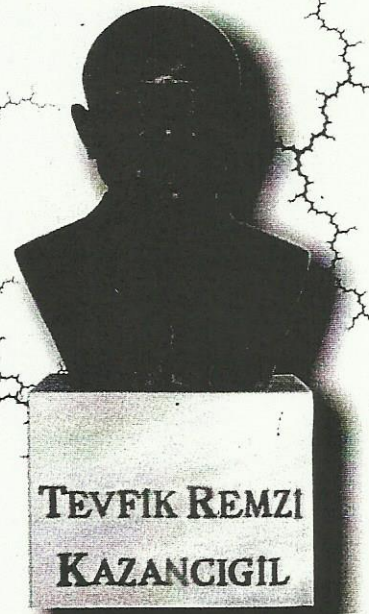
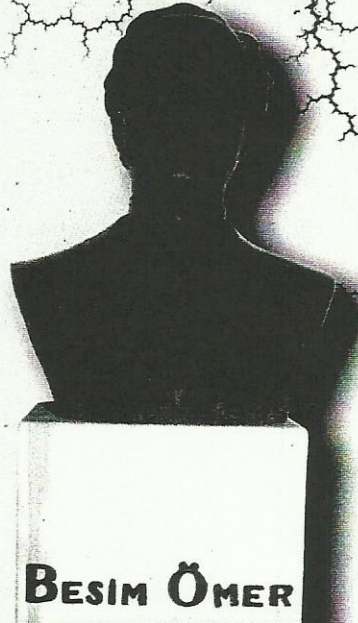




CERRAHPAŞA KADIN-DOĞUM KLİNİĞİ BEŞ YILLIK BİLİMSEL ETKİNLİKLER KİTABI

İSTANBUL UNIVERSITY CERRAHPAŞA
MEDICAL SCHOOL DEPARTMENT OF OBSTETRICS
AND GYNECOLOGY PROCEEDINGS

EDİTÖR
M. FERİDUN AKSU



İSTANBUL UNIVERSITY PRESS

MCMXCIV

MCMXCIX

Farklı (Varyant) Lüteinizan Hormonun Polikistik Over Sendromu Etyolojisindeki Önemi

Koray ELTER*, C. Tamer EREL*, Erdoğan ERTÜNGEALP*,
Mehmet İDİL*, M. Feridun AKSU*

* İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı

GİRİŞ

Lüteinizan hormon (LH), alfa (α)/beta (β) heterodimerlerden meydana gelmiş glikoprotein hormonlar (FSH, hCG, TSH) grubunun bir üyesidir. Bu hormonların α zincirleri aynı, β zincirleri ise farklı yapıdadır.

Günümüzde, serum LH düzeyleri immünolojik yöntemler ile belirlenir. Antikorların kullanıldığı bu yöntemlerle serum LH düzeyini belirleyen sensitif ve spesifik tahliller geliştirilmiştir. Bu tahlillerin zaman içinde gelişmesi ve hassaslaşması ile farklı antikorlar kullanılarak yapılan ölçümlerde değişik sonuçların elde edilmesi şüpheyle karşılanmış ve immünolojik heterojenitenin sebebini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda farklı bir LH'un varlığı belirlenmiştir⁽¹⁾. Lüteinizan hormonu farklı olan hastalarda LH β geninin DNA sıralaması belirlenerek bu farklılıktan sorumlu iki mutasyon saptanmıştır; birinci mutasyonda 8. kodondaki triptofan (Trp; TGG) yerine arjinin (Arg; CGG), ikinci mutasyonda ise 15. kodondaki izolösin (Ile; ATC) yerine treonin (Thr; ACC) geçmektedir. (Trp⁸ \Rightarrow Arg ve Ile¹⁵ \Rightarrow Thr)⁽²⁾. Böylece oluşan LH'a farklı (varyant) LH denmektedir⁽²⁾. Farklı LH'un, in vitro biyoaktivitesinin daha fazla, in vivo yarı ömrünün ise daha kısa olduğu gösterilmiş ve değişik ülkelerdeki sıklığının % 7 ile 42 arasında değiştiği bildirilmiştir^(3, 4).

Bu mutasyonların bulunduğu erkeklerin daha kısa boylu olduğu ve testis hacimlerinin daha küçük olduğu bildirilmesine rağmen kadınlardaki etkileri henüz netlik kazanmamıştır^(2, 3, 5, 6). Farklı LH saptanan kadınların düzensiz adet görmesi ve bu kadınlarda GnRH stimülasyon testine PKOS'ndaki gibi cevap alınması, PKOS ile LH'daki bu mutasyonlar arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür^(2, 6). Yapılan az sayıda çalışmada ise çelişkili sonuçlar bildirilmiştir^(7, 8). Çalışmamızın amacı farklı LH'un PKOS etyolojisindeki önemini belirlemektir.

MATERYAL VE METOD

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na hirsutizm, adet düzensizliği ve infertilite şikayetleri ile başvuran 30 PKOS'lu kadın ve düzenli adet gören 30

1994 - 1999

CERRAHPAŞA
KADIN DOĞUM
(ob/Gyn)

BEŞ YILLIK
BİLİMSEL
ETKİNLİKLER
KİTABI
(Proceedings)

ed. M.F. AKSU

İstanbul Üniversitesi
Basımevi ve
Film Merkezi

• 1999
İstanbul

sağlıklı kadın çalışmaya dahil edildi. Kadınların 3 ay öncesinden herhangi bir hormonal ilaç kullanmadıkları belirlendi. Fizik muayeneleri yapılan kadınlardan BMI'i 25 kg/m²'den yüksek olanlar obez olarak kabul edildi (7), Ferriman Gallwey skoru 8'in üzeri anormal olarak kabul edildi.

Tüm kadınlara erken foliküler fazda (3.-5. günler arası) USG yapıldı. Ultrasonografide polikistik over (PKO) tanısı çok sayıda (<10), küçük (2-8) mm çapında) folikülün, stroma etrafında "inci tanesi" şeklinde çevresel diziliminin ve stromal ekojenite artışının saptanması ile koyuldu (9).

Kadınlardan erken foliküler fazda (3.-5. günler arası) hormonal parametreler ve genetik çalışma için sabah aç karnına venöz kan alındı. Alınan kanlardan serum LH, FSH- Ö₂, PRL, TSH, total testosteron (TT), serbest testosteron (ST), androstenedion (A), DHEAS ve 17OHP düzeyleri ölçüldü.

Kontrol grubundaki kadınlar düzenli adet gören, hirsutizm ve infertilite şikayetleri olmayan, USG'de bilateral overleri normal görünümde olan ve serum androjen düzeyleri normal olan kadınlar arasından seçildi.

Polikistik over sendromu teşhisi (1) oligomenore veya amenore ve/veya kronik anovulasyonun, (2) USG'de bilateral PKO'lerin ve (3) hiperandrojeneminin (yüksek serum TT ve/veya A ve/veya ST) beraber bulunduğu ve hiperandrojenemiye sebep olabilecek diğer hastalıkların (Cushing sendromu, prolaktinoma, geç başlayan konjenital adrenal hiperplazi (GBKAH), tiroid bozuklukları, adrenal ve over kaynaklı tümörler) olmadığı gösterilerek koyuldu (10). Bazal serum 17OHP düzeyi 2 ile 8 ng/mL arasında olan PKOS olgularına, GBKAH'yi dışlamak için ACTH stimülasyon testi yapıldı (11). Cushing sendromu belirtileri olan PKOS olgularına bir gecelik deksametazon supresyon testi yapıldı (10).

GENETİK YÖNTEM

Kadınlardan EDTA'lı tüplere alınan 10 mL kandan DNA izole edildi ve izole edilen DNA'nın LHβ geninin ilgili mutasyonları içeren 660 baz çiftlik (bç) bölümü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı (2). PCR karışımı bir kontaminasyon hazırlandıktan sonra DNA amplifikasyonları Perkin-Elmer Thermal Cycler 480'de 95°C'de 1 dakika, 62°C'de 2 dakika ve 72°C'de 2 dakika protokolünün 35 defa tekrarlanması ile tamamlandı. Çoğaltılan bu bölümde herhangi bir kontaminasyonun olmadığını ve yöntemin çalıştığını göstermek amacıyla amplifikasyon ürünleri % 3'lük agaroz jelde yürütüldü ve jel ultraviyole altında incelendi.

Trp⁸ ⇒ Arg mutasyonu ile Ncol kesim bölgesi ve Ile¹⁵ ⇒ Thr mutasyonu ile FokI kesim bölgesi mutasyona uğradığından RFLP için Ncol ve FokI restriksiyon enzimleri kullanıldı. Kesim ürünleri % 20'lik poliakrilamid jelde yürütüldü, gümüş nitrat ile boyandı ve ilgili mutasyonlar açısından değerlendirildi. Ncol kesimi ile normal LH homozigot olgularda 475, 100 ve 85 bç'lik 3 adet bant oluşmaktadır (2). Nokta mutasyonu ile 8. kodondaki Trp yerine Arg geldiğinde bu enzimin kesim için tanıdığı bölgelerden biri değişeceğinden 185 bç'lik bölüm bölünmemekte, homozigot olgularda 475 ve 185 bç'lik 2 bant oluşurken heterozigot olgularda tüm bantlar gözlenmektedir. FokI enzim kesimi ile normal LH homozigot olgularda 390, 176, 51 ve 43 bç'lik 4 adet bant oluşmaktadır. Onbeşinci kodondaki Ile yerine Thr geldiğinde ise 433 bç'lik bölüm bölünmemekte, homozigot olgularda 433, 176 ve 51 bç'lik 3 bant oluşurken heterozigot olgularda tüm bantlar gözlenmektedir (2).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Normal dağıldıkları Kolmogorov-Smirnov test ile gösterildikten sonra her iki

gruptaki kadınların yaş, BMI ve serum hormon değerleri student-t testi ile karşılaştırıldı. Her iki gruptaki mutasyon sıklıkları ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Farklı LH saptanan kadınlarla, sağlıklı ve farklı LH bulunmayan kadınların yaş, BMI ve serum hormon değerleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Farklı LH'u saptamada faydalı olabilecek bir sınır LH seviyesinin belirlenebilmesi için, farklı LH saptanan kadınlarla, sağlıklı ve farklı olabilecek bir sınır LH seviyesinin belirlenebilmesi için, farklı LH saptanan kadınlarla, sağlıklı ve farklı LH bulunmayan kadınların oluşturduğu grupta ROC ("Receiver Operator Characteristic") eğrisi çizildi. En uygun sensitivite ve spesifisiteyi veren değer sınır olarak alındı. Bulunan değer anlamlılığı Fisher'in kesin olasılık testi ile gösterildi ve odds oranı, sensitivite ve spesifisite hesaplandı. Tüm değerler "ortalama \pm SD" olarak ifade edildi. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarındaki olguların demografik ve hormonal verileri tablo 1'de görülmektedir. PKOS olgularının % 90'ında oligo-amenore, % 86'sında hirsutizm, % 77'sinde obezite, % 47'sinde infertilite mevcuttu. Bir (% 3) olguda akantozis nigrikans mevcuttu.

Ncol ve Fokl enzimleri ile yapılan RFLP sonucu PKOS grubundaki bir (% 3) hastada, kontrol grubundaki 5 (% 17) hastada $Trp^8 \Rightarrow Arg$ ve $Ile^{15} \Rightarrow Thr$ mutasyonları saptandı. Gruplar arasında mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). Bu hastalardan kontrol grubundaki biri dışında hepsi homozigottu (% 83). Ayrıca, 6 hastadan sadece kontrol grubundaki biri şişmandı.

Farklı LH saptanan 6 kadın ile LH'u normal yapıda olan 25 sağlıklı kadın yaş, BMI ve hormonal değerleri açısından karşılaştırıldıklarında sadece serum LH düzeyleri anlamlı olarak farklıydı (Tablo 2). Bu gruptaki 31 kadının LH ölçümleri ROC eğrisi ile değerlendirildiğinde 5.1 mIU/mL değerinin sınır alınması ile en uygun sensitivite ve spesifitenin sağlandığı gözlemlendi. Serum LH değeri ≤ 5.1 mIU/mL olan kadınlarda farklı LH bulunma ihtimali diğerlerine göre daha fazlaydı (Odds oranı : 26, % 95 güven aralığı : 2.4-289; $p = 0.004$; sensitivite : % 83; spesifisite : % 84).

TARTIŞMA

İmmünolojik olarak anormal LH'u bulunan sporadik olguların incelenmesi ile farklı LH'dan, LH geninin 8. ve 15. kodonlarındaki iki nokta mutasyonununun sorumlu olduğu gösterilmiştir (2). Farklı LH sıklığının Finlandiya'da % 28, İngiltere'de % 15 olduğu bildirilmiş ve bunun evrensel, yaygın bir DNA polimorfizmi olduğu anlaşılmıştır (3, 7). Daha sonra, Nilsson ve ark. iki immünoflorometrik kit kullanarak farklı LH'un diğer ülkelerdeki sıklığını bildirmişlerdir (4). Bu çalışmada, farklı LH'a Asya ülkelerinde, Avrupa ülkelerine göre daha az rastlandığı gösterilmiştir. Biz çalışmamızda sağlıklı kadınların % 17'sinde farklı LH'a rastladık. Bu sıklık Çin, Tayland ve Japonya'dan bildirilen sıklıklara (sırasıyla % 14, % 13, % 12) benzerdir (4). Henüz ülkemizde farklı LH ile ilgili bir sıklık çalışması yapılmamıştır. Ancak çalışmamız tahmini bir yardımda bulunabilir. Toplumumuzdaki gerçek sıklığı bulmak için erkeklerin de içinde olduğu daha geniş bir toplumu taramak gerekmektedir.

Lüteinizan hormonon PKOS etyolojisindeki önemi bilinmektedir. Farklı LH, biyoaktivitesinin fazlalığına bağlı olarak overlerden androjen sentezini arttırabilir ve PKOS'na sebep olabilir. Gerçekten de PKOS olgularının çoğunda biyoaktif/immünoaktif LH oranının arttığı ve bu artıştan, daha biyoaktif bir LH formunun sorumlu olabileceği fikri, daha farklı LH bulunmadan çok önce ortaya atılmıştır (12, 13).

Çalışmamızda, daha biyoaktif olan bu farklı LH sıklığının PKOS'lu ve sağlıklı kadınlarda benzer olduğunu saptadık. Rajkhowa ve ark. da PKOS'nda sıklığının artmadığını, ancak obez PKOS olgularında daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir (7). Huhtaniemi ve ark. ise PKOS olgularında benzer sonucu elde ederken, obez PKOS olgularında daha az bulunduğunu bildirmişlerdir (8). Olgularımız sınırlı olduğu için farklı LH ile obezite arasındaki ilişkiyi araştıramadık. Fakat, PKOS grubu anlamlı olarak obez olmasına rağmen, bu grupta farklı LH sıklığı anlamlı olmasa da daha düşüktü (Tablo 1). Obez PKOS olgularında

Tablo 1: PKOS ve kontrol gruplarının demografik ve hormonal verileri

	PKOS	Kontrol	p
Yaş (yıl)	25.53±4.57	27.3±4.8	AD
BMI (kg/m ²)	30.67±7.43	24.2±4.41	< 0.001
FSH (mIU/mL)	5.68±1.72	7.22±2.75	0.01
LH (mIU/mL)	12.24±6.86	7.09±3.66	0.001
LH/FSH	2.13±0.97	1.02±0.48	< 0.001
Ö ² (pg/mL)	62.43±43.19	59.08±37.68	AD
PRL (ng/mL)	15.28±9.08	13.39±8.57	AD
TSH (µIU/mL)	1.72±1.22	1.69±1.0	AD
TT (ng/dL)	72.63±31.60	35.67±20.73	< 0.001
ST (pg/mL)	3.47±1.69	1.47±0.66	< 0.001
170HP (ng/mL)	1.3±1.0	0.69±0.48	0.004
A (ng/mL)	1.72±1.07	1.62±0.65	AD
DHEAS (µg/dL)	261.43±102.51	185.81±91.7	0.004

* AD = Anlamlı değil

** Tüm değerler ortalama±SD olarak ifade edilmiştir.

farklı LH sıklığının normal toplumdakinden daha fazla olmadığına inanmaktayız.

Farklı LH saptanan kadınlarla LH'u normal yapıda olan sağlıklı kadınların hormon düzeyleri karşılaştırıldığında, sadece serum LH düzeylerinde fark gözlemlendi. Diğer hormon değerlerinin benzer olması, bu mutasyonların hiperandrojene miye sebep olmadığı görüşünü desteklemektedir. Az sayıda kitin farklı LH'u saptadığı bilindiğinden, LH'un anlamlı olarak farklı olması, kullandığımız LH kitinin farklı LH'u ölçmemesine bağlanabilir (1).

Çalışmamızın amacı olmayan, ancak çalışmamızın yapıldığı sırada saptadığımız ve tartışılması gereken bir diğer konu ise, farklı LH'u saptayamayan kitler kullanıldığında karşımıza çıkabilecek problemlerdir. Kontrol grubundaki 30 kadının ve PKOS grubunda farklı LH saptanan bir kadının serum LH değerlerini kullanarak bir ROC eğrisi çizdik ve bir sınır değeri elde ettik. Klinikte, örneğin, ovulasyon indüksiyonu yaparken serum LH düzeyleri ile takip edeceğimiz kadınlardan, LH'u mutant olanlarda LH artışı anlaşılabilir. Erken foliküler fazdaki serum LH düzeyinin ≤ 5.1 mIU/mL olması bizi farklı LH'un varlığı açısından uyaracak ve genetik incelemeye yöneltecektir. Böylece elimizdeki farklı LH'u ölçemeyen kit ve sistemleri değiştirmeden, belki de daha ucuz ve kesin

şekilde farklı LH bulunan kadınlar anlaşılabilir. Ancak, bu değerlerin onaylanması ve desteklenmesi için daha geniş serilerle çalışmalar yapılmalıdır veya doğal LH yanında farklı LH'ü saptayabilen kitlerin yaygınlaştırılması sağlanmalıdır.

Tablo 2 : Farklı LH saptanan kadınlarla, farklı LH bulunmayan sağlıklı kadınların demografik ve hormonal verileri

	Varyant LH- (n = 25)	Varyant LH+ (n = 6)	p
Yaş (yıl)	27.80±4.34	23.67±6.19	AD
BMI (kg/m ²)	24.48±4.02	22.51±5.79	AD
FSH (mIU/mL)	7.56±2.82	5.61±1.48	AD
LH (mIU/mL)	7.86±3.50	4.70±3.77	0.003
LH/FSH	1.10±0.48	0.85±0.59	AD
Ö ² (pg/mL)	54.05±26.89	96.32±69.87	AD
PRL (ng/mL)	13.29±7.49	15.87±13.45	AD
TSH (µIU/mL)	1.68±1.04	1.87±0.86	AD
TT (ng/dL)	35.84±19.48	38.0±27.04	AD
ST (pg/mL)	1.41±0.67	2.15±1.09	AD
170HP (ng/mL)	0.61±0.41	1.05±0.61	AD
A (ng/mL)	1.57±0.64	2.04±0.76	AD
DHEAS (µg/dL)	178.52±89.39	256.38±125.72	AD

* AD = Anlamlı değil

** Tüm değerler ortalama±SD olarak ifade edilmiştir.

Sonuç olarak; (1) Çalışmamızdaki sağlıklı kadınlar arasında farklı LH sıklığı % 17 idi, (2) PKOS'lu kadınlardaki farklı LH sıklığı toplumdakine benzerdir. Farklı LH bulunan olguların serum androjen seviyeleri de normal toplumdakine benzer olduğundan PKOS etyolojisinde ve hiperandrojenemide farklı LH'un rolü yoktur, (3) Erken floiküler fazdaki serum LH düzeyi ≤ 5.1 mIU/mL olan kadınlarda farklı LH bulunma riski daha fazladır ve bu kadınlar genetik olarak farklı LH açısından araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Pettersson K, Soderholm JR:** Individual differences in lutropin immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies. Clin Chem 37:333-340; 1991.
2. **Furui K, Suganuma N, Tsukahara S. et al:** Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) b-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. J Clin Endocrinol Metab 78:107-113, 1994.
3. **Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, Virkamäki A, Huhtaniemi :** Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. J Clin Endocrinol Metab, 80:1257-1263, 1995.
4. **Nilsson C, Pettersson K, Millar RP et al:** Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone : an international collaborative research. Fertil Steril. 67:998-1004, 1997.

1994 - 1999

CERRAHPAŞA
KADIN DOĞUM
(ob/Gyn)

BEŞ YILLIK
BİLİMSEL
ETKİNLİKLER
KİTABI
(Proceedings)

ed. M.F. AKSU

İstanbul Üniversitesi
Basımevi ve
Film Merkezi

• 1999
İstanbul

5. Raivio T, Huhtaniemi I, Anttila R et al: The role of luteinizing hormone β gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:3278-3282; 1996.
6. Sukanuma N, Frui K, Furuhashi M, Asada Y, Kikkawa F, Tomoda Y: Screening of the mutations in luteinizing hormone beta-subunit in patients with menstrual disorders. *Fertil Steril.* 63:989-995, 1995.
7. Rajkhowa M, Talbot JA, Jones PW et al: Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 43:297-303, 1995.
8. Huhtaniemi I, Pettersson K, Haavisto AM, Anttila L, Jaatinen T, Irala K: A variant of luteinizing hormone due to polymorphism in its β -subunit gene occurs with normal frequency in nonobese, but is underrepresented in obese patients with polycystic ovarian syndrome. *Eur J Endocrinol.* 130 (Suppl 2), abstr. S17.04; 1994.
9. Adams J, Polson DW, Franks S: Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J* 293:355-359; 1986.
10. Rittmaster RS: Hyperandrogenism. In : copeland LJ, Jarrell JF, McGregor =JA (Eds): *Textbook of gynecology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, First ed. 414, 1993.
11. Speroff L, Glass RH, Kase NG: Hirsutism. In : Speroff L, Glass RH, Kase NG (eds): *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Williams & Wilkins, Baltimore, Fifth ed. 483, 1994.
12. Lobo RA, Shoupe D, Chang SP, Campeau J: The control of bioactive luteinizing hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 148:423-428; 1984.
13. Reader SC, Robertson WR, Diczfalusy E: Microheterogeneity of luteinizing hormone in pituitary glands from women of pre-and postmenopausal age. *Clin Endocrinol (Oxf)* 19:355-363; 1983.s