

# Polikistik Over Sendromu'nda HLA Antijenleri Dağılımı

Gökay BOZKURT<sup>1</sup>, Fatih ÖGÜÇ<sup>2</sup>, H.Çetin EKERBİÇER<sup>3</sup>, Şükrü PALANDÜZ<sup>4</sup>, Çetin ALGÜNEŞ<sup>5</sup>

## 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 kliniğine gönderilen 30 Polikistik Over sendromlu vaka ve Sönmez G tarafından bildirilen 3731 kişilik kontrol grubunu içermektedir. Vakaların yaş ortalaması 20,67+4,16 SD şeklindedir. 30 hastamızda minimum 35 gün süren aralıklarla adet gören oligomenoreli ve hirsutizmi olan vakalarda, 2-6 cm çapında ve en az 10 adet folikül 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(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 olabileceği belirlendi.

**Sonuç:** Çoğu 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 + 4,16 SD 30 of our cases had oligomenore. Hirsutizm and menstrual cyclus 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(5) (p .00), HLA-52(5) (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.

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

<sup>2</sup> Uzm.Dr. Özel Trakya Hastanesi

<sup>3</sup> Araş.Gör.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.

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

<sup>5</sup> Prof.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

HLA tiplemesi yeni teknolojilerin tıp sektörüne girmesinden çok büyük oranda etkilenen bir laboratuvar testidir. Bu alandaki moleküler tekniklerin tanıtımı, düzenlerce yeni allellerin keşfine ve metodolojik gelişimlerde bir patlamaya yol açmıştır. İlave 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 stimülasyonunu ve killer-cell'lere transformasyonunu sağlamaktır. HLA antijenlerinin virüslara karşı, immun savunma yanında, kendinden olmayan yapıları ve hücreleri tanımda da rol oynadıkları bilinmektedir.

Sonuç olarak HLA sistem antijenleri allograftların 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 laboratuvarlarındaki 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 anatomik 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 immünogenetik araştırmaların arttırılmasının gerekliliği söz konusudur. Polikistik over sendromunun immünogenetik olarak etiyopatogenezini kontrol etme eforları daha geniş bir perspektif sağlayacaktır. Immünogenetik 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. Moleküler seviyede çevrenin organizma üzerinde bir değişiklik yapabilmesi için öncelikle genetik faktörlerin kontrolü altındaki immun sistem ile etkileşime girmesi gerekmektedir. (4,5,6). Organizmanın reaksiyonu immun sistemin cevabıyla belirlenir. Bir başka deyişle 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, immünogenetik araştırmaların arttırılarak, insanlığın ölümsüzlük sırları da dahil tüm hastalıkların çözümünün bu süreçlerin irdelenmesine bağlı olduğu ortadadır. Polikistik over sendromunun ortaya çıkmasından 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 -Doğum Hastalıkları polikliniğinde Polikistik over sendromu tanısı almış 30 hastanın HLA tayinleri yapılarak istatistiki 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.

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-Elde 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 üzerinden taşan fazla parafin pastör pipeti ile aspire edilir.

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

7-20 ° C'de 10 dakika inkübe edilir.

8- Class I plağındaki 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 anijenlerinin tespiti:

B-lenfositlerin E - rozet yöntemiyle izolasyonu

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

2. Class I plağı için elde edilen mikst lenfositlerin yeterli bir kısmı alındıktan sonra kalan kısmı üzerine koyun 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 Lymphoprep 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 plağındaki her bir kuyucuğa Hamilton pipeti ile 1 mikrolitre HLA antikoru ilave edilir.

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

Verilerimiz iki bağımsız grup içerisinde (kontrol ve vaka) alınan dikotom değişkenlerden oluşmaktadır. Bununla birlikte X<sup>2</sup> 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)		X <sup>2</sup>	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)		X <sup>2</sup>	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)		X <sup>2</sup>	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)		X <sup>2</sup>	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)		X <sup>2</sup>	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 istatistiksel olarak anlamlı olsa da daha güvenilir sonuçlara ulaşabilmek için bu konuyla ilgili farklı populasyonlarda yapılacak

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

Polikistik Over Sendromu ve bazı HLA antijenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunması Polikistik Over Sendromunun etyopatogenezinde immünojenetik faktörlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Polikistik Over Sendromu ve bazı HLA antijenleri arasındaki ilişkinin netleştirilmesi için bu konuyla 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 yayınevi. 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. Retvit. 1995; 3: 170-176