

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HASHİMOTO TANILI OLGULARDA SİTOTOKSİK T LENFOSİT
İLİŞKİLİ PROTEİN-4 (CTLA-4) VE SELENOPROTEİN S (SEPS1) GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

FİDAN İSLAMOVA

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN danışmanlığında, Fidan İSLAMOVA tarafından hazırlanan “ Hashimoto Tanılı Olgularda Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein (CTLA-4) ve Selenoprotein S (SEPS1) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

İmza:

Fen Bilimleri Enstitü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HASHİMOTO TANILI OLGULARDA SİTOTOKSİK T LENFOSİT İLİŞKİLİ PROTEİN-4 (CTLA-4) VE SELENOPROTEİN S (SEPS1) GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Fidan İSLAMOVA

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Otoimmün tiroiditi olan Hashimoto tiroiditi (HT) hipotiroidizmin en sık nedenlerindedir. HT'nin patogenezinde genetik faktörler önemli role sahiptir. Bu güne kadar HLA, bağışıklık düzenleyici genler CD40, CTLA-4, PTPN22 ve CD25, tiroid özgül genler (tiroglobulin ve tiroid uyarıcı hormon TSH reseptör) gibi birçok gen lokusu HT ile ilişkilendirilmiştir. Sitotoksik T lenfosit antijen-4 homeostaz ve immun yanıtın negatif düzenlenmesinde önemli etkiye sahiptir. Literatürde CTLA-4 (49A/G) ve SEPS1 -105G/A gen polimorfizmlerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. CTLA-4 49A/G ve SEPS1 -105G/A polimorfizmlerinin Hashimoto tiroidi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamıza 19-71 yaş aralığında Hashimoto tiroidi tanısı konulmuş 55 olgu ve kontrol grubu olarak 50 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hashimoto tiroiditi tanısı konulmuş hastaların 12'si erkek 43'u ise kadındır. Olgu ve kontrol grubu bireylere ait kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve CTLA-4 49A/G, SEPS1 -105G/A polimorfizminin varlığı PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışılan 55 olgudan 26'sının ve 50 kontrol bireyden 19'nun Heterozigot AG genotipine sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda CTLA-4 49A/G polimorfizminin HT ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Uygulanan PZR-RFLP yöntemi ile SEPS1 -105G/A polimorfizmi saptanamamıştır.

Anahtar kelimeler: Hashimoto tiroiditi, CTLA-4, SEPS1, PZR, RFLP

2017, 52 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

EXAMINATION OF (CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE-ASSOCIATED PROTEIN-4) (CTLA-4) AND SELENOPROTEIN S (SEPS1) GENE POLYMORPHISMS IN HASHIMOTO DIAGNOSED CASES

Fidan ISLAMOVA

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Hashimoto's disease being autoimmune thyroiditis is the most common cause of hypothyroidism. Genetic factors play an important role in the pathogenesis of Hashimoto thyroiditis. To date, several loci have been associated with HT, such as HLA, immune-regulatory genes CD40, CTLA-4, PTPN22, FOXP3 and CD25 and thyroid-specific genes (thyroglobulin and thyroid-stimulating hormone TSH receptor). Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) has an important role in homeostasis and negative regulation of immune responses. The aim of our study was to investigate 49A/G polymorphism of CTLA-4 gene has been associated with Hashimoto thyroiditis . There is only one research about CTLA-4 49A/G and SEPS1 -105G/A gene polimorphism. In our study included 55 patients diagnosed with Hashimoto's thyroiditis between 19-71 years old and 50 patients in healthy control groups. Our patient group with hashimoto's thyroiditis are 12 men and 43 women. Blood samples were collected for DNA isolation and PCR-RFLP were studied. Twenty-six of the 55 strains studied and 50 control individuals were found to have 19 genotypes of Heterozygous AG. Statistical analysis revealed that CTLA-4 49A / G polymorphism was not associated with HT. We used PCR-RFLP methods and in the present study, no association between the SEPS1 - 105G/A variation and Hashimoto's thyroiditis was identified.

Keywords: Hashimoto, CTLA-4, SEPS1, PCR, RFLP

2017, 52 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her zaman desteğini hissettiğim sevgili danışmanım

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e,

Tez çalışmamın deneysel kısmında destek ve katkılarını benden esirgemeyen değerli hocam

Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a

Hasta temin edilmesinde emeği geçen herkese, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı kliniği mensuplarına ve

Doç. Dr. Hülya ILIKSU GÖZÜ'ne

Başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Naciye Gülkız ŞENLER olmak üzere tek tek teşekkür etmeyi kendime borç bildiğim ve asla unutamayacağım;

Doç. Dr. Sırrı KAR'a, Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER'e, Doç. Dr. Deniz ŞİRİN'e, Yrd. Doç. Dr. Nevin ŞAFAK ODABAŞI'na, Doç. Dr. Elife Zerrin BAĞCI'ya ve özel teşekkürüm sevgili hocam Doç. Dr. Cenk ARAL'a

Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarıma Hande AKALAN, Büşra AYDIN, Medine Münevver UMA'ya

Özel teşekkürüm sevgili arkadaşım Gönül KARTAL ALAÇAM'a hep yanımda olduğu ve manevi desteği için

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme, sevgili eşim ve biricik oğlum Ümid'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
2. TEMEL BİLGİLER	3
2.1 Tiroid Bezi, Anatomisi ve Fonksiyonları.....	3
2.2. Otoimmün hastalıkları.....	5
2.3. Hashimoto Tiroidi.....	6
2.4. Polimorfizmler.....	8
2.5. CTLA-4 geni.....	10
2.6. SEPS1 geni.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	14
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	15
3.1.3. Kullanılan çözelti ve tamponlar.....	16
3.1.4. Primerler.....	18
3.1.5. Kullanılan bilgisayar programları.....	18
3.1.6. Kullanılan restriksiyon enzimleri.....	18
3.1.7. Hasta grubu.....	18
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Kandan DNA izolasyonu.....	22
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	27
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi.....	30
3.2.4. PZR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesimi.....	30
3.2.5. İstatistiksel analizler.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Hasta grubu.....	32
4.2. PZR ve RFLP sonuçları.....	32
4.2.1. CTLA-4 49A/G gen polimorfizmi.....	32
4.3.İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	35
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	45
6 KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Tiroid bezi anatomisi.....	3
Şekil 2.2. Hashimoto tiroidinin patolojik görünümü.....	6
Şekil 2.3. CTLA-4 geni kromozomal lokalizasyonu, ideogram üzerinde gösterimi.....	10
Şekil 2.4. CTLA-4 gen polimorfizmleri	11
Şekil 2.5. SEPS1 geni kromozomal lokalizasyonu, ideogram üzerinde gösterimi.....	11
Şekil 2.6. SEPS1'in yanlış katlanmış protein cevabındaki rolü.....	12
Şekil 4.2. CTLA-4 geni için PZR sonuçları.....	33
Şekil 4.2.1. SEPS1 geni PZR sonuçları.....	33
Şekil 4.2.2. CTLA-4 geni PZR-RFLP sonuçları.....	34

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tiroid hastalıklarında otoimmünitenin genetik temeli.....	9
Çizelge 3.1.PZR aşamasında kullanılan primerler ve Tm (melting temperature) dereceleri.....	18
Çizelge 3.2. Hashimoto tanılı olgulara ait yaş, cinsiyet, Aile öyküsü, Sigara ve alkol kullanımı verileri ve FT3, FT4, TSH, AntiTG ve AntiTPO değerlerine ait klinik bulgular.....	19
Çizelge 3.3. Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet, Aile öyküsü, Sigara ve alkol kullanımı verileri ve FT3, FT4, TSH, AntiTG ve AntiTPO değerlerine ait klinik bulgular.....	20
Çizelge 3.4. Kontrol grubu bireylerinden elde edilen DNA'nın spektrofotometrede ölçümü.....	23
Çizelge 3.5.Hasta grubu bireylerden elde edilen DNA'nın spektrofotometrede ölçümü.....	25
Çizelge 3.6. CTLA-4 geni için PZR programı.....	29
Çizelge 3.7 SEPS1 geni için PZR programı.....	29
Çizelge 4.2.1. Hashimoto tiroiditi olgularında belirlenen CTLA-4 genotipleri.....	34
Çizelge 4.2.2. Sağlıklı bireylerde belirlenen CTLA-4 genotipleri.....	34
Çizelge 4.3.1 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu yaş ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	35
Çizelge 4.3.2. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol yaş ilişkisinin ki- kare testi ile değerlendirilmesi.....	36
Çizelge 4.3.3 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu cinsiyet ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	36
Çizelge 4.3.4. CTLA-4 49 A/G polimorfizmi ve kontrol cinsiyet ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	37
Çizelge 4.3.5 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu aile öyküsü ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	37
Çizelge 4.3.6. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol aile öyküsü ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	38
Çizelge 4.3.7. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu sigara kullanımı ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	38
Çizelge 4.3.8. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol sigara kullanımı ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	39
Çizelge 4.3.9. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu alkol kullanımı ile ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	39
Çizelge 4.3.10. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol alkol kullanımı ile ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	40

Çizelge 4.3.11. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu FT3 değeri ile ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	40
Çizelge 4.3.12. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol FT3 verisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	41
Çizelge 4.3.13. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu FT4 verisi ile ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	41
Çizelge 4.3.14. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol FT4 değeri ile ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 4.3.15. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu AntiTPO ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 4.3.16. CTLA-4 49A/G polimorfizmi kontrol klinik veri Anti TPO değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri.....	43
Çizelge 4.3.17. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu AntiTG ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	43
Çizelge 4.3.18. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol AntiTG ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	43
Çizelge 4.3.19. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu TSH ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	44
Çizelge 4.3.20. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol TSH ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti Tg	: Anti Tiroglobulin
Anti TPO	: Anti Tiroid peroksidaz
CTLA-4	: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein-4
HLA	: İnsan lökosit antijeni
HT	: Hashimoto Tiroiditi
IFN- γ	: İnterferon gama
MHC	: Major doku uygunluk kompleksi
PTPN22	: Protein Tirozin Fosfataz Nonreseptör-Tip 22
Ala/Thr	: Alanin/Treonin
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SEPS1	: Selenoprotein S
IL-1	: İnterlökin 1
TNF	: Tümör nekrozu faktör
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon
TRH	: Tiroid stimülan hormon
MIT	: Monoiyodotironin
DIT	: Diiyodotironin
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TPO	: Tiroid peroksidaz
TG	: Tiroglobulin
NIS	: Sodyum-iyot simportur
TBG	: Tiroksin bağlayıcı globülin
TBP	: Tiroksin bağlayıcı prealbumin
Th	: T helper 1
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
TE	: Tris – EDTA
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	: Tris – borat – EDTA
UV	: Ultraviole
d H ₂ O	: Distile su
A	: Adenin
G	: Guanin
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
KCL	: Potasyum klorür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

1. GİRİŞ

Tiroid bezi hastalıkları önemli endokrin sorunlara neden olmakta ve dünyada oldukça yaygın olarak gözlenmektedir. Otoimmün tiroid hastalıkları içinde en sık görülen tiroid türü Hashimoto tiroididir. Otoimmün hastalıkların etiyojisi tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, bu hastalıkların ortaya çıkışında genetik ve çevresel etkileşiminin rol oynadığı birçok çalışmada vurgulanmıştır. Genetik faktörlerin %80'lik oranla immunitetin ortaya çıkmasında daha baskın olduğu bildirilmektedir. Çevresel faktörler ise %20'lik orana sahip olup; bunlara sigara kullanımı, gebelik, menopo, stres, iyot alımı, selenyum eksikliği, çevre kirliliği ve buna benzer diğer fiziksel koşullar gösterilmektedir (Kurtoğlu 1997).

Otoimmün tiroid hastalıkları genel olarak 3 farklı grupta sınıflandırılmaktadır: Bu gruplar;

Tip 1 otoimmün tiroidit (Hashimoto hastalığı Tip 1)

1A: Guatrlı

1B: Guatrsız

Tip 2 otoimmün tiroidit (Hashimoto hastalığı Tip 2)

2A: Guatrlı (Klasik Hashimoto hastalığı)

2B: Guatrsız (Primer miksödem, atrofik tiroidit)

2C: Geçici tiroidit

Tip 3 otoimmün tiroidit (Graves hastalığı)

3A: Hipertiroid Graves hastalığı

3B: Ötiroid Graves hastalığı

3C: Hipotiroid Graves hastalığıdır (Davies ve Amino 1993).

Oldukça yaygın olan Hashimoto tiroidi en sık 30-50 yaş arasında olmak üzere her yaş grubunda görülebilir. Kadınlarda erkeklere oranla 15-20 kat fazla görülür. Kadınlarda daha sık görülmesi özellikle steroid yapıdaki cinsiyet hormonları ile bağlantılıdır. Toplumda görülme sıklığı %2'dir (Barbesino ve Chiovato 2000). Hastalığın insidiansı kadınlarda 4/1000, erkeklerde 1/1000'dir. Down sendromu ve Turner sendromu olan hastalarda HT'nin görülme sıklığı daha fazladır (Popova ve ark. 2008; Kamel ve ark. 2014).

HT'de T supresör hücrelerindeki genetik defekt sonucunda hücreyel immunité bozulur. Bu sonuca bağılı olarak supresör T lenfositleri yardımcı T lenfositleri baskılayamaz hale gelir.

Aktive olmuş yardımcı T lenfositleri B lenfositlerle ilişkiye girer. Bu durumda γ -interferon (γ -INF) ve daha birçok sitokin salgılanır. Bu sitokinler tirositleri uyararak MHC-II yüzey antijenlerinin oluşmasını sağlar (Volpe 1991). Ayrıca aktivasyona uğramış B lenfositleri tiroid antijenleri ile reaksiyona girerek otoantikorlar oluşturur. Hashimoto tiroiditinde klinik belirtiler siliktir ve diğer otoimmün hastalıklar gibi hastalığı akut ve kronik dönemleri vardır (Acar 2010).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Hashimoto tiroidi ile ilişkilendirilen bir çok gen polimorfizmleri tanımlanmıştır. Polimorfizmleri tanımlanan genlerden bazıları; Human Lökosit Antijen (HLA), Protein Tirozin Fosfataz Nonreseptör-Tip 22 (PTPN22), Tiroglobulin, Vitamin D reseptörü, sitokin genleridir (Özata 2003). Hastalıkla ilişkisi olabilecek aday genler ve bu genlere ait polimorfizmlerin araştırıldığı çalışmalarda devam etmektedir.

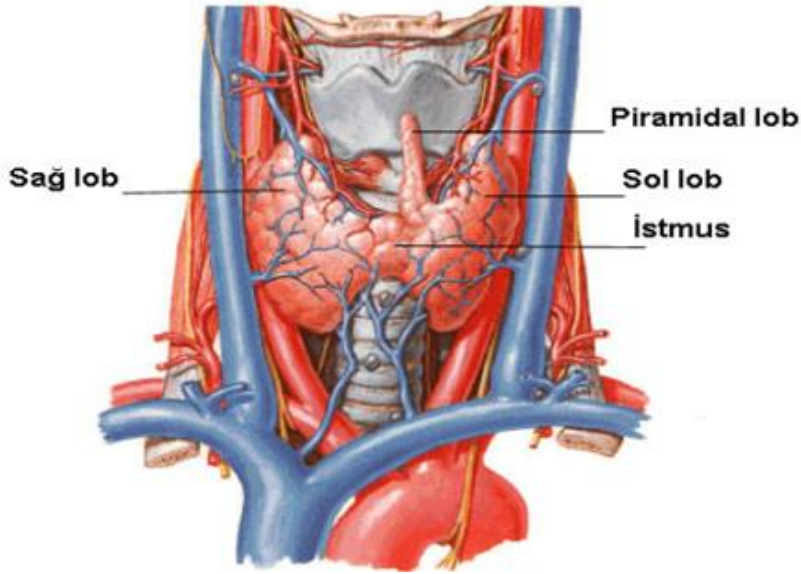
Bu tez çalışması kapsamında iki aday gen sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA-4) ve selenoprotein S genlerinde HT ilişkili olabilecek iki polimorfizmin varlığı araştırılmıştır. CTLA-4 geni 3 ekzondan oluşmaktadır ve bir sinyal peptid molekülü kodlar. Bu gende otoimmünite ile ilişkili birkaç polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan en dikkat çekeninin, 1. ekzonun 49. pozisyonunda bulunan Ala/Thr değişimine neden olan A/G SNP (single nükleotid polimorfizmi) olduğu belirtilmektedir (Kamel ve ark.2014) (Braun ve ark. 1998).

Selenoproteinler, SEPS1 geni tarafından kodlanan ve selenosistein rezidüleri içeren proteinlerdir. İnsan vücudunda 100'e yakın selenoprotein bulunmuş ve bunların 30 tanesi tanımlanmıştır (Brown ve Arthur 2001). SEPS1'in hücreleri oksitativ stres ve apoptozdan koruduğu bildirilmiştir. SEPS1'deki genetik varyasyonların, özellikle promotörün önünde bulunan -105G/A polimorfizmlerinin HT patojenezine neden olduğu bilinen İnterlökin-1 Beta (IL-1 β), İnterlökin (IL-6) ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin seviyeleri ve sirkülasyonu ile yakından ilişkili olduğunu rapor edilmiştir (Curran ve ark. 2005).

2.TEMEL BİLGİLER

2.1. Tiroid Bezi, Anatomisi ve Fonksiyonları

Embriyonik gelişim sürecinde, endokrin bezler içerisinde ilk oluşan bez olan tiroid bezi 24.günde farenks tabanının median yüzünde oluşmaya başlar (İşgör 2000). Vasküler yapıya sahip olan tiroid bezi boynun alt kısmında anteriorda 5. servikal vertebra ile 1. torasik vertebra arasında bulunur. U şeklinde olan tiroid bezi bir sağ, bir sol lobtan ve bunları birbirine bağlayan median bir istmustan oluşur. Hastaların %40-50'sinde istmustan hyoid kemiğe doğru uzanan üçüncü bir lob olan piramidal lob vardır. Piramidal lob tiroglossal kanalın alt ucunun açık kalması sonucunda oluşmaktadır (Arıncı ve Elhan 2001). Her bir lobun uzunluğu 2,5-4 cm, genişliği 1,5-2 cm, kalınlığı 1-1,5 cm'dir. Tiroid bezi kırmızı-kahverengi renge olup ortalama 15-20 gr ağırlığındadır. Menstrüasyon ve gebelik dönemlerinde kadınlarda tiroid bezi ağırlık olarak daha da artmaktadır (Şekil 1.1.).



Şekil 2.1. Tiroid bezi anatomisi (<http://www.savaskocak.org/tiroid.php>).

Tiroid bezi dışarıdan fibroz bir kapsül ile sarılmıştır. Tiroid bezinde gerçek kapsülden başka yalancı kapsül veya cerrahi kapsülde mevcuttur. Tiroidin temel yapısını foliküller oluşturmaktadır. Folikül hücrelerine tiroisit adı da verilir. Foliküller 100-300 µm çapındadır. Her bir folikül, içi kolloidle dolu bir lümeni saran tek katlı kübik epitel ve bu epiteli çevreleyen bazal membrandan oluşur. Tiroid bezi her biri 20-40 folikülden oluşan lobüllere ayrılmıştır. Tiroid bezinde üç tip hücre mevcuttur. Bu hücreler A, B ve C, hücreleri olarak isimlendirilmiştir. A hücreleri tiroid hormonlarının yapımı, salınımı ve taşınmasından

sorumlu olan folikül hücresidir ve tiroid stimüle edici hormonun (TSH) etkisiyle fonksiyonları gerçekleşmektedir. (Henry 1997). Askenazi hücresi, onkosit veya Hürthle hücresi olarak adlandırılan B hücreleri çok miktarda serotonin biriktiren hücrelerdir. C hücresi (parafoliküler hücre) kalsitonin salgırlar ve TSH kontrolünde faaliyet göstermez. Kalsitonin salgısı hipofiz kontrolünde değildir; Salgısı kan kalsiyum seviyesine bağlıdır. Parafoliküler hücreler tiroid bezin %1'inden azını oluşturur (Schmid 2015). Kalsitonin vücut kalsiyum dengesinde önemli rol oynar (İliçin ve ark.1996).

Tiroid bezi fonksiyonlarının düzenlenmesinde ilkin basamak hipotalamustan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) ve hipofiz bezinden de tiroid stimulan hormon (TSH) salgılanmasıdır.

TSH glikoprotein yapısında bir hormon olup, 28000-30000 dalton arasında değişen molekül ağırlığındadır. TSH α ve β polipeptid zincirinden ve bu zincire karbohidrat moleküllerinin katılmasından oluşmaktadır. TRH, ilkin olarak hipotalamustan proTRH halinde sentezlenir. Memelilerde proTRH 2900 dalton molekül ağırlığındadır. TRH, tirotrop hücrelerdeki TRH reseptörüne bağlanarak TSH geninin transkripsiyonuna ve TSH'un sentezlenmesine sebep olur (Shupnik ve ark. 1986). TSH reseptörleri tiroid folikül hücre membranında bulunur (Silvestri ve ark. 2005).

Tiroid bezi folliküler hücrelerinin başlıca görevi T4 ve T3 tiroid hormonlarının sekresyonunu gerçekleştirmektir. Dolaşımdaki T4'ün tamamı ve T3'ün % 20'si tiroid bezinde, kalan %80'i ise periferde T4'ün T3'e deiyodinasyonu sonucunda oluşmaktadır. Tiroid hormonun sentezi birbirinden farklı aşamalardan geçerek gerçekleşir. Tiroid hormon sentezinde iki ana ürün tirozin ve iyottur. Tirozin bir iyot atomu ile birleşirse monoiyodotironin (MIT), iki iyot atomu ile birleşirse diiyodotironin (DIT), meydana gelir. MIT ve DIT moleküllerinin birleşmesinden T3, iki DIT molekülünün birleşmesinden ise T4 meydana gelir (Ede 2006).

Tiroid hormon sentezi için tiroglobuline (TG), tiroid peroksidaza (TPO), Sodyum-iyot simporter (NIS) ihtiyaç vardır. TPO hidrojen peroksit (H_2O_2) ile birlikte inorganik iyodürün organik iyodin haline gelmesi ve tiroglobuline bağlanmasında önemli rol oynar. Tiroglobulin moleküler ağırlığı 660.000 dalton olan bir glikoproteindir. Tiroglobulinin başlıca rolü tiroid hormonlarının oluşumunu ve depolamasını sağlamaktır (Yılmaz 1999). Tiroid peroksidaz moleküler ağırlığı 9 kDa olan 926 aminoasitten oluşan hemoglikoprotein yapılu bir enzimdir. NIS, 80–90 kDa molekül ağırlığında olan bir transmembran proteindir

Günlük iyot ihtiyacının %90'ı gıdalardan, %10'u ise içme sularından sağlanır (Kurtoğlu 1997). Tiroid hormon yapımı için gerekli olan günlük iyot miktarı 100-150µg'dır. İyot alımı önerilen miktarın altına düştüğünde tiroid yeterli hormon sentez edemez, guatr ve hipotiroidizm gelişir. İyot hücre içine aktif transport yolu ile plazma membranında bulunan sodyum/ iyot (Na⁺/I⁻) simporter protein aracılığıyla alınır. İyodun oksidasyonu tiroid peroksidaz (TPO) enzimi sayesinde gerçekleşmektedir.

T3 ve T4 tiroglobulinden ayrılarak serbest hormon şeklinde kana salgılanırlar. Salgılanan hormonlar plazma proteinlerine bağlanırlar. Tiroid hormonlarının kanda taşınması 3 farklı proteinle gerçekleşmektedir. Tiroksin bağlayıcı globulin (TBG), kanda dolaşan tiroksinin %60'ını, Tiroksin bağlayıcı prealbumin (TBPA), kanda dolaşan tiroksinin %30'unu ve son olarak Tiroksin bağlayıcı albümin, tiroksinin %10'unu bağlar. Proteine bağlı olan tiroid hormonları dolaşımında inaktif halde bulunmaktadır. T3'ün ömrü yaklaşık bir gün, T4'ün ömrü serumda 7 gündür.

Tiroid hormonlarının vücuttaki birçok organ ve sistemler üzerinde metabolik etkileri vardır. Beyin, dalak, testis, retina, akciğer hariç tüm dokularda ısı üretimi, oksijen tüketimini ve Na-K ATPaz aktivitesini artırır. Tiroid hormonları karbonhidrat metabolizmasına etki göstererek sindirim sisteminden glikozun emilimini artırır, glikoneojenez ve insülin salgılanmasında artış sağlar (Guyton ve Hall 2001). Tiroid hormonlarının etkisiyle besinler bağırsaklarda hızlı şekilde emilir ve bağırsak hareketlerinde artışa sebep olur (Yılmaz 1999). Tiroid hormonun aşırı salınımı sürekli yorgunluğa neden olur. Tiroid hormon salgısının azalmasıyla kolesterol, fosfolipit ve trigliseridlerin plazma düzeyinin artışına ve ayrıca karaciğerde yüksek oranda yağ depolanmasına sebep olur. Tiroid hormonu fetal gelişim ve doğumdan sonraki dönemde beynin normal şekilde büyümesi için önemli etkiye sahiptir. Fetüs yeterli miktarda tiroid hormonu salgılamazsa doğumdan önce ve sonraki aşamalarda beynin gelişmesi zayıflar ve buna bağlı olarak beyin normalden küçük olur. Kadınlarda gebelik tiroid bezinde fizyolojik değişikliklere yol açmaktadır. Gebelik sırasında östrojen seviyelerindeki artışa bağlı olarak TBG seviyesinde de artış gözlenmektedir.

2.2. Otoimmün Hastalıklar

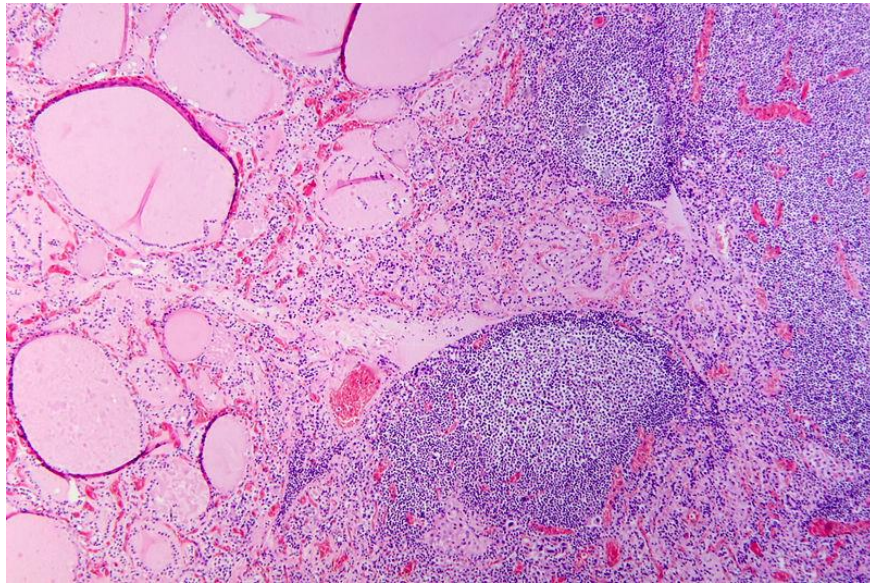
Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immun cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmunizasyonun rol oynadığı hastalıklarda otoimmün hastalıklar adı verilmektedir (Kronenberg ve Rudensky 2005). Bu tip hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan hücresel tip immun cevap ve otoantikörlerin belirlenmesinden

yararlanılmaktadır. Otoimmün tiroid hastalıkları tüm organ spesifik otoimmün hastalıklarının %30'nu oluşturmaktadır. En sık raslanan organ spesifik otoimmün hastalık olan Hashimoto tiroiditi popülasyonun %3'ünde saptanır (Özata 2003). Otoimmün hastalıkları olan kişilerde diğer otoimmün hastalıklarının görülme oranı artmaktadır ve bu nedenle hastalıklarda kişisel yatkınlığın önemli olduğu bildirilmektedir (Kabalak 2009).

Otoimmün hastalıklar organa özgü otoimmün hastalıklar (hashimoto, graves, pernisiyoz anemi, insüline bağımlı şeker hastalığı (diyabetes mellitus), adisson hastalığı, akut romatizmal ateş, otoimmün alopesi vb.) ve birden fazla organda gözlenen sistemik otoimmün hastalıklar (romatoid artrit, sistemik nekrotizan vaskulit ve sjögren sendromu vb.) olmak üzere iki gruba ayrılır (Chistiakov 2005).

2.3. Hashimoto Tiroiditi

Kronik otoimmün tiroiditi olan Hashimoto tiroiditi hipotiroidizmin en sık nedenlerindedir. Hashimoto tiroidi; ilk defa 1912 yılında Dr. Hakaru Hashimoto tarafından tanımlanmıştır. Dört kadın hastanın tiroid dokusunu histopatolojik olarak değerlendirmiş, tiroid bezinin sertleştiğini ve fonksiyonel özelliklerinin kaybolduğunu bildirmiştir. Bu hastaların tiroid bezinde plazma hücreleri, fibrozis, lenfosit infiltrasyonu, parankimal atrofi ve bazı bölgelerde eozinofilik dejenerasyon gözlenmiştir (Hashimoto 1912). Eozinofilik hücrelere Askenazi veya Hürtle hücreleri denilir. Bu hücreler bol miktarda mitokondri içerir, foliküler alan küçük, kolloid ise ya seyrek ya da yok derecesindedir.



Şekil 2.2. Hashimoto tiroidinin patolojik görünümü.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hashimoto's_thyroiditis,_HE_5.jpg

Otoimmün tiroid hastalıklarının tanısındaki başlıca yöntemlerden biri serumda antiTPO ve antiTG'nin belirlenmesidir. 1956 yılında Roitt ve Doniach tarafından Hashimoto tiroidinin kendi antijenine karşı otoantikor oluşturduğu tanımlanmıştır (Roitt ve ark. 1956). Hashimoto tiroidi olan hastaların % 90'ında antiTPO antikoru ve % 80'inde antiTG antikoru pozitiftir (Erbaş ve Dağdelen 2004). AntiTPO ve antiTG immünglobulin G grubuna dahildir. Hastalığın ilkin evresinde antiTG antikoru antiTPO antikoru oranla daha yüksektir. HT'li hastalarda sodyum iyot simporter'a karşı otoantikorlar gelişmiştir. Bu otoantikora bağlı olarak foliküler hücrelerde iyot transportunda bozulma gözlenmiştir. NIS antikoru ise %15 oranındadır.

T hücre aracılı otoimmünite ile oluşan HT genetik ve çevresel faktöre bağlı oluşur. Çevresel faktörlere, diyetsel iyot alımı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, sitokin tedavisi ve gebelik örnek gösterilebilir (Chistiakov 2005). HT gelişiminde lityum, amiodaron, interferon, interlökin gibi ilaçların kullanımı rol oynamaktadır (Tanda ve ark. 2009). Birçok çalışma Hashimoto tiroiditi ile diğer çevresel hepatit C, parvovirüs, ramiodoronubella, enfeksiyonlarının ilişkili diğer çevresel faktörler olduğunu bildirmiştir (Tomer ve Huber 2009).

T ve B lenfositler immun yanıtta önemli rol oynayan hücrelerdir. T lenfositler CD4+ yüzey antijeni eksprese eden yardımcı T lenfosit ve CD8+ yüzey antijeni eksprese eden sitotoksik T lenfosit olarak iki gruba ayrılır. CD4+ T hücreler T helper 1 ve Th2 hücreler olmak üzere iki farklı grupta incelenirler. Hücrel immun yanıtta görev alan Th1 hücresi IL-2, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinler salgılar. Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılayarak B hücrelerinin uyarılmasını sağlarlar (Romagnani 2000). Hashimoto tiroiditi olan hastaların tiroid dokusunda Th1 hücreleri baskın olmakla birlikte hem Th1 hem de Th2 hücreleri bulunmaktadır (Binay ve Şimşek 2016). B hücreleri ise T helper hücreleri tarafından aktive edilmektedir. Aktive olmuş B hücreler tiroid otoantikorlarının sentez ve salgısını gerçekleştirir. B lenfositler tiroglobülin, tiroid peroksidaz ve tirotropin reseptörü (TSHR) başta olmakla birlikte tiroid antijenlerine karşı antikor üretirler (Dallas ve Foley 2003; Dallas 2003). Diğer tiroid otoantikorlarından farklı olarak TSH reseptör antikoru, Graves ve Hashimoto tiroiditli hastalara spesifiktir. HT tanılı olgularda TSHR antikoru olguların %60'ında pozitiftir.

Hastaların ailelerinde hastalığın tekrarlandığı görülmektedir. Hashimoto hastalarının birinci derece akrabalarında görülme sıklığı %18-33'dür (Barbesino and Chiovato 2000). Monozigot ikizlerde HT'nin görülme oranı %30-60 arasında değişmektedir (Brix ve ark. 2000). Dizigotik ikizlerde bu oran %10 olarak bildirilmektedir. Bu çalışmalar HT'de genetik bir yatkınlık olduğunu göstermiş, bu nedenle hastalığın gelişiminde rol oynayan genetik faktörlerin ve yatkınlığa neden olabilecek polimorfizmlerin belirlenmesi birçok araştırmaya konu olmaktadır. Bu kapsamda birçok polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmlerden biri Major doku uygunluk kompleksi diğer adıyla insan lökosit antijeni (HLA) olarak bilinen genlerde tanımlanmıştır. HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolunda, 6p21.3 bölgesinde bulunur (Goldberg ve Rizzo 2015). HLA, 4000 kilobaz büyüklüğündeki bir bölgede lokalize olan gen topluluğudur (Mizuki ve Kimura 1996). Hücre yüzey molekülleri olan MHC molekülleri MHC I (HLA- A, B, C) ve MHC II (HLA-DP, DR, DQ) iki gruba ayrılır. Bu iki grup yapıcı bir birine benzer olsa da MHC I moleküllerinin esas görevi viruslar, tümör antijenleri gibi intrasitoplazmik antijenleri CD8+ sitotoksik T hücrelerine sunmaktır. MHC I molekülleri bütün çekirdekli hücrelerde bulunurken, MHC II makrofaj ve dendritik hücrelerde mevcuttur. Genetik çalışmalar HLA-DR4, DR5, DQw3.1 ve DQA2 allellerinin Hashimoto tiroiditinde normal popülasyona oranla daha sıklıkla bulunduğu göstermiştir.

Apoptozun otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), masif tiroisit yıkımında major rol oynar. Hashimoto tiroiditinde apoptozisin başlanma nedeni Fas reseptörünün Fas-L ligandı ile birleşmesidir. Fas ligandı, hem normal tiroid hücrelerinde hem de Hashimoto tiroiditli hastaların tiroid hücrelerinde yüksek miktarda bulunmuştur (Lumachi ve Basso 2002). Fas (CD95) molekül ağırlığı 45kDa olan tip 1 membran proteindir ve tümör nekroz faktör (TNF) ailesine aittir (Nagata 1998).

D vitamini Hashimoto tiroiditi patogenezinde önemli özelliğe sahip olan faktörlerden biridir. Yapılan çalışmalarda D vitamini reseptörü (VDR) polimorfizminin Hashimoto tiroiditi sıklığını arttırdığı vurgulanmıştır (Lin ve ark. 2006)

2.4. Polimorfizmler

Toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır (Ekmekçi ve ark. 2008). Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) insan genomunda en çok bulunan (ortalama her 1000 nükleotitte bir) DNA dizi değişimleridir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Hashimoto tiroidi ile

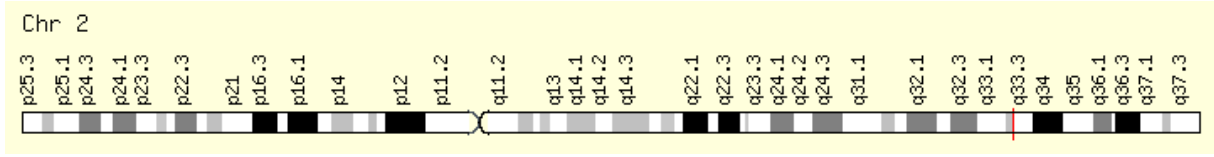
ilişkilendirilen birçok gen polimorfizmleri tanımlanmıştır. Polimorfizmleri saptanan genler arasında Human Lökosit Antijen (HLA), Protein Tirozin Fosfataz Nonreseptör-Tip 22 (PTPN22), Tiroglobulin, Vitamin D reseptörü, sitokin genleri bulunmaktadır (Zaletel 2011).

Çizelge 2.1. Tiroid hastalıklarında otoimmünitenin genetik temeli (İliçin, ve ark. 1996)

Gen	İlişkili varyantlar	İlişkili ırk
HLA-DR	DR3, DR5 (guatr)	Kafkas
	DR3 ve HLA B8 (atrofik)	Kafkas
	DR9 ve HLA Bw46.87	Çin
HLA-DQ	DQw2 (HLA DR3)	Kafkas
	DQ AO30I (HLA DR4)	Kafkas
	DQ B02OI (HLA DR3)	Kafkas
CTLA-4	A/G 49SNP, CT60 TNP	Kafkas, Japon
	3'UTR AT mikrosatellit	Kore, Çin
PTPN22	R620W TNP	Kafkas
Tiroglobulin	S734A TNP	Kafkas
	T2334C TNP	Japon
	MI028V, RI999W TNP	

Bahsedilen bu polimorfizmler dışında CTLA-4 (49A/G) ve SEPS1 (-105G/A) gen polimorfizmlerine ait tek bir çalışma bulunmaktadır ve bilgilerin doğrulanması gerekmektedir. Yaptığımız çalışmada CTLA-4 49A/G ve SEPS1 -105G/A SNP'lerinin Hashimoto tiroidi ile olan ilişkisi araştırılmıştır.

2.5. CTLA-4 geni

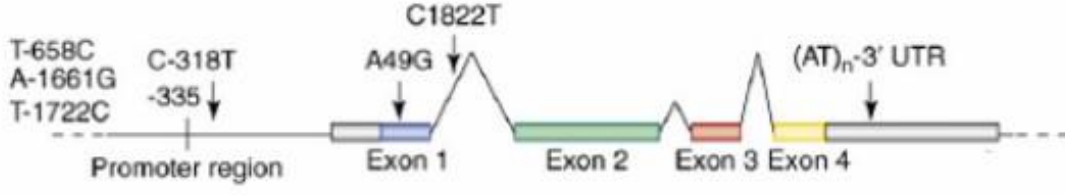


Şekil.2.3. CTLA-4 geni kromozomal lokalizasyonu, ideogram üzerinde gösterimi (Genetics Home Reference).

CTLA-4 proteinini kodlayan gen 2. kromozomun uzun kolunda; 2q33 bandında bulunur (Agarwal ve ark. 2000). CTLA-4 149 aminoasitten oluşmaktadır (Lindsten ve ark. 1993). CTLA-4 geni 223 aminositli bir prekürsör protein olarak kodlanır. CTLA-4, immünglobulin süper ailesi üyesi bir transmembran protein olup B7 (dendritik hücrelerde bulunan periferel hücre zarı proteini) molekülüne bağlanarak T hücre aktivasyonunu azaltan bir kostimulatördür. CTLA-4, 3 ekzondan oluşan oldukça polimorfik bir gen bölgesidir ve bu bölgede otoimmünite ile ilişkili birkaç polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan en dikkat çekeninin, 1. ekzonun 49. pozisyonda bulunan ve sinyal peptid molekülünde Ala/Thr değişimine neden olan A/G SNP olduğu belirtilmektedir (Kamel ve ark. 2014; Braun ve ark. 1998) Bundan başka, promotör bölgede -318. Pozisyondaki C/T polimorfizmi (Deichmann, Heinzmann et al. 1996), ekzon 4'de 3'UTR bölgesinde AT dimerlerinin tekrarlarında CTLA-4 gen polimorfizmlerindedir (Yanagawa ve ark. 1995), İntron 1 de 1822. pozisyonda C/T (+1822 C/T) saptanan polimorfizmlerden bir diğeridir.

CTLA-4 bir başka T hücre yüzey reseptörü olan CD28'in homologudur. CD80 ve CD86 molekülleri CTLA-4'un ligandı olmakla birlikte homologu olan CD28'in de ligandı olarak tanımlanmıştır. CTLA-4, CD28 gibi antijen sunan hücrelerde bulunan CD80 ve CD86 ligandlarına bağlanır fakat bağlanma afiniteleri birbirinden farklıdır. CTLA-4'ün B7 molekülüne bağlanma afinitesi CD28'e nazaran 10-100 kat daha fazladır (Gough ve ark. 2005). Sonuç itibari ile CTLA-4 kendi başına bir sinyal oluşturamaz ancak CD28'in pozitif etkisini önler. CD28 molekülü de B7 molekülüne bağlanarak T hücresinin aktive olmasını sağlar.

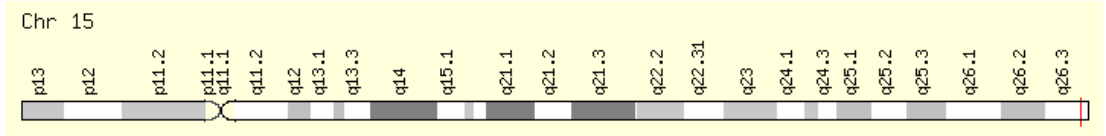
CTLA-4 geni Hashimoto tiroiditinden başka diğer otoimmün hastalıklara örnek olan Graves hastalığı ve tip 1 diyabette de kritik öneme sahiptir (Ueda ve ark. 2003).



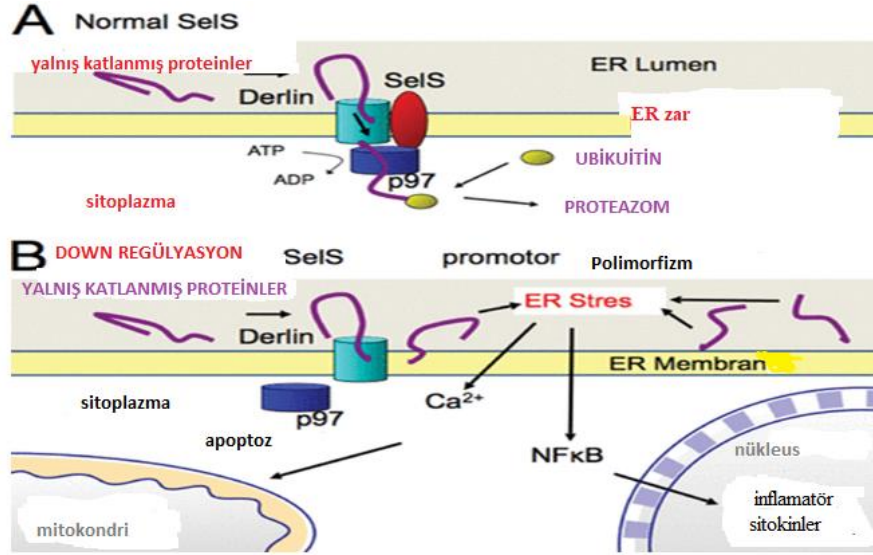
Şekil 2.4. CTLA-4 gen polimorfizmleri (Valk ve ark. 2008)

2.6. SEPS1 geni

Selenyum, insanlarda hücreyi oksidatif hasarlardan koruyan glutatyon peroksidazların (GPx), iotiroin deiyodinazların, tioredoksin redüktazın ve selenoprotein P'nin de dahil olduğu pek birçok metabolik yolakta rol oynamaktadır. Selenoproteinler ise, selenosistein rezidüleri içeren protein yapılarıdır. Bu gen, endoplazmik retikulumda lokalize olan bir transmembran proteini kodlar. SEPS1 (rs28665122) geni kromozom 15q26.3'te yerleşim göstermektedir. Selenoprotein geni içindeki tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP'ler) selenoprotein sentezini etkileyebileceği ileri sürülmüştür(Papp ve ark.2007)



Şekil 2.5. SEPS1 geni kromozomal lokalizasyonu ideogram üzerinde gösterimi(Human Gene Database).

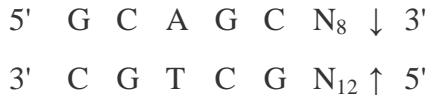


Şekil 2.6. SEPS1'in yalniş katlanmış protein cevabındaki rolü (Volpe 1991).

Selenoprotein endoplazmik retikulumda (ER), yalniş katlanmış proteinlerin ER lümeninden sitozole retrotranslokasyonu aracılığı ile yalniş katlanmış proteinleri proteazoma yönlendirerek, inflamator yanıtta işlev görür (Santos ve ark. 2014). p97/Valosin içeren protein VCP übikülin proteazom sistemi (UPS), ER ilişkili protein yıkımında şaperon olarak görev yapar. Sels, transmembran alana sahiptir ve hücreleri ER stres kaynaklı apoptozdan p97 (VCP) ile etkileşim yoluyla korur (Ye ve ark. 2004). Sels yalniş katlanmış proteinleri ER dışına taşımak için ER membran proteini DERLİN ve sitozolik ATPaz p97 ile etkileşen bir ER zar proteindir. NF-κB transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesi sonucunda inflamatuvar işlerde görevli genler indüklenir. Ancak yalniş katlanmış proteinlerin ER lümende birikmesi Sels'in aşağı düzenlenmesinden kaynaklanır ve Sels ile ilişkili SNP'lerin ER stresinin aktivleşmesine neden olur. SEPS1'deki genetik varyasyonların, özellikle -105G/A promotöründeki polimorfizmlerin HT patojenezine neden olduğu bilinen IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi sitokinlerin plazma düzeylerini etkilediği gösterilmiştir. (Curran ve ark. 2005)

Hastalıklarla ilişkili mutasyon ve polimorfizmlerin tanımlanmasında Southern blot, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP), denature gradyan jel elektroforezi (DGGE) gibi birçok tekniğin tekbaşına veya birlikte uygulanmasından yararlanılmaktadır (Al-Haggar 2013). Bizim çalışmamızda CTLA-4 ve SEPS1 genlerindeki polimerfizmlerin belirlenmesinde PZR ve RFLP yöntemleri kullanılmıştır. PZR, spesifik bir DNA parçasının in vitro şartlarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. CTLA-4 genine ait 328 bç'lik bölge F-

5'CCACGGCTTCCTTTCTCGTA3' R- 5'AGTCTCACTCACCTTTGCAG'3 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. SEPS1 genine ait 211 bç'lik bölge F-5'-TCTTGGCGTTCCATGACC-3' ve R-5'-AGCGTAGCCGGGATTTCTC-3' primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. RFLP ise restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması yöntemidir. CTLA-4 geni PCR ürünü BbVI restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmiştir. Bu restriksiyon enziminin kaynağı *Bacillus brevis*'den elde edilen BbVI genin taşıyan bir *Escherichia coli* suşudur. BbVI bir type II S Restriksiyon enzimidir. BbVI enzimi



tanıma bölgesinden kesim yaparak yapışkan uç oluşturur. Bu tip enzimler asimetrik DNA dizilerini tanıyan ve tanıma bölgesi dışından kesim yapabilen enzimlerdir. DNA'daki tek bir nükleotid değişikliği bile enzimin tanıma bölgesini değiştireceği için sonuçta farklı boylarda DNA bantlarının oluşmasına neden olacaktır. BbVI enzimi tanıma bölgesi CTLA-4 geni 49. nükleotidi içermektedir. CTLA-4 geni wild type genotipi (AA) sahip olduğundan enzim PZR ürünün kesmediği için agaroz jelde 328 bç'lik tek bir bant oluşur. A/G polimorfizmi olan örneklerde kesim gerçekleşir ve 328, 244 ve 84 bç. olmak üzere agaroz jelde 3 bant görülmektedir. Homozigot GG genotipi için enzim kesimi sonucu 244bç ve 84bç uzunlukta iki fragment oluşmaktadır. PZR sonucu elde edilen ürün agaroz jel yöntemi ile görüntülenmiştir. CTLA-4 geni için gerçekleştirilen PZR'ından sonuç alınmış ve RFLP yöntemi ile CTLA-4 49A/G polimorfizmi belirlenmiştir. Ancak SEPS1 geni için kurulan PZR'larından sonuç alınamamış bu nedenle enzim kesimi işlemine devam edilememiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Buz makinası, Bluewave BW, Çin

Buzdolabı +4°C, Profilo, Türkiye

Derin Dondurucu -20°C, Vestel, Türkiye

Distile su cihazı, GFL, Almanya

Ultrasaf su cihazı, Millipore, ABD

Elektroforez güç kaynağı, Cleaver, İngiltere

Elektroforez güç kaynağı, Thermo, İngiltere

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere

Hassas terazi, Ohaus, ABD

Isı döngü cihazı, Techne TC Plus, İngiltere

Isıtıcı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

Mikrosantrifüj, Cleaver, İngiltere

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Otoklav, Tek Bal, Türkiye

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

pH metre, Hanna HI221, Romanya

Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye

Vorteks, WiseMix, Kore

Transillüminatör, Vilber Lourmat, Fransa

Mikrodalga Fırını, Bosch, Almanya

Termal döngü cihazı, AB Proflex, ABD

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Agaroz, Sigma, ABD

Borik asit, Sigma, ABD

Etanol, Sigma, ABD

Fenol, Merck, Almanya

İzoamilalkol, Sigma, ABD

Kloroform, Sigma, ABD

Deoksiribonükleik asit trifosfat (dNTP) set, MBI Fermentas, Litvanya

DNA belirteç (100 bç'lik), Thermo, Almanya

EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit), Sigma, ABD

Etidyum bromür, Sigma, ABD

NaCl, Sigma, ABD

SDS, MP Biomedicals, France

Borik asit, Calbiochem, Germany

Fikol, Sigma, ABD

Brom fenol mavisi, Fisher Scientific, ABD

Ksilen siyanol, Sigma, ABD

Turuncu G, Sigma, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Magnezyum klorür, Sigma, ABD

BseXI (BbvI) restriksiyon enzimi Thermo Fisher Scientific, ABD

MlsI restriksiyon enzimi Thermo Fisher Scientific, ABD

Taq DNA polimeraz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya

Tris, Sigma, ABD

Yükleme tamponu, MBI Fermentas, Litvanya

3.1.3. Kullanılan çözelti ve tamponlar

Yükleme tamponu (Fermantas, Litvanya)

Tris-HCl pH 7,6

% 0,03 bromfenol mavisi

% 0,03 ksilen siyanol FF

% 60 gliserol

60 mM EDTA içeren yükleme tamponu Fermantas (Litvanya) firmasından temin edildi.

Etidyum bromür çözeltisi

10 mg/ml etidyum bromür distile su kullanılarak hazırlandı.

5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu

54 g Tris baz

27,5 g Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Çözelti 1 litre'ye dH₂O ile tamamlandı. 1X TBE hazırlamak için 5X TBE stoğundan 200 ml alındı ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

25 mM MgCl₂ (Fermantas, Litvanya)

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan 25 mM MgCl₂ Taq DNA polimeraz enzim kiti içerisinde hazır olarak alındı.

10 mM dNTP (Fermantas, Litvanya)

Her biri 100 mM olan dNTP, dGTP, dCTP ve dTTP solüsyonlarından 10'ar mikrolitre ve steril dH₂O'dan 60 mikrolitre alınarak 500 mikrolitrelik steril ependorf tüp içerisinde son hacim 100 µl olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

TE tamponu

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0) karıştırılarak son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

Solüsyon 1

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂ karıştırılarak son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

Solüsyon 2

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

0.5mM NaCl

% 0.5 SDS

2 mM EDTA karıştırılarak son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

Yükleme boyası

%10 Fikol® 400

% 0,25 Bromofenol Mavisi

% 0,25 Ksilen siyanol

% 0,4 Turuncu G

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

50 mM EDTA karıştırılarak son hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

3.1.4. Primerler

Çalışmanın PZR aşamasında kullanılan primerler CTLA-4 49A/G SNP ve SEPS1 - 105G/A için primerler (Kamel ve ark. 2014 ; (Mao ve ark. 2015) yayınından verilen diziler referans alınarak Thermo Fisher Scientific, ABD firmasından alınmıştır. Kullanılan primerler ve Tm değerleri çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR aşamasında kullanılan primerler ve Tm (melting temperature) dereceleri

POLİMORFİZM	PRİMER DİZİLERİ (5'→3')	Tm(C°)
CTLA-4 49A/G	F-CCACGGCTTCCTTTCTCGTA- R-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-	50°
SEPS-1 -105G/A	F-TCTTGGCGTTCCATGACC- R-AGCGTAGCCGGGATTTCTC-	59°

3.1.5. Kullanılan bilgisayar programları

Microsoft word, ABD

Microsoft excel, ABD

SPSS 15.0, ABD

3.1.6. Kullanılan restriksiyon enzimleri

Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmlerinin tayininde kullanılan restriksiyon enzimleri BseXI (BbvI) restriksiyon enzimi ve MlsI restriksiyon enzimi Thermo Fisher Scientific ABD temin edilmiştir.

3.1.7. Hasta grubu

Çalışmaya dahil edilen hasta grubu 50 kişiden oluşmaktadır. Kontrol grubu 50 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Hastalar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı kliniğinde Hashimoto tiroiditi teşhisi konmuş kişiler arasından seçilmiştir. Olgulara ait veriler ve klinik bulguları Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Hashimoto tanılı olgulara ait yaş, cinsiyet, Aile öyküsü, Sigara ve alkol kullanımı verileri ve FT3, FT4, TSH, AntiTG ve AntiTPO değerlerine ait klinik bulgular

No	Yaş	Cinsiyet	Aile Öyküsü	Sigara	Alkol	FT3	FT4	TSH	Anti TG	Anti TPO
1	37	E	-	-	-	-	-	-	-	-
2	59	K	-	-	-	3,2	0,76	8,6	-	236
3	59	K	+	+	-	2,79	0,95	5,82	9,9	119
4	32	K	-	-	-	-	0,7	5,02	-	-
5	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
6	45	K	+	-	-	3,65	0,91	1,63	258	442
7	36	K	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
9	28	K	+	-	-	2,51	0,77	3,19	88	1,86
10	45	K	-	+	-	5,36	16,65	57	>4000	>600
11	21	K	+	-	-	2,94	1	9,25	1,9	1013
12	45	E	-	+	-	3,75	1,11	1,27	1,39	358
13	30	K	+	-	-	1,28	2,86	2,44	3,5	97
14	38	K	+	-	-	-	-	-	-	-
15	27	K	-	-	-	1,5	0,66	2,72	18,6	270
16	41	K	-	-	+	4,48	1,05	1,23	523	971
17	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-
19	44	K	-	-	-	3,32	0,86	1,52	20,53	324
20	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
21	38	K	-	-	-	3,35	0,89	3,75	0,9	180
22	24	K	-	-	-	4,37	0,79	4,11	103	327
23	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-
25	21	K	-	-	-	-	-	-	-	-
26	41	K	+	+	-	3,46	0,58	3,38	1728	5160
27	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
28	52	K	+	-	-	-	-	-	-	-
29	19	K	+	-	-	2,94	0,87	1,67	0,9	341
30	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
32	44	K	-	-	-	2,77	0,6	5,38	10	64

33	55	K	-	-	-	4,02	0,91	1,73	1,4	1077
34	36	K	-	-	-	3,58	0,71	2,86	176	1077
35	47	E	+	+	-	-	-	-	-	-
36	28	K	+	-	-	-	-	-	-	-
37	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-
38	46	K	+	-	-	3,55	0,6	3,01	329	850
39	42	K	+	-	-	3,43	0,92	2,75	163	262
40	31	K	+	+	-	3,01	0,9	2,36	8,69	272
41	66	E	-	-	-	3,69	0,76	5,17	278	107
42	71	E	-	+	+	3,2	0,89	3,15	1	193
43	26	K	+	-	-	2,9	0,51	52	380	>1077
44	40	K	-	-	-	-	-	-	-	-
45	33	K	-	+	+	3,27	0,75	1,31	2	>1077
46	32	K	-	-	-	36	0,81	8,85	8,14	784
47	57	K	-	+	-	2,9	0,49	3,04	>2533	>1077
48	52	E	-	+	-	3,02	0,78	0,39	98	155
49	32	K	-	+	-	-	-	-	-	-
50	21	E	+	-	+	3,7	0,67	2,52	189	92
51	33	K	+	-	-	3,5	1,04	1,41	205	12,4
52	36	K	+	-	-	3,5	1,29	0,08	1,9	310
53	35	K	+	-	-	2,91	0,94	2,19	1,2	31
54	43	K	-	-	-	-	-	-	-	-
55	37	K	-	+	-	3,3	0,85	2,07	7,2	222

Çizelge 3.3. Kontrol grubuna ait yaş, cinsiyet, Aile öyküsü, Sigara ve alkol kullanımı verileri ve FT3, FT4, TSH, AntiTG ve AntiTPO değerlerine ait klinik bulgular

N	Yaş	Cinsiyet	Aile öyküsü	Sigara	Alkol	FT3	FT4	TSH	Anti TG	Anti TPO
S007	34	E	+	+	+	3	1,01	2,5	0,87	<0,50
S008	29	K	-	-	-	2,91	1,07	1,1	2,47	<0,50
S010	28	K	-	-	-	3,14	1,12	1,01	1,4	<0,50
S014	27	K	-	-	-	2,57	1,04	2,04	2,98	<0,50
S015	34	E	+	-	-	3,05	1,01	0,77	2,67	0,76
S016	40	E	-	-	-	2,99	0,91	0,53	1,46	<0,50
S017	34	E	+	+	-	2,86	0,9	1,93	0,42	<0,50
S018	47	K	+	+	-	2,91	0,89	1,96	56,93	<0,50

S019	37	K	+	+	+	2,98	0,93	1,5	2,43	<0,50
S020	32	K	-	-	+	2,49	0,81	1,88	5,55	11,31
S022	34	K	+	-	+	2,31	0,79	2,54	1	<0,50
S025	29	K	+	-	+	3,25	1,26	1,92	3,72	<0,50
S026	32	E	+	-	+	2,76	1,11	2,01	0,52	<0,50
S027	34	K	+	-	-	2,38	1,4	1,73	11,43	38
S028	25	K	-	-	-	3,05	0,96	1,96	2,52	<0,50
S029	40	E	-	+	-	2,97	0,95	1,48	0,67	<0,50
S030	31	E	+	+	-	2,87	0,95	1,92	0,61	<0,50
S032	54	E	-	+	+	2,99	0,94	0,44	1,33	0,54
S033	47	K	+	-	-	2,76	0,88	2,27	0,79	<0,50
S034	63	E	-	+	-	2,87	0,96	1,96	1,3	<0,50
S035	27	K	+	+	-	2,71	0,99	0,92	0,48	<0,50
S036	x	E	x	x	x	x	x	x	x	x
S037	35	E	-	-	-	3,22	0,82	0,79	0,78	0,50
S038	43	E	-	+	+	2,77	0,89	0,66	2,24	0,55
S039	35	K	-	+	+	2,7	1,11	0,71	0,93	<0,50
S044	33	E	-	+	+	2,88	1,17	1,02	0,63	<0,50
S046	18	K	-	-	-	3,47	1	1,06	5,49	<0,50
S047	x	K	x	x	x	x	x	x	x	x
S048	57	K	-	-	-	3,04	0,94	1,95	1,18	0,84
S049	53	K	-	-	-	2,37	0,85	1,9	1,25	<0,50
S050	17	K	-	-	-	3,11	1,04	2,24	0,94	<0,50
S052	60	E	-	+	+	3,21	1,04	1,99	0,53	<0,50
S055	28	E	-	-	-	2,98	1,04	3,96	0,54	<0,50
S056	21	E	-	-	-	2,73	0,84	1,48	1,01	<0,50
S057	28	K	-	+	-	3,02	0,87	1,22	1,63	0,72
S058	33	K	-	-	-	2,44	1,01	2,03	1,84	<0,50
S059	x	E	x	x	x	x	x	x	x	x
S060	44	E	-	+	-	2,31	0,96	2,09	0,52	<0,50
S063	41	K	+	-	+	2,97	0,77	1,79	2,77	133,8
S066	37	E	+	+	+	3,13	1,12	1,84	4,48	34,8
S065	56	E	-	+	-	2,89	1,25	1,19	1,01	<0,50
S068	44	K	-	-	-	2,88	0,92	2,94	2,04	5,67
S069	54	E	-	-	+	3,29	0,97	1,13	1,45	1,57
S070	34	E	-	+	+	3,05	1,09	0,97	1,02	<0,50
S071	38	E	-	+	-	2,92	1,05	0,63	1,06	<0,50
S076	57	E	-	+	+	2,96	0,77	1,67	1,39	0,69
S077	32	E	+	+	+	3,04	1,04	1,2	1,11	<0,50

S080	48	K	-	-	-	2,64	0,84	2,92	65	<0,50
S066	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
S053	28	E	-	+	-	3,02	0,87	1,22	1,63	0,72
S006	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

3.2. Yöntem

3.2.1. Kandan DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan kan örnekleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı kliniğinden alındı. Kan örnekleri alınarak EDTA'lı tüp içinde + 4°C' de saklandı.

Çalışmaya katılan bireylerden 1/100 hacimde 0,5 mmol/L sodyum EDTA içeren tüplere 5 ml kan alındı. Daha sonra tüpün hacmi Solüsyon 1 kullanılarak 10 ml'ye tamamlandı. Buna ilaveten 120 µl nonidet P40 hücrelerin lizis'i için ortama eklendi. Tüp birkaç defa tersyüz çevrilerek iyi bir şekilde karıştırıldı. Nükleer peleti çöktürmek için 2000 rpm'de 10 dakika çevrildi. Pelet oynatılmaksızın süpernatant döküldü. Pelet 800 µl solüsyon 2 ile dikkatlice süspanse edildi. 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. 400 µl fenol ilave edilerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 400 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (1:1:1) solüsyonu eklendi. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 700 µl kloroform / izoamilalkol (1:1) eklenerek tersyüz edilip karıştırıldı. Tekrar 12000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı. İki hacim % 100 etanol ilave edilerek tüp tersyüz edildi. (Bu aşamada DNA görünür hale gelmektedir). Elde edilen DNA Pasteur pipetinin kapatılmış bir yüzeyi ile 1 ml % 70 etanol içeren bir Eppendorf tüpüne transfer edildi. Çalkalanarak iyice yıkanması sağlandı. Tüpler 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Etanol ortamdan uzaklaştırıldı. Örnekler 37 °C'lık etüvde birkaç dakika bekletilerek kurutuldu. Ardından DNA TE tamponda çözüldü (John, Weitzner et al. 1991).

Elde edilmiş DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlendi. 260/280 nm oranı DNA örneklerinin saflığı ile ilgili tahmini karşılaştırma sunar.

$$\text{DNA konsantrasyonu}(\mu\text{g/ml}) = (\text{OD260}) \times (\text{dilüsyon faktörü}) \times \frac{50 \mu\text{g DNA/ml}}{1 \text{ OD260 birim}}$$

$$\text{Miktar} = (\text{DNA konsantrasyonu } \mu\text{g/ml}) \times (\text{toplam hacim(ml)}).$$

Çizelge 3.4. Kontrol grubu bireylerinden elde edilen DNA'nın spektrofotometrede ölçümü, DNA kalitesi, DNA miktarı ve 10ng DNA içeren örneklerin hazırlanması

Tiroid sağlıklı örnekler	260nm	280nm	DNA kalite	DNA miktar	10ng
S022	0,24	0,18	1,37	11,95	84μl+16μl su
S039	0,34	0,22	1,55	17,10	58μl+42μl su
S78	0,17	0,11	1,55	8,30	60μl+40μl su
S80	0,31	0,19	1,61	15,55	64μl+36μl su
S021	0,50	0,31	1,62	24,95	40μl+60μl su
S049	0,32	0,20	1,62	15,80	63μl+37μl su
S048	0,23	0,14	1,62	11,60	86μl+14μl su
S79	0,71	0,43	1,63	35,30	28μl+72μl su
S030	0,40	0,24	1,64	20,00	50μl+50μl su
S70	0,73	0,44	1,65	36,60	27μl+72μl su
S71	0,62	0,37	1,65	30,85	32μl+68μl su
S034	0,49	0,30	1,65	24,70	40μl+60μl su
S052	0,38	0,23	1,67	18,90	52μl+48μl su
S76	0,48	0,29	1,67	23,90	42μl+58μl su
S77	0,64	0,38	1,67	31,90	31μl+69μl su
S011	0,69	0,42	1,67	34,60	28μl+72μl su
S006	0,41	0,25	1,68	20,65	48μl+52μl su
S007	0,39	0,23	1,68	19,50	51μl+49μl su
S047	0,34	0,20	1,68	16,75	60μl+40μl su
S018	0,35	0,21	1,69	17,65	57μl+43μl su
S024	0,69	0,41	1,69	34,65	29μl+71μl su
S61	0,37	0,22	1,69	18,60	54μl+46μl su
S67	0,43	0,25	1,69	21,35	47μl+53μl su
S81	0,39	0,23	1,70	19,60	51μl+49μl su
S054	0,53	0,31	1,70	26,60	37μl+63μl su
S015	0,44	0,26	1,70	22,10	45μl+55μl su

S046	0,41	0,24	1,70	20,50	49µl+51µl su
S051	0,46	0,27	1,70	22,75	44µl+56µl su
S029	0,38	0,22	1,71	18,80	53µl+47µl su
S72	0,77	0,45	1,71	38,55	28µl+72µl su
S73	0,93	0,54	1,71	46,30	21µl+79µl su
S023	0,38	0,22	1,71	18,75	53µl+47µl su
S009	0,59	0,35	1,71	29,65	34µl+66µl su
S045	0,75	0,44	1,71	37,30	27µl+72µl su
S74	0,58	0,34	1,72	28,90	35µl+65µl su
S035	0,54	0,32	1,72	27,20	37µl+63µl su
S040	0,40	0,23	1,72	20,15	50µl+50µl su
S010	0,75	0,44	1,73	37,60	26µl+74µl su
S043	0,48	0,28	1,73	23,95	42µl+58µl su
S031	0,40	0,23	1,74	20,05	50µl+50µl su
S64	0,53	0,31	1,74	26,65	37µl+63µl su
S62	0,53	0,31	1,74	26,70	37µl+63µl su
S66	0,59	0,34	1,74	29,45	33µl+67µl su
S036	0,45	0,26	1,75	22,60	44µl+56µl su
S032	0,53	0,30	1,75	26,55	38µl+62µl su
S75	1,04	0,60	1,75	52,15	19µl+81µl su
S042	0,48	0,27	1,75	23,95	42µl+58µl su
S012	0,93	0,53	1,75	46,45	21µl+79µl su
S037	0,85	0,48	1,75	42,25	24µl+76µl su
S014	0,74	0,42	1,76	37,00	27µl+72µl su
S019	0,82	0,46	1,76	40,75	24µl+76µl su
S68	0,69	0,39	1,77	34,70	29µl+71µl su
S041	0,63	0,36	1,77	31,55	32µl+68µl su
S69	0,71	0,40	1,77	35,50	28µl+72µl su
S008	0,48	0,27	1,77	23,95	42µl+58µl su
S65	0,90	0,50	1,78	44,75	22µl+78µl su
S016	0,75	0,42	1,78	37,40	27µl+72µl su
S038	1,02	0,57	1,78	51,10	19µl+81µl su
S027	0,89	0,50	1,79	44,45	22µl+78µl su

S026	1,18	0,66	1,79	59,10	17µl+83µl su
S059	0,62	0,35	1,79	31,05	32µl+68µl su
S63	0,68	0,38	1,79	33,80	29µl+71µl su
S056	0,67	0,37	1,79	33,45	30µl+70µl su
S055	0,54	0,30	1,80	26,85	37µl+63µl su
S020	0,45	0,25	1,80	22,55	44µl+56µl su
S60	0,50	0,28	1,80	25,00	40µl+60µl su
S028	0,52	0,29	1,80	26,20	38µl+62µl su
S033	0,43	0,24	1,81	21,50	46µl+54µl su
S058	0,67	0,37	1,81	33,45	30µl+70µl su
S057	0,66	0,36	1,82	32,80	30µl+70µl su
S017	0,93	0,51	1,82	46,40	21µl+79µl su
S044	1,02	0,55	1,84	50,85	20µl+80µl su
S053	0,54	0,29	1,84	26,75	37µl+63µl su
S050	0,99	0,54	1,85	49,50	20µl+80µl su
S025	0,76	0,38	2,01	37,90	26µl+74µl su
S82	0,29	0,07	4,01	14,45	69µl+31µl su

Çizelge 3.5. Hasta grubu bireylerden elde edilen DNA'nın spektrofotometrede ölçümü, DNA kalitesi, DNA miktarı ve 10ng DNA içeren örneklerin hazırlanması

Hasta	260nm	280nm	DNA kalite	DNA miktar	10ng
H1	1,123	0,611	1,84	56,15	18µl+82µl su
H2	0,667	0,380	1,76	33,35	30µl+70µl su
H3	0,696	0,409	1,70	34,8	29µl+71µl su
H4	0,995	0,560	1,78	49,75	20µl+80µl su
H5	0,60	0,35	1,68	29,8	33µl+67µl su
H6	0,49	0,30	1,66	24,6	40µl+60µl su
H7	0,66	0,38	1,72	33,35	30µl+70µl su
H8	0,94	0,52	1,80	46,95	21µl+79µl su
H9	0,49	0,30	1,64	24,5	40µl+60µl su
H10	0,70	0,40	1,75	35,2	28µl+72µl su
H11	0,48	0,29	1,66	24,05	41µl+59µl su

H12	0,83	0,49	1,72	41,7	24µl+76µl su
H13	0,69	0,39	1,77	34,5	29µl+71µl su
H14	0,77	0,44	1,77	38,5	26µl+74µl su
H15	0,76	0,43	1,74	37,75	26µl+74µl su
H16	0,50	0,29	1,76	25,1	40µl+60µl su
H17	0,64	0,36	1,78	32,2	31µl+69µl su
H18	1,05	0,556	1,89	52,7	19µl+81µl su
H19	0,57	0,32	1,77	28,5	35µl+65µl su
H20	0,61	0,35	1,75	30,5	33µl+67µl su
H21	0,96	0,55	1,75	48,15	20µl+80µl su
H22	0,39	0,26	1,51	19,35	52µl+48µl su
H23	0,46	0,27	1,71	23	43µl+57µl su
H24	0,84	0,46	1,85	42,1	23µl+77µl su
H25	0,51	0,53	0,96	25,3	39µl+61µl su
H26	1,31	0,75	1,75	65,65	15µl+85µl su
H27	0,84	0,49	1,73	42,05	24µl+76µl su
H28	0,44	0,25	1,74	21,9	45µl+55µl su
H29	0,51	0,31	1,64	25,65	39µl+61µl su
H30	0,21	0,14	1,46	10,35	96µl+4µl su
H31	0,33	0,22	1,54	16,6	60µl+40µl su
H32	0,15	0,11	1,43	7,6	10µl
H33	1,06	0,63	1,68	52,8	19µl+81µl su
H34	0,46	0,26	1,75	23,05	43µl+57µl su
H35	1,00	0,62	1,61	49,9	20µl+80µl su
H36	0,46	0,29	1,61	23,2	43µl+57µl su
H37	0,22	0,14	1,56	10,85	97µl+31µl su
H38	0,17	0,14	1,29	8,7	10µl
H39	0,18	0,11	1,63	8,95	10µl
H40	1,87	1,02	1,83	93,6	11µl+89µl su
H41	0,42	0,26	1,64	20,9	48µl+52µl su
H42	0,44	0,28	1,59	22,05	45µl+55µl su
H43	0,35	0,23	1,52	18,45	54µl+46µl su
H44	0,29	0,19	1,51	14,45	69µl+31µl su

H45	1,09	0,66	1,65	4,59	18µl+82µl su
H46	1,73	1,04	1,67	86,7	11µl+89µl su
H47	0,49	0,30	1,64	24,35	40µl+60µl su
H48	1,15	0,68	1,69	57,5	17µl+83µl su
H49	0,23	0,16	1,41	11,55	86µl+14µl su
H50	0,37	0,24	1,52	18,45	54µl+46µl su
H51	0,34	0,21	1,60	17	59µl+41µl su
H52	0,75	0,45	1,64	37,5	27µl+73µl su
H53	0,076	0,060	1,27	3,8	10µl
H54	1,23	0,706	1,75	61,6	16µl+84µl su
H55	0,52	0,31	1,67	26,25	38µl+62µl su

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu PZR (Polymerase Chain Reaction, PCR), spesifik bir DNA parçasının in vitro şartlarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bir PCR döngüsü denatürasyon, bağlanma, uzama olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Çift zincir DNA (dsDNA), tek zincir DNA (ssDNA) biçimine çözülür ve kopyalanarak çoğaltılır. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzanmasını sağlar. Kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur.

PCR'ın temel bileşenleri:

- Kalıp DNA,
- Öncü DNA molekülleri (primerler),
- Deoksiribonükleozidtrifosfatlar (dNTP) – dATP, dGTP, dTTP ve dCTP,
- Mg²⁺,
- Tampon,
- DNA polimeraz (Taq polimeraz) – *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilir.

PZR reaksiyon sonucu elde edilen örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

PZR yöntemi ile CTLA-4 49A/G ve SEPS1 -105G/A polimorfizmlerini içeren ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bunun için PZR reaksiyon karışımları hazırlandı

CTLA-4 49A/G gen polimorfizmi için

25 µl'lik bir reaksiyon karışımı

- 0,1-1 µg kalıp DNA

-10xPCR tamponu

-10 pmol ileri ve geri primerleri

-200 µM dNTP karışımı

- 1,5 mM MgCl₂

-1 ünite Taq polimeraz enzimi

- dH₂O içermektedir.

SEPS-1 -105G/A gen polimorfizmi için

50 µl'lik bir reaksiyon karışımı için

-0,1-2 µg kalıp DNA

-10xPCR tamponu

-10 pmol ileri ve geri primerleri

-200 µM dNTP karışımı

-1,5 mM MgCl₂

-1 ünite Taq polimeraz enzimi

-dH₂O içermektedir

SEPS-1 -105G/A gen polimorfizmi için

25 µl'lik bir reaksiyon karışımı için

-0,1-2 µg kalıp DNA

-10xPCR tamponu

-15 pmol ileri ve geri primerleri

-200 µM dNTP karışımı

-1,5 mM MgCl₂

-1 ünite Taq polimeraz enzimi

-dH₂O içermektedir

Bu işlem 0,2 ml'lik eppendorf tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek, aşağıda belirtilen program uygulandı.

Çizelge 3.6 CTLA-4 geni için PZR programı

ön denatürasyon	96°C'de 1dak	
Kalıp DNA' nın denatürasyonu.....	94 °C'de 30sn	} 35
Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması.....	50 °C de 45sn	
Yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesi.....	72 °C'de 30sn	
Final uzatması.....	72 °C'de 7 dakika	

Çizelge 3.7. SEPS1 geni için PZR programı

Ön denatürasyon.....94 °C'de 5 dak

Kalıp DNA' nın denatürasyonu.....94 °C'de 30sn	}	30
Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması.....59 °C de 30sn		
Yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesi.....72 °C'de 30sn		
Final uzatması.....72 °C'de 2 dakika		

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz, kırmızı alg türü olan Agar agar'dan izole edilmiş jelimsi özelliğe sahip polisakkarittir. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin tanımı, ayırımı ve saflaştırılmasında kullanılan yaygın yöntemlerden biridir. Küçük DNA fragmanları için konsantrasyonu yüksek agaroz, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz konsantrasyonu ile agaroz jeller hazırlanarak DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. Agaroz jelde DNA'nın görünür hale gelmesi için EtBr kullanılmaktadır.

Bu çalışmada PZR ile çoğaltılan ürünlerin doğruluğunu kontrol etmek için jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla 50 ml 1xTBE içerisinde 1 g agaroz ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Konsantrasyonu 10mg/ml olan EtBr'den 2,5 µl ilave edilerek jel düzeneğine uygun taraklar takılarak döküldü. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve düzenek içerisinde 1x TBE bulunan tanka yerleştirildi. Kuyucuklara örnekler ve belirteç DNA yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. Yüklenen DNA örnekleri 35 dakika 120 volt sabit voltajda yürütüldü ve oluşan DNA bantları UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi.

3.2.4. PZR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesimi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması yöntemidir. Restriksiyon enzimleri DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar. Bu yöntem genotipleme polimorfizm çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. 200'den fazla farklı bakteri türünden çok sayıda restriksiyon enzim bulunmuştur. Bakterinin orijinal isminin kısaltılması ile adlandırılmaktadır. RFLP; DNA izolasyonu, PCR, elde edilen PCR ürününün restriksiyon enzimlerle kesimi, elektroforezle kesilen fragmanların ayırımı ve görüntülenmesi

şeklinde 4 temel aşamadan oluşmaktadır. SEPS 1 -105 G/A polimorfizminde PCR ürünü Msc I restriksiyon enzimi ile kesilecektir.

CTLA-4 49A/G polimorfizminde PCR ürünü BbVI restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmiştir. Bu restriksiyon enziminin kaynağı *Bacillus brevis*'den elde edilen BbVI genin taşıyan bir *E.coli* suşudur.

5' G C A G C N₈ ↓ 3'
3' C G T C G N₁₂ ↑ 5'

SEPS 1 -105 G/A polimorfizminde PCR ürünü Msc I restriksiyon enzimi ile kesilecektir. Bu restriksiyon enziminin kaynağı *Micrococcus* türlerinden elde edilen Msci genin taşıyan bir *E. coli* suşudur.

5' TGG ↓ CCA 3'
3' ACC ↑ GGT 5'

CTLA-4 49A/G Her bir kesim için reaksiyon tüpüne;

- PZR ürünü (10µL)
- 10x Tampon (2µL)
- Restriksiyon enzimi (1µL)
- dH₂O (18µL)

CTLA-4 49A/G gen polimorfizminde PCR ürünü BbVI restriksiyon enzim ile kesim gerçekleştirildi. Termal döngü cihazında kesim 2-4 saat süre ve 65°C ile inkübe edildi. Kesim ürünleri %2 veya % 4'lük agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Kesim sonucunda heterozigot AG genotipi için 328, 244 ve 84 bç, wild type AA genotipi için 328 bç, homozigot GG genotipi için 244 ve 84 bç bant oluştu. SEPS1 geni için yapılan PZR çalışmalarından sonuç alınamamıştır. Bu nedenle enzim kesimi işlemi yapılmamıştır.

3.2.5. İstatistiksel analizler

Hasta ve kontrol grubuna ait veriler ve klinik bilgiler SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak karşılaştırıldı. PZR ve RFLP sonuçlarındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığı

Ki-kare testi ile değerlendirildi ve ‘‘p’’ değerinin 0,05’den küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hasta grubu

Çalışmaya Hashimoto tiroiditi tanısı konulmuş 50 hasta dahil edilmiŐdir. Çalışmaya dahil edilmiş hastaların 12’i erkek 43’u kadındır. 22 hastanın FT3 değeri bulunmamaktadır. 21 hastanın FT4 değerine, 21 hastanın TSH değerine, 23 hastanın AntiTG değerine ve 22 hastanın AntiTPO değerine ulaŐılamadı. Hastalara ait veriler izelge 3.2 de sunulmuŐtur. Hastaların 20 tanesinde aile öyküsü bulunmaktadı. 10 hastada sigara kullanımı mevcutken 4 hastada alkol kullanımı mevcuttur. 20 hastanın verilerine ulaşılamamıştır. Hastaların yaş aralığı 19-71’dir.

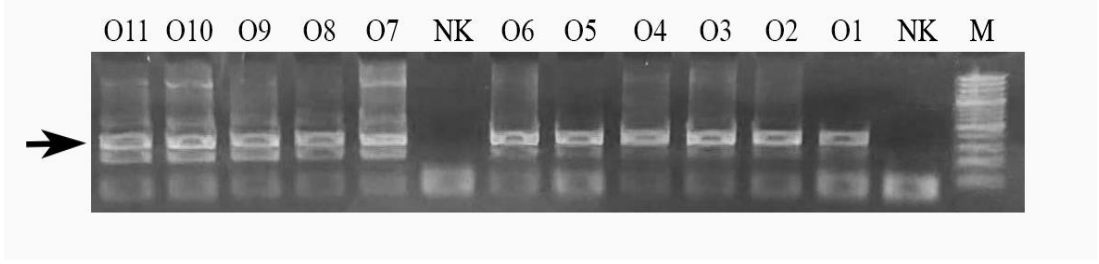
Kontrol grubuna dahil edilen kişi sayısı 50’i dir. Kontrol grubuna ait veriler ve klinik bulguları 3.3 çizelgede verilmiştir. Kontrol grubunun 26’sı erkek, 23’u kadın ve 1 kiŐinin cinsiyeti çizelgede mevcut değildir. Hastaların 15 tanesinde aile öyküsü bulunmaktadı. 20 hastada sigara kullanımı mevcutken 16 hastada alkol kullanımı mevcuttur. 4 hastanın verilerine ulaşılamamıştır. Kontrol grubunun aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımından başka, TSH, FT3, FT4, AntiTPO ve AntiTG verileri deęerlendirilmiŐdir.

4.2. PZR ve RFLP sonuçları

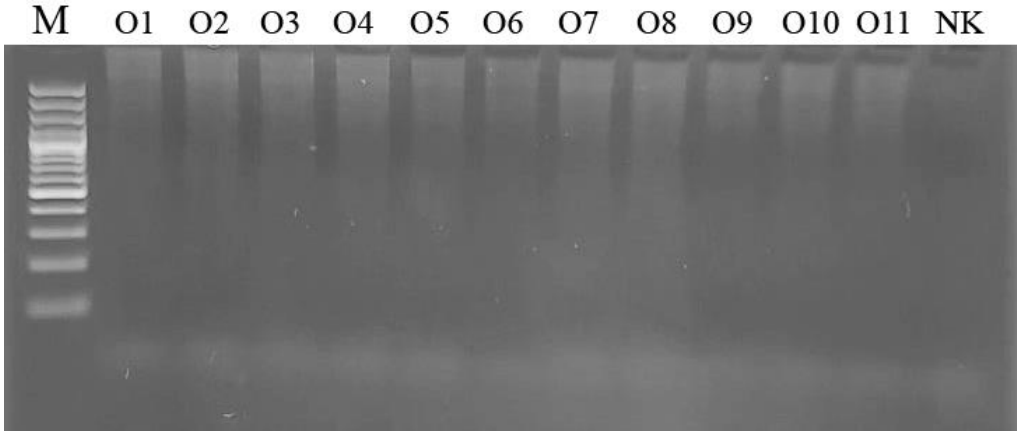
4.2.1 CTLA-4 49A/G gen polimorfizmi

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun periferik kan lökositlerinden izole edilen DNA’ların CTLA-4 49A/G polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve RFLP yöntemi ile kesimi gerçekleştirildi. Beklenen bantlar %2 ve ya %4 agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

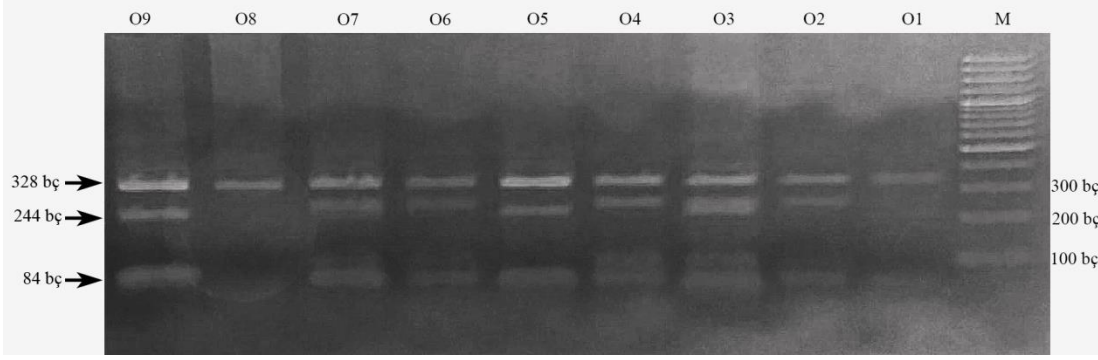
alıŐan 55 olguya ait DNA örneklerinden 46 tanesinde PZR ürünü elde edilmiş, 9 örnekten sonuç alınamamıştır. PZR ürünü elde edilen örneklere RFLP yöntemi uygulanmıştır.



Şekil 4.2. CTLA-4 geni PZR sonuçları M: Marker (100 Bç NK: negatif kontrol, O: olgu Ok ile PZR sonucu elde edilen 327 Bç PZR ürünü gösterilmektedir. -hasta).



Şekil 4.2.1. SEPS1 geni PZR sonuçları: SEPS1 geni için iki farklı koşulda PZR yöntemi uygulanmış ancak ok ile gösterilen bant düzeyinde PZR ürünü izlenememiştir



Şekil 4.2.2. CTLA-4 PZR-RFLP kesim sonuçları; CTLA-4 geni 49A/G polimorfizminde PCR ürünü BbVI restriksiyon enzim ile kesim gerçekleştirildi. Termal döngü cihazında kesim 2-4 saat süre ile inkübe edildi. Kesim ürünleri %2 veya % 4'lük agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Heterozigot AG genotipi için 328bç, 244bç ve 84 bç, wild type AA genotipi için 328 bç, homozigot GG genotipi için 244 ve 84 bç bant oluştu.

Çizelge 4.2.1. Hashimoto tiroiditi olgularında belirlenen CTLA-4 genotipleri

CTLA-4 olgu	Wild type AA	Heterozigot AG	Homozigot GG
	13	26	7

Hashimoto tiroiditi hastaların 9'unda PZR-RFLP ile sonuç alınamadı. Sonuçlanan 46 örnekten 13'ü yabancı tip AA genotipinde , 26'sı heterozigot AG ve 7'si ise homozigot GG genotipine sahiptir.

Çizelge 4.2.2. Sağlıklı bireylerde belirlenen CTLA-4 genotipleri

CTLA-4 Kontrol	Wild type AA	Heterozigot AG	Homozigot GG

	10	19	1
--	----	----	---

Kontrol grubuna ait 20 örnekte PZR-RFLP ile sonuç alınamamıştır. Sağlıklı bireylerin toplam 30'unda RFLP yöntemi uygulanmıştır. 30 olgunun 10'u yabancıl tip AA genotipinde, 19'u heterozigot AG genotipinde ve 1'inin homozigot GG genotipinde olduğu belirlenmiştir.

4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Yapılan tez çalışması Hashimoto tiroiditi tanılı 55 kişi ile sağlıklı 51 bireyden oluşan kontrol grubu arasında, CTLA-4 49A/G polimorfizminin genotipleri ve alleleri açısından anlamlılık analizleri ki-kare testi ile yapıldı.

Çizelge 4.3.1 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu yaş ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	Yaş			Toplam	p
	45>	46-60	60<		
CTLA4 Wild Type	7	2	0	9	0,663
Heterozigot	18	4	2	24	
Homozigot	3	2	0	5	
Toplam	28	8	2	38	

Toplam 38 olguya ait yaş verisi bulunmaktadır. Olguların 28'i 45 yaş altında, 8'i 46-60 yaş aralığında ve 2'si 60 yaş üstüdür. Olguda CTLA-4 49A/G polimorfizm saptanmıştır ancak bu polimorfizm ile hasta yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p= 0,663$).

Çizelge 4.3.2 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol yaş ilişkisinin ki- kare testi ile değerlendirilmesi

	Yaş			Toplam	p
	45>	46-60	60<		
CTLA4 Wild Type	6	3	0	9	0,295
Heterozigot	17	2	0	19	
Homozigot	1	0	0	1	
Toplam	24	5	0	29	

Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu ile kontrol grubu arasında yaş değerlendirmesi sonucu istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilemedi.

Çizelge 4.3.3 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu cinsiyet ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	Cinsiyet		Toplam	p
	Kadın	Erkek		
CTLA4 WildType	8	5	13	0,268
Heterozigot	22	4	26	
Homozigot	5	2	7	
Toplam	35	11	46	

Hasta klinik veri cinsiyet değerlendirmesinin ki-kare test sonucu cinsiyet ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.3.4 CTLA-4 49 A/G polimorfizmi ve kontrol cinsiyet ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	Cinsiyet		Toplam	p
	Kadın	Erkek		
CTLA4 WildType	3	7	10	0,215
Heterozigot	11	8	19	
Homozigot	1	0	1	
Toplam	15	15	30	

Kontrol klinik veri cinsiyet değerinin hasta klinik veriye yakın sonuç elde edilmiş ve anlamlı bağlantı kurulamamıştır.

Çizelge 4.3.5 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu aile öyküsü ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	Aile		Toplam	p
	Var	Yok		
CTLA4 Wild Type	6	7	13	0,689
Heterozigot	9	17	26	
Homozigot	2	5	7	
Toplam	17	29	46	

Toplam 46 hastanın aile öyküsünün değerlendirilmesi sonucunda anlamlı bağlantı kurulamamıştır (p= 0,689).

Çizelge 4.3.6. CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol aile öyküsü ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		Aile		Toplam	p
		Var	Yok		
CTLA4	Wild Type	4	5	9	0,496
	Heterozigot	5	14	19	
	Homozigot	0	1	1	
Toplam		9	20	29	

CTLA-4 49A/G polimorfizminin kontrol grubu aile öyküsünün değerlendirmesi zamanı istatistiksel bağlantı kurulamamıştır.

Çizelge 4.3.7 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu sigara kullanımı ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		Sigara		Toplam	p
		Var	Yok		
CTLA4	WildType	4	9	13	0,489
	Heterozigot	4	22	26	
	Homozigot	2	5	7	
Toplam		10	36	46	

CTLA-4 49A/G gen polimorfizminin hasta grubunun sigara kullanımı incelenmiş ve anlamlı sonuca ulaşlamamıştır.

Çizelge 4.3.8 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol sigara kullanımı ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		Sigara		Toplam	p
		Var	Yok		
CTLA4	Wild Type	4	5	9	0,446
	Heterozigot	7	12	19	
	Homozigot	1	0	1	
Toplam		12	17	29	

İncelenen gen polimorfizminin kontrol grubunun sigara kullanımı ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.3.9 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu alkol kullanımı ile ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		Alkol		Toplam	p
		Var	Yok		
CTLA4	WildType	2	10	12	0,374
	Heterozigot	1	25	26	
	Homozigot	1	6	7	
Toplam		4	41	45	

Toplam 45 hastadan elde edilen klinik veri sonucu incelenen gen polimorfizminin alkol kullanımı ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.3.10 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol alkol kullanımı ile ilişkisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	Alkol		Toplam	p
	Var	Yok		
CTLA4 Wild Type	5	4	9	0,233
Heterozigot	6	13	19	
Homozigot	1	0	1	
Toplam	12	17	29	

Daha önce incelediğimiz klinik verilere yakın sonuç elde edilmiş ve kontrol grubunun alkol kullanım değerlendirmesinin gen polimorfizmi ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.3.11 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu FT3 değeri ile ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	FT3				Toplam	p
		2.3>	2.3-4.2	4.2<		
CTLA4 Wild Type	6	0	7	0	13	0,449
Heterozigot	7	2	15	2	26	
Homozigot	4	0	2	1	7	
Toplam	17	2	24	3	46	

Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu FT3 parametrisinin incelenmesi sonucunda anlamlı bağlantı kurulamamıştır.

Çizelge 4.3.12 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol FT3 verisinin ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	FT3			Toplam	p
	2,3>	2,3-4,2	4,2<		
CTLA4 Wild Type	0	9	0	9	0
Heterozigot	0	19	0	19	
Homozigot	0	1	0	1	
Toplam	0	29	0	29	

Elde edilen verilerin FT3 değerinin 2,3> ve 4,2< ait değerinin olmaması sonucunda ki-kare testi p değerinin 0 olması ve anlamlı bağlantı kurulamamıştır.

Çizelge 4.3.13 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu FT4 verisi ile ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	FT4				Toplam	p
		0.8>	0.8-1.8	1.8<		
CTLA4 Wild Type	6	2	5	0	13	0,202
Heterozigot	6	10	8	2	26	
Homozigot	5	1	1	0	7	
Toplam	17	13	14	2	46	

CTLA-4 49A/G polimorfizminin FT3 değerlendirilmesinden başka FT4 değerlendirilmesi yapılmış anlamlı sonuca varılamamıştır.

Çizelge 4.3.14 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol FT4 değeri ile ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	FT4				Toplam	p
		0.8>	0.8-1.8	1.8<		
CTLA4 Wild Type	0	1	8	0	9	0,941
Heterozigot	0	2	17	0	19	
Homozigot	0	0	1	0	1	
Toplam	0	3	26	0	29	

Çizelge 4.3.14 gösterildiği gibi kontrol klinik verilerinin FT4 parametrik değerlendirilmesi yapılmış anlamlı sonuca ulaşılamamıştır.

Çizelge 4.3.15 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu AntiTPO ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	AntiTPO			Toplam	p
		9>	9<		
CTLA4 Wild Type	6	0	7	13	0,505
Heterozigot	7	1	18	26	
Homozigot	4	0	3	7	
Toplam	17	1	28	46	

Toplam 46 hastadan elde edilen verilerin ki-kare testi yapılmış ve bağlantı kurulamamıştır.

Çizelge 4.3.16 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol AntiTPO ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		AntiTPO		p
		9>	9<	
CTLA4	Wild Type	9	9	0
	Heterozigot	19	19	
	Homozigot	1	1	
Total		29	29	

Kontrol grubu AntiTPO değerlendirmesi zamanı p değerinin 0 olması ve bu verinin CTLA-4 49A/G polimorfizmi ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.3.17 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu AntiTG ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		AntiTG			Toplam	p
		116>	116<			
CTLA4	WildType	6	5	2	13	0,566
	Heterozigot	8	11	7	26	
	Homozigot	4	1	2	7	
Toplam		18	17	11	46	

Çizelge 4.3.18 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol AntiTG ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

		AntiTG		Toplam	p
		116>	116<		
CTLA4	Wild Type	8	1	9	

Heterozigot	19	0	19	0,316
Homozigot	1	0	1	
Toplam	28	1	29	

Kontrol ve hasta gruplarının TSH değerlendirmesi yapıldı ve iki grup arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi

Çizelge 4.3.19 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve olgu TSH ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	TSH			Toplam	p
	0.3>	0.3-3.04	3.04<		
CTLA4 Wild Type	6	0	5	2	0,292
Heterozigot	6	1	9	10	
Homozigot	4	0	3	0	
Toplam	16	1	17	12	46

Hasta grubunun TSH değerinin karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi (p=0,292).

Çizelge 4.3.20 CTLA-4 49A/G polimorfizmi ve kontrol TSH ilişkisi ki-kare testi ile değerlendirilmesi

	TSH			Toplam	p
	0,3>	0,3-3,04	3,04<		
CTLA4 Wild Type	0	9	0	9	0,761
Heterozigot	0	18	1	19	
Homozigot	0	1	0	1	
Toplam	0	28	1	29	

CTLA-4 49A/G polimorfizminin kontrol grubunun TSH değeri ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (p= 0,761).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kronik otoimmün tiroiditi olan Hashimoto tiroiditi hipotiroidizmin en sık nedenlerindedir. Toplumda görülme sıklığı %2'dir (Barbesino ve Chiovato 2000). T hücre aracılı otoimmünite ile oluşan HT genetik ve çevresel faktöre bağlı oluşur. Çevresel faktörlere, diyetsel iyot alımı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, sitokin tedavisi ve gebelik örnek gösterilebilir (Chistiakov 2005). Hastaların ailelerinde hastalığın tekrarlandığı görülmektedir. Hashimoto hastalarının birinci derece akrabalarında görülme sıklığı %18-33'dür (Barbesino ve Chiovato 2000), bu nedenle gen polimorfizmlerinin HT patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Hashimoto tiroidi ile ilişkilendirilen birçok gen polimorfizmleri tanımlanmıştır. Bu genlerden CTLA-4 (49A/G) ve SEPS (-105G/A) gen polimorfizmlerine ait az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bilgilerin doğrulanması gerekmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında CTLA-4 49A/G ve SEPS1 -105G/A polimorfizmlerinin Hashimoto tiroidi ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla Hashimoto Tiroidi tanısı konmuş 55 hasta ile 50 sağlıklı bireyin periferik kan lökositlerinden izole edilen DNA örneklerinden CTLA-4 49A/G ve SEPS1 -105G/A bölgelerini içeren alan özgün primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. CTLA-4 geni PZR ile çoğaltılabilmiş ancak SEPS1 geni çoğaltılamamıştır. SEPS1 geni için PZR ürünü elde edilemediğinden RFLP analizleri gerçekleştirilememiştir.

Selenyum ve inflamasyon arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve selenoproteinlerin folliküler tiroid hücre fizyolojisinde rol alması, otoimmün tiroid hastalıklarının patogeneziinde selenoproteinlerin varsayılan bir rolüne işaret etmiştir (Santos ve ark. 2014). SEPS1 geni 15q26.3'te yerleşim göstermekte, 6 ekzondan oluşmaktadır ve 189 aminoasitlik SEPS1 proteinini kodlamaktadır (Curran ve ark. 2005). Selenyum, insanlarda organizmayı oksidatif hasarlardan koruyan glutatyon peroksidazların (GPx), iodo tiroin deiyodinazların, tiyoredoksin redüktazın ve selenoprotein P'nin de dahil olduğu pek birçok metabolik yolda rol oynamaktadır. Selenoproteinler ise, selenosistein rezidüleri içeren protein yapılarıdır. Selenoprotein endoplazmik retikulumda (ER), yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninden sitozole retrotranslokasyonu aracılığı ile yanlış katlanmış proteinleri proteazoma yönlendirerek, inflamator yanıtta işlev görür (Santos ve ark. 2014). SEPS1'in 105G/A promotor polimorfizminin IL-1 β , IL-6 ve TNF- α proinflamator sitokinlerin plazma düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (Curran ve ark. 2005).

Santos L.R. ve arkadaşlarının yaptığı SEPS1 geni promotor varyasyonlarının araştırıldığı (-105G/A SNP, rs28665122) 481 HT olgusu ve 516 kontrol ile yaptıkları çalışmada SEPS1 105 G/A ve A/A genotipi ve HT arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada genetik varyantları Real-time PZR yöntemi ile TaqMan SNP assay kullanarak belirlemişlerdir (Santos ve ark. 2014). Bir başka çalışmada SEPS1 gen varyantları ile HT arasındaki ilişki Avrupa kökenli olgularda belirlenirken Çin kökenli olgularda böyle bir bağlantı olmadığı belirtilmiştir (Li ve ark. 2015). SEPS1 polimorfizmlerinin araştırıldığı tüm bu çalışmalarda Real-time PZR yöntemi ile TaqMan SNP assay kullanılmıştır. Biz çalışmamızda çok daha ekonomik bir yöntem olan PZR-RFLP yöntemini kullandık. SEPS1 -105G/A SNP belirlemek için daha önce Mao ve arkadaşlarının gastrik kanser olguları ile yaptığı çalışma referans olarak kullanılmış ve bu çalışmada kullanılan PZR primerleri ile araştırmacıların yayınladığı reaksiyon koşullarından yararlanılmıştır (Mao ve ark. 2015). Ancak bizim elde ettiğimiz DNA örnekleri ile aynı primer ve reaksiyon koşullarında sonuç alınamamıştır. Farklı PZR koşulları için birçok teknik tekrar yapılmasına rağmen PZR ürünü elde edilemediği için RFLP yöntemi uygulanamamıştır.

Sitotoksik T Lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4) immünoglobülin süper ailesi üyesi bir proteindir ve CD28'in yapısal homologudur ancak T hücre cevabında negatif düzenleyici olarak işlev görür. Kromozom 2q33'te lokalize olan insan CTLA-4 geni CTLA-4 antijenini kodlar ve bu antijen T-hücre proliferasyonu ve IL-2 akümüülasyonunun düzenlenmesini sağlar. Ayrıca antijen sunan hücrelerde B7 molekülüne bağlanarak T-hücre apoptozunun da düzenlenmesinde işlev görür. CTLA-4 bu nedenle T-hücre ilişkili otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasında etki edebilecek güçlü bir aday olarak görülmüş ve bu gende birçok polimorfizm saptanmıştır. CTLA-4 polimorfizmlerinden üçü HT de dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalıkla ilişkili bulunmuş ve sıklıkla çalışılmıştır. Bu polimorfizmlerden ilki ekzon 3'te yer alan dinükleotid tekrarlarıdır. Ekzon 3'te 7 ile 30 arasında değişen sayıda AT tekrarı içeren en az 23 farklı alel saptanmıştır. İkinci polimorfizm promotor bölgede 318. nükleotidde tanımlanan C-T transisyonudur. Üçüncü polimorfizm ise çalışmamıza da konu olan ekzon 1'de 49. nükleotidin G-A transisyonudur. Bu SNP lider peptidin 17. kodonunda alanin aminoasitinin threonine değişimi ile sonuçlanmaktadır. CTLA4 geni ekzon1 A49G polimorfizminin HT ile ilişkisi tanımlanmıştır ancak farklı etnik kökenden gelen olgulara ait verilere hala ihtiyaç duyulmaktadır (Benhatchi ve ark. 2011).

CTLA-4 exon-1 49 A/G polimorfizmi ile HT ilişkisi birçok çalışmaya araştırma konusu olmuştur. Qiu H. Ve arkadaşlarının yaptıkları ve 4600 olguya ve 18 olgu kontrol çalışmasının sonuçlarını içeren meta analizinde CTLA-4 genotipinin HT ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Dominant genetik model olgularda yani varyant G aleli taşıyıcıların (GG/GA), homozigot AA olgulara kıyasla HT riskinin daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Olguların etnik kökenleri değerlendirildiğinde hem Asya popülasyonunda hem de beyaz ırkta (GG/GA) bireylerde homozigot AA olgulara kıyasla HT riski daha yüksek bulunmuştur (Qui ve ark. 2014). Feng ve arkadaşlarının yaptığı meta analizinde CTLA-4 49 A/G gen polimorfizminin Asya toplumunda Hashimoto tiroiditi için artan risk faktörü olduğu ancak beyaz ırkta HT ile ilişkili olmadığı vurgulanmıştır (Feng ve ark. 2013). Ting ve arkadaşları ise çocuk ve yetişkin HT olgularını karşılaştırdıkları çalışma sonucunda CTLA-4 49A/G gen polimorfizminin yalnız çocuklarda önemli olduğunu öne sürmüşlerdir (Ting ve ark. 2016). İran kökenli olgular ile yapılan bir başka çalışmada da CTLA-4 -318C/T ve 49 A/G gen polimorfizmlerinin HT ile ilişkili bulunmadığı bildirilmiştir (Nejat ve ark. 2017).

Çalışılan 55 HT olgusuna ait DNA'ların 46'sında ve 50 kontrol bireye ait DNA'ların 30'unda CTLA-4 PZR ürününün BbVI restriksiyon enzim ile kesimi gerçekleştirildi. Kesim sonrasında elektroforezle kesilen fragmanların ayırımı yapıldı. Agaroz jel elektroforezi sonrasında CTLA-4 wild type AA genotipi için 328 bç, heterozigot AG genotipi için 328, 244 ve 84 bç, homozigot GG genotipi için 244 ve 84 bç uzunlukta bantlar gözlemlendi. 46 HT olgusunun 13'ünde AA genotipi, 26'sında da AG genotipi ve 7'sinde homozigot GG genotipi belirlendi. HT hastaların 9'unda PZR-RFLP yöntemi ile sonuç alınamadı. 50 Kontrol bireyin 10'unda AA genotipi, 19'unda AG genotipi ve 1'inde homozigot GG genotipi belirlendi.

Belirlenen genotip ile HT, hastaların yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı, aile öyküsü, FT3, FT4, TSH, AntiTG, AntiTPO değerleri ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm bu parametreler için yapılan ki-kare testi sonucunda anlamlı bağlantı kurulamamıştır.

Sonuç olarak HT patogeneğinde CTLA-4 49 A/G polimorfizminin Türk popülasyonunda etkili olmadığı söylenebilir ancak kesin bir sonuca varmak için daha fazla olguda çalışmaya devam edilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Agarwal, K., A. J. Czaja, D. E. Jones and P. T. Donaldson (2000). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis." Hepatology 31(1): 49-53.
- Arıncı K and Elhan A (2001). "Anatomi." Güven Kitabevi(Ankara): 349-351.
- Barbesino, G. and L. Chiovato (2000). "The genetics of Hashimoto's disease." Endocrinol Metab Clin North Am 29(2): 357-374.
- Braun, J., H. Donner, T. Siegmund, P. G. Walfish, K. H. Usadel and K. Badenhoop (1998). "CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis." Tissue Antigens 51(5): 563-566.
- Brix, T. H., K. O. Kyvik and L. Hegedus (2000). "A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins." J Clin Endocrinol Metab 85(2): 536-539.
- Brown, K. M. and J. R. Arthur (2001). "Selenium, selenoproteins and human health: a review." Public Health Nutr 4(2B): 593-599.
- Chistiakov, D. A. (2005). "Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis." J Autoimmune Dis 2(1): 1.
- Curran, J. E., J. B. Jowett, K. S. Elliott, Y. Gao, K. Gluschenko, J. Wang, D. M. Abel Azim, G. Cai, M. C. Mahaney, A. G. Comuzzie, T. D. Dyer, K. R. Walder, P. Zimmet, J. W. MacCluer, G. R. Collier, A. H. Kissebah and J. Blangero (2005). "Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response." Nat Genet 37(11): 1234-1241.
- Dallas, J. S. (2003). "Autoimmune thyroid disease and pregnancy: relevance for the child." Autoimmunity 36(6-7): 339-350.
- Davies, T. F. and N. Amino (1993). "A new classification for human autoimmune thyroid disease." Thyroid 3(4): 331-333.
- Deichmann, K., A. Heinzmann, E. Bruggenolte, J. Forster and J. Kuehr (1996). "An Mse I RFLP in the human CTLA4 promoter." Biochem Biophys Res Commun 225(3): 817-818.
- Ede, B. (2006). "Tiroit Cerrahisinde Tiroit Hormonlarının Peroperatif Değişimleri." Uzmanlık Tez: 19.
- Erbaş, T. and S. Dağdelen (2004). "Hashimoto Tiroiditi." Türkiye Klinikleri J Endocrin 2: 49-53.
- Goldberg, A. C. and L. V. Rizzo (2015). "MHC structure and function - antigen presentation. Part 1." Einstein (Sao Paulo) 13(1): 153-156.
- Gough, S. C., L. S. Walker and D. M. Sansom (2005). "CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity." Immunol Rev 204: 102-115.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2001). "Tiroidin Metabolik Hormonları. Tıbbi Fizyoloji. 10.Edisyon." 858-868.

- Hao Qiu, Weifeng Tang, Pengfei Yin, Feng Cheng, Lixin Wang; Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 polymorphism and Hashimoto's thyroiditis susceptibility: a meta-analysis, *Endocrine* (2014) 45:198–205
- Hashimoto, H. (1912). "Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa)" *Arch Klin Chir* 97: 219.
- Henry, J. F. (1997). "Surgical anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands and recurrent and external laryngeal nerves. Clark OH, Duh QY (ed)." *Textbook of endocrine surgery*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; : 8-14.
- İliçin, G., S. Ünal, K. Biberoğlu, S. Akalın and G. Süleymanlar (1996). *İç Hastalıkları Cilt 23: 2019-2021*.
- İşgör, A. (2000). "Tiroit Fizyolojisi, Tiroit Hastalıkları ve Cerrahisi. İşgör, A." *Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul*: 69-122.
- John, S. W., G. Weitzner, R. Rozen and C. R. Scriver (1991). "A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes." *Nucleic Acids Res* 19(2): 408.
- Kabalak, T. (2009). "Otoimmün." *Tiroid El Kitabı*: 354.
- Kamel, A. M., M. F. Mira, G. I. Mossallam, G. T. A. Ebid, E. R. Radwan, N. H. A. Eldin, M. Mamdouh, M. Amin, N. Badawy, H. Bazaraa, A. İbrahim, N. Salah and J. Hansen (2014). "Lack of association of CTLA-4 +49A/G polymorphism with predisposition to type 1 diabetes in a cohort of Egyptian families." *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 15: 25-30.
- Karim Benhatchi & Ivana Jochmanová & Viera Habalová & Hedviga Wagnerová & Ivica Lazúrová; CTLA4 exon1 A49G polymorphism in Slovak patients with rheumatoid arthritis and Hashimoto thyroiditis—results and the review of the literature: *Clin Rheumatol* (2011) 30:1319–1324
- Kronenberg, M. and A. Rudensky (2005). "Regulation of immunity by self-reactive T cells." *Nature* 435(7042): 598-604.
- Lin, W. Y., L. Wan, C. H. Tsai, R. H. Chen, C. C. Lee and F. J. Tsai (2006). "Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan." *J Clin Lab Anal* 20(3): 109-112.
- Lindsten, T., K. P. Lee, E. S. Harris, B. Petryniak, N. Craighead, P. J. Reynolds, D. B. Lombard, G. J. Freeman, L. M. Nadler, G. S. Gray and et al. (1993). "Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells." *J Immunol* 151(7): 3489-3499.
- Lumachi, F. and S. Basso (2002). "Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases." *Thyroid* 12(1): 27-34.
- Mao, H., R. Cui and X. Wang (2015). "Association analysis of selenoprotein S polymorphisms in Chinese Han with susceptibility to gastric cancer." *Int J Clin Exp Med* 8(7): 10993-10999.
- Mizuki, N. and M. Kimura (1996). "[Gene structure of the human MHC region]." *Nihon Rinsho* 54(6): 1705-1717.

- Mohammad Al-Haggar (2013). "Evolving Molecular Methods for Detection of Mutations." *Gene Technology* 2(1): 1-2
- Özata, M. (2003). "Tiroid Hastalıkları Tanı ve Tedavisi. Tiroid hormonları ve tiroid hastalıklarının fizyopatolojisi." *Gata Basımevi*.
- Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren and K. K. Khanna (2007). "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." *Antioxid Redox Signal* 9(7): 775-806.
- Popova, G., W. F. Paterson, A. Brown and M. D. Donaldson (2008). "Hashimoto's thyroiditis in Down's syndrome: clinical presentation and evolution." *Horm Res* 70(5): 278-284.
- ROİTT, I. M., D. DONIACH, P. N. CAMPBELL and R. VAUGHAN-HUDSON (1956). "Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre." 820.
- Romagnani, S. (2000). "T-cell subsets (Th1 versus Th2)." *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(1): 9-18; quiz 18, 21.
- Santos, L. R., C. Duraes, A. Mendes, H. Prazeres, M. I. Alvelos, C. S. Moreira, P. Canedo, C. Esteves, C. Neves, D. Carvalho, M. Sobrinho-Simoes and P. Soares (2014). "A polymorphism in the promoter region of the selenoprotein S gene (SEPS1) contributes to Hashimoto's thyroiditis susceptibility." *J Clin Endocrinol Metab* 99(4): E719-723.
- Schmid, K. W. (2015). "Histopathology of C Cells and Medullary Thyroid Carcinoma." *Recent Results Cancer Res* 204: 41-60.
- Shupnik, M. A., S. L. Greenspan and E. C. Ridgway (1986). "Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine in pituitary cell culture." *J Biol Chem* 261(27): 12675-12679.
- Silvestri, E., L. Schiavo, A. Lombardi and F. Goglia (2005). "Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis." *Acta Physiol Scand* 184(4): 265-283.
- Tanda, M. L., E. Piantanida, A. Lai, V. Lombardi, I. Dalle Mule, L. Liparulo, N. Pariani and L. Bartalena (2009). "Thyroid autoimmunity and environment." *Horm Metab Res* 41(6): 436-442.
- Tomer, Y. and A. Huber (2009). "The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment." *J Autoimmun* 32(3-4): 231-239.
- Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd and S. C. Gough (2003). "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease." *Nature* 423(6939): 506-511.
- Valk, E., C. E. Rudd and H. Schneider (2008). "CTLA-4 trafficking and surface expression." *Trends Immunol* 29(6): 272-279.

- Volpe, R. (1991). " Autoimmune thyoiditis." In: Braverman LE, Utiger RD, editors Werner and Ingbar's the thyroid, 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott, : 921.
- Yanagawa, T., Y. Hidaka, V. Guimaraes, M. Soliman and L. J. DeGroot (1995). "CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population." J Clin Endocrinol Metab 80(1): 41-45.
- Yılmaz, B. (1999). "Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi 1. Baskı ": 43-44.
- Zaletel, K. (2011). "Thyroid: from genes to the disease." Curr Genomics 12(8): 525.

ÖZGEÇMİŞ

Fidan İSLAMOVA; 20.06.1989 tarihinde Bakü'de doğdu. İlköğrenimini Samir HACIYEV adına İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini 286 numaralı Okulda, lise öğrenimini Kimya-Biyoloji Lisesi'nde tamamladı. Bakü Devlet Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2011 yılında Biyolog unvanıyla mezun oldu. 2015-2016 Eğitim Öğretim yılının güz yarıyıl döneminde Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2015 yılından itibaren yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.