

Ovaryan hiperstimulasyon sendromlu hastalarda anjiotensin dönüştürücü enzim geni insersiyon / delesyon polimorfizmi

Insertion / deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene in ovarian hyperstimulation syndrome patients

Cihan Kabukçu, Gülşen Vardar

Gönderilme tarihi: 14.04.2018

Kabul tarihi: 02.10.2018

Özet

Amaç: Ovaryan hiperstimulasyon sendromu (OHSS) riski altındaki hastalarda, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) gen insersiyon / delesyon (I/D) polimorfizminin ovaryan hiperstimulasyon sendromu gelişiminde etkisinin olup olmadığının belirlenmesidir.

Gereç ve yöntem: Yardımcı üreme teknikleri tedavisi için ovulasyon indüksiyon programına alınan, ve insan koryonik gonadotropin (hCG) yapıldığı gün östradiol seviyesi 3000 pg/ml'den fazla olan, OHSS gelişimi için yüksek risk altında bulunan 47 infertil hasta dahil edildi. Hastaların yaşı, infertilite süresi, kullanılan total gonadotropin dozu, indüksiyon süresi, elde edilen folikül sayısı, endometriyum kalınlığı ve infertilite nedeni kaydedildi. Kontrol (n:25) ve OHSS (n:22) grubu hastalarının ACE genine ait insersiyon/delesyon polimorfizmi, PCR yöntemiyle çalışılarak tesbit edildi.

Bulgular: Yaş, infertilite süresi, gonadotropin dozu, indüksiyon süresi, endometriyum kalınlık ölçümleri iki grup arasında anlamlı farklılık göstermedi. Folikül sayısı kontrol grubunda 17.1 ± 4.2 OHSS grubunda 25.4 ± 6.8 olarak bulundu. Her iki grup arasında bulunan fark anlamlıdır ($p < 0.001$). OHSS grubunda ACE geni D allel frekansı %56.8 kontrol grubunda %54,0 ve toplam 47 hastadaki D allel frekansı %55.3 olarak bulundu. OHSS ve kontrol grubu ACE genotipi için karşılaştırıldığında iki grup arasında II – ID – DD genotipleri bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). OHSS grubunda genotipin DD olma olasılığı, kontrol grubuna göre 1,47 kat daha yüksektir (OR: 1.47 %95 Güven Sınırı, 0.44-4.86) fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Sonuç: Çalışmada OHSS için yüksek riskli hastalarda ACE gen insersiyon/delesyon polimorfizmi çalışılmıştır. DD genotipinin oranı OHSS ve kontrol grubunda farklı değildir. ACE gen insersiyon/delesyon polimorfizmi, OHSS gelişiminde etken faktör olarak değerlendirilmemiştir.

Anahtar sözcükler: Ovaryan hiperstimulasyon sendromu, anjiotensin dönüştürücü enzim, polimorfizm.

Kabukçu C, Vardar G. Ovaryan hiperstimulasyon sendromlu hastalarda anjiotensin dönüştürücü enzim geni insersiyon / delesyon polimorfizmi. Pam Tıp Derg 2019;12;13-22.

Abstract

Purpose: Previous studies have shown that ovary contains all the components of renin-angiotensin system. Renin-angiotensin system may play a primary role in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). In this study our purpose was to investigate the relationship between the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion / deletion polymorphism and OHSS, in high risk patients for the syndrome.

Materials and methods: 47 patients who have undergone controlled ovarian hyperstimulation cycle (control n: 25; OHSS n: 22) were recruited in the study. Estradiol levels of all patients in both group were higher than 3000 pg/ml. Age, duration of infertility, total gonadotropin dose, induction time, total follicular number, endometrial thickness and cause of infertility were recorded. DNA was extracted, and the insertion/deletion polymorphism of ACE gene was detected by polymerase chain reaction (PCR).

Results: There were no statistically difference in age, duration of infertility, total gonadotropin dose, induction time and endometrial thickness between control and OHSS group. Follicle number was higher in OHSS group ($p < 0.001$). There were no difference in the ACE II – ID – DD genotypes between OHSS and control group patients ($p > 0.05$). Homozygotes for the deletion polymorphism (DD genotype) were found 1.47 times higher in OHSS group (OR: 1.47 %95 confidence interval, 0.44 - 4.86) but this was statistically insignificant.

Conclusion: These data indicate that ACE gene I/D polymorphism is not associated with OHSS. ACE gene polymorphism doesn't play a major role in the pathogenesis of OHSS.

Key words: Ovarian hyperstimulation syndrome, angiotensin converting enzyme, polymorphism.

Kabukçu C, Vardar G. Insertion / deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene in ovarian hyperstimulation syndrome patients. Pam Med J 2019;12;13-22.

Cihan Kabukçu, Dr.Öğr.Üyesi. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, DENİZLİ, e-posta: cihankabukcu@yahoo.com (orcid.org/0000-0003-3331-5714) (Sorumlu yazar)

Gülşen Vardar, Prof. Dr. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD (vefat etmiş)

Giriş

Ovaryan hiperstimulasyon sendromu (OHSS), foliküler büyüme ve ovulasyonu indüklemek için kullanılan eksojen gonadotropin tedavisinin neden olduğu iatrojenik bir komplikasyondur [1]. Belirgin klinik özellikleri; overlerde büyüme ve artmış kapiller geçirgenlik ve buna bağlı olarak oluşan asit, hidrotoraks, ve perikardial efüzyondur. Şiddetli formlarında tromboembolik olaylar, respiratuvar distres ve renal yetmezlik gelişebilir [2]. OHSS, laboratuvarı ve klinik semptomları ile geniş spekturuma sahip bir sendromdur. Bu spekturumun bir ucunda sadece artmış steroidlerin varlığını gösteren kimyasal bulgular varken, diğer ucunda ise hayatı tehdit edebilecek semptomlar bulunur ve yardımcı üreme tekniklerinin en ciddi komplikasyonudur.

OHSS için klinik ve laboratuvar bulgulara göre, hastalığın şiddetini belirlemek için zaman içerisinde çeşitli sınıflandırmalar önerilmiştir [3-7]. Hafif vakalar tedavi sikluslarının %23-33'ünde, orta şiddetli olanlar %3-6'sında, şiddetli formlar ise %0,3-5'inde izlenmiştir [8]. Genç yaş, düşük vücut ağırlığı, yüksek östradiol seviyesi, hızlı artan östradiol seviyesi, yüksek bazal anti-müllerian hormon (AMH) konsantrasyonu, stimule olan folikül sayısı ve boyutu, toplanan oosit sayısı, polikistik over sendromu varlığı, luteal destek için insan koryonik gonadotropin (hCG) kullanımı ve gebelik, OHSS gelişimi için risk faktörleridir [9].

Şiddetli OHSS'ye yol açan patofizyolojik mekanizma halen net olarak bilinmese de OHSS'nin iki komponenti vardır; bunlardan birincisi çok sayıda folikül, luteal kist ve stromada ödem ile over büyümesi; ikincisi intravasküler kompartmandan üçüncü boşluğa sıvı kaçmasıdır [2, 9]. Hiperstimule overlerden salınan faktör veya faktörler kana karışır ve bu maddeler peritoneal membranlardaki damarları stimule eder ve sıvı kaçağına neden olur [10]. Sitokinler, foliküler sıvıda ve bunu çevreleyen over dokusunda tesbit edilmiştir. IL-2 (interlökin-2), IL-6 ve TNF- α (tümör nekroz faktör-alfa) artmış vasküler permeabilitede rol oynayan mediatörlerdir [11, 12]. hCG stimülasyonunun, vasoaktif maddelerin salınımında gerekli rolü oynadığı muhtemeldir. Günümüze kadar östrojen, histamin, prolaktin, serotonin, prostoglandin gibi aracı mediatörler suçlansa da bu maddelerin etken olmadığı düşünülmüştür.

Bugün için; immun sisteme ait faktörler, interlökinler, tümör nekroz faktör (TNF)-alfa, endotelin-1, vasküler endothelial growth faktör (VEGF) ve renin anjiotensin sistemi gibi çeşitli vasoaktif maddelerin OHSS patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir [13, 14]. Renin-anjiotensin-aldosterone sisteminin lokal aktivasyonu, hiperstimulasyon sendromunun şiddetli formuna neovaskularizasyon ve artmış kapiller geçirgenlik yoluyla neden olabilir [15].

Anjiotensin II, renin anjiotensin sisteminin bir parçası olarak görev yapan, potent bir vasokonstrüktördür. Ayrıca vasküler endotel hücrelerinde de konstrüksiyon yaparak, vasküler geçirgenliği artırır. OHSS'de belirgin özellik olan vasküler geçirgenlikteki artış, Anjiotensin II artışı ile birlikte olabilir. Yapılan analizler sonucunda bireyler arası ACE (Anjiotensin Dönüştürücü Enzim) genetik varyasyonları belirlenmiştir. ACE gen 16 intron bölgesindeki insersiyon/delesyon polimorfizmi, değişken ACE enzim seviyelerine neden olur. Delesyon alleli için homozigot olan bireylerde ACE düzeyleri en fazla, insersiyon alleli için homozigot olan olanlarda ise en azdır [16].

OHSS'li hastalarda ACE düzeyleri çalışılmış olmasına rağmen bu hastaların enzim düzeylerini etkileyecek ACE geni polimorfizmi ile ilgili bilgi literatürde mevcut değildir. Eğer OHSS'li hastalarda anjiotensin II, patogenezinde etkin olarak rol alıyor ise, delesyon alleli için homozigot olan bireylerde OHSS riski daha yüksek olmalıdır. Bu nedenle, çalışmanın amacı, OHSS riski altındaki hastalarda ACE geni insersiyon/delesyon polimorfizminin incelenmesi ve bu hastalardaki delesyon ve insersiyon polimorfizminin OHSS gelişiminde etkisinin olup olmadığının belirlenmesidir. Çalışma sonucunda; delesyon alleli için homozigot olan bireylerde, insersiyon alleli için homozigot olanlara göre, daha yüksek oranda OHSS tespit edilirse; hastaların var olan riskleri ovulasyon indüksiyonu öncesinde tespit edilebilir.

Gereç ve yöntem

Hasta Seçimi

Bu çalışmaya, Ağustos 2000-Haziran 2001 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda ovulasyon indüksiyon programına alınan, OHSS gelişimi için yüksek risk altında

bulunan 47 hasta dahil edildi. Bir hastayı OHSS gelişimi için yüksek riskli kabul etmek için gerekli olan kriter, hCG gününde serum östradiol düzeyinin 3000 pg/mL'den yüksek olması olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen hastaların değerlendirilmesi için anamnez, yaş, infertilite süresi, infertilite nedeni, polikistik over sendromu (PCOS) varlığı, ve şu anki ovulasyon indüksiyonuna ait şikayetleri sorgulandı. Tüm hastaların fizik muayenesi ve jinekolojik değerlendirmesi yapıldı.

47 hasta OHSS gelişimi için takip edildi. OHSS sınıflaması Golan kriterlerine göre yapıldı [4]. Golan sınıflamasına göre (Tablo 1) grade 2 ve daha yüksek gradeli hastalar OHSS grubunu (n:22 %46,8); grade 1 olan hastalar ise kontrol grubunu (n:25 %53,2) oluşturdu. Gebelik varlığı OHSS insidansını arttırdığı ve semptomları şiddetlendirdiği için gebe kalan hastalar çalışma grubuna dahil edilmedi. Vakaların hiçbirisi tedavi sonucunda gebe kalmadı. Çalışma grubu ve kontrol grubu arasında yaş, infertilite süresi, infertilite nedeni açısından anlamlı fark yoktu. Çalışmaya dahil edilen hastalar çalışma

hakkında bilgilendirildi ve onayları alındı. Hastaların demografik özellikleri, kullanılan ovulasyon indüksiyonu, östradiol düzeyleri ve folikül takipleri kaydedildi. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından maddi destek sağlanmıştır (Proje Kodu: 2001-08-10-052).

Ovaryan stimülasyon protokolü ve oosit toplama

Çalışmaya dahil edilen hastalara menstrüel siklusun 21. gününde subkutan 0,1 mg/gün triptorelin asetat (Decapeptyl®, ER-KİM İlaç San, İstanbul, Türkiye) uygulanmaya başlandı. Takip eden menstruasyonun ikinci gününde yeterli baskılama (serum östradiol düzeyi düzeyi <50 pg/mL) sağlandığında ovulasyon indüksiyonuna başlandı. Ovulasyon indüksiyonu üriner insan menopozal gonadotropin (hMG) (Menogon®, ER-KİM İlaç San, İstanbul, Türkiye), üriner folikül stimulan hormon (uFSH) (Metrodin HP®, Serono, Aubonne, İsviçre) veya rekombinant folikül stimulan hormon (r- FSH) (Gonal F®,

Tablo 1. Ovaryan hiperstimulasyon sendromunun sınıflandırılması

Hafif	
Grade 1	Abdominal şişkinlik ve rahatsızlık
Grade 2	Grade 1'e ek olarak, bulantı, kusma, ve/veya diare; overler 5-12 cm'ye kadar büyümüş
Orta	
Grade 3	Hafif OHSS bulguları ve ultrasonografik olarak asit varlığının gösterilmesi
Şiddetli	
Grade 4	Orta şiddetli OHSS bulgularına ek olarak klinik asit ve/veya hidrotoraks ile birlikte dispnea
Grade 5	Grade 4'e ek olarak azalmış kan volumü, artmış kan viskozitesi, pıhtılaşmaya meyil ve azalan renal perfüzyon ve renal fonksiyon

Serono, Aubonne, İsviçre) kullanılarak yapıldı. Vajinal ultrasonografi ile yapılan folikül takibinde, lider folikül büyüklüğü 18 mm.'ye ulaşınca bütün hastalara 10000 IU insan koryonik gonadotropin (hCG) (Pregnyl®, Organon, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu yapılarak ovulasyon tetiklendi. Tüm hastaların hCG günü periferik venöz kanları alınarak serumdaki östradiol seviyesi belirlendi. Serum östradiol seviyesi 3000 pg/mL'den yüksek olan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Oosit toplanması hCG enjeksiyonunu takiben 36. saatte yapıldı. Hastaların hiçbirisine hCG ile luteal faz desteği uygulanmadı. Tüm hastalara luteal faz desteği amacıyla intravajinal mikronize progesteron 600 mg (Progestan®

tablet, Koçak İlaç San, İstanbul, Türkiye) verildi. Embryo transferini takiben 12. günde β -hCG ölçümü yapılarak hastanın gebelik durumu belirlendi. β -hCG pozitif olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

ACE polimorfizm genotiplendirme

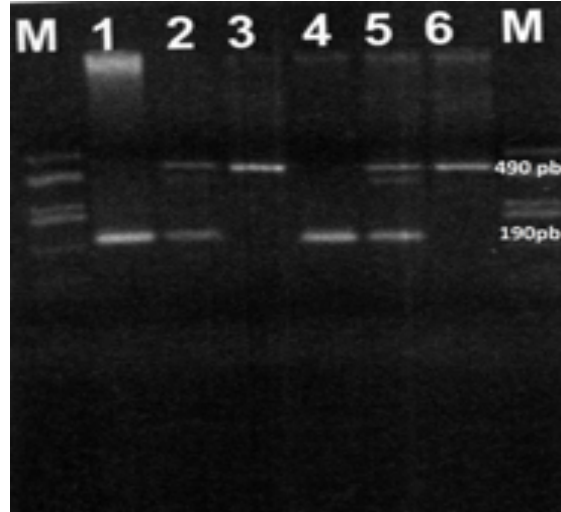
PCR ile ACE geni polimorfizmi belirlenmesi amacı ile çalışma kapsamına alınan hastalardan, periferik venöz kan alınarak DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu, periferik kandan standard fenol:kloroform ekstraksiyonu ile gerçekleştirildi [17]. Elde edilen DNA'nın miktar ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrik ölçüm yapıldı. ACE polimorfizminin belirlenmesi

amacıyla, 0,1-0,5 mikrogram DNA, 4 pikomol primer 1,4 pikomol primer 2,2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dTTP ve 1 ünite Taq polimeraz 0,5 mL'lik mikrofuj tüpü içinde karıştırıldı ve üzeri mineral oil ile kaplandı. ACE geni I/D polimorfizmini belirlemek için sense: 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' ve antisense: 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGAT-3' primerleri kullanıldı. PCR şartları şu şekilde tanımlandı: 93°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu takiben, denatürasyon 92°C'de, 1 dakika, bağlanma 57°C'de, 1 dakika ve uzama 72°C'de, 1 dakika ve son uzama 72°C'de, 7 dakika toplam 30 siklus.

Elde edilen PCR ürünü etidyum bromür içeren %2 agaroz jele yüklendi ve 90V' da 1 saat elektroforez uygulandı. Elektroforez sonrasında jelin fotoğrafı çekildi (Resim 1). I alleli 490 bp fragmanında, D alleli ise 190 bp fragmanında yerleştiğinden, elektroforez sonrası hem 190 hem de 490 bp fragmanında görüntü elde edilmesi ID genotipi, sadece 490 bp fragmanında parlak görüntü elde edilmesi II genotipi, sadece 190 bp fragmanında parlak görüntü elde edilmesi ise DD genotipi olarak değerlendirildi. Yapılan çalışmalarda insersiyon alelinin bazı durumlarda delesyon aleli olarak saptanabileceği, DD genotipi belirlenen bireylerin gerçekte ID genotipine sahip olabileceği, bu nedenle de bu bireylerde farklı primerler kullanılarak ikinci bir PCR uygulaması gerçekleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir [18]. Bu nedenle genotipi DD olanlara, insersiyon spesifik primer (sense: 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CCG CCA CTA C-3' ve antisense: 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3') kullanılarak ikinci bir PCR işlemi uygulanmış ve genotip doğrulanmıştır.

İstatistiksel analiz

Genotip dağılımlarının gerçek Mendeliyen popülasyonu yansıtmadığını, yani Hardy-Weinberg eşitliğine uyum sağlayıp sağlamadığını kontrol etmek için gruplarda I ve D allellerinin sıklığı bulundu. Allellerin hesaplanan sıklığına göre her bir allelin rastlanma olasılığı ve II, ID ve DD genotiplerinin oluşma olasılığı hesaplandı. Bu şekilde belirlenen ve beklenen genotip sıklıkları ile çalışma gruplarındaki genotip sıklıkları karşılaştırıldı. Örnekte elde edilen genotipe göre dağılımın, Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu tesbit edildi ($p>0,05$).



Resim 1. ACE geni I/D polimorfizminin agaroz jel elektroforezi. Sütun 1-4 homozigot DD, sütun 2-5 heterozigot ID, sütun 3-6 homozigot II genotipine ait PCR ürünü. M: marker yüklenen kuyuyu göstermektedir (marker, pUC18/ HaellI kesimi).

Ölçümle belirtilen verilerde kontrol ile OHSS gruplarının karşılaştırılmasında student's t testi, kategorik verilerde iki grubun karşılaştırılmasında Ki-kare ve Fischer-exact testi kullanıldı. Ayrıca iki grup için genotip dağılımının bir risk teşkil edip etmediğini belirlemek için Odds Ratio değeri ve %95 güven sınırları verilmiştir. İstatistiksel hesaplarda "SPSS 9.0 for Windows" paket program kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen kontrol ve OHSS grubundaki 47 hastanın klinik verileri Tablo 2'de özetlenmiştir. Serum östradiol seviyesinin 3000 pg/ml'den fazla olması çalışmaya dahil edilme kriteri olduğu için, kontrol ve OHSS grubundaki tüm bireylerin serum östradiol seviyesi bu değerden yüksekti. Kontrol ve OHSS grubu arasında hasta yaşları, infertilite süreleri, total gonadotropin dozu, stimülasyon süreleri ve ultrasonografide hcg günü endometriyum çift duvar kalınlık ölçüleri arasında anlamlı fark göstermemesine rağmen OHSS grubundaki hastalar gonadotropinlere daha iyi cevap vermiş ve OHSS grubunda daha çok sayıda folikül tesbit edilmiştir.

İki grup arasında infertilite nedenleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark bulundu. Bu farkın polistik overli hastaların tümünün OHSS grubunda olmasından kaynaklandığı tesbit edildi (Tablo 3). PCOS,

OHSS gelişimi için bir risk faktörü olduğu için bu hastalar çıkarıldıktan sonra iki grup karşılaştırıldığında infertilite nedeni açısından anlamlı fark olmadığı tesbit edildi.

Her iki grubun genotip sıklıklarının Hardy-Weinberg eşitliğine uyum gösterdiği ve dolayısıyla gerçek Mendeliyen populasyonu yansıttığı görüldü ($p>0,05$). ACE genotip ve allel frekansları Tablo 4'de gösterilmiştir. OHSS grubunda D allel frekansı %56,8 kontrol grubunda %54,0 ve toplam 47 hastadaki D allel frekansı %55,3 olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

Kontrol grubu ve OHSS grubu ACE genotiplerine göre karşılaştırıldığında, DD genotipi OHSS grubunda daha yüksek bulunmasına rağmen iki grup arasında genotip

dağılımı açısından fark olmadığı tesbit edilmiştir ($p>0,05$). OHSS grubunda genotipin DD olma olasılığı, kontrol grubuna göre 1,47 kat daha yüksektir (OR:1,47 %95 Güven Sınırı, 0,44-4,86) fakat istatistiksel olarak anlamsızdır.

D alleli için homozigot olan bireyler, I alleli için homozigot olan bireylerle karşılaştırıldığında 2 kat daha fazla ACE seviyesine sahiptirler [16]. Bu nedenle hastalar DD genotipi olanlar ve olmayanlar olarak da gruplandırıldı. ACE DD genotipi olanlar ile DD genotipi olmayanların (II+ID) karşılaştırılmaları da Tablo 5.a'da tüm hastalar ortak olarak, Tablo 5.b'de grup bazında özetlenmiştir. Bu incelemenin amacı yaşın, infertilite süresinin, kullanılan gonadotropin dozunun, stimülasyon süresinin, folikül

Tablo 2. Kontrol ve OHSS grubunun klinik verileri

	Kontrol (ort±SD)	OHSS (ort±SD)	p^*
Yaş (yıl)	29,4±5,0	29,1±4,8	>0,05
İnfertilite süresi(yıl)	6,1±3,3	7,2±4,8	>0,05
Total gonadotropin dozu (IU)	2819,0±932,1	2440,3±952,2	>0,05
Stimülasyon süresi (gün)	11,9±1,6	11,7±2,6	>0,05
Folikül sayısı	17,1±4,2	25,4±6,8	<0,001
Endometriyum kalınlığı (mm)	10,2±1,6	10,4±1,6	>0,05

* $p<0,05$ koyu belirtilmiştir

Tablo 3. Kontrol ve OHSS grubunun, infertilite nedenleri

İnfertilite nedeni	Kontrol		OHSS	
	n	%	n	%
Açıklanamayan	6	24,0	3	13,6
PCOS	0	0	6	27,3
Tubal Faktör	2	8,0	2	9,1
Erkek Faktörü	17	68,0	11	50,0
Toplam	25	100,0	22	100,0

Tablo 4. Kontrol ve OHSS grubunda, ACE genotip sıklığı ve allel frekansı

	ACE Genotipi					Allel Frekansı			
	DD		ID		II	D		I	
	n	%	n	%	n	%	(%)	(%)	
Kontrol									
(n:25)	8	32,0	11	44,0	6	24,0	54,0	46,0	
OHSS									
(n: 22)	9	40,9	7	31,8	6	27,3	56,8	43,2	

$p>0,05$

sayısının, endometriyum kalınlığının II+ID ve DD genotipleriyle ilişkisini tespit etmektedir. Yapılan karşılaştırmada parametreler arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

PCOS, OHSS için bir risk faktörüdür. İnfertilite nedeni PCOS olan 6 hastanın tümünün OHSS grubu içinde yer aldığı tesbit edildi. PCOS, OHSS ile ACE genotip ilişkisini belirlemede sonuçları etkileyebileceği için bu hastalar çıkarıldıktan sonra genotip tekrar değerlendirildi (Tablo 6). OHSS grubunda PCOS'u olmayan hastalarda genotipin DD olma olasılığı, kontrol grubuna göre 2,73 kat daha yüksektir (OR:2,73 %95 Güven Sınırı, 0,74-9,99). Bu oran, tüm hastalar incelendiğindeki orana göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Tartışma

ACE seviyesi bireyler arasında farklılık gösterir ve bu farklılık, ACE DNA polimorfizmi ile belirlenir. Bu çalışmada OHSS patogenezinde ACE geni insersiyon/delesyon polimorfizminin etkisi araştırılmıştır. Bizim bilgimize göre, bu çalışma, literatürde OHSS'li hastalarda ACE geni üzerinde yapılmış tek çalışmadır.

Serum östradiol seviyesi yüksek olan hastalarda OHSS gelişme insidansı artar. Şiddetli OHSS riski, östradiol konsantrasyonu 3000-3999 pg/mL olan hastalarda %1, 4000 pg/mL'den yüksek olduğu olgularda ise %5,9'dür [19]. Çalışmada kontrol ve OHSS grubu, yüksek östradiol (>3000 pg/mL) seviyesine ulaşan hastalardan oluştuğu için, çalışmaya dahil edilen tüm hastalar OHSS için yüksek riskli hastalardır. Yüksek östradiol seviyesi açısından eşit riske sahip bu hastaların, bir kısmında

Tablo 5.a: DD genotipi olanlar ile DD genotipi olmayanların özelliklerinin karşılaştırılması

	ACE Genotipi		p
	II + ID (n=30)	DD (n=17)	
Yaş	29,1±4,9	29,4±5,0	>0,05
İnfertilite süresi (yıl)	6,5±3,9	6,8±4,4	>0,05
Total gonadotropin dozu (IU)	2605,4±867,1	2705,9±1108,3	>0,05
Stimulasyon süresi (gün)	11,9±2,5	11,7±1,2	>0,05
Folikül sayısı	20,4±6,5	21,9±7,7	>0,05
Endometriyum kalınlığı (mm)	10,1±1,6	10,8±1,4	>0,05

veriler ortalama±S.D. (standard deviasyon) olarak verilmiştir.

Tablo 5.b: Kontrol ve OHSS grubunda DD genotipi olanlar ile DD genotipi olmayanların özelliklerinin karşılaştırılması

	Kontrol		p	OHSS		p
	II + ID n: 17	DD n: 8		II + ID n: 13	DD n: 9	
Yaş	28,8±4,6	30,7±5,9	>0,05	29,62±5,4	28,2±4,0	>0,05
İnfertilite süresi (yıl)	6,1±3,4	6,2±3,5	>0,05	7,1±4,6	7,3±5,2	>0,05
Total gonadotropin dozu (IU)	2866,2±1010,4	2718,7±792,9	>0,05	2264,4±483,4	2694,4±1380,7	>0,05
Stimulasyon süresi (gün)	12,0±1,8	11,6±1,2	>0,05	11,8±3,3	11,8±1,2	>0,05
Folikül sayısı	17,6±4,7	15,8±2,6	>0,05	24,0±7,0	27,3±6,6	>0,05
Endometriyum kalınlığı (mm)	10,1±1,5	10,5 ± 15	>0,05	10,1±1,7	10,9±1,2	>0,05

veriler ortalama±S.D. (standard deviasyon) olarak verilmiştir.

Tablo 6. Kontrol ve OHSS grubunda, ACE genotip sıklığı (PCOS'lu hastalar çıkarıldıktan sonra)

	ACE Genotipi					
	DD		ID		II	
	n	%	n	%	n	%
Kontrol (n:25)	8	32,0	11	44,0	6	24,0
OHSS (n: 22)	9	56,3	4	25,0	3	18,8

p>0,05

OHSS semptom ve bulguları gelişmesine rağmen , bir kısmında ise OHSS semptomları gelişmemiştir. Çalışmada ana hedef, bu farkın oluşmasında ACE gen polimorfizminin etkisi olup olmadığını ortaya koymaktır.

Ovulasyon sırasında artmış vaskülarite, ve buna ek olarak artmış kapiller geçirgenlik, foliküldeki angiogenik cevabın önemli bir parçasıdır. Ayrıca, ovulasyon indüksiyonunun neden olduğu ovaryan hiperstimulasyonun karaciğer histopatolojisi ve fonksiyonları üzerine olumsuz etkisi gösterilmiştir [20]. Foliküler sıvıda bulunan yüksek prorenin, yüksek plazma renin aktivitesi, anjiotensin II, ve anjiotensin dönüştürücü enzim, renin-anjiotensin sisteminin OHSS patofizyolojisinde rol alabileceğini düşündürür [21-24]. Overin renin-anjiotensin sisteminin bütün elemanlarını içerdiği gösterilmiştir [22, 25, 26]. Overde, prorenin üretimi, renin ve ACE varlığı tanımlanmıştır. Korpus luteumda, foliküllerin stromal ve teka hücrelerinde anjiotensin II tesbit edilmiştir. Anjiotensin II'nin foliküler konsantrasyonu plasmadaki konsantrasyonunun 10 katıdır ve renin konsantrasyonu ile ilişkilidir. Foliküler sıvıdaki anjiotensin II seviyesi, gonadotropinler ile stimüle edilen sikluslarda anlamlı derecede yükselir [24, 25]. Periovulatuvar periodda peritoneal sıvıda anjiotensin II seviyesi artar [27]. Anjiotensin II tansiyon yapıcı etkileri yanında , steroidogenezi artırır, prostaglandin sentezine aracılık yapar, angiogenezi başlatır, ve vasküler permeabiliteyi artırır [22, 28, 29]. Anjiotensin II muhtemelen VEGF gibi diğer maddelerle etkileşim içindedir. Anjiotensin II'deki artış, asit formasyonunda primer faktör olmasa da, asitin devamında rol alabilir [29].

ACE, kan basıncını regüle eden renin-anjiotensin sisteminin enzimidir. ACE'nin fonksiyonu anjiotesin-I'i anjiotensin-II'ye

dönüştürür. Sağlıklı bir kişide tekrarlayan ölçümlerde değişmeyen ACE değerleri tesbit edilse de plazma ACE seviyesinin bireyden bireye büyük farklılık gösterdiği tesbit edilmiştir [16]. Bu farklılığın nedeni, genetik etkiden kaynaklanır. Plazma ACE seviyesi, ACE geninin genetik kontrolü altındadır ve ACE DNA polimorfizmi ile belirlenir. D alleli için homozigot olan bireyler, I alleli için homozigot olan bireylerle karşılaştırıldığında 2 kat daha fazla ACE seviyesine sahiptirler. Bu bireylerde anjiotensin II seviyesi diğer genotiplere sahip bireylere göre daha yüksektir [16, 30, 31]. ACE DD polimorfizmine sahip bireylerde ACE aktivitesi daha yüksek olacağı için daha yüksek anjiotensin II seviyesi elde edilir. Anjiotensin II, yukarıda da bahsedildiği gibi neovaskülarizasyon ve vasküler permeabiliteyi ve kapiller hidrostatik basıncı artırarak OHSS'nin klinik bulgularını oluşturma yeteneğine sahip olabilir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, öne sürdüğümüz OHSS grubunda delesyon için homozigot genotipinin daha sık görüleceği iddiası gerçekleşmiş ve DD genotipi OHSS grubunda, kontrol grubuna göre 1,47 kat daha yüksek bulunmuştur. OHSS grubunda D allel frekansı, kontrol grubundaki D allel frekansından yüksektir. Fakat iki grup arasındaki genotip ve allel frekans farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Göreceli olarak hasta grubunun sayıca az olması istatistiksel anlamlılığı olumsuz etkiliyor olabilir.

OHSS grubunda ACE/DD genotip frekansı %40,9, kontrol grubunda ise %32,0'dır. Jia ve ark.'nın [32], yaptıkları meta-analiz çalışmasında ACE gen polimorfizmi ile PCOS ilişkisi gösterildiği ve PCOS varlığı OHSS için risk faktörü olması sebebiyle bu hastaların sonuç üzerindeki etkisini ortadan kaldırmak için, PCOS hasta verileri çıkarılarak istatistiksel

analizi tekrarlandığında, OHSS grubunda ACE/DD oranı %56,3'e yükselmesine rağmen aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. PCOS hastaları çıkarılarak yapılan analizlerde de iki grup (OHSS-Kontrol), DD genotipinde olanlar ve olmayanlar (II+ID) ile karşılaştırıldığında da anlamlı sonuç elde edilmemiştir.

ACE gen polimorfizmi, ACE ekspresyonunu etkileyen tek faktördür fakat serum ACE düzeylerindeki farklılığın %47'sinden sorumludur [16]. Fakat diğer genetik veya çevresel faktörler ACE düzeylerini etkileyebilir. OHSS'ye neden olan mediatör net olarak bilinmediği için birçok çevresel faktöre bağımlı olarak iki grup arasındaki sonuç anlamsız olmuş olabilir. Burada dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta da Renin-Anjiotensin sisteminin OHSS patogenezindeki rolünün henüz literatürde net olarak kanıtlanmış olmamasıdır.

Çalışmamız sonucunda OHSS ve kontrol grupları arasında ACE/DD genotip oranının farklı olmadığını bulmuş olmamız, ACE aktivitesinin OHSS patogenezinde rol almadığını düşündürmektedir. Fakat yukarıda da anlatıldığı üzere renin-anjiotensin sistemi overde etkin rol oynamaktadır. Çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olması elde ettiğimiz sonucun gücünü azaltmaktadır.

OHSS'li hastaların asit mayilerinde yüksek prorenin ve anjiotensin II konsantrasyonu tesbit edilmiş olsa da, artmış plasma renin aktivitesi muhtemelen vazodilasyona sekonder olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur [33]. Balasch ve ark. [34] OHSS'de Renin-Anjiotensin sisteminin aktivasyonunun primer patolojik olaydan daha çok hemostatik dengeyi sağlamak için (sekonder) meydana geldiğini belirtmişler ve prorenin-renin ve anjiotensin artışını vasküler sıvı dinamiğinin değişmesine bağlı fizyolojik bir olay olduğunu savunmuşlardır.

Çalışmamızın kısıtlılıkları mevcuttur. Çalışmanın göreceli olarak az sayıda hastayı içermesi araştırmanın gücünü azaltmaktadır. Çalışmanın sadece hastaların gen polimorfizmi değerlendirilerek yapılmış olması ve hastaların plasma anjiotensin seviyesinin eş zamanlı olarak ölçülmemiş olması ve bu değerlerin ACE gen aktivitesi ile karşılaştırılmaması çalışmamızın ikinci kısıtlılığı olarak kabul

edilebilir. Buna karşın, OHSS'li hastalarda ACE geni polimorfizminin daha önce çalışılmamış olması çalışmamızı ilginç kılmaktadır.

Sonuç olarak; çalışmada OHSS için yüksek riskli hastalarda ACE gen insersiyon/delesyon polimorfizmi çalışılmıştır. Daha yüksek ACE aktivitesine sahip DD genotipi oranı OHSS ve kontrol grubunda farklı değildir. OHSS patogenezinde etken faktör halen net olarak belli değildir. Çalışmamız sonucunda da elde edilen bulgularla renin-anjiotensin sisteminin OHSS'de aktive olmasının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu yanıtızsız kalmış olmakla birlikte, renin-anjiotensin sisteminin son ürünü oluşturan enzimin (ACE) genotipinin OHSS gelişiminde etkili olmadığı tesbit edilmiştir.

Çıkar İlişkisi: Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

Teşekkür

Çalışmanın yayın aşamasından önce aramızdan ayrılan Sayın Prof. Dr. Gülşen Vardar'ı, çalışma sırasında sağlamış olduğu olanaklar ve her konudaki desteği için şükran ve saygı ile anıyorum. Laboratuvar çalışmalarının gerçekleştirilmesini sağlayan Sayın Dr. Halil Karabulut'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından maddi destek sağlanmıştır (Proje Kodu: 2001-08-10-052).

Kaynaklar

1. Delvigne A, Rozenberg S. Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). Hum Reprod Update 2003;9:77-96.
2. Kumar P, Sait SF, Sharma A, Kumar M. Ovarian hyperstimulation syndrome. J Hum Reprod Sci 2011;4:70-75.
3. Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. Fertil Steril 1978;30:255-268.
4. Golan A, Ron-el R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. Obstet Gynecol Surv 1989;44:430-440.
5. Golan A, Weissman A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. a modern classification of OHSS. Reprod Biomed Online 2009;19:28-32.

6. Jenkins, JM, Drakeley AJ, Mathur RS. The management of ovarian hyperstimulation syndrome. In: Green-top guideline no. 5. London: Royal College of Obstetricians and Gynecologists 2006. reconfirmed 2016. Available at: https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/green-top-guidelines/gtg_5_ohss.pdf. Erişim tarihi 19 Nisan 2018.
7. Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992;58:249-261.
8. McElhinney B, McClure N. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:103-122.
9. Humaidan P, Nelson SM, Devroey P, et al. Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Hum Reprod* 2016;31:1997-2004.
10. Yarali H, Fleige-Zahradka BG, Yuen BH, McComb PF. The ascites in the ovarian hyperstimulation syndrome does not originate from the ovary. *Fertil Steril* 1993;59:657-661.
11. Alataş E. Ovaryan hiperstimulasyon sendromu ve sitokinler. *Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1999;5:26-33.
12. Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev* 2014;81:284-314. doi: 10.1002/mrd.22285
13. Pietrowski D, Szabo L, Sator M, Just A, Egarter C. Ovarian hyperstimulation syndrome is correlated with a reduction of soluble VEGF receptor protein level and a higher amount of VEGF-A. *Hum Reprod* 2012;27:196-199. doi: 10.1093/humrep/der349
14. Soares SR, Gómez R, Simón C, García-Velasco JA, Pellicer A. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update* 2008;14:321-333.
15. Kwik M, Maxwell E. Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016;28:236-241. doi:10.1097/GCO.0000000000000284
16. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-1346.
17. Mamiatis T, Fritsch EF, Sambrook J, Engel J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
18. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993;3:120-121.
19. Jaffe SB, Jaffe LH, Jewelewicz R. Incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome with extremely elevated serum estrogen levels. *Gynecol Obstet Invest* 1993;35:222-227.
20. Alataş E, Alataş O, Kasapoglu E. Effect of ovulation induction on liver histopathology and functions in an experimental model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Med Sci Res* 1995;24:629-630
21. Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, et al. Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1987;48:57-61.
22. Gonçalves PB, Ferreira R, Gasperin B, Oliveira JF. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. *Reproduction* 2012;143:11-20.
23. Ezra Y, Simon A, Yaron A, Laufer N, Navot D. Angiotensin-I-converting enzyme and its correlation with human follicular fluid steroids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;44:71-75.
24. Itskovitz-Eldor J, Kol S, Lewit N, Sealey JE. Ovarian origin of plasma and peritoneal fluid prorenin in early pregnancy and in patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:461-464.
25. Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, Djahanbakhch O. Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Hum Reprod* 1997;12:651-662.
26. Palumbo A, Ávila J, Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system (OVRAS): a major factor in ovarian function and disease. *Reprod Sci* 2016;23:1644-1655.
27. Delbaere A, Bergmann PJ, Gervy-Decoster C, Deschodt-Lanckman M, de Maertelaer V, Englert Y. Periovarian elevation of angiotensin II in the peritoneal fluid during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2810-2815.
28. Fernandez LA, Tarlatzis BC, Rzasca PJ, et al. Renin-like activity in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 1985;44:219-223.
29. Delbaere A, Bergmann PJ, Gervy-Decoster C, Staroukine M, Englert Y. Angiotensin II immunoreactivity is elevated in ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome: implications for pathophysiology and clinical management. *Fertil Steril* 1994;62:731-737.
30. Heiskanen JT, Pirskanen MM, Hiltunen MJ, Mannermaa AJ, Punnonen KR, Heinonen ST. Insertion-deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with obstetric cholestasis but not with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:600-603.
31. Miao HW, Gong H. Correlation of ACE gene deletion/insertion polymorphism and risk of pregnancy-induced hypertension: a meta-analysis based on 10,236 subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015;16:982-994. doi: 10.1177/1470320315588872

32. Jia H, Wang B, Yu L, Jiang Z. Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2013;14:255-262. doi: 10.1177/1470320312452768
33. Balasch J, Arroyo V, Fábregues F, et al. Neurohormonal and hemodynamic changes in severe cases of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Ann Intern Med* 1994;121:27-33.
34. Balasch J, Fábregues F, Arroyo V. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1998;13:2718-2730.