

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ



İDİYOPATİK HİRSUTİZMLİ HASTALARDA ÖSTROJEN VE ANDROJEN  
METABOLİZMASINDA GÖREVLİ GENLERİN MRNA  
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI  
TCD-12-4053  
Çok Disiplinli Araştırma Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

PROF. DR. KÜRŞAD ÜNLÜHIZARCI  
Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

**Araştırmacı:**

YRD. DOÇ. DR. SERPİL TAHERİ  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

PROF. DR. MURAT BORLU

Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / Deri ve Zührevi Hastalıkları

PROF. DR. FATİH TANRIVERDİ

Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

PROF. DR. TUNCAY ÖZGÜN

Tıp Fakültesi / Cerrahi Tıp Bilimleri / Kadın Hastalıkları ve Doğum

PROF. DR. MUNİS DÜNDAR

Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / Tıbbi Genetik

DOÇ.DR. ZÜLEYHA CİHAN ÖZDAMAR KARACA

Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

PROF. DR. FAHRETTİN KELEŞTİMUR

Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

*Bu projenin yürütülmesinde Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.*

## İÇİNDEKİLER

### ÖZET

	<u>Sayfa no</u>
1. GİRİŞ.....	4
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	5
3. BULGULAR.....	8
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	8

## ÖZET

**Amaç:** Hırşutizm, hiperandrojenemi ve/veya aşırı androjen cevabının sonucudur. Hırşutizm sebepleri arasında İdiyopatik Hırşutizm (İH) adı verilen androjen fazlalığı göstermeyen bir grup vardır. İdiyopatik Hırşutizm'in patojenezi çok net ortaya konamamıştır.

**Metod:** Aromataz enzimi ve steroidojenik yolda fonksiyonel rol üstlenen diğer enzimlerin mRNA ekspresyonlarını araştırmak amacıyla, İdiyopatik Hırşutizm'li kadınlarda ve sağlıklı kadınlarda subumbilikal bölgeden ve üst koldan cilt biyopsisi yapıldı. Bu çalışmaya İdiyopatik Hırşutizm'li 21 kadın ve 15 sağlıklı kadın çalışmaya dahil edildi. Bu çalışmada İdiyopatik Hırşutizm'li hastaların cilt biyopsileri ile kan örneklerinden, lokal androjen sentezi ve metabolizmasıyla ilişkili genlerin (*CYP11A1*, *STS*, *CYP19A1*, *SRD5A1*, *SRD5A2*, *HSD3B1*, *AR*, *COMT*, *ESR1*, *ESR2*, *HSD3B2*, *CYP17A1*, *SULT2A1*, *SULT1E1*, *HSD17B2*, *IL6*, *TGFBI*, *TNFA*) mRNA ekspresyonları belirlendi.

**Bulgular:** Subumbilikal bölgeden elde edilen deri biyopsilerinde, sağlıklı deneklere kıyasla İdiyopatik Hırşutizm hastalarında sağlıklı kontrollere göre *IL6* geninin mRNA ekspresyon değerleri daha düşük, *steroid sulphatase (STS)* and *Hydroxysteroid (17beta) Dehydrogenase2 (HSD17B2)* genlerinin mRNA ekspresyonları ise daha yüksekti ( $p < 0.001$ ).

**Tartışma:** İH hastalarından alınan umbilikal ve üst kol cilt biyopsilerinde, kontrollere karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı *HSD17B2* ve *STS* mRNA ekspresyonunda artış, *IL6* gen ekspresyonunda ise azalma tespit edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonlarındaki artma ve azalmanın lokal androjen biyosentezini etkileyebileceğini ve aktif androjenlerin miktarında artmaya neden olabileceğini düşünmekteyiz.

## **GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM**

Hirşutizm kadınlarda sık görülen, erkek tipi terminal kılların aşırı büyümesi ile karakterize klinik durumdur. Hirşutizm Polikistik Over Sendromu (PKOS), nonklasik adrenal hiperplazi, adrenal veya over tümörleri gibi sebeplerden kaynaklanabileceği gibi idiyopatik de olabilir (1, 2). İdiyopatik Hirşutizm, normal ovulatuvar fonksiyon ve normal serum androjen seviyeleri ile karakterize hirşutizm olarak tanımlanmaktadır (3). İdiyopatik Hirşutizm'in prevalansı popülasyonlara göre değişkenlik göstermektedir (4-6). İdiyopatik Hirşutizm'in patogenezi açık değildir, artmış periferik 5 $\alpha$  redüktaz aktivitesi (7) ve androjen reseptör gen polimorfizminin (8, 9) patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir.

Normal limitler içinde bulunmasına rağmen, İdiyopatik Hirşutizm hastalarının sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında daha yüksek serum androjen seviyelerine sahip olduğu daha önceden tarafımızdan gösterilmişti. Aynı zamanda aromataz aktivitesi fonksiyonu göstergelerinden östrojen/testosteron oranı İdiyopatik Hirşutizm hastalarında daha düşüktü (10). Diğer yandan insan derisi androjen sentezi ve katabolizması için gerekli olan bütün enzimlere sahip olan bağımsız periferik endokrin bir organdır. Bu nedenle bu çalışmada subumbilikal deri ve koldan elde edilen taze deri dokularındaki steroidojenik yollarda fonksiyonel rol üstlenen aromataz enzimi ve diğer enzimlerin mRNA ekspresyonlarını araştırmak amaçlandı.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Erciyes Üniversitesi Endokrinoloji Bölümü'nde takip edilen İdiyopatik Hirşutizm'li 21 kadın hasta ve 15 kadın kontrol çalışmaya dahil edildi. İdiyopatik Hirşutizm tanısı Hirşutizm (modifiye Ferriman-Gallwey skoru >8) (11), normal ovulatuvar menstrüel siklus (lüteal faz serum Progesteron seviyesi > 4 ng/ml), ve normal testosteron, androstendion, DHEAS'ı içeren serum androjen profili varlığına dayalı olarak konuldu. Hormonal değerlendirmeler menstrüel siklusların foliküler fazında çalışılmış ve lüteal fazdaki ovulasyonun doğrulaması ek olarak alınan kan örneklerindeki serum Progesteron seviyelerinden yapıldı.

Normal androjen seviyeleri ticari kitlerdeki referans değerlerine göre belirlendi. Tiroid disfonksiyonu, hiperprolaktinemi, nonklasik konjenital adrenal hiperplazi, PKOS, adrenal/over tümörleri uygun testler ve görüntüleme teknikleri ile belirlenerek çalışma dışı

birakıldı. Bu çalışmaya başlamadan önce, hem hastalardan hem kontrollerden bilgilendirilmiş onam formu alındı. Çalışma yerel etik komitesi tarafından onaylandı.

4 mm punch biyopsi yöntemi kullanılarak, hastaların subumbilikal orta hat alanından lokal anestezi altında deri biyopsi örnekleri alındı. İntakt anajen kıl folikülleri daha önceden tanımlanmış prosedürlere göre izole edildi (12). Ek olarak üst koldan aynı miktarda kıl folikülünün az olduğu bölgeden cilt biyopsisi alındı.

Kontrol grubu Erciyes Üniversitesi Jinekoloji ve Obstetrik Bölümü'ne tüp ligasyonu vb benign durumlar için başvuran hastalar arasından seçildi. Kontrol grubundaki hiçbir kişide overian disfonksiyon, hirsütizm veya hiperandrojenemi bulunmamaktaydı. Aynı miktarda doku operasyonlar sırasında subumbilikal bölgeden alındı. Etik nedenlerden dolayı, kontrol grubunda sadece subumbilikal bölgeden deri örneği alındı. Alınan bütün cilt biyopsileri hemen RNA later solüsyonuna konuldu.

### **Gen Ekspresyonu**

Testosteron (DIAsource Immunoassays, Louvain-laNeuve, Belgium), DHEAS (Immunotech, Marseille, France), androstenedion (DSL-3800, Diagnostic System Laboratories, Inc., Texas, U Costa Mesa, CA, USA) seviyeleri RIA metodu ile ölçüldü. Serum SHBG (Immunotech IM3532, Prague, Czech Republic) seviyeleri IRMA metodu ile ölçüldü. Serum östradiol seviyeleri (ACS: 180, Bayer) kemilüminesans enzim immunoassay sistemi ile ölçüldü. Serbest androjen indeksi (FAI) testosteron (nmol/L)/SHBG (nmol/L) x 100 metodu kullanılarak hesaplandı.

*Cytochrome P450, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1 (CYP11A1), Steroid Sulfatase (Microsomal), Isozyme S (STS), Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1, Aromatase (CYP19A1), Steroid 5 alpha-Reductase 1 (SRD5A1), Steroid 5 alpha Reductase 2 (SRD5A2), 3beta Hydroxysteroid Dehydrogenase/delta(5) delta(4) Isomerase Type 1 (HSD3B1), 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/delta(5) delta(4) Isomerase Type 2 (HSD3B2), Androgen Receptor (AR), Catechol-O-Methyltransferase (COMT), Estrogen Receptor 1 (ESR1), Estrogen Receptor 2 (ESR2), Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1 (CYP17A1), Sulfotransferase Family, Cytosolic, 2A, Dehydroepiandrosterone (DHEA) Preferring, Member 1 (SULT2A1), Sulfotransferase Family 1E, Estrogen-Preferring, Member 1 (SULT1E1), Hydroxysteroid (17beta) Dehydrogenase 2 (HSD17B2), interleukin 6 (IL6), Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1), Tumor*

*Necrosis Factor Alpha (TNFA)* genlerinin mRNA ekspresyonları hastalardan ve kontrollerden alınan cilt biyopsisi ve kan örneklerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak belirlenmiştir.

### **RNA Eksraksiyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif PCR**

Hasta ve kontrol gruplarının cilt biyopsilerinden ve periferal mononükleer kan hücrelerinden (PBMC) TRIZOL (Roche) yöntemiyle Total RNA izole edildi.

Her RNA örneğinin konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, United States) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Total 200 ng RNA örneği ve random hexamer kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi için 10 dk 25°C'de, 120 dk 37°C'de ve 5 dk 85°C PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar ile 18 gene ait spesifik primerler kullanılarak örnekler preamplifiye edildi. Daha sonra preamplifiye ürünler bağlanmayan primerleri temizlemek için exonükleaz I (Thermo Scientific, United States) ile muamele edildi. Elde edilen PCR ürünleri 18 gene ait primerler kullanılarak (Biomark, Fluidigm®) Real time PCR sistemi ile 18 genin ekspresyon analizleri yapıldı.

### **Data Analizleri**

Datalar oto global Cq thresolt ve lineer baseline correction metodu kullanılarak Fluidigm Real Time PCR sistemiyle elde edildi. Sistem tarafından verilen 999 ve Cq değeri 23'ten büyük olan Cq değerleri analizden çıkarıldı. Genlerin ekspresyon stabilitesini değerlendirmek için GeNORM program kullanıldı. İnternal kontrol olarak qPCR data'larının normalizasyonu için Beta-aktin geni kullanıldı(13). Dataların normalizasyonu karşılaştırmalı Cq metodu kullanılarak yapıldı(14). Hastaların ve kontrollerin hormonal ve demografik değerlerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Histogram ve q-q değerleri çalışıldı ve data normalizasyonlarını değerlendirmek için Levene testi kullanıldı. Hastaların ve kontrollerin bazal hormone değerleri ve demografik farklılıkların karşılaştırılması için hem bağımsız t testi hem de Mann-Whitney testi uygulandı. Gruplar arasında mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması için microarray için kullanılan linear model ve RNA-Seq data(limma) metodu kullanıldı. Analizler Rcmdr(15) ve limma(16) R 3.1.1. software kullanılarak yapıldı ( URL <http://www.R-project.org/>). P ve ayarlanan p değerleri %5'in altında ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## **BULGULAR**

Kontrol grubu hasta grubuna göre biraz daha obez iken, hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması değerleri arasında fark yoktu. Beklendiği gibi modifiye Ferriman-Gallwey skoru hastalarda anlamlı daha yüksekti ( $p<0.001$ ). Hasta ve kontrol grubundaki bütün kadınlarda serum androjen seviyeleri normaldi fakat İdiyopatik Hirşutizm hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek serum testosteron ve DHEAS seviyeleri belirlendi. Östrojen/Testosteron oranı hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü ( $p<0.05$ ). Bütün veriler tablo 1’de sunulmuştur.

Subumbilikal bölgeden elde edilen cilt biyopsilerinde, sağlıklı kontrollere kıyasla İdiyopatik Hirşutizm hastalarında IL6 mRNA ekspresyon seviyeleri 5.4 kat daha düşüktü ve STS ve HSD17B2 genleri mRNA ekspresyonları İH hastalarında sağlıklı kontrollere göre 2.2 ile 2.3 kat daha yüksekti ( $p<0.001$ ). Kol ve subumbilikal cilt biyopsileri arasında hastalarda gen ekspresyonlarında anlamlı bir fark yoktu. Buna ek olarak, hastalarda ve sağlıklı kadınlarda periferik mononükleer kan hücrelerindeki hiçbir gen ekspresyonu arasında anlamlı bir fark yoktu. Androjen biyosentez yolağında görev alan ve çalışılan bütün genler Figür 1’de gösterilmiştir. Tüm istatistiksel veriler Figür 2 ve Tablo 2’de sunulmuştur. Ek olarak, mRNA ekspresyon seviyeleri ile ilişkili tüm veriler Heat map grafikleri ile Figür 3’de sunulmuştur.

## **TARTIŞMA VE SONUÇ**

Hirşutizm, hiperandrojenemi ve/veya abartılı androjen yanıtından kaynaklanır. Androjen fazlalığının gösterilemediği bazı hastalar İdiyopatik Hirşutizm olarak adlandırılmaktadır. İdiyopatik Hirşutizm’in patogenezi henüz çok net aydınlatılamamıştır. Günümüzde, İdiyopatik Hirşutizm patofizyolojisinde deri 5 $\alpha$  redüktaz aktivitesinde primer artış ve androjen reseptör fonksiyonunda muhtemel bir değişiklik olduğu düşünülmektedir (3).

İdiyopatik Hirşutizm’li hastalarda sağlıklı kadınlara göre artmış testosteron ve azalmış östrojen seviyeleri, İH patogenezinde artmış lokal androjen sentezinin muhtemel bir rolü olabileceğini desteklemektedir (10). Spektrofotometre kullanmamıza rağmen ki bu çalışma için bir sınırlama olarak kabul edilebilir, serum androjen ölçüm verileri önceki bulgularımızı desteklemektedir. Erkeklerde, Androjenik Alopesi (AGA) ve akne gibi deri hastalıkları ile aktif androjenlerin muhtemel lokal aşırı üretimi arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (17). Bu nedenle bu çalışmada İdiyopatik Hirşutizm hastalarında derideki androjen sentezi ve metabolizmasında görevli çeşitli enzimlerin gen ekspresyonlarını



araştırmak amaçlandı. Literatürde şu ana kadar, İdiyopatik Hirşutizm hastalarında kıl foliküllerindeki lokal androjen sentezinde rol alan enzimlerin mRNA ekspresyonlarının araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Steroidojenik akut reglatuvar protein, sitokrom p450 kolesterol yan zincir cleavage (p450cc) ve sitokrom p450 17- $\alpha$  hidroksilazin'in derideki ekspresyonu daha önce gösterilmişti. Deride üretilen kolesterol insan epidermisinde ve sebace bezlerde de-novo steroid hormon sentezi için substrat olarak kullanılabilir. (18).

Ayrıca deri gibi periferik organlarda steroid sülfataz, 3 $\beta$  OH steroid dehidrojenaz ve 17beta HSD tarafından bir dizi eylemle zayıf fakat en bol bulunan androjen olan DHEAS'nin dolaşımdaki dönüşümü ile testosteron elde edilebilir (19). Tip2 17 $\beta$  HSD enzimi östradiol ve testosteronun östron ve androstendiona dönüşümünü inaktive eder (20). Bu çalışmada sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında İdiyopatik Hirşutizm'li kadınlarda hem subumbilikal deri hem kol derisinde lokal androjen metabolizmasına katkıda bulunduğu düşünülen STS ve HSD17B2 mRNA ekspresyonlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

AGA'da da olduğu gibi testosteron veya 5 $\alpha$  DHT'nin anormal serum konsantrasyonları androjenik hastalıkların gelişimi için bir ön koşul değildir (21). İdiyopatik Hirşutizm'i de içeren bu tip hastalıklarda lokal üretilen androjenlerin çok önemli bir role sahip olduğu görünmektedir. DHEAS normal seviyelerinde STS aracılığıyla yerel androjen sentezini sağlayan önemli bir endokrin faktördür. STS hemen hemen tüm memeli dokularında mevcut olup DHEAS bu mikrozomal enzim için bir substrat görevi görmektedir (22).

Hoffmann ve arkadaşları saç foliküllerinde STS enzim aktivitesi ile birlikte insan kafa derisi biyopsilerinde de STS için immünohistokimyasal analiz yaptılar. Her iki metotta da STS dermal papillada primer olarak belirlendi(23).

mRNA ekspresyon seviyeleri protein seviyesinde veya mRNA, protein veya aktif enzim seviyelerinde cevabı etkileyebilir. mRNA, protein ve aktif enzim seviyeleri arasında statik bir korelasyon vardır (24,25). Diğer yandan, çalışmalarda mRNA ekspresyon seviyeleri ve onlara karşılık gelen protein miktarlarının eşit olmadığına dair sonuçlar da vardır. Transkripsiyon seviyeleri yani post-translasyonel mRNA seviyeleri ve post-transkripsiyonel regulasyon nedeniyle her zaman enzim aktivitesiyle korele değildir (26, 27). *STS* enzim aktivitesini ölçmememize rağmen, artmış mRNA ekspresyonu İdyopatik Hirşutizm'li kadınlarda local hiperandrojeneminin bir göstergesi olabilir. Buna ek olarak, kılsız kol derisindeki artmış *STS* mRNA ekspresyonu İdyopatik Hirşutizm'li hastalarda kapsamlı

ekspresyon artışını desteklemektedir (Figür 1, Figür 2). Bu çalışmada AGA'da olduğu gibi İdiyopatik Hirsütizm'li kadınlarda, cilt biyopsisi vücudun neresinden alınmış olursa olsun *STS* gen ekspresyonu sağlıklı kadınlara göre anlamlı artmıştır.

Bu çalışmada ayrıca pilosebace üitedeki testosteron'un östradiol'e redüksiyonla dönüşümünü ve bu hormonların daha az aktif prekürsörlerine oksidasyon yoluyla geri dönüşünü katalizleyen diğer bir steroidojenik enzim olan *HSD17B2* gen ekspresyonu yüksek bulundu.

Oliveira ve arkadaşları (28) PCOS'lu ya da idiyopatik hirsütizimli hirsüt kadınların kafa derisinde *HSD17B2* ekspresyonunun azaldığını tespit ettiler. Aksine biz bu çalışmada *HSD17B2* gen ekspresyonunda artış tespit ettik. Fakat bunun sebebi vücudun farklı yerlerindeki kıl foliküllerinin androjenlere farklı cevap vermesi ile ilişkili olabilir. Vücudun farklı kısımları intraselüler androjen metabolizmasında varyasyonlara sahiptirler. Ek olarak Oliviera ve arkadaşları mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için Revers transkriptaz PCR kullanmışlardır. Biz bu çalışmada mRNA ekspresyonlarını belirlemek için Real Time PCR kullandık. Real Time PCR metodu Revers transkriptaz PCR'a göre daha hassas bir metoddur (29). Artan *HSD17B2* mRNA ekspresyonu SZ95 sebosit hücrelerinde azalan testesteron seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur (30). Artan *HSD17B2* üzerinden testesteron inaktivasyonu hipoandrojenik milieu'ya yol açarken, eş zamanlı olarak östradiol inaktivasyonu üzerinde *HSD17B2*'nin etkisi bu hipoandrojenik durum ile etkisizleşebilir. Hem testesteron hem de östradiol inaktivasyonu üzerinde *HSD17B2*'nin etkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (31). Bizim datalarımıza göre idiyopatik hirsütizimli hastalarda kontroller ile karşılaştırıldığında farklı bölgelerde artan *HSD17B2* gen ekspresyonuna sahiptirler ve bu olay idiyopatik hirsütizimli hastalarda androjen metabolizmasında regülasyon görevine sahip olabilir.

Bu çalışmada aromataz ekspresyonunu regüle eden *IL6* mRNA ekspresyonu, İH'li hastaların deri biyopsilerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı düşük bulundu (Figür 1, Figür 2). Bizim düşüncemize göre östojenin local sentezi *IL6*'nın aromataz aktivitesi üzerine indirek etkisiyle negatif olarak etkilenebilir. İnsan hücrelerinde aromataz ekspresyonunun regülasyonu, alternatif promotörler aracılığıyla çeşitli hormonlar tarafından aktive veya inhibe edilebilir. Bu durum insan vücudundaki östrojen biyosentezinin kompleksliğini göstermektedir (32).

Sonuç olarak, bulgularımız İdiyopatik Hirsütizm'in azalmış östradiol/testosteron oranıyla karakterize olduğunu desteklemektedir. Artmış *HSD17B2* ve *STS* ekspresyonu,

azalmış *IL6* ekspresyonu hiperandrojenik olmayan bu hastalarda dolaşımdaki testosteron seviyelerinden bağımsızdır. Bu çalışmada tespit ettiğimiz artan *HSD17B2* ve *STS*, azalan *IL6* mRNA ekspresyon seviyeleri aktif androjenlerin lokal miktarındaki artışı belirlemede kullanılabilir ve diğer androjenik metabolik yollar için substrat olarak kullanılabilir. aktif androjenlerin lokal düzeylerinin artmasına neden olabilir.

**Bu projen elde edilen sonuçlar 2015 yılında European Journal of Endocrinology dergisinde yayınlanmıştır.**

## **REFERANSLAR**

- 1) Escobar Morealle HF, Carmina E, Dewailly D, Gambineri A, Kelestimur F, Moghetti P, Pugeat M, Qiao J, Wijeyaratne CN, Witchel SF, Norman RJ. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. Hum Reprod Update 2012 18 146-170.
- 2) Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, Taylor K, Boots LR. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. J Clin Endocrinol Metab 2004 89 453-462.
- 3) Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic hirsutism. Endocr Rev 2000 21 347-362.
- 4) Carmina E. Prevalence of idiopathic hirsutism. Eur J Endocrinol 1998 139 421-423.
- 5) Azziz R, Waggoner WT, Ochoa T, Knochenhauer ES, Boots LR. Idiopathic hirsutism: an uncommon cause of hirsutism in Alabama. Fertil Steril 1998 70 274-278.
- 6) Unluhizarci K, Gokce C, Atmaca H, Bayram F, Kelestimur F. A detailed investigation of hirsutism in a Turkish population: idiopathic hyperandrogenemia as a perplexing issue. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2004 112 504-509.
- 7) Serafini P, Lobo RA. Increased 5alpha-reductase activity in idiopathic hirsutism. Fertil Steril 1985 43 74-78.
- 8) Sawaya ME, ShalitaAR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism and acne. J Cutan Med Surg 1998 3 9-15.

- 9) Legro RS, Shahbahrami B, Lobo RA, Kovacs BW. Size polymorphisms of the androgen receptor among female Hispanics and correlations with androgenic characteristics. *Obstet Gynecol* 1994 83 701–706.
- 10) Unluhizarci K, Karababa Y, Bayram F, Kelestimur F. The investigation of insulin resistance in patients with idiopathic hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 89 2741-2744.
- 11) Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981 140 815–830.
- 12) Caglayan AO, Dundar M, Tanriverdi F, Baysal NA, Unluhizarci K, Ozkul Y, Borlu M, Batukan C, Kelestimur F. Idiopathic hirsutism: local and peripheral expression of aromatase (CYP19A) and 5 alpha-reductase genes (SRD5A1 and SRD5A2). *Fertil Steril* 2011 96 479-482.
- 13) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002 3 1-12.
- 14) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 2001 25 402–408.
- 15) Fox, J. Getting started with the The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *J Statistical Software* 2005 14 1-42.
- 16) Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004 3 Article 3.
- 17) Zouboulis CC, Deqitz K. Androgen action on human skin -- from basic research to clinical significance. *Exp Dermatol* 2004 13 suppl 4 5-10
- 18) Chen W, Thiboutot D, Zouboulis CC. Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. *J Invest Dermatol* 2002 119 992-1007.
- 19) Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol* 2001 116 793-800.

- 20) Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S. Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 1993 268 12964-12969.
- 21) Messenger AG. Androgen effects on hair growth. *Dermatol Ther* 1998 8 7-18.
- 22) Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F. Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase/delta-5 delta-4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta HSD, 5 alpha reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol Cell Endocrinol* 1994 104 103-111.
- 23) Hoffmann R, Rot A, Niiyama S, Billich A. Steroid sulfatase in the human hair follicle concentrates in the dermal papilla. *J Invest Dermatol* 2001 117 1342-1348.
- 24) Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 2004 75 807-821.
- 25) Hargrove JL, Schmidt FH. The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J* 1989 3 2360-2370.
- 26) Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Terasaki T. Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos* 2012 40 83-92.
- 27) Gen K, Okuzawa K, Kumakura N, Yamaguchi S, Kagawa H. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol Reprod* 2001 65 1186-1194.
- 28) Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS, Spritzer PM. Gene expression of type 2 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. *Steroids* 2003 68 641-649.
- 29) Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39: 75-85.

30) Inoue T, Miki Y, Kakuo S, Hachiya A, Kitahara T, Aiba S, Zouboulis CC, Sasano H. Expression of steroidogenic enzymes in human sebaceous glands. *J Endocrinol* 2014 222 301-312.

31) Puranen TJ, Kurkela RM, Lakkakorpi JT, Poutanen MH, Itäranta PV, Melis JP, Ghosh D, Vihko RK, Vihko PT. Characterization of molecular and catalytic properties of intact and truncated human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzymes: intracellular localization of the wild-type enzyme in the endoplasmic reticulum. *Endocrinology* 1999 140 3334–3441.

32) Nelson LE, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001 45 116-124.

## EKLER

**Tablo.1.** Hastalar ve kontrol grubunun demografik ve bazal hormon değerleri.

**Table 1.** Demographic and basal hormone values of the patients and control subjects.

Variables	Normal value	Patient	Control	<i>p</i> value	Adjusted <i>p</i> value†
Age (years)	NA	26.55±7.67	30.47±7.59	0.143	0.369
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	20-24.9	24.29±4.33	27.20±3.76	0.043	NA
Modified FGS	<8	13.00(10.00-14.00)	3.00(2.00-4.00)	<0.001	<0.001
DHEAS (ng/ml)	1330-4410	2219.05±757.54	1553.73±729.80	0.013	0.039
Testosterone (ng/dl)	6-82	53.00(42.00-64.00)	32.00(20.00-41.00)	<0.001	0.007
Androstenedione (ng/ml)	0.3-3.1	1.45(0.975-1.825)	1.75(1.35-2.1)	0.192	0.470
Estradiol (pg/ml)	19-246	46.00(38.00-64.00)	67.00(32.00-94.00)	0.279	0.117
Estradiol/Testosterone	NA	0.98(0.70-1.14)	2.44(1.55-3.35)	0.005	0.030
SHBG (nmol/L)	32-100	33.00(23.50-62.00)	54.50(43.00-71.00)	0.097	0.008
FAI	NA	4.62(3.44-7.70)	1.54(1.21-2.27)	<0.001	0.007

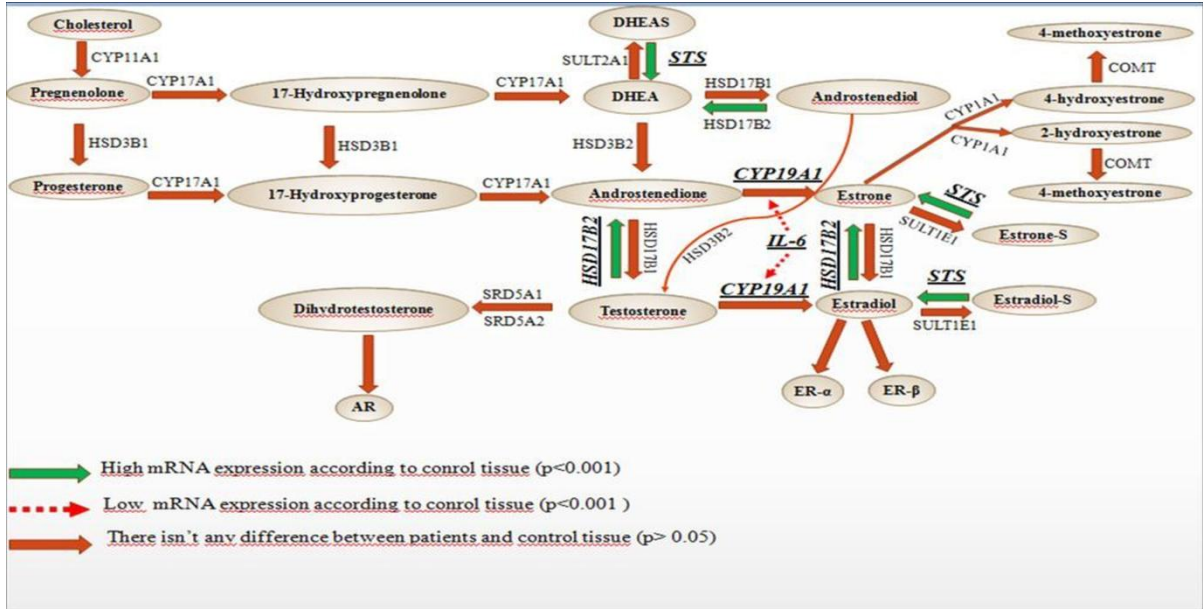
†Adjusted by BMI. Values are expressed as mean±SD or median (1<sup>st</sup> -3<sup>rd</sup> quartiles). FGS: Ferriman-Gallwey score, FAI: free androgen index, NA: Not applicable.

**Tablo.2.** İdiyopatik Hirsütizm’li hastalar ve kontrol grupları arasındaki gen ekspresyon değerlerinin dağılımı

**Table 2.** The distribution of gene expression levels between idiopathic hirsutism and control groups

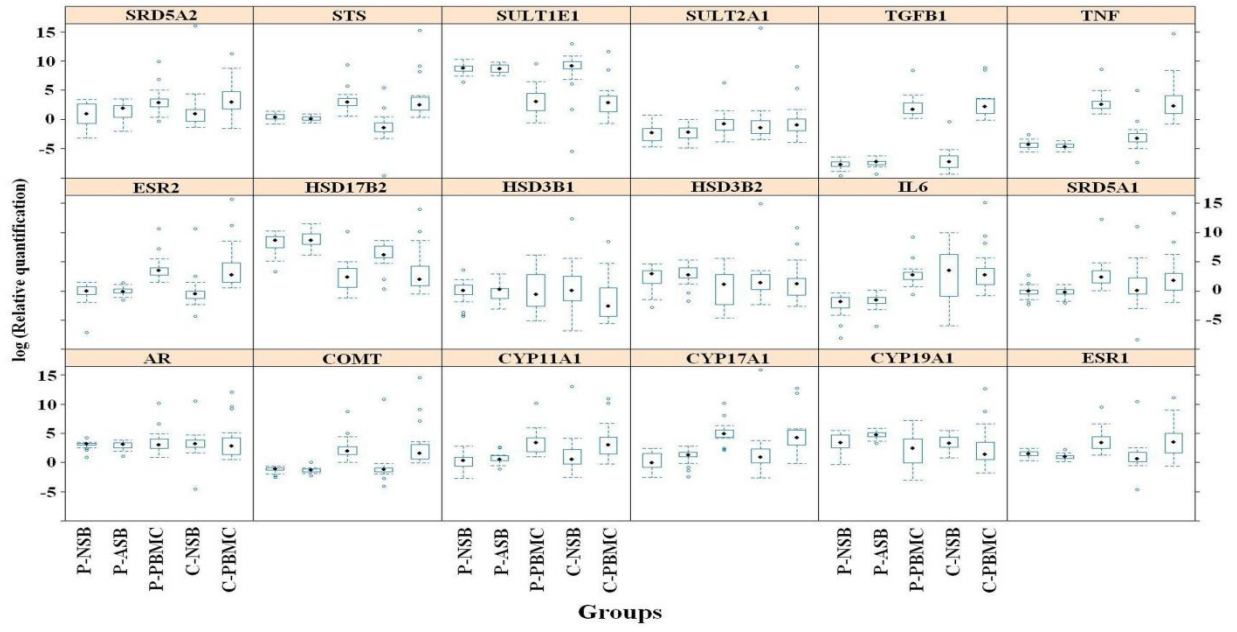
Gene	P-PBMC	C-PBMC	P-ASB	P-USB	C-USB
AR	3.03(2.46/4.04)	2.82(1.35/4.27)	3.11(2.56/3.36)	3.15(2.95/3.31)	3.18(2.59/3.86)
HSD3B1	-0.57(-2.61/2.79)	-2.58(-4.29/0.49)	0.28(-1.29/0.48)	0.05(-0.65/0.98)	0.03(-1.66/2.51)
TGFB1	1.68(1.08/2.81)	2.16(1.00/3.56)	-7.29(-7.77/-7.15)	-7.70(-8.07/-7.25)	-7.26(-8.23/-6.26)
COMT	1.98(1.38/2.75)	1.61(0.63/3.11)	-1.32(-1.55/-1.10)	-1.13(-1.32/-0.87)	-1.24(-1.55/-0.91)
HSD3B2	1.07(-2.36/2.82)	1.16(-0.75/2.20)	2.70(2.28/3.94)	2.92(1.25/3.54)	1.44(0.21/2.80)
TNF	2.52(1.93/3.13)	2.29(1.01/4.10)	-4.69(-4.78/-4.23)	-4.29(-4.76/-4.02)	-3.26(-3.86/-2.44)
<b>IL6</b>	2.7(2.01/3.17)	2.70(1.07/3.88)	<b>-1.57(-2.12/-1.13)</b>	<b>-1.88(-2.92/-1.12)</b>	<b>3.46(-0.91/6.25)</b>
CYP11A1	3.41(1.84/4.22)	3.03(1.44/4.34)	0.51(0.35/1.15)	0.28(-0.63/0.85)	0.51(-0.22/2.21)
CYP17A1	4.93(4.31/5.58)	4.26(3.00/5.59)	1.25(0.96/1.74)	-0.10(-0.87/1.56)	0.87(-0.01/2.31)
SRD5A1	2.37(1.36/3.49)	1.77(0.14/3.04)	-0.22(-0.56/0.27)	-0.04(-0.51/0.17)	0.01(-0.50/2.26)
CYP19A1	2.42(-0.01/4.05)	1.36(0.48/3.46)	4.72(4.42/5.05)	3.41(2.53/4.72)	3.30(2.57/4.35)
SRD5A2	2.84(2.14/3.56)	2.96(1.81/4.71)	1.88(0.39/2.37)	0.92(-0.69/2.62)	0.98(-0.31/1.74)
ESR1	3.37(2.41/4.46)	3.45(1.62/5.01)	1.01(0.67/1.20)	1.44(1.14/1.88)	0.59(0.11/1.79)
<b>STS</b>	2.95(2.33/3.60)	2.44(1.56/3.84)	<b>0.11(-0.08/0.46)</b>	<b>0.37(0.09/0.87)</b>	<b>-1.43(-2.07/-0.60)</b>
ESR2	3.47(2.74/3.99)	2.69(1.50/4.84)	-0.16(-0.36/0.32)	-0.01(-0.57/0.71)	-0.50(-1.26/-0.01)
SULT1E1	3.07(1.48/4.47)	2.87(1.36/3.98)	8.65(8.06/9.31)	8.80(8.29/9.14)	9.16(8.62/9.89)
<b>HSD17B2</b>	2.32(0.62/3.89)	2.00(0.96/4.22)	<b>8.67(7.98/9.81)</b>	<b>8.67(7.42/9.29)</b>	<b>6.15(5.68/7.68)</b>
SULT2A1	-0.82(-1.79/0.00)	-1.01(-1.91/0.03)	-2.18(-3.17/-1.42)	-2.28(-3.61/-1.51)	-1.42(-2.44/-0.23)

Values are expressed as median(1<sup>st</sup>/3<sup>rd</sup> quartiles). P-USB: Patient’s subumbilical region Skin Biopsy, C-USB: Control’s subumbilical region Skin Biopsy, P-PBMC: Patient’s Peripheral Blood Mononuclear Cells, C-PBMC: Control’s Peripheral Blood Mononuclear Cells, P-ASB: Patient’s Arm Skin Biopsy. Statistically significant genes were shown in bold.

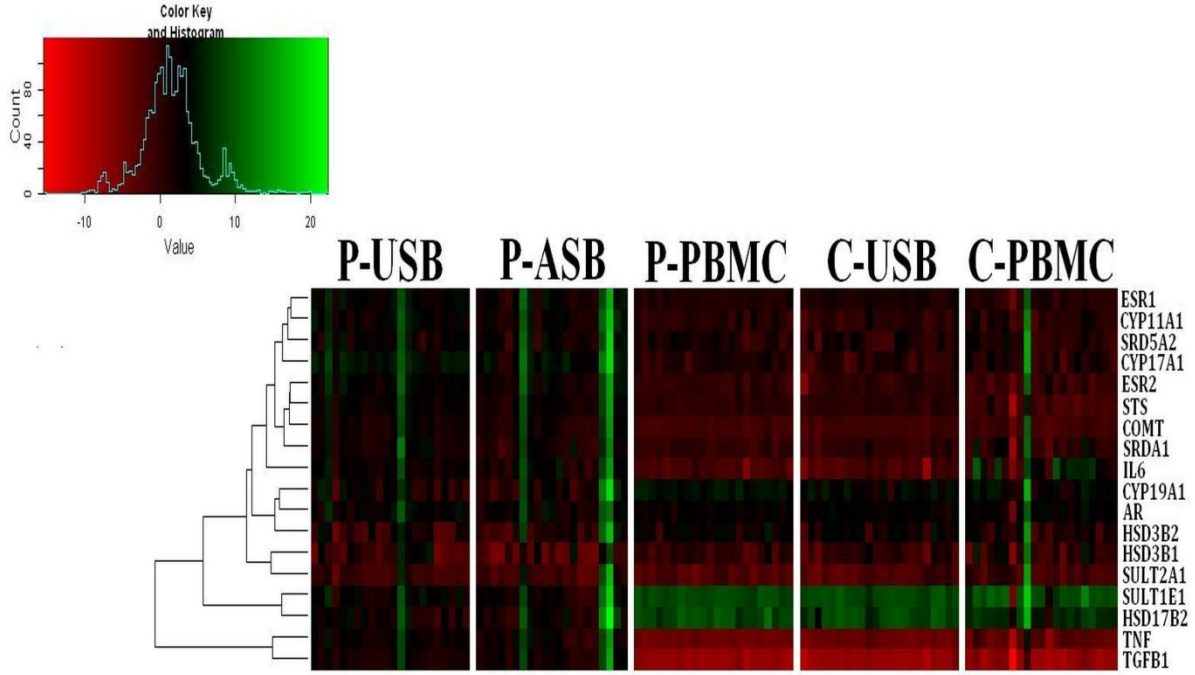


**Figür 1.** Androjen biyosentezindeki değişen mRNA ekspresyon değerlerinin ve steroid biyosentezinin şematik sunumu.





**Figür 2.** Logaritmik ölçekte androjen sentezi ve metabolizması ile ilişkili gen ekspresyonlarının nispi ölçümü ve bunların dağılımını gösteren kutu diyagramlar. Hastalarda kontrol grubuna göre *STS*, *HSD17B2* gen ekspresyonları anlamlı upregüle saptandı, *IL6* gen ekspresyonu ise anlamlı downregüle saptandı ( $p < 0.001$ ). **P-USB:** Hastaların subumbilikal bölge deri biyopsileri, **C-USB:** Kontrollerin subumbilikal bölge deri biyopsileri, **P-PBMC:** Hastaların Periferal Mononükleer Kan Hücreleri, **C-PBMC:** Kontrollerin Periferal Mononükleer Kan Hücreleri, **P-ASB:** Hastaların kol bölge deri biyopsileri.



**Figür 3.**

Her bir grupta, androjen sentezi ve metabolizması ile ilişkili genlerin ekspresyon değerlerini gösteren heatmap plot.

18 farklı eksprese edilen genlerin gen ifade profil paternleri. Hastalarda kontrol grubuna göre *STS*, *HSD17B2* gen ekspresyonları anlamlı upregüle belirlendi, *IL6* gen ekspresyon değerleri ise anlamlı downregüle belirlendi ( $p < 0.001$ ). Küme figüründe sütunlar örnekleri ve satırlar genleri temsil etmektedir (siyah, kırmızı ve yeşil renkler sırasıyla değişmemiş, downregüle ve upregüleyi temsil etmektedir). **P-USB:** Hastaların subumbilikal bölge deri biyopsileri , **C-USB:** Kontrollerin subumbilikal bölge deri biyopsileri , **P-PBMC:** Hastaların Periferal Mononükleer Kan Hücreleri , **C-PBMC:** Kontrollerin Periferal Mononükleer Kan Hücreleri, **P-ASB:** Hastaların kol bölge deri biyopsileri.