda HLA-B*27 ve CYP2D6*4 Allellerinin Sıklığı**The Frequencies of CYP2D6*4 and HLA-B*27 Alleles in Cases of Suspected Ankylosing Spondylitis**Elçin Latife Kurtoğlu¹, Gonca Gülbay¹, Elif Yeşilada¹, İbrahim Tekedereli¹¹Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye**Özet**

Ankilozan spondilit (AS), birincil olarak spinal ve sakroiliak eklemleri etkileyen ve oldukça yaygın olan kronik inflamatuvar artropatidir. HLA-B*27, AS ile güçlü ilişkisinden dolayı en fazla çalışılan HLA sınıf I allellerinden biridir. HLA genleri dışında Sitokrom P450 2D6 (CYP2D6) geninin zayıf metabolize edici genotipinin de AS ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na AS ön tanısı ile refere edilen olgularda HLA-B*27 ve CYP2D6*4 allellerinin dağılımını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla periferik kandan izole edilen DNA'dan HLA-B*27 ve CYP2D6*4 allelerine özgü bölgelerin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilmesinin ardından ters hibridizasyon yöntemi kullanılarak çalışılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir. Bölgemiz için ilk kez rapor edilen bulgularımıza göre 336 olgu arasında, 119'unun (%35.41) yalnızca HLA-B*27 alleleline sahip olduğu belirlenmiştir. CYP2D6*4 mutasyonu bakımından ise olguların 66'sının (%19.64) heterozigot, 6'sının (%1.78) homozigot olduğu ve 264'ünün (%78.57) ise CYP2D6*4 allelini taşımadığı bulunmuştur. Tüm olguların 31 tanesinde (%9.22) ise HLA-B*27 ve CYP2D6*4 allellerinin birlikte bulunduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HLA-B*27, CYP2D6*4, Ankilozan Spondilit.

Abstract

Ankylosing spondylitis (AS) is common chronic inflammatory arthropathy that primarily affects the spinal joints and sacroiliac joints. HLA-B*27 has been one of the most studied HLA class I allele because of its strong association with AS. Outside HLA genes, poor metabolizer genotype of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene are also reported to be associated with AS. In this study, it was aimed to determine the distribution of HLA-B*27 and CYP2D6*4 alleles in patients with the prediagnosis of AS that referred to Medical Biology and Genetics Department. For this purpose, reverse hybridization was studied and results were analyzed after the amplification with PCR of HLA-B*27 and CYP2D6*4 allele specific regions from DNA that isolated from the peripheral blood. According to our findings which are reported the first time in our region, among the 336 patients, we determined 119 (35.41%) cases had only HLA-B*27 allele. In respect to CYP2D6*4 mutation, 66 (19.64%) of cases were heterozygous, 6 (1.78%) of the cases were homozygous and 264 (%78.57) of the cases had no CYP2D6*4 allele were determined. Moreover, we observed that in all of the cases, 31 (9.22%) cases had both HLA-B*27 and CYP2D6*4 allele together.

Keywords: HLA-B*27, CYP2D6*4, Ankylosing spondylitis.

Giriş

Ankilozan spondilit (AS), spondiloartropati (SpA)'nin en yaygın alt tipidir (1). AS genellikle yaşam kalitesinde önemli bir etkiye sahip olan, fiziksel fonksiyon ve spinal hareketliliğin ciddi şekilde bozulmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır. Çoğunlukla yaşamın üçüncü on yılı sırasında ve nadir olarak 45 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (2). AS'nin prevalansının genel olarak % 0.5-1 arasında olduğuna inanılmaktadır (2, 3). Ayrıca, cinsiyete bağlı olarak AS ortaya çıkma oranı çalışmalar arasında farklılık göstermekle beraber 2:1 (erkek: kadın) olarak rapor edilmektedir (2). İlk kez 1972'de keşfedilmesinden bu yana HLA-B*27 alleli, AS ile güçlü bir ilişkiye sahip olması nedeniyle en çok çalışılan HLA sınıf I allellerindedir (4, 5). Genel olarak, AS'nin prevalansının HLA-B*27

ile doğrudan bağlantılı olduğu görülmektedir (5). Fakat HLA-B*27'nin AS etiyojisindeki kesin rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (5, 6). Farklı populasyonlar arasında belirgin ölçüde değişiklik gösterebilmekle birlikte ilişki derecesi bazı etnik gruplar için hala eksiktir (1, 3, 6). HLA-B*27 pozitif bireylerde AS ya da diğer spondiloartropatiler gelişmeyebilmekte ve AS'li hastaların %5-10'u HLA-B*27 bakımından negatif olabilmektedir (5).

Genetik faktörler, romatik hastalıklara ve ters ilaç etkileşimlerine yatkınlığı belirlemede önemli bir role sahiptir (7). Geniş genom taramaları ve spesifik gen polimorfizm çalışmaları AS ve diğer SpA'lerle ilişkili olarak, HLA genleri dışında pek çok yatkınlık geninin olabileceğini desteklemektedir (8). Bunlardan biri de AS ile

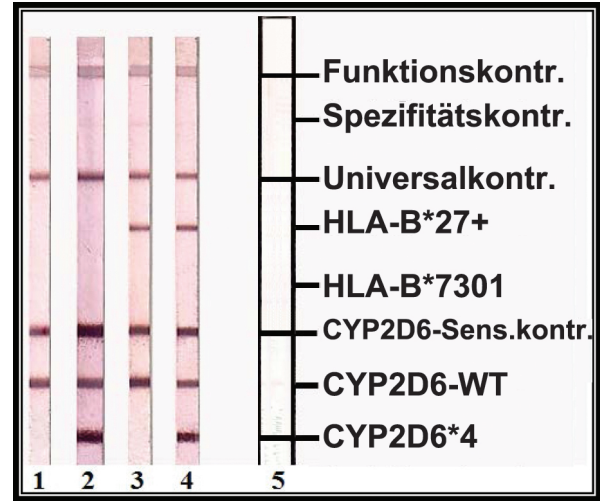
ilişkili olduğu bulunan ve 22 nolu kromozomun uzun kolunda yerleşmiş olan sitokrom P450 2D6 (CYP2D6) geninin zayıf metabolize edici genotipidir. Bu gen belirli ilaçlar, metaller ve endüstriyel ya da doğal olarak ortaya çıkan kimyasalları içeren ksenobiyotiklerin metabolizmasında fonksiyon görmektedir (9). CYP2D6 geni AS'ye yatkınlığı etkilemektedir (10). Ancak bu gendeki polimorfizmin AS'ye neden olmadaki katkısının nasıl olduğu henüz açık değildir (9). Sitokrom P450 enzimleri oksidatif (faz I) ilaç metabolizmasının büyük bölümünden sorumludurlar. Sitokrom P450 enzimi CYP2D6, yaygın metabolizerleri ile karşılaştırıldığında bu aktivitenin eksik olduğu Avrupalıların %5-10'unda polimorfiktir. Bu eksikliğin genetik temeli artık daha iyi bilinmektedir ve genotipleme yöntemleri zayıf metabolizerlerin %95'inden fazlasının tanımlanmasına izin vermektedir (7). Bazı araştırmacılar CYP2D6 geninin doğal toksin veya antijenin metabolizmasını değiştirmesi yoluyla AS'ye yatkınlığı artırabildiğini belirtmektedirler (9, 11). CYP2D6'nın zayıf metabolizer fenotipi bu genin en az 15 farklı genetik varyantı nedeniyle ortaya çıkabilmektedir (11). Bunlar arasında CYP2D6*4 allelinin en yaygın görülen varyant olduğu belirtilmektedir (12).

Sağlık hizmetlerinin etkin olarak sunulması için hastalık prevalansının bilinmesi çok önemlidir (2). İlgili genlerin pozitifliğinin gösterilmesi tanıyı ve sonuçta tedavi kararlarını etkileyebilmektedir (3). Bu retrospektif çalışma ile, bölgemizde AS ön tanısı bulunan olgulardaki HLA-B*27 ve CYP2D6*4 allellerinin dağılımı belirlenerek, farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, artrit, sakroiliak, eklem ve sırt ağrısı semptomları ile İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi'ndeki çeşitli polikliniklere (Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, Tetkik, Dahiliye, Pediatri, Ortopedi) başvuran 336 hastayı kapsamaktadır. Hasta grubu 4-73 yaş aralığında olan 146 kadın ve 190 erkekte oluşmaktadır. Çalışmada HLA-B*27 ve CYP2D6*4 genlerine özgü bölgelerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilmesinin ardından ters hibridizasyon yöntemini temel alan kit (GenID GmbH, Strassberg) kullanılmıştır. Yöntem, beş aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalarda sırası ile aşağıdaki işlemler yapılmıştır: (a) DNA, periferik kan örneklerinden izole edilmiştir (QIAamp® Blood Mini Kit, Qiagen), (b) *in vitro* multipleks amplifikasyon (multipleks PZR)'un

ardından (c) %2'lik agaroz jelde 175 ve 421 bp bantların gözlenmesi ile multipleks PZR kontrol edilmiştir. Daha sonra (d) HLA-B*27 ve CYP2D6*4 spesifik immobilize oligonukleotid problemlerini (sequence-specific oligonucleotide probes; SSOP) taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu sağlanmıştır (ters hibridizasyon). Hibridizasyon esnasında denatüre olmuş amplifiye DNA stripe bağlı olan gen problemlere bağlanmıştır. Problemlerin amplifiye DNA'ya %100 komplementerlikte bağlanıp bağlanmadığı ise geriye yalnızca hibridlerin kalabildiği yüksek spesifiklikteki bir yıkama işlemi ile belirlenmiştir. Son aşamada (e) biyotinle işaretlenen dizilerin streptavidine-alkaline fosfatase ve renk substratları kullanarak belirlenmesinin ardından sonuçlar analiz edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. HLA-B*27 ve CYP2D6*4 bakımından farklı genotipler: 1. Normal, 2. CYP2D6/ CYP2D6*4, 3. HLA-B*27 +, 4. HLA-B*27 + ve CYP2D6/ CYP2D6*4, 5. CYP2D6*4/ CYP2D6*4.

Bulgular

Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre 336 olgu arasında, 119'unun (%35.41) (38 kadın/ 81 erkek) yalnızca HLA-B*27 alleleline sahip olduğu belirlenmiştir. HLA-B*27 pozitif kadınların oranı %26 iken erkekler arasında bu oran %42.6 olarak belirlenmiştir. CYP2D6*4 mutasyonu bakımından ise olguların 66'sının (%19.64) heterozigot, 6'sının (%1.78) homozigot olduğu ve 264'ünün (%78.57) ise CYP2D6*4 allelini taşımadığı saptanmıştır. Çalışma sonuçlarımıza göre; CYP2D6*4 allelinin tüm popülasyondaki frekansı ise 0.11 olarak bulunmuştur. Tüm olguların 176'sında (%52.38) HLA-B*27 ve CYP2D6*4 allellerinin her ikisinin de negatif olduğu belirlenirken, 31 tanesinde (%9.22) ise hem HLA-B*27 ve hem

de CYP2D6*4 allellerinin birlikte bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 1, 2).

Tablo 1. Ankilozan spondilit ön tanılı hastalarda HLA-B*27 ve CYP2D6*4 taşıyanların sıklığı

	% (n)	
	Negatif	Pozitif
HLA-B*27	64.58 (n=217)	35.41 (n=119)
CYP2D6*4	78.57 (n=264)	21.42 (n=72)
HLA-B*27 ve CYP2D6*4	52.38 (n=176)	9.22 (n=31)

Tablo 2. Ankilozan spondilit ön tanılı hastalarda YP2D6*4 bakımından genotip ve allel sıklığı.

Genotip	Kadın n=146(%)	Erkek n=190(%)	Toplam n=336 (%)
CYP2D6 / CYP2D6 (normal)	111 (76.02)	153 (80.5)	264 (78.57)
CYP2D6*4 / CYP2D6*4 (homozigot)	3 (2.05)	3 (1.5)	6 (1.78)
CYP2D6 / CYP2D6*4 (heterozigot)	31 (21.23)	35 (18.42)	66 (19.64)
Allel			
CYP2D6	253 (42.59)	341 (57.4)	594 (88.39)
CYP2D6*4	37 (47.43)	41 (52.56)	78 (11.60)

Tartışma

İntervertebral, kostovertebral ve sakroiliak eklemlerin ankilozanı ile karakterize multisistemik bir hastalık olan AS ailesel geçiş göstermektedir. Populasyonlar arasında değişiklik göstermekle birlikte AS hastalarının %90-95'inin HLA-B*27 pozitif olduğu ve HLA-B*27 pozitif olanların ise %20'sinin AS bulgularına sahip olduğu belirtilmektedir. İlave olarak HLA-B*27'nin sağlıklı bireylerdeki oranı ise populasyonlar arasında farklılık göstermekte farklı çalışmalarda %8-14 olarak rapor edilmektedir (12). Bazı populasyonlarda bu oran %1 gibi düşük frekanslarda rapor edilirken bazılarında ise %50'ye kadar çıktığı belirtilmektedir (12, 13). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da bu oran yine oldukça değişen oranlarda rapor edilmektedir. Oğuz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sağlıklı kontrol grubunda HLA-B*27 pozitifliği %2.6 olarak rapor ederken (6) Gül ve arkadaşları %6.8 olarak, Acar ve arkadaşları ise %4.5 olarak rapor etmiştir (14, 15).

Çalışmamızda AS ön tanısı ile refere edilen 336 olgu değerlendirilmiş ve bunlar arasında HLA-B*27 taşıyanların frekansı %35.41 olarak bulunmuştur (Tablo 1). Bu oran AS'li hastalarda beklenen veya daha önce rapor edilen oranlara göre oldukça düşüktür. Bu durum ise refere edilen hastaların henüz kesin tanı almaması ile açıklanabilir. AS hastalarında HLA-B*27

pozitifliği Yunanistan'da yapılan bir çalışmada %80.5 olarak belirtilirken (16), Suriye'de yapılan bir çalışmada %60 (17), ve Çin'de yapılan bir çalışmada %36 olarak belirtilmiştir (3). Ayrıca, Liu ve arkadaşları HLA-B*27 pozitiflik oranını kadınlar da %16.4 erkeklerde ise %52 olarak rapor ederken hastalığın ortaya çıkma yaşını ise 40'ın altında olarak belirtmiştir (3). Türkiye'de farklı AS'li hasta populasyonlarında yapılan çalışmalarda ise bu oran yine değişiklik göstermektedir (14, 16, 18). AS'in erkeklerde daha yüksek sıklıkta gözleendiği rapor edilmektedir (18, 19). Çalışmamızda HLA-B*27 pozitif olan kadınların oranı %26'ya karşılık gelirken erkekler arasında ise %42.6'ya karşılık gelmektedir. Ciurea ve arkadaşlarının çalışma sonucuna göre ise AS'li hastalardaki HLA-B*27 prevalansı erkeklerde %83 ve kadınlarda %72.1 olarak bulunmuştur (20). Gunal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise erkek-kadın oranı 1.8 olarak belirtilmiştir (16). Çalışmamızda HLA-B*27 homozigotluğu araştırılmamıştır. Bununla birlikte, HLA-B*27 için homozigotluğun hastalık riskini arttırdığı belirtilmektedir (21, 22).

CYP2D6 geninde fonksiyon kaybına neden olan genetik varyantların da AS ile ilişkili olabileceği ve CYP2D6*4 bakımından homozigot olanların AS için daha yüksek bir riske sahip olabileceği düşünülmektedir. Beyaz ırkın yaklaşık olarak %5-10'unun yetersiz CYP2D6 enzim fonksiyonuna sahip olduğu belirtilmektedir. CYP2D6'nin hastalığa yatkınlığı nasıl etkilediği ise henüz tam olarak açıklanamamıştır (12, 23). Çalışmamızda CYP2D6*4 mutasyonu bakımından olguların %19.64'ünün heterozigot, % 1.78'inin ise homozigot olduğu bulunmuştur. Tüm olguların %9.22'sinde ise hem HLA-B*27 ve hem de CYP2D6*4 allellerinin birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer sonuçlar Şahin ve arkadaşlarının Karadeniz Bölgesi'nde yaptığı bir çalışmada rapor edilmiştir (12). Tokat bölgesinde yapılan bir çalışmada ise CYP2D6*4 alleli 53 hastada araştırılmış ve 15'nin heterozigot, 1'nin de homozigot olduğu belirlenmiştir (10). Brown ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada AS'li hastaların CYP2D6*4 alleli bakımından %30'unun heterozigot ve %7'sinin de homozigot olduğu belirlenmiştir (11).

Sonuç

Ankilozan spondilit; HLA veya HLA dışındaki genler ile kronik inflamatuvar hastalık arasındaki ilişkinin araştırıldığı ve özellikle de HLA-B*27 alleli ile ilişkili çok sayıda çalışmanın yapıldığı bir hastalıktır. Ancak bu ilişki populasyonlara ve

etnik gruplara göre farklılık gösterebilmektedir. AS hastalarında, HLA-B*27 ve CYP2D6*4 allellerinin birlikteliğinin tanısasal değerini ortaya çıkarmak için daha büyük populasyonlarda ve klinik veriler ile birlikte değerlendirmek daha bilgi verici olabilecektir.

Kaynaklar

1. Popa OM, Bojinca M, Bojinca V, Ciofu C, Dutescu MI, Bardan A, et al. Distribution of HLA-B27 in Romanian spondyloarthritides patients. *Int J Immunogenet* 2010; 37(6): 513-6.
2. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatol* 2014; 53(4): 650-7.
3. Liu X, Li YR, Hu LH, Zhou ZM, Chen FH, Ning Y, et al. High frequencies of HLA-B27 in Chinese patients with suspected of ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2010; 30(10): 1305-9.
4. Ben Radhia K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Ben Romdhane T, Makhlof M, Gorgi Y, et al. Distribution of HLA-B*27 subtypes in Tunisians and their association with ankylosing spondylitis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2008; 75(2): 172-5.
5. Sorrentino R, Bockmann RA, Fiorillo MT. HLA-B27 and antigen presentation: At the crossroads between immune defense and autoimmunity. *Mol Immunol* 2014; 7(1): 22-7.
6. Oguz FS, Ocal L, Diler AS, Ozkul H, Asicioglu F, Kasapoglu E, et al. HLA B-27 subtypes in turkish patients with spondyloarthropathy and healthy controls. *Dis Markers* 2004; 20(6): 309-12.
7. Beyeler C, Armstrong M, Bird HA, Idle JR, Daly AK. Relationship between genotype for the cytochrome P450 CYP2D6 and susceptibility to ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55(1): 66-8.
8. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Campbell D, Andrew L, March R, et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* 1998; 41(4): 588-95.
9. Reveille JD, Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13(4): 265-72.
10. Inanır AY, S. Sariyildiz, MA. Sogut, E. Outcomes of Turkish Ankylosing Spondylitis Patients. *Eur J Gen Med*. 2013; 10(3): 145-9.
11. Brown MA, Edwards S, Hoyle E, Campbell S, Laval S, Daly AK, et al. Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Human Mol Genet* 2000; 1; 9(11): 1563-6.
12. Sahin S, Aydogan L, Benli I, Ozyurt H. Distribution of HLA-B27 and CYP2D6*4 mutations in the middle Black Sea area (Tokat) of Turkey. *Genet Mol Res: GMR* 2011; 10(4): 3987-91.
13. Roberts RL, Wallace MC, Jones GT, van Rij AM, Merriman TR, Harrison A, et al. Prevalence of HLA-B27 in the New Zealand population: effect of age and ethnicity. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(5): R158.
14. Acar M, Cora T, Tunc R, Acar H. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls. *Rheumatol Int* 2012; 32(10): 3103-5.
15. Gul A, Uyar FA, Inanc M, Ocal L, Barrett JH, Aral O, et al. A weak association of HLA-B*2702 with Behcet's disease. *Gen Immun* 2002; 3(6): 368-72.
16. Gunal EK, Sarvan FO, Karnali S, Gul A, Inanc M, Carin M, et al. Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme* 2008; 75(3): 299-302.
17. Harfouch EI, Al-Cheikh SA. HLA-B27 and its subtypes in Syrian patients with ankylosing spondylitis. *Saudi Med J* 2011; 32(4): 364-8.
18. Diyarbakır EE, N. Uzkeser, H. Karatay, S. Topçu, A. Yıldırım, K. Pirim, İ. The Distribution of HLA-B27 in Patients with Ankylosing Spondylitis in Eastern Anatolia. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2012; 19(1): 23-5.
19. Diyarbakır E, Eyerci N, Melikoglu M, Topcu A, Pirim I. HLA B27 Subtype Distribution Among Patients with Ankylosing Spondylitis in Eastern Turkey. *Genet Test Mol Bioma* 2012; 16(5): 456-8.
20. Ciurea A, Scherer A, Weber U, Neuenschwander R, Tamborrini G, Exer P, et al. Age at symptom onset in ankylosing spondylitis: is there a gender difference? *Ann Rheum Dis* 2014; 73(10): 1908-10.
21. Jaakkola E, Herzberg I, Laiho K, Barnardo MCNM, Pointon JJ, Kauppi M, et al. Finnish HLA studies confirm the increased risk conferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(6): 775-80.
22. Reveille JD. An update on the contribution of the MHC to as susceptibility. *Clin Rheumatol* 2014; 33(6): 749-57.
23. Brown MA. Non-major-histocompatibility-complex genetics of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Cl Rh* 2006; 20(3): 611-21.

Sorumlu Yazar:

Elçin Latife KURTOĞLU
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Tıp Fakültesi, İnönü Üniversitesi,
44100 Malatya, Türkiye.
E-mail: elcinkurtoğlu@hotmail.com