

MULTİPL SKLEROZDA HLA DOKU ANTİJENLERİ

Yaşar Zorlu*, Fadime Güven**, Serdar Kesken*, Füsün Karaaslan***, Halis Gügül**

Nedeni kesin olarak bilinmeyen multipl sklerozun (MS), myelin kılıfdaki antijen ya da antijenlere karşı T hücrelerinin aracı olduğu otoimmün bir hastalık olduğuna ve de poligenik bir kontrolün söz konusu olduğuna inanılır. Bu nedenle çalışmalar majör histokompatibilite kompleksi (MCH) ile kodlanan insan lökosit antijenleri (Human Leucocyte Antigen=HLA) üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada 18 kadın, 22 erkek toplam 40 MS hastasının HLA molekülleri 891 sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı. HLA sınıf I ve sınıf II antijenleri lenfositotoksitate yöntemi ile saptandı. HLA sınıf I antijenlerinden; HLA-A24, HLA-B38, B51, B44 de, HLA sınıf II antijenlerinden; HLA-DR2 ve DR4, HLA-DQ1, DQ8 ve DQ7 de MS grubunda anlamlı ölçüde artma saptandı. Sonuçlar ülkemizde yapılan benzeri çalışmalar ve literatür bilgileri ışığında tartışıldı.

Anabtar sözcükler: Multipl skleroz , HLA sınıf I ve sınıf II antijenleri

HLA tissue antigens in multiple sclerosis

The cause of multiple sclerosis (MS) remains uncertain but it is currently widely believed that a T cell-mediated autoimmune response directed at myelin antigens is responsible. For this reason studies are concantrated on the human leukocyte antigens (HLA) which are coded with major histocompatibility complex (MCH). In this study HLA types of 18 female, 22 male, total 40 patients and 891 healthy controls were determined by the lymphocytotoxicity method. In class I antigens; HLA-A2, HLA B38, B51, B44 and in HLA class II antigens; HLA DR2 and DR4, HLA DQ1, DQ8, DQ7 were significantly increased in MS patients. Results were discussed.

Key Words : Multiple Sclerosis, HLA Class I and Class II antigens

Multipl Sklerozun (MS) nedeni henüz bilinmemektedir. Miyelin kılıfındaki antijen ya da antijenlere T hücrelerinin aracı olduğu otoimmün bir hastalık olduğuna inanılır. MS etyolojisine yönelik çalışmalara bakıldığında ilk kez 1896'da Eichhorst'un genetik geçişe dikkati çektiği görülmekte ise de bu yöndeki yoğun çalışmalar son 10 yıldadır (19). MS başlangıç yaşının, klinik tablonun ve klinik seyrinin farklılıklar göstermesi bazı coğrafik bölgelerde prevelansının yüksek olması genetik yakınlık yanında çevresel tetikleyici faktörlerin varlığını da hep gündemde tutmuştur.

Bugün için kabul edilen MS'e yakınlığın poligenik kontrol altında olduğudur. Çalışmaların dikkatini de yoğun olarak HLA antijenleri çekmektedir. İmmünglobülin sabit ve değişken bölge genleri ve de kompleman lo-

kusları, üzerinde çalışılan diğer önemli bölgelerdir. MS ile en sıkı ilişki majör histokompatibilite kompleksi (Major Histocompatibility Complex=MCH) tarafından kodlanan HLA antijenleri arasında olduğu düşünülmektedir. Otoimmün reaksiyonun başlangıcında T hücrelerine antijen sunan HLA sınıf I moleküllü CD8'dir. Sınıf II molekülleri ise antijen sunan hücreler de bulunur ve antijeni CD4 tipi helper lenfositlere sunar. İmmün yanıtta hedefde miyelin basic protein (MBP) veya proteolipid protein (PLP) gibi miyelin antijenleridir (7,9,23). MS ile HLA sınıf I ve sınıf II antijenleri arasındaki ilişki, incelenen topluluklar arasındaki farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (1). Değişik etnik kökenli kişilerin yaşadığı ülkemiz coğrafyasında bölgeler arasında bile farklılık olabileceğini düşündüğümüzden MS polikliniğimizce izlenen ve Poser kriterlerine göre kesin MS tanısı almış olan 40 hastanın HLA sınıf I (HLA-A,B,C) ve sınıf II (HLA-DR,DQ) antijenlerini saptadık. MS'li hasta ve sağlıklı bireylerin sonuçlarını ülkemizde daha önce yapılan çalışmalar ve literatür bilgileri ile birlikte değerlendirdik.

* Uzman Dr., SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Nöroloji Kliniği

** Araştırma Gör. Dr. SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Nöroloji Kliniği

*** Uzman Dr. SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Biokimya Bölümü, Doku Tiplendirme Laboratuvarı, İzmir

GEREÇ VE YÖNTEM:

MS grubu MS polikliniğimizde izlenen ve Poser kriterlerine göre kesin MS tanısı almış 18 kadın, 22 erkek toplam 40 hasta idi (21). Hastaların yaş ortalaması 33.6, hastalık süresi ise 6.4 ± 0.8 yıldır. Kurtzke Expanded Disability Status Scala (EDSS) düzey ortalaması 3.8 (0.5-8) dir. Hastaların 37'si RR (Relapsing Remittan), 2'si PP (Primer Progressive) ve 1'i SP (Sekonder Progressive) gidiş göstermekteydi. Hastanemiz doku tiplendirme laboratuvarında organ donörü olarak incelenen sağlıklı 891 kişinin sonuçları da kontrol grubunu oluşturdu (14).

Doku gruplarının tayininde mikrolenfositotoksosite yöntemi kullanıldı. Periferik venden heparinli tüpe alınan 10 ml kan 5 ml lenfoprep solüsyonu üzerine tabakalandırıldı, 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan hücreler 3 kez fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Elde edilen lenfositlerden 1 ml'si hazır HLA antiserum plaklarına (Biotest 2x60 Well Trays Anti-HLA) kondu, 30 dakika oda ısısında beklendi, 5 ml kompleman ilave edilerek 1 saat daha beklendi. Takiben floresan boya (aktidin orange-merk lot 3535031) ile boyama yapıldı.

Sınıf II antijenlerinin tayininde de yine mikrolenfositotoksosite yöntemi kullanıldı. Ancak B hücrelerinden zengin hücre topluluğu elde edebilmek için başlangıçta santrifüj edilmiş kan örneğine CD19'u tanıyan antikorlarla kaplı (buffy coat) manyetik boncuklardan 4×10 boncuk/ml ve PBS eklenerek 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Tüpe iliştirilen bir mıknatıs ile inkübasyon 5 dakika daha sürdürüldü ve boncukların tüp duvarına tutunması sağlandı. Tüp içi iki kez PBS eklenerek yıkandı. Son yıkama sonunda tüp de B lenfositden zengin hücre topluluğu elde edildi. Bu çözeltiden 1 ml HLA antiserum plaklarına konarak sınıf I antijen tayininde kullanılan basamaklar tekrarlandı.

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen sonuçlar, BINOM testi kullanılarak P değerleri elde edildi. P'nin 0.05'den küçük olması anlamlı kabul edildi. İzlenen gruplar için görece risk (Relative Risk=RR) hesaplanarak antijenin varlığının hastalık riskini artırma katsayısı gösterilmeye çalışıldı.

BULGULAR

Serolojik yöntem ile saptanan 40 multipl sklerozlu hasta ve 891 sağlıklı donörün sınıf I antijenlerinin dağılımı (HLA A ve B) tablo 1 ve 2 de, Sınıf II antijenlerinin (HLA DR ve DQ) dağılımı da tablo 3 ve 4 de sunulmuştur.

Sınıf I antijenlerinden HLA-A antijenleri arasında en anlamlı fazlalık HLA-A24 ($p=5.5 \cdot 10^{-6}$, $RR= 4.16$) de gözlemlendi. A9, A2, A11, A3 ve A28 MS'li hasta popülasyonunda

normal gruba oranla anlamlı ölçüde az idi. HLA-B grubu antijenlerinden MS'li grupta B38 ($p=6.24 \cdot 10^{-6}$, $RR=9.78$), B51 ($p= 4.08 \cdot 10^{-4}$, $RR=3.72$), B44 ($p=1.004 \cdot 10^{-3}$, $RR=4.40$) anlamlı ölçüde yüksek bulundu. Normal popülasyonda % 33.3 sıklıkla rastlanan B5 MS'li hasta grubunda hiç görülmeydi.

Sınıf II antijenlerinden HLA-DR grubunda DR51'in ($p=1.02 \cdot 10^{-7}$, $RR=7.80$) MS'li hasta grubunda görülme oranındaki yükseklik en anlamlı idi. Yine DR53 ($p= 2.2 \cdot 10^{-4}$, $RR=3.18$), DR13 ($p= 0.01$, $RR=3.01$) ve DR11 ($p= 0.015$, $RR=1.86$) normal popülasyona kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulundu. Sınıf II antijenlerinden HLA-DQ' ları tüm MS'li hastalarımıza karşın 350 sağlıklı hastada çalışabildik. İstatistiksel yöntemi de bu rakamlara göre uyguladık. HLA-DQ grublarında MS'li hastalarda DQ1 ($p=0.02$, $RR=1.93$), DQ8 ($p=3.07 \cdot 10^{-3}$, $RR=5.49$) ve DQ7 ($p=0.03$, $RR=1.84$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Normal popülasyonda %11.7 görülen DQ3'e ise MS'li popülasyonda hiç rastlanmadı.

TARTIŞMA

Genetik olarak yatkın kişilerde eksojen çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıktığı düşünülen MS'in immünopatogenezi halen açıklık kazanmamıştır. MS'e yatkınlığı etkileyen genetik lokusu açıklamak için yapılan çalışmalar; MCH, immünglobülinin sabit ve değişken bölge genleri ve kompleman lokuslarına yöneliktir. MS ile en sıkı bağlantı HLA ile bulunmuştur. HLA ile MS arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar incelendiğinde topluluklar arasında farklı sonuçlar saptandığı görülür. Tekrarlanan benzeri çalışmaların giderek daha geniş MS'li hasta grubunu kapsayacağı ve ülkemiz açısından daha anlamlı verilere ulaşacağımızı düşünerek kendi hasta grubumuzda bu çalışmayı planladık.

HLA sınıf I antijenlerini içeren çalışmalardan Kuzey Avrupa ülkelerinde yapılan da, MS' in HLA-A3 ve B7 ile bağlantısı gösterilmiştir (24). Yine aynı bağlantı Kuzey Avrupa'dan, Kuzey Amerika ve Güney Batı Avustralya'ya göç edenler arasında da görülmektedir (22). Orknay adaları MS insidansının yüksek olduğu bir bölgedir. Burada yapılan bir çalışmada HLA-B7 ve HLA-DR2 hem MS hastalarında hem de sağlıklı kontrollerde yüksek oranda saptanmış ancak arada anlamlı bir fark bulunamamıştır (2). Siyah ırktan Amerikalılarda HLA-A3 (4), Hintlilerde HLA-B12 (25). İranlılarda HLA-B7 (17), Yunanlılarda HLA-A3 ve B7 (8), İspanyollarda HLA-B18 (6) antijenlerinin MS ile birlikteliği siktir.

İdiman ve arkadaşlarının 100 MS hastasında lenfositotoksosite metoduyla yaptıkları HLA sınıf I antijen çalışmalarında HLA-A1 ve B8 antijeninin kontrol grubuna

MS'li hasta ve sağlıklı kontrollerde

Tablo-1: HLA-A antijenlerinin dağılımı (%)

	MS	Normal	RR*
A2	37.5	59.2	
A24	35.0	11.5	4.16
A1	20.0	17.3	
A3	20.0	39.8	
A26	12.5	8.7	
A11	10.0	24.2	
A28	7.5	26.7	
A30	7.5	14.5	
A25	7.5	4.5	1.72
A9	0	67.7	

Tablo-2: HLA-B antijenlerinin dağılımı (%)

	MS	Normal	RR*
B35	35.0	24.4	1.67
B51	20.0	6.3	3.72
B44	12.5	3.2	4.40
B18	12.5	6.8	1.97
B7	10.0	6.2	1.68
B38	10.0	1.2	9.78
B8	7.5	8.3	
B14	7.5	4.7	1.68
B40	7.5	8.2	
B5	0	33.3	

Tablo-3: HLA-DR antijenlerinin dağılımı (%)

	MS	Normal	RR*
DR52	65.0	75.85	
DR53	37.5	15.82	3.18
DR11	35.0	20.58	1.86
DR15(2)	30.0	24.66	
DR4	25.0	30.10	
DR51	20.0	3.06	7.80
DR13	15.0	5.78	3.01
DR17(3)	10.0	17.18	
DR7	7.5	22.45	
DR1	7.5	13.95	
DR2	2.5	24.66	

Tablo 4: HLA-DQ antijenlerinin dağılımı (%)

	MS	Normal	RR*
DQ1	57.5	41.4	1.93
DQ7	47.5	32.8	1.84
DQ2	20.0	15.4	1.37
DQ5	10.0	6.8	1.50
DQ8	10.0	2.2	5.49
DQ4	5.0	2.8	
DQ6	2.5	1.7	
DQ9	2.5	0.0	
DQ3	0	11.7	

*: Relatif risk

oranla daha yüksek olduğunu saptamışlardır (13). Aynı yöntem ile aynı bölgede yaptığımız çalışmada HLA-A24'ü ($p=5.5.10^{-6}$, $RR=4.16$) normal grubumuzdan yüksek olduğunu saptadık, HLA-B grup antijenlerinden HLA-B38 ($p=6.24.10^{-6}$, $RR=9.78$), B44, B51 in MS'li hasta grubunda görülme oranı normal popülasyondan anlamlı oranda fazla bulundu.

MS ile esas bağlantının sınıf II antijenleri ile olduğu düşüncesinin yaygınlaşmasından sonra çalışmaların ağırlığı bu yöne kaymıştır. Bir çok çalışmada dikkat HLA-DR2'ye çekilmiştir. Avrupa ve Kuzey Amerika da yaşayan MS'li hasta gruplarında HLA-DR2'nin sıklığına ve MS için $RR=3.5$ 'a kadar yükseldiğine dikkat çekilmiştir (10,11,16). Japonlarda HLA-DR2 ve DR4 (20), Ürdün Araplarında (15) ve Sardinya adasında HLA-DR4'ün (18) MS ile birlikteliğinin sıklığı saptanmıştır. Direskeneli ve arkadaşları 101 MS hastası ve 100 sağlıklı kontrol ile yaptıkları doku grubu çalışmasında HLA-DR2'nin alt grubunu oluşturan HLA-DR15 ve HLA-DR4'ü hasta grubunda anlamlı oranda

yüksek saptamışlar, ülkemizde Akdeniz ülkelerinde bulunan MS-HLA-DR4 bağlantısı ile Avrupalılarda bildirilen MS-HLA-DR2 bağlantısının birlikte bulunduğu dikkati çekmişlerdir (3). İdman ve arkadaşları da MS ile HLA-DR2 nin bağlantısını göstermişlerdir (13).

MS'li hasta grubunda en anlamlı yüksekliği HLA-DR 51'de (% 20'ye karşı %3.06, $RR=7.80$) bulduk. Yine HLA-DR 15 (2)'nin MS'li hasta grubunda görülme oranı % 30 idi. DR-51 ve DR 15 (2); DR2 nin alt grubu olduğu dikkate alınarak tümü toplu olarak değerlendirildiğinde HLA-DR2 nin MS'li hasta grubunda en sık görülen doku grubu olarak saptadık diyebiliriz. Dikkati çeken bir gruplaşma da HLA-DR53'de oldu (% 37.5'a karşı % 15.82, $RR=3.18$). HLA-DR4'ün alt grubu olan HLA-DR53'deki sayı HLA-DR4 ile birlikte değerlendirildiğinde ikinci sırada en sık görülen doku grubu HLA-DR4 oldu. Bu sonuçlarda ülkemizde daha önce yapılan 2 çalışma ile uyumlu idi. MS'li hasta grubunda ikinci olarak görülen DR53 (% 37.5'e karşı %15.82, $RR=3.18$) aslında DR4'ün alt grubudur. İkisi bir-

likte değerlendirildiğinde DR4 % 62.5 oranı ile en fazla görülen doku antijeni olarak bulunmuştur. Yine MS'li hasta grubunda en anlamlı yüksekliğe sahip HLA-DR5'de (%20'ye karşı %3.06, RR=7.80), DR15 (2) ile birlikte DR2'nin alt grublarıdır. Her 3 grup birlikte değerlendirildiğinde DR2'nin görülme oranı % 52.5 ile ikinci sıklıkla yer almaktadır. Bu sonuç Direskeneli ve arkadaşlarının ülkemizde Akdeniz ülkelerinde görülen MS-HLA-DR4 bağlantısı ile Avrupalılarda görülen MS-HLA-DR2 bağlantısı birlikteliğini destekler niteliktedir.

Antijen sunan hücreler tarafından ortaya çıkarılan HLA sınıf II moleküllerinden DQ'lar üzerine son yıllarda dikkat çekilmiştir. Hillert DQ6'nın tüm dünyada MS'li hastalardaki yaygınlığından söz etmiştir (10,12). Runmaker ve arkadaşları 25 yıl süre ile izledikleri kendi MS'li gruplarında DR15, DQ6'nın çarpıcı yüksekliğini vurgularken prognoza etkinin olmadığını, malign seyirli hastalarında da DQ2'nin daha sık olduğunu belirtmişlerdir (22). Ebers ve arkadaşları Kuzey Avrupa Ülkelerini kapsayan çalışmalarında sınıf II antijenlerinden DR2'nin yanında DQ1'in yaygınlığını vurgulamışlardır (5).

Bizim hasta grubumuzda DQ1, DQ8 ve DQ7 normal popülasyona oranla anlamlı ölçüde fazla idi. Literatürde söz edilen DQ6 (% 2.5'e karşı %1.7) ve DQ2'de (% 20'ye karşı %15.4, RR= 1.37) MS'li hasta grubunda normal popülasyona oranla daha fazla olmasına karşın, bu farklılık istatistiksel anlam taşımıyordu. DQ1'deki yükseklik ise Ebers ve arkadaşlarının Kuzey Avrupa ülkelerini kapsayan sonuçları ile uygunluk gösterdi. Ülkemizde yapılan iki çalışmada DQ tayini yapılmadığından ülkemiz MS popülasyonu ile kıyaslama şansımız olmadı. Sonuç olarak diyebilirizki; değişik etnik kökenli insanların yaşadığı ülkemiz coğrafyasında izlediğimiz 40 MS'li hastada HLA sınıf I antijenlerinden HLA A-24 ve HLA B-38, B51, B44'ü; HLA sınıf II antijenlerinden de HLA DR2 ve DR4'ü ayrıca HLA DQ1, DQ8 ve DQ7'yi normal popülasyona oranla daha sık olduğunu saptadık. Ülkemiz ve dünya literatürü ile olan farklılıkların hasta sayısının azlığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR:

- 1- Batchelar JR, Compston DAS, Mc Donald WI. HLA and multiple sclerosis. In the HLA system. British Medical Bulletin 1978; 34: 279-284
- 2- Compston DAS. Multiple sclerosis in the Orkneys. Lancet 1982; 2: 661-662
- 3- Direskeneli GS, Kurt BB, Örnek İ. Nöropsikiyatri Arşivi 1995; (32)(1): 17-23

- 4- Dupont B, Lisak RP, Jersild C, et al. HLA antigens in black American patients with multiple sclerosis. Transplantation Proceedings 1977; 9: 181-185
- 5- Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility; A critical review. J Neuroimmunology 1994; 54: 1-98
- 6- Gantes M, Gonzales T. HLA-B12 antigen and multiple sclerosis in a Spanish population (Canary Island). Tissue Antigens 1983; 22: 172-173
- 7- Genç KK. Multipl skleroz genetiği. Nörolojik Bilimler Dergisi 1994; 11: 3-4
- 8- Georgaras A, Constantopoulos C, Lygidakis C, et al. HLA antigens and multiple sclerosis in Greeks. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1984; 47: 751-752
- 9- Gorodezky C, Najera B, Rangel BE, et al. Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexican. Human Immunology 1986; 16: 364-374
- 10- Hillert J, Ollerup O. HLA and multiple sclerosis. Neurology 1993; 43: 2426-2427
- 11- Hillert J, Ollerup O. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA DR-DQ subregion on a normal DR15, DQ6, DW2 haplotype. Neurology 1993; 43: 163
- 12- Hillert J. Human leukocyte antigens studies in multiple sclerosis. Ann Neurol 1994; 36:5-7
- 13- İdman E, Gülay Z, Balkan B. XXIX. Ulusal Nöroloji Kongresi özet kitabı. 1993
- 14- Karaaslan F, Çoker I, Sert H. SSK Tepecik Hastanesi doku tiplendirme laboratuvarında 891 olguda HLA dağılımı. SSK Tepecik Hastanesi Dergisi 1994; 4: 20-23
- 15- Kurdi A, Ayesh I, Abdallah A, et al. Different B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis in Arabs and North Europeans. Lancet 1977; 1:1123-1125
- 16- Libalu R, Van Endert PM, Sandberg-Wollheim M, et al. Antigen processing gene polymorphism in HLA-DR2 multiple sclerosis. Neurology 1993; 43: 1192-1197
- 17- Lofti J, Nibkkin B, Derakshani J, et al. HLA in multiple sclerosis in Iran. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1978; 41: 699-701.
- 18- Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, et al. Sardinian multiple sclerosis is associated with HLA-DR4: a serologic and molecules analysis. Neurology 1988; 38: 137-139
- 19- Martin R, Mc Farland HF. Multiple sclerosis: Are HLA class I molecules involved in disease pathogenesis? Ann Neurol 1995; 38: 137-139
- 20- Natio S, Kuroiwa Y, Hoyama T, et al. HLA and Japanese multiple sclerosis. Tissue Antigens 1978; 12:19-24
- 21- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L. New diagnostic criteria for multiple sclerosis guidelines for research protocols. Ann Neurol 1986; 13: 227-231
- 22- Runmaker B, Martinsson T, Wahlstrom J, et al. HLA and prognosis in multiple sclerosis. J Neurol 1994; 241: 385-390
- 23- Schiffer RB, Weitkamp LR, Ford C, et al. A genetic marker and family history study of the upstate New York multiple sclerosis cluster. Neurology 1994; 44: 329-333
- 24- Stewart GJ, Basten A, Guinan J, et al. HLA-DW2 viral immunity and family studies in multiple sclerosis. J Neurol Sci 1977; 32: 153-167
- 25- Wadia NH, Trikinnad VS, Krishnaswamy PR. HLA antigens in multiple sclerosis among Indians. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1981; 44:849-851