

**TİROİD HASTALIKLARINDA TSHR (D727E) VE
İNERLÖKİN 1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ
(IL1RN^{VNTR}) POLİMORFİZMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Bahar GÜRSU

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN
2017**

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİROİD HASTALIKLARINDA TSHR (D727E) VE İNTERLÖKİN 1
RESEPTÖR ANTAGONİSTİ (IL1RN^{VNTR}) POLİMORFİZMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Bahar GÜRSU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN danışmanlığında, Bahar GÜRSU tarafından hazırlanan “ Tiroid Hastalıklarında TSHR (D727E) ve İnterlökin 1 Reseptör Antagonisti (IL1RN^{VNTR}) Polimorfizmlerinin Belirlenmesi ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda 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. Süray PEHLİVANOĞLU

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİROİD HASTALIKLARINDA TSHR (D727E) VE İNTERLÖKİN 1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ (IL1RN^{VNTR}) POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİ

Bahar GÜRSU

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Otoimmün hastalıkların içerisinde Hashimoto tiroiditi tiroidit hastalıkları arasında en sık görülenidir. Yapılan çalışmalarda hastalığın oluşmasında genetik faktörlerin önemi gösterilmiştir. Çalışmalarda TSHR ve IL1RN araştırılan genler arasında yer almaktadır. Bu genlerde oluşan D727E ve IL1RN^{VNTR} polimorfizmleri Hashimoto tiroiditi riskine katkıda bulunabileceği ve hastalığa yatkınlık ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmaya 55 Hashimoto tiroidit tanısı konulan bireyler ile 49 sağlıklı kontrol dahil edilmiş olup DNA izolasyonu standart fenol kloroform yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. TSHR geni D727E polimorfizmi PZR – RFLP, IL1RN^{VNTR} polimorfizmi ise PZR yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. PZR ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi uygulanarak polimorfizmler görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; TSHR geni D727E polimorfizmi hasta ve kontrol grupları arasında istatistiki bir anlamlılık bulunmazken, IL1RN^{VNTR} polimorfizminin hastalıkta risk faktörü olabileceği bulunmuştur. Bulgularımız IL1RN^{VNTR} polimorfizminin daha büyük hasta gruplarında çalışılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Hashimoto tiroiditi, TSHR, TSHR D727E polimorfizmi, IL1RN, IL1RN^{VNTR} polimorfizmi, PZR, RFLP.

2017, 66 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

ESTABLISHMENT OF THE POLYMORPHISMS OF TSHR (D727E) AND INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST (IL1RN^{VNTR}) IN THYROID DISEASES

Bahar GÜRSU

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Among the autoimmune thyroiditis Hashimoto thyroiditis is the most common one. Previous studies show that genetic factors are important in developing Hashimoto thyroiditis. TSHR and IL1RN genes are among those which are currently investigated in studies. D727E and IL1RN^{VNTR} polymorphisms in these genes are thought to contribute to risk of Hashimoto thyroiditis, and to be related to predisposition towards this disease. In this study, TSHR gene D727E polymorphism was revealed through PCR–RFLP method for DNAs isolated from the blood of both patients and healthy subjects (55 patients, 49 subjects). IL1RN^{VNTR} polymorphism was visualized through gel electrophoresis for PCR products. According to the results; while TSHR gene polymorphism does not indicate any difference between patients and controls, IL1RN^{VNTR} polymorphism is found to be a risk factor in this disease. However, a definite judgement is difficult to make due to restricted number of patients and small size of control group.

Keywords: Hashimoto thyroiditis, TSHR, TSHR polymorphism, IL1RN, IL1RN^{VNTR} polymorphism, PCR, RFLP.

2017, 66 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen değerli danışmanım

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e,

Çalışmalarımı destekleyen ve her türlü yardımda bulunan

Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a,

Hasta temin edilmesi aşamasında yardımlarını aldığım 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,

Çalışmamın yürütülmesi sırasında manevi desteğini aldığım hocalarım

Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER ve Doç. Dr. Deniz ŞİRİN'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım

Dilan H. KIZILOCAK ve Gürkan AKYILDIZ'a,

Ayrıca;

Her zaman yanımda olup desteğiyle beni yalnız bırakmayan erkek arkadaşım

Murtaza ATİK'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince hiçbir özveriden kaçınmayarak bana her zaman maddi ve manevi destek olan

biricik aileme,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TRH	: Tirotropin salgılatan hormon
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
TPO	: Tiroid peroksidaz
AntiTPO	: Anti tiroid peroksidaz
AntiTG	: Anti tiroglobulin
HT	: Hashimoto tiroiditi
TSHR	: Tiroid uyarıcı hormon reseptör
T ₄	: Tiroksin
T ₃	: Triiyodotironin
sT ₄	: Serbest tiroksin
sT ₃	: Serbest triiyodotironin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
AMA	: Antimikrozomal antikor
IgG	: İmmünglobulin G
IgM	: İmmünglobulin M
IgA	: İmmünglobulin A
IFN- γ	: İnterferon gama
MHC	: Major doku uygunluk kompleksi
HLA	: İnsan lökosit antijeni

VNTR	: Değişken sayılı bitişik tekrarlar
RAIU	: Radyoaktif iyodin uptake
CTLA – 4	: Sitotoksik T lenfosit antijen 4
PARP – 1	: Poli [ADP-riboz] polimeraz 1
SLE	: Sistemik lupus eritromatöz
IL1RN	: İnterlökin 1 reseptör antagonisti
IL1RA	: İnterlökin 1reseptör antagonist protein
IL – 1	: İnterlökin 1 gen
D	: Aspartik asit
H	: Histidin
P	: Prolin
T	: Treonin
E	: Glutamik asit
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
dNTP	: Deoksiribonükleikasit trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
UV	: Ultraviole
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
KCL	: Potasyum klorür
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
TE	: Tris - EDTA

d H ₂ O	: Distile su
NaCl	: Sodyum klorür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBE	: Tris – borate - EDTA
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
BSA	: Bovin serum albumin
EtBr	: Etidyum bromür
Th1	: T helper (yardımcı) hücre 1
A	: Adenin
T	: Timin
G	: Guanin
C	: Sitozin

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
ÇİZELGE DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Tiroid Bezi ve Fonksiyonları	3
2.2. Tiroiditler.....	5
2.2.1. Tiroiditlerin Sınıflandırılması.....	5
2.3. Otoimmün Tiroiditler	5
2.4. Hashimoto Tiroiditi	6
2.5. Tiroid Uyarıcı Hormon Reseptör (TSHR) Polimorfizmi	11
2.6. İnterlökin 1(IL1RN) Gen Polimorfizmi	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	16
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	17
3.1.3. Kullanılan çözelti ve tamponlar.....	18
3.1.4. Kullanılan çözeltiler	19
3.1.5. Kullanılan primerler	21
3.1.6. Kullanılan bilgisayar programları.....	21
3.1.7. Kullanılan restriksiyon enzimleri	21
3.1.8. Hasta grubu.....	21
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Kandan DNA izolasyonu.....	23
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	24
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi	26
3.2.4. PZR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesimi.....	26
3.2.5. İstatistiksel analizler	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. Hasta Grubu.....	29
4.2. PZR ve RFLP Sonuçları	30
4.2.1. TSHR D727E polimorfizmi	30
4.2.2. IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi.....	31
4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları	32
4.3.1. TSHR D727E polimorfizmi	32
4.3.2. IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Tiroid Bezi (Mousa 2012)	3
Şekil 2.2: Tiroid Hücreleri (www.tipfakultesi.org)	4
Şekil 2.3: Hashimoto tiroiditi'nin olası patojenik mekanizması (Cotran ve ark. 1999).....	9
Şekil 2.4: TSHR geni (http://www.genecards.org/cdn/genomic-location/TSHR-gene.png) ...	11
Şekil 2.5: Tiroid uyarıcı hormon reseptörü (TSHR) geninde belirlenen polimorfizmler.....	12
Şekil 2.6: IL1RN geni (http://www.genecards.org/cdn/genomic-location/IL1RN-gene.png) .	13
Şekil 2.7: VNTR polimorfizminin çeşitli alellerinin IL1RN gendeki pozisyonunun şematik diyagramı (Jaiswal ve ark. 2012)	14
Şekil 3.1: HSP92 II (NlaIII) restriksiyon enziminin tanıma bölgeleri ve kesim noktaları.....	27
Şekil 4.1: TSHR D727E polimorfizmi için PZR ürünlerinin HSP92 II restriksiyon enzimi ile kesiminin %2,5'lük agaroz jel elektroforezi sonuçları	30
Şekil 4.2: IL1RVNTR polimorfizmi için PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez sonuçları	31
Şekil 4.3: TSHR D727E polimorfizmi genotip değerlendirme grafiği	33
Şekil 4.4: TSHR D727E polimorfizmi allel değerlendirme grafiği.....	33
Şekil 4.5: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme grafiği	34
Şekil 4.6: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği	35
Şekil 4.7: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği ...	36
Şekil 4.8: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği	36
Şekil 4.9: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği	37
Şekil 4.10: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT3 değerlendirme grafiği.....	38
Şekil 4.11: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT4 değerlendirme grafiği.....	38
Şekil 4.12: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri TSH değerlendirme grafiği.....	39
Şekil 4.13: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTG değerlendirme grafiği	40
Şekil 4.14: TSHR D727E polimorfizmi klinik veri AntiTPO değerlendirme grafiği	40
Şekil 4.15: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirme grafiği.	41
Şekil 4.16: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği	42
Şekil 4.17: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği.....	42
Şekil 4.18: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği.....	43
Şekil 4.19: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği.....	44
Şekil 4.20: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT3 değerlendirme grafiği	44
Şekil 4.21: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT4 değerlendirme grafiği	45
Şekil 4.22: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri TSH değerlendirme grafiği	46
Şekil 4.23: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTG değerlendirme grafiği.....	46
Şekil 4.24: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTPO değerlendirme grafiği	47
Şekil 4.25: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi genotip değerlendirme grafiği	48
Şekil 4.26: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi allel değerlendirme grafiği	49
Şekil 4.27: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme grafiği	49
Şekil 4.28: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği	50

Şekil 4.29: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği	51
Şekil 4.30: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği	51
Şekil 4.31: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği.....	52
Şekil 4.32: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirme grafiği.....	53
Şekil 4.33: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği	54
Şekil 4.34: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği	55
Şekil 4.35: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği	56
Şekil 4.36: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği	57

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1: PZR aşamasında kullanılan primerler ve Tm (melting temperature) dereceleri ..	21
Çizelge 3.2: Olgulara ait veriler ve klinik bulguları	22
Çizelge 4.1: TSHR D727E polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi p değeri	32
Çizelge 4.2: TSHR D727E polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi p değeri	33
Çizelge 4.3: TSHR D727E polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu	34
Çizelge 4.4: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	34
Çizelge 4.5: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	35
Çizelge 4.6: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri.....	35
Çizelge 4.7: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	36
Çizelge 4.8: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri.....	37
Çizelge 4.9: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT3 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	37
Çizelge 4.10: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT4 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	38
Çizelge 4.11: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri TSH değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	39
Çizelge 4.12: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTG değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	39
Çizelge 4.13: TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTPO değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	40
Çizelge 4.14: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	41
Çizelge 4.15: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	41
Çizelge 4.16: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	42
Çizelge 4.17: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	43
Çizelge 4.18: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	43
Çizelge 4.19: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT3 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri.....	44
Çizelge 4.20: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT4 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri.....	45
Çizelge 4.21: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri TSH değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri.....	45
Çizelge 4.22: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTG değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	46
Çizelge 4.23: TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTPO değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri	47
Çizelge 4.24: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi p değeri	48

Çizelge 4.25: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi p değeri	48
Çizelge 4.26: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme ve ki-kare testi p değeri.....	49
Çizelge 4.27: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme ve ki-kare testi p değeri.....	50
Çizelge 4.28: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme ve ki-kare testi p değeri	50
Çizelge 4.29: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirme ve ki-kare testi p değeri.....	51
Çizelge 4.30: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirme ve ki-kare testi p değeri	52
Çizelge 4.31: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirme ve ki-kare testi p değeri	53
Çizelge 4.32: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirme ve ki-kare testi p değeri.....	54
Çizelge 4.33: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirme ve ki-kare testi p değeri	55
Çizelge 4.34: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirme ve ki-kare testi p değeri.....	56
Çizelge 4.35: IL1RN ^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol klanımı değerlendirme ve ki-kare testi p değeri	57

1. GİRİŞ

Hashimoto tiroiditi (HT) tiroid bezinin lenfositlerce infiltrasyonu sonucu oluşan ve tiroid hormon bozukluğu ile sonuçlanan toplumda en sık rastlanılan otoimmün bir tiroidittir (İliçin ve ark. 1996).

Hashimoto tiroiditi hastalığının oluşmasında genetik ve çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır (Chistiakov 2005). Ancak genetik faktörler, hastalığın oluşumunda daha ağır basmaktadır (Chiovata ve Martino 2001). Hastaların ailelerinde de genellikle hipotiroidi, Graves, Hashimoto gibi hastalık öyküsü bulunmaktadır. Kardeşler arasında hastalığın tekrarlama sıklığı normalden 20 kat daha fazla olmaktadır. Monozigotik ikizlerde görülme olasılığı daha yüksektir. Toplumda görülme sıklığı % 2'dir. Kadınlarda erkeklerden daha sıklıkla görülmektedir. En sık orta yaşlarda ortaya çıkar (Tunbridge ve Vanderpump 2000, Wang ve ark. 2004).

Yaş ilerledikçe hastalığın insidansının artması hastalıkta çevresel faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir. HT oluşumunu tetikleyen çevresel faktörler; iyot alımı (Rose ve ark. 1997, Rose ve ark. 2002), bakteri ve virüs enfeksiyonları (Mine ve ark. 1997, Tomer 2002), sitokin tedavisi (Kakizaki 1999) ve gebeliktir (Imaizumi ve ark. 2001, Tomer 2002). Epidemiyolojik çalışmalar (Boukris ve ark. 1983) ve hayvan çalışmalarında (Harach ve ark. 1985, Allen ve ark. 1987) diyet ile alınan iyodun etyolojideki rolü iyi tanımlanmış olup, tiroidit oluşumunu tetikleyen en önemli çevresel faktör olarak bildirilmiştir (Keskindemirci 2010).

HT, T hücre ilişkili otoimmünitinin tipik bir örneği olarak kabul edilir. Bu hastalıkta T helper (Th1) hücrelerinin baskın olması sonucunda tiroid bezindeki tersiyer lenfoid foliküllerin ektoptik formasyonu ve tiroid foliküllerinin yıkımı meydana gelmektedir (Orgiazzi 2000, Phenekos ve ark. 2004). Yapılan çalışmalarda polimorfizmlerin hastalık riskine katkıda bulunabileceği ortaya konmuştur. Otoimmünitinin nasıl tetiklendiği ve hastalığın etyolojisinde hangi genetik faktörlerin rolü olduğu tam olarak açıklanabilmiş değildir. Otoimmünitinin Tiroid uyarıcı hormon reseptör (TSHR) geni ve İnterlökin reseptör antagonisti 1 (IL1RN) geni ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Pirro ve ark. 1995, De Roux ve ark. 1996).

TSHR geninde üç tip polimorfizm belirlenmiştir. Bunlar TSHR'nün ekstraselüler domainin 36. pozisyonundaki D36H polimorfizminde aspartik asitin histidine dönüşümü ve 57. pozisyonundaki P52T polimorfizminde prolinin treonine dönüşümü ile meydana gelir. İntraselüler domainde yer alan D727E polimorfizmi de aspartik asitin glutamik asite dönüşümü ile gerçekleşir (Tonacchera ve Pinchera 2000, Tomer and Davies 2003, Ban and Tomer 2005, Jacobson and Tomer 2007). IL1RN geninde ise VNTR (Değişken sayılı bitişik tekrarlar) polimorfizmi görülmektedir (Tarlow ve ark. 1993).

TSHR geni D727E polimorfizmi ve IL1RN^{VNTR} polimorfizminin Hashimoto tiroiditinin ortaya çıkmasında rol oynayan genetik faktörler olabileceği düşünülmektedir. Daha önce bu polimorfizmlerin Hashimoto tiroiditi ile ilişkisi araştırılmış ve çalışmaların bazılarında anlamlı sonuçlar olduğu bildirilmiştir (Yin ve ark. 2008).

Yapılan literatür taramalarında Hashimoto tiroiditi hastalığında etken olabilecek genlerin polimorfizmlerini araştıran bir çok çalışma bulunmaktadır. Fakat çalışmamıza konu olan gen bölgelerindeki polimorfizmlerin araştırıldığı çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda Hashimoto tiroiditi hastalarında TSHR ve IL1RN gen bölgelerinde fonksiyonel polimorfizm olup olmadığının araştırılması ve bu polimorfizmin Türk populasyonundaki sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

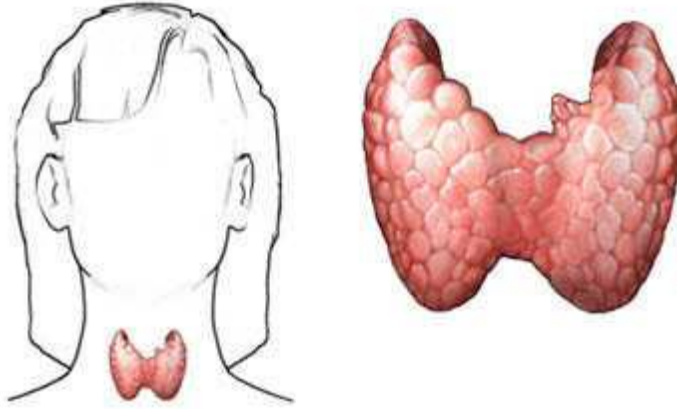
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Tiroid Bezi ve Fonksiyonları

Tiroid bezi insan vücudundaki en büyük endokrin organdır. En önemli görevi tiroid hormonlarının salgılanmasını sağlamaktır (İliçin ve ark.1996).

Tiroid bezinin embriyolojik olarak gelişimi 3. haftada başlamaktadır. Fetal tiroid dokusu; gebeliğin 10. haftasında iyodu konsantre etme özelliği kazanır ve tiroksin üretimine başlar (İliçin ve ark.1996).

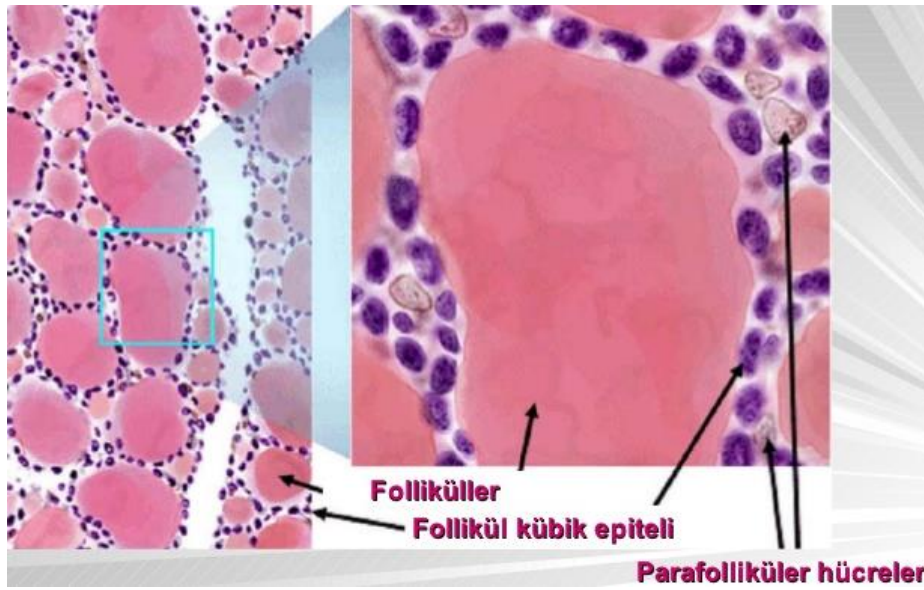
Tiroid bezi boynun alt kısmında trakeanın ön yüzünde, larinksin hemen aşağısında, tiroid ön grup kaslarının arkasında bulunmaktadır (Şekil 2.1.). Normal bir erişkinde tiroid bezi açık kahverengi renge sahiptir ve ağırlığı 15- 20 gr arasında değişmektedir. Bez sağ ve sol olmak üzere iki lobtan oluşmaktadır ve bunlar istmus denen bölümlerle birbirine bitişik halde bulunurlar (Meller ve Becker 2002). Loblar yaklaşık olarak 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğindedir. Tiroidin kalınlığı loblarda 20- 40 mm olup, istmusta 2- 6 mm'dir.



Şekil 2.1. Tiroid Bezi (Mousa 2012)

Tiroid, farklı büyüklüklerdeki foliküllerden meydana gelmektedir. Tiroid bezinin fonksiyonel yapısını oluşturan her bir folikül, içi kolloid dolu bir boşluk etrafında tek sıra dizilen kübik epitel hücreleri ve bu epitelyumu saran bazal membrandan oluşmaktadır (Henry 1997). Folikül hücresine tiroisit adı da verilmektedir. Bir tiroid folikülünde temel olarak üç tip hücre bulunmaktadır. Bu hücreler; foliküler lümenle ve de bazal membranla ilişkide olan normal folikül hücresi ve oksifilik hücreler (Hürthle) ve lümenle ilişkide olmayan fakat bazal

membranla ilişkide olan parafoliküler hücrelerdir. Aynı zamanda bu hücreler A, B ve C hücreleri olarak da adlandırılır. Tiroid folikülü ve tiroid hücrelerinin mikroskopik görüntüsü Şekil 2.2’de gösterilmiştir. A hücresi normal bir folikül hücresidir. Tiroid (tirosit) hormonlarının yapımı ve salınımindan sorumludur. Tiroid uyarıcı hormon (TSH) hormonunun etkisi altındadır. B hücresi (Askanazy hücresi, Hürthle hücresi, onkosit) çok miktarda serotonin toplamaktadır. TSH reseptörü içerip tiroglobulin sentezi yapabilmektedir fakat fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. C hücresi (parafoliküler hücre) ise tirokalsitonin hormonunun yapımı ve salınımindan sorumludur. TSH’nın kontrolünde değildir (Rhodin 1995, Henry 1997).



Şekil 2.2. Tiroid Hücreleri (www.tipfakultesi.org)

Tiroid bezi folikül hücreleri iki tane hormon üretir ve dolaşıma salgılar. Bu hormonlardan bir tanesi tiroksin (T_4), diğeri ise triiyodotironin (T_3) dir. Hücre içerisinde T_3 hormonu etkili olduğundan dolayı T_4 hormonu hücreye girmeden önce T_3 hormonuna dönüşmektedir. T_4 ve T_3 hormonları; vücudumuzun metabolizmasını düzenler ve ayrıca metabolizmanın hızını kontrol ederler. Tiroid hormonları normal büyüme ve santral sinir sistemi gelişimini sağlayarak kalp hızını düzenlerler. Bunun yanında su atılımını ve enerji tüketimini, ısı üretimini, vücut ağırlığını ve lipit metabolizmasını düzenlerler. Tiroid hormonları karbonhidrat metabolizmasında glukoz Emilimini artırır, glikolizi uyarır, glukoz salınımına etki ederler (İşgör 2000, Guyton ve Hall 2001). Yağ metabolizmasında serum kolesterolünü düşürür, lipoprotein yapımını artırır (Dumont 2005). Protein metabolizmasında protein yapım, yıkım ve aktivasyonunda rol oynarlar (Dumont 2005). Kalsiyum ve fosfor

metabolizmasında kalsiyumun bağırsaklarda emilimini azaltarak kalsiyumun atılımını sağlarlar (Gökhan 1989, Noyan 2005). Büyüme metabolizmasında ise DNA ve RNA sentezini artırma ve büyüme faktörleri sentezini artırma gibi etkileri vardır (Yılmaz 1999, Guyton ve Hall 2001).

Tiroid bezinin kontrolü normal fizyolojik koşullar altında hipotalamus – hipofiz ekseninde sağlanmaktadır. Hipotalamustan salgılanan tirotropin salgılatan hormon (TRH) hipofiz bezini uyarır ve bir hipofiz hormonu olan tiroid uyarıcı hormonun (TSH) üretilmesini ve salgılanmasını sağlar. Kan dolaşımındaki tiroid hormonları azalmaya başladığında hipofizden TSH salgısı artar. Eğer dolaşımda tiroid hormon salgısı artmaya başlarsa hipofizden TSH salgısı azalır (Kopp 2001) .

2.2. Tiroiditler

Tiroiditler; inflamasyon, fibrozis veya lenfositik infiltrasyonun baskın olduğu, tiroid bezinin işlevini etkileyen farklı nedenlere bağlı olarak meydana gelen hastalıklardır. Tiroiditlerde, tiroidal inflamasyonun sebep olduğu farklı klinik tablolar ortaya çıkmaktadır (Dayan ve ark. 1996).

2.2.1. Tiroiditlerin Sınıflandırılması

Tiroiditlerin birçoğunda hastalığın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle sınıflandırma;

- Akut tiroidit
- Subakut tiroidit
- Kronik tiroidit
- Hashimoto tiroiditi (otoimmün tiroidit, kronik lenfositik tiroidit)

olarak kabul edilmektedir (Dayan ve ark. 1996).

2.3. Otoimmün Tiroiditler

Otoimmünite; bağışıklık sisteminin kendi doku ve organlarına karşı immün reaksiyon göstermesidir. İmmün sistem kendisine ait antijene karşı reaksiyon göstermezken, yabancı antijeni hemen tanır ve savunmaya geçer. Vücudun, tüm doku ve moleküllerine karşı

toleranslı olmasını sağlayan mekanizmalar vardır. Yeterli toleransın oluşmaması veya sonradan yok olması, vücudun kendi doku veya moleküllerine karşı immün reaksiyon oluşturmasına sebep olmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda ilgili doku, organ veya molekülde fonksiyonel bozukluk, inflamasyon veya apoptoz gibi olaylarla karşılaşmaktadır (Bekfilaviođlu 2009, Kabalak 2009).

Otoimmüitenin nedeni tam olarak bilinmese de, temelinde genetik yatkınlığın olduğu bilinmektedir. Otoimmün hastalığı olan bireylerin birinci derece akrabalarında da benzer hastalıkların normalden daha sıklıkta görülmesi genetik faktörlerin rolünü kanıtlamaktadır (Kabalak 2009).

2.4. Hashimoto Tiroiditi

Hashimoto tiroiditi ilk kez 1912 yılında Japon bilim adamı Hakaru Hashimoto tarafından tanımlanan tiroid bezinde lenfosit infiltrasyon sonucu oluşan ve tiroid hormon bozukluğu ile ortaya çıkan toplumda en sık rastlanılan otoimmün tiroidittir (İliçin ve ark.1996). Hakaru Hashimoto'nun opere ettiği 4 hastanın materyallerini değerlendirdiği raporu 1912 yılında yayınlanmıştır. Bu hastalarda tiroid bezinin plazma hücreleri ve lenfositlerce infiltre olduğu, parankimde atrofi, fibrozis ve eozinofilik dejenerasyonun geliştiği görülmüştür. Daha sonraki yıllarda benzer hasta gruplarında antitiroid antikörlerin gösterilmiş olması nedeniyle patogenezinde otoimmüitenin rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Hashimoto tiroiditinde sık bulgu hafif bir guatr ve Anti tiroid peroksidaz (AntiTPO) yüksekliğidir. Hastaların %75'inde ötiroid guatr vardır. Tiroid bezi büyümesi genellikle asemptomatik olarak seyreder. Tiroid bezi difüz olarak büyümüştür, orta sertliktedir ve lastik kıvamındadır. Kliniđe başvuran hastaların %20'sinde hipotiroidi bulguları mevcuttur ya da yıllar içerisinde gelişme ihtimali vardır. Hashimoto tiroiditi lenfoma gelişimi için bir risk taşımaktadır. Asimetrik bez büyümesi, ağrı, ses kısıklığı, lenf nodu gelişimi tiroid lenfomasının olma olasılığını akla getirmektedir (Zimmerman 1986).

Hashimoto tiroiditi, otoimmün kökenli olduğu düşünölen diğer tiroid hastalıkları, Graves hastalığı ve primer tiroid atrofisi ile yakından ilişkilidir (DeGroot 2001). Aynı hastada Hashimoto tiroiditi yanında Graves hastalığı da görölebilmektedir (Tamai ve ark. 1989). Hipotiroidizmden hipertiroidizme geçiş olabileceği iyi bilinmektedir (Takasu ve ark. 1990). Bunun tam tersi de mümkün olmaktadır (Kraiem ve ark. 1992). Bir yıl hipotiroidi olan

ertesı yıl Graves hipertiroidisi tablosunda olan sonra tekrar hipotiroidiye dönen hastalar bildirilmiştir (Tamai ve ark. 1980).

Haşimoto tiroiditinde; normalde yabancı maddeler ile savaşıma görevini üstlenmiş bağışıklık sistemimizin ürettiği antikorların hücumuna maruz kalmaktadır. Tiroid bezi içerisinde T4 ve T3 hormonlarının yapımında rol oynayan tiroid peroksidaz adlı enzim bulunur. Haşimoto tiroiditinde bağışıklık sistemi bu enzimi tanıyamaz ve ona karşı antiTPO antikorunu üretir. T4 ve T3 hormonları tiroid bezi içerisinde tiroglobulin molekülüne bağlı halde depolanır. Normal kişilerin tiroglobulininde bir sorun yoktur. Haşimoto tiroiditinde hastanın immun sistemi tiroglobuline (TG) karşı antitiroglobulin (antiTG) antikoru üretir. AntiTG ve antiTPO antikoru Haşimoto tiroiditi olan kişilerde tiroid bezine gidip tiroid bezini tahrip etmeye başlar. Haşimoto tiroiditine yol açan antiTPO ve antiTG tiroidin büyük bir kısmını tahrip edebilir. Sonuçta tiroid hormon üretimi azalır ve hipotiroidi gelişir.

Hashimoto tiroiditinde lenfositlerin tiroid antijenlerine karşı duyarlılaştığı ve bu antijenlerle etkileşen otoantikörlerin oluştuğu görülür. HT'de en sık görülen otoantikörler antiTG, antiTPO ve TSHR bloke edici antikordur. Hastalığın başında antiTG yüksek olup antiTPO hafif yüksek seyreder. Devam eden süreçte antiTG kaybolabilir fakat antiTPO dolaşımında uzun yıllar mevcut kalabilmektedir. HT'nin patolojisi normal tiroid yapısını tamamen bozan ağır lenfosit infiltrasyonu ile karakterizedir. Foliküler epitel hücreleri büyümüştür ve mitokondrilerin olduğu eosinofilik sitoplazmaya sahiptirler. Bezin yıkımı serbest tiroksin (sT4) ve serbest triiyodotironin (sT3) de azalmaya ve TSH' da artmaya sebep olmaktadır. Başlangıçta TSH'nin yükselmesi tiroid bezinde büyüme ya da guatra neden olarak yeterli hormon üretimini sağlamaktadır. Zamanla guatrlı ya da guatrsız hipotiroidizm gelişebilmektedir. HT ailesel olup diğer otoimmün hastalıklarla da ilişkili olabilmektedir. Kadın : Erkek oranı 4:1 olarak görülür. Çoğu zaman tiroid bezi çok büyümeden durumun farkına varılamayabilir. Daha yaşlı hastalar küçük sert bir tiroid bezi ile kendini gösterebilir (Barbesino ve Chiovato 2000, Muller ve ark. 2001, Rapoport ve McLachlan 2001).

Serum tiroid hormonu ve TSH değeri, hastalığın şiddetine göre değişiklik göstermektedir. TSH' daki yükselme, tiroid yetersizliğini gösteren ilk bulgu olabilir. TSH yükselmesi ile beraber total ve serbest T4 te düşme gerçekleşirse hipotiroidizm gelişmiş demektir. Hastaların %90' ında antiTPO; yani antimikrozomal (AMA) antikörler bulunur. 24 saatlik RAIU (Radyoaktif iyodin uptake) olguların %20'sinde düşük, diğerlerinde normal

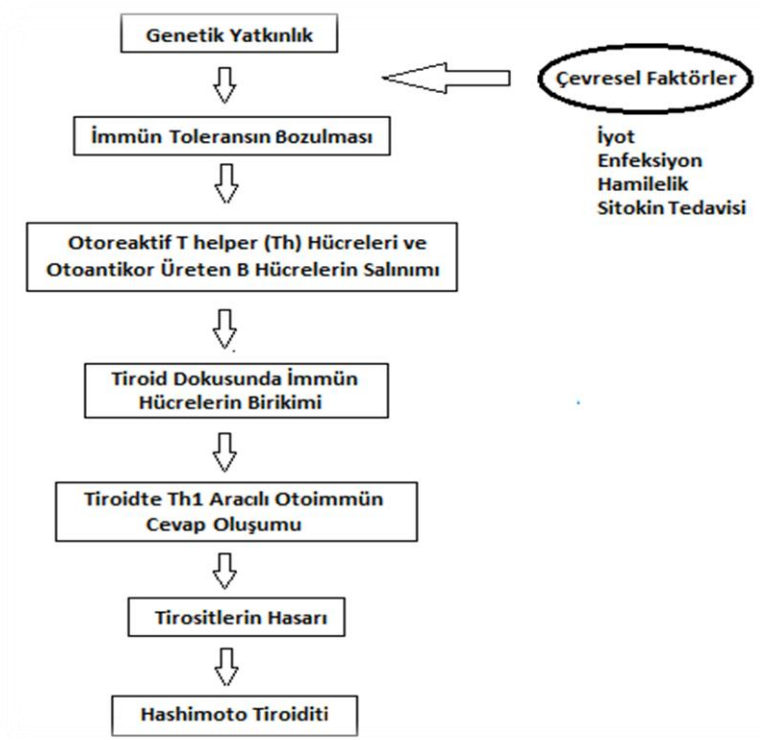
veya yüksek olabilir. Yükselmiş uptake tiroide iyot konsantrasyonunun azaldığını ya da organifikasyonda bir eksiklik olduğunu gösterir (Oğuz ve ark. 2002, Charles ve ark. 2005).

Tiroglobulinin hormon komponenti onu immunojenik hale getirir. Sonuçta mevcut olan antikorun bağlanma yeteneği taşımakta olduğu hormon yoğunluğu ile ilişkilidir. Çoğu immünglobulin G (IgG) yapısında olmakla birlikte immünglobulin M (IgM) ve immünglobulin A (IgA) tipinde de antitiroglobulin bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerin kanında yüksek konsantrasyonlarda bulunabilen antitiroglobulin antikorları komplemanı fikse etmezler. Biyolojik aktivitesinin yapılan çalışmalarda fazla olmadığı belirlenmiş olsa da sağlıklı bireylerde poliklonal olan bu antikor kronik otoimmün tiroiditli bireylerde oligoklonal karakterde bulunmaktadır. Hamile kadınların serumlarında yüksek konsantrasyonda bulunan antitiroglobulin antikoru, bu kişilerin hamilelik döneminde normal serum konsantrasyonuna sahip bireylere göre yüksek olması postpartum tiroidit geçirme ihtimalinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Kronik otoimmün tiroiditli bireylerin %80 – 90'ında serum otoimmün antikor konsantrasyonu yüksektir fakat antiTG antikoru düzeyinin nadiren antiTPO kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (Bravermann ve Utiger 2005).

AntiTPO antikorları da antiTG gibi daha çok IgG vafındadır. AntiTG antikorundan farklı olarak serumdaki konsantrasyonu kronik otoimmün tiroiditte hastalık aktivitesi ile bağlantılıdır. Bu antikorlar komplemanı fikse edebilir ve tiroid hücrelerine bağlanarak *in vitro* olarak onları yok edebilmektedirler. Benzer olayın *in vivo* olduğu kabul edilirse hipotiroidi gelişiminde rol oynadıkları düşünülebilir. TSH reseptör antikorunun da otoimmün tiroid hastalığında direkt olarak patolojik rolü olduğu düşünülmektedir. Tirotropin reseptörünü stimule edebilen ya da bloke edebilen biyolojik aktivitesi vardır. Uyarıcı aktivite, TSH agonisti gibi hareket etmesi sebebiyle Graves hastalığında tirotoksikoz ve guatrın nedenidir. Bloke edici aktivite ise kronik otoimmün tiroiditli bazı hastalarda hipotiroidinin gelişmesinden sorumludur (Bravermann ve Utiger 2005).

Bütün otoimmün hastalıklarda olduğu gibi Hashimoto tiroiditinin oluşmasında internal (genetik) ve eksternal (çevresel) faktörlerin zararlı bir etkileşimi söz konusudur (Şekil 2.1.). Ancak genetik bileşim bu kompleks hastalığın oluşmasında daha ağır basmaktadır. Hastaların ailesinde genellikle Hashimoto hastalığı, guatr, hipotiroidi ve ya Graves hastalığı öyküsü bulunmaktadır. Kardeşler arasında hastalığın tekrarlama riski normale göre 20 kat daha fazladır. Monozigot ikizlerde % 30 - % 60 birliktelik olur. Çevresel faktörlerden yüksek iyot alımı, selenyum eksikliği, sigara, metaller ve kronik hepatit C gibi etkenlerin rolü olduğu

düşünülmektedir. Toplumda görülme sıklığı %2'dir. Olguların %95'ini kadınlar oluşturmaktadır. En sık orta yaş grubunda görülür, 40-65 yaşlarda görülme sıklığı artmaktadır (Wang ve Crapo 1997, Tunbridge ve Vanderpump 2000). HT'nin olası patojenik mekanizması Şekil 2.3'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Hashimoto tiroiditi'nin olası patojenik mekanizması (Cotran ve ark. 1999)

HT, diğer otoimmün hastalıklarla birlikte görülebilmektedir. Bunlar; Graves hastalığı, tip 1 diyabet, adrenokortikal yetmezlik, sistemik lupus eritromatöz (SLE), romatoid artrit, pernisiyöz anemi ve Sjögren sendromu 1'dir (Mark ve Robert 1999).

Hashimoto tiroiditinde supressör T hücrelerindeki genetik defekt sonucunda hücrel immunitenin bozulması söz konusudur. Bu defekt sonucunda supressör T lenfositleri, yardımcı T lenfositlerini baskılayamazlar. Aktive olmuş yardımcı T lenfositleri B lenfositleri ile etkileşime girer ve interferon-gama (INF- γ)'yı da içeren birçok sitokin salgırlar. Bu sitokinler tiroisitleri uyararak major doku uygunluk kompleksi (MHC-II) yüzey antijenlerinin oluşmasına yardımcı olurlar. Ayrıca aktive olmuş B lenfositleri tiroid antijenleri ile reaksiyona giren antikorlar meydana getirirler (Volpe 1991).

HT oluşumuna sebep olan genetik etkenlere karşı, hücrel ve hümoral immün cevap birlikte rol oynamaktadır. HT’de tiroid bezi yaygın olarak lenfositik ve plazma hücreleri ile infiltre edilmiştir. Bu hücrelerden lenfositlerin %60’ını T lenfositleri, %30’unu B lenfositleri, T lenfosit popülasyonunu ise CD4⁺ (yardımcı), CD8⁺ (sitotoksik) ve CD8⁺ (supresör) hücreleri oluşturmaktadır (LaFranchi 2004).

Supresör özelliğe sahip CD8⁺ T hücreleri HT’de sayıca azalmış durumdadır. Bu hücrelerin azalması, organizmanın kendi doku antijenlerine karşı olan toleransın da azalmasına sebep olur. Bu defekt sonucu supresör CD8⁺ T lenfositleri, yardımcı CD4⁺ T lenfositlerini suprese edemez hale gelir (Colin ve ark. 2006, Keskindemirci 2010). Aktive olmuş yardımcı CD4⁺ T lenfositleri B lenfositleri ile etkileşirler ve aktive olan B lenfositleri birçok tiroid antijenine karşı antikor üretirler, bu da tiroid dokunun tahrip edilmesine neden olmaktadır (Dayan ve ark. 1996, Birinci 2009).

Genetik faktörlerin rolü Hashimoto tiroiditinin en çok araştırılan yönlerinden birisi olmasına rağmen çevresel faktörlerde hastalığın oluşmasında önemli etkiye sahiptir. Çevresel faktörlerden en önemli etkiye sahip olanı artmış iyot alımıdır. İyotça zengin olan tiroglobulinler daha fazla antijenik özellik göstermektedir. Bu da tiroid otoantikörlerinde yükselmeye sebep olmaktadır. Genetik olarak hassasiyeti olan kadınlara potasyum iyodür verilmesi, serum tiroid otoantikör seviyesinde artmaya ve tiroidde lenfositik infiltrasyona yol açabilmektedir. HT, iyot alımının çok olduğu ülkelerde hipotiroidizmin en sık nedenidir. Günümüzde iyot eksikliğinin giderilmesi ve fazlalaşması ile otoimmün tiroidite bağlı guatr sıklığının giderek arttığı görülmektedir (Laurberg ve ark. 1991).

Bir diğer çevresel faktör de enfeksiyondur. Enfeksiyonların otoimmün tiroid hastalıklarını uyardığı bilinmektedir. Hastalarda bakteriyel ya da viral enfeksiyon öyküsü saptanabilir. Belli başlı enfeksiyon etkenlerinin *Yersinia enterocolitica*, Coxsackie B virüsü, retrovirüsler ve *Helicobacter pylori* olduğu bilinmektedir (Antonelli 2004, Tomer ve Huber 2009).

Hamilelikte sessiz kalan tiroidit hastalığı doğum sonrasında oluşabilmektedir. Bu nedenle postpartum tiroidit olarak adlandırılmaktadır. Postpartum sürecinin ilk aylarında HT görülebilmektedir. Bu durumun gebelik süresince immün sistemin baskılanması ile doğumdan sonraki ilk aylarda T hücre aktivasyonunun artmasından ileri geldiği kabul edilmektedir (Stagnaro ve ark. 1992).

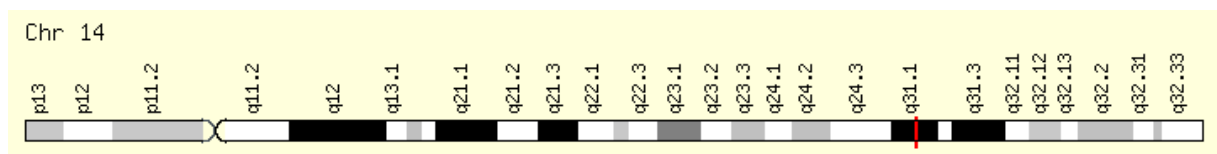
Hashimoto tiroiditine neden olan genetik etmenlerin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Genetik çalışmaların büyük bir çoğunluğu hastalıkla ilişkili olabilecek aday genlerdeki polimorfizmlerin belirlenmesini amaçlamaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda Hashimoto tiroiditinde PARP-1(Poli [ADP-riboz] polimeraz 1) gen polimorfizmi ve Hashimoto tiroiditi hastalarında IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ düzeyleri ve D vitamini reseptör gen polimorfizmi araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda PARP-1 geninin Hashimoto tiroiditi patogenezinde rol oynayan aday genlerden birisi olduğu bulunmuştur (Karakurt 2012). IL-2, IL-4, IFN- γ için Hashimoto tiroiditi olan grupla kontrol grubu arasında anlamlı farklılıklar olduğu görülmüş, IL-5 için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. D vitamini açısından Hashimoto tiroiditi olan hastalarda sağlıklı kontrollere göre D vitamini düzeyleri açısından bir farklılık gözlenmemiştir. MHC-HLA (Major doku uygunluk kompleksi – insan lökosit antijen) kompleksiyle ilgili genlerle HT'nin ilişkisi gösterilmiş, fakat bu gen polimorfizmlerinin rolleri tam olarak anlaşılammıştır (Gülyüz 2014). Ayrıca hastalığın genetiği ile ilgili CTLA-4 (Sitotoksik T – lenfosit antijen 4), MHC, HLA gibi spesifik genlerde araştırılmıştır (Allahabadia ve Gough 1999). CTLA-4 geni T hücre yüzeyindeki molekülü kodlayan immün bir gendir. Genin T hücre cevabı üzerinde negatif etkisi vardır. HT'nde bu gen polimorfizmiyle negatif etki ortadan kalkmakta ve sitotoksik hücre yıkımı meydana gelmektedir (Kotsa ve ark. 1997).

Yapılan bu çalışmalarda polimorfizmlerin hastalığın genetiği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda hastalığın oluşmasında TSHR gen ve interlökin 1 reseptör antagonisti (IL1RN) gen polimorfizmlerinin ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

2.5. Tiroid Uyarıcı Hormon Reseptör (TSHR) Polimorfizmi

Tiroid uyarıcı hormon reseptör (TSHR) protein kodlayan bir gendir. Bu genin etkileri hipertiroidizmin birkaç tipine sebep olur. Kromozom 14q31 de konumlanan tiroid spesifik bir gendir (Tomer ve ark. 1997). TSHR proteini tiroid için önemli otoantijen olarak kabul edilir ve otoimmün tiroid hastalığının patogenezinde önemli rol oynar (Davies ve ark. 2005).



Şekil 2.4. TSHR geni (<http://www.genecards.org/cdn/genomic-location/TSHR-gene.png>)

Anti TSHR otoantikörlerinin HT tanısındaki önemi bilinmektedir. Bu faktör dikkate alınarak HT’nde TSHR geni, aday gen analizi yapılarak incelenmiş ve TSHR geninde üç yaygın polimorfizm tanımlanmıştır (Tonacchera ve Pinchera 2000). Bunlardan ikisi, TSHR’nün ekstraselüler domainin 36. pozisyonudaki D36H polimorfizminde aspartik asitin histidine dönüşümü ve 57. pozisyonundaki P52T polimorfizminde prolinin treonine dönüşümüdür. Ekstraselüler domain, TSH hormonu ve TSHR otoantikörlerinin bağlandığı bölgedir. Teorik olarak bu bölgedeki amino asit dizisinin, TSHR’ndeki T hücre epitoplarnı değiştirdiği düşünülerek; özellikle ekstraselüler domainin araştırıldığı ifade edilmektedir. İntraselüler domainde yer alan D727E polimorfizminde, aspartik asit glutamik asite dönüşmektedir (Tonacchera and Pinchera 2000, Tomer and Davies 2003, Ban and Tomer 2005, Jacobson and Tomer 2007). TSHR geninde belirlenen polimorfizmler Şekil 2.5’te şematik olarak gösterilmiştir.

D727E polimorfizminin fonksiyonel analizi TSH’dan sorumlu yüksek siklik adenzin 3’5’ monofosfat (cAMP) ile önemli derecede ilişkili olduğu açığa çıkmıştır (Gabriel ve ark. 1999). Birçok ilişkili çalışmada Hashimoto tiroiditinin TSHR D727E polimorfizmi ile ilişkili olduğu onaylanmıştır (Muhlberg ve ark. 2000, Ban ve ark. 2002).



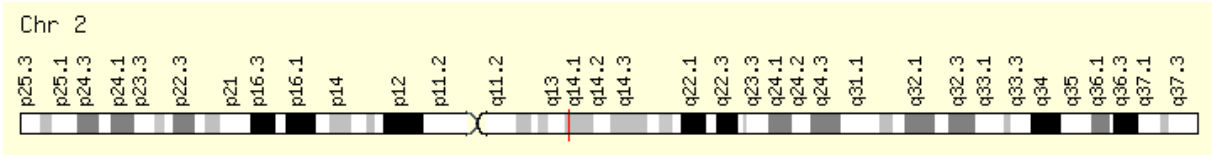
Şekil 2.5. Tiroid uyarıcı hormon reseptörü (TSHR) geninde belirlenen polimorfizmler (Robin ve ark. 2006)

Rusya beyaz ırk popülasyonunda, D727E ile HT arasında anlamlı bir ilişkinin saptandığı (Chistiakov ve ark. 2002) ancak bunu izleyen çalışmaların bu veriyi desteklemediği ifade edilmektedir (Ban ve ark. 2002). Bu sebeple, TSHR geninin HT için bir minör duyarlılık geni olduğu belirtilmektedir (Ban and Tomer 2005).

2.6. İnterlökin 1 reseptör antagonisti (IL1RN^{VNTR}) Polimorfizmi

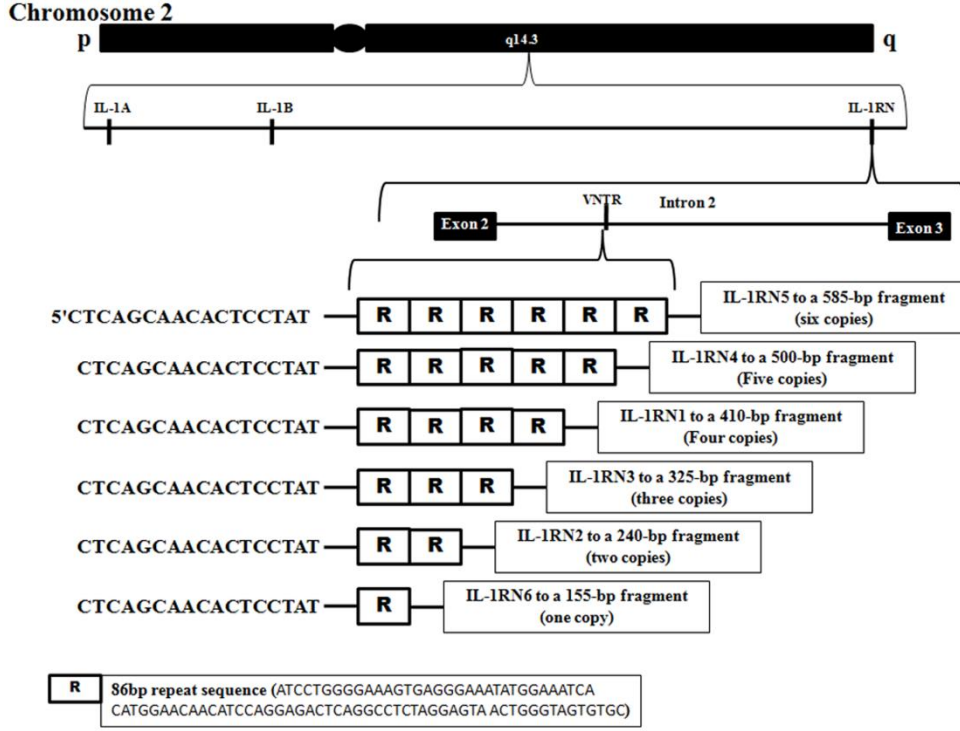
İnterlökin 1 (IL-1) sitokin ailesinin bir üyesidir. İmmünolojik reaksiyonlarda ve inflamasyonun başlamasında önemlidir. En güçlü inflamator sitokin olarak adlandırılır. IL-1 reseptörüne bağlandığında hücrede sinyalleşme başlar. IL1Ra proteini kromozom 2 de

lokalle olan IL1RN geni tarafından kodlanmaktadır. IL1RN geni kromozomal lokalizasyonu Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. IL1RN geni (<http://www.genecards.org/cdn/genomic-location/IL1RN-gene.png>)

IL1RN'nin intron 2 bölgesindeki polimorfizm (rs2234663) 86 baz çiftlik birbiri ardına çeşitli tekrarlar sebebu olmaktadır (VNTR) (Tarlow ve ark. 1993) (Şekil 2.7.). VNTR'lar ardışık olarak tekrarlayan baz dizileridir. Genellikle 10 – 100 baz çiftlik uzunluktan oluşan tekrar birimleridir. VNTR lokusları gen içinde şifrelenmeyen yani amino asit dizisi okunmayıp protein olarak kodlanmayan dizilerdir. Bu lokusların en önemli özellikleri tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişim göstermesidir. Bu nedenle büyük oranda alellik varyasyon gösterirler. VNTR lokusları yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle önemli genetik belirleyiciler olarak kabul edilirler. Hashimoto tiroiditi açısından popülasyondaki alel frekansına bağlı olarak paternal yansımalar yapabilmesi ve yüksek oranlarda yeterli polimorfizm elde edilebildiği için önemlidir (Hoelzel 1998, Tuli ve ark. 2001).



Şekil 2.7. VNTR polimorfizminin çeşitli alellerinin IL1RN genindeki pozisyonunun şematik diyagramı (Jaiswal ve ark. 2012)

IL1RN geninde 86 baz çiftlik (bç) tekrarlarba bağlı olarak altı farklı allel oluştuğu belirlenmiştir (Tarlow ve ark. 1993). Bunlar; Allel 1 (A1) 410 bç uzunluğunda ve dört tekrar, Allel 2 (A2) 240 bç uzunluğunda ve iki tekrar, Allel 3 (A3) 325 bç uzunluğunda ve üç tekrar, Allel 4 (A4) 500 bç uzunluğunda ve beş tekrar, Allel 5 (A5) 595 bç uzunluğunda ve altı tekrardan oluşur. En yaygın alleller allel 1 ve allel 2 olarak belirlenmiştir (Vamvakopoulos ve ark. 2002; Steinkasserer ve ark. 1991). En yaygın genotipler ise A1A1 ve A1A2'dir. Allel 2'nin birçok otoimmün hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Blakemore ve ark. 1995, Fang ve ark. 1999).

Yapılan çalışmalarda Hashimoto tiroiditi hastalığının başında IL1RN^{VNTR} polimorfizmi ile antiTPO antikorunun üretimi arasında ilişki olduğu bulunmuştur. Bu ilk sonuçlara göre IL1RN^{VNTR} polimorfizminin Hashimoto tiroiditi yatkınlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Blakemore ve ark. 1995, Fang ve ark. 1999).

Yapılan literatür çalışmalarında Hashimoto tiroiditi hastalığında polimorfizmlerin araştırıldığı bir çok çalışma bulunmaktadır. Fakat TSHR ve IL1RN gen bölgeleriyle ilgili araştırmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı Hashimoto tiroiditi

hastalarında TSHR ve IL1RN gen bölgelerinde fonksiyonel polimorfizm olup olmadığının araştırılmasıdır.

Polimorfizmlerin belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemleri kullanılacaktır. PZR DNA veya RNA parçasının *in vitro* şartlarda kopyalanmasına dayanan üç aşamadan oluşan bir yöntemdir. RFLP ise DNA'yı özgül bölgelerden kesen restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan kesim işlemidir. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi için PZR yöntemi uygulanmıştır. Çoğaltılan bölge daha sonra agaroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmiştir. TSHR geni D727E polimorfizmin belirlenmesinde PZR-RFLP yöntemi uygulanmıştır. Çalışmamızda RFLP HSP92 II restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HSP92 II restriksiyon enzimi Tip II enzim grubuna girmektedir. Tip II grubu enzimler çift iplikli DNA'da spesifik nükleotid dizilerine bağlanırlar ve belli bir uzunlukta iki iplikçikte kesme yaparlar. HSP92 II enzimi “ 5' CATG 3' ” tanıma bölgesinden kesim yaparak yapışkan uç oluşturur.

3'↑GTAC 5'

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı +4⁰C, Profilo, Türkiye

Derin Dondurucu -20⁰C, Vestel, Türkiye

Distile su cihazı, GFL, Almanya

Ultrasaf su cihazı, Millipore, ABD

Elektroforez güç kaynağı, Cleaver, İngiltere

Elektroforez güç kaynağı, Thermo, İngiltere

Hassas terazi, Ohaus, ABD

Isı döngü cihazı, Techne TC Plus, İngiltere

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

Kar buz makinası, Bluewave BW, Çin

Mikrosantrifüj, Cleaver, İngiltere

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Otoklav, Tek Bal, Türkiye

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

pH metre, Hanna H1221, Romanya

Soğutmalı mikrosantrifüj, VWR, Almanya

Soğutmalı mikrosantrifüj, Hettich, Almanya

Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye

Vorteks, WiseMix, Kore

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere

UV kaynağı, Vilberlourmat, Fransa

Termal döngü cihazı, AB Proflex, ABD

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Agaroz, 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

HCL, Sigma, ABD

NaCl, Sigma, ABD

SDS, MP Biomedicals, France

Borik asit, Calbiochem, Germany

BSA, Sigma, ABD

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

HSP92 II restriksiyon enzimi Promega, USA

Taq DNA polimeraz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya

Tris, Sigma, ABD

Yükleme tamponu, MBI Fermentas, Litvanya

3.1.3. Kullanılan çözeltiler 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.

10X reaksiyon tamponu (Fermantas, Litvanya)

100 mM Tris-HCl (pH 8.8)

500 mM KCl

0,8 % Nonidet P40

2 mM MgCl₂ içeren Taq DNA polimeraz enzim seti içerisinde hazır olarak alındı.

TE tamponu

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

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

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.

3.1.4. Kullanılan çözeltiler

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.

Etidyum bromür çözeltisi

Etidyum bromür final konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde 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 litreye dH₂O ile tamamlandı.

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

RFLP tamponu

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl₂

50 mM NaCl

0,1 mg/ml BSA 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.

3.1.5. Kullanılan primerler

Çalışmanın PZR aşamasında kullanılan primerler IDT Technologies, ABD'den temin edilmiştir.

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

POLİMORFİZM	PRİMER DİZİLERİ (5' → 3')	Tm (C°)
D727E	F- GTCAGCAATTCTGAACAAGCC	60
	R-TTCTTTGGGGTTAGATGGG	
IL1RN^{VNTR}	F-CTCAGCAACACTCCTAT	58
	R-TCCTGGTCTGCAGGTAA	

3.1.6. Kullanılan bilgisayar programları

PASW® Statistics 18 (SPSS 16.0)

3.1.7. Kullanılan restriksiyon enzimleri

Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmlerinin tayininde kullanılan HSP92 II restriksiyon enzimi Promega, USA'dan temin edilmiştir.

3.1.8. Hasta grubu

Çalışmaya dahil edilen hasta grubu 55 kişiden oluşmaktadır. Kontrol grubu 49 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. Olgulara ait veriler ve klinik bulguları

No	Yaş	Cinsiyet	Aile Öyküsü	Sigara	Alkol	FT3	FT4	TSH	Anti TG	Anti TPO
1	42	K	+	-	-	-	-	-	-	-
2	36	K	-	-	-	3,58	0,71	2,86	176	>1077
3	28	K	+	-	-	-	-	-	-	-
4	57	K	-	+	-	2,9	0,99	3,04	>2533	>1077
5	71	E	-	+	+	3,2	0,89	3,15	1	193
6	36	K	+	-	-	3,5	1,29	0,08	1,9	310
7	55	K	-	-	-	4,02	0,91	1,73	1,4	>1077
8	37	K	-	+	-	3,3	0,85	2,07	7,2	222
9	66	E	-	-	-	3,69	0,76	5,17	278	107
10	33	K	+	-	-	3,5	1,04	1,41	205	12,4
11	46	K	+	-	-	3,55	0,6	3,01	329	850
12	35	K	+	-	-	2,91	0,94	2,19	1,2	31
13	33	K	-	+	+	3,27	0,75	1,31	2	>1077
14	42	K	+	-	-	3,43	0,92	2,75	163	262
15	19	K	+	-	-	2,94	0,87	1,67	≤0,9	341
16	31	K	+	+	-	3,01	0,9	2,36	8,69	272
17	26	K	+	-	-	2,9	0,51	52	380	>1077
18	21	E	+	-	+	3,7	0,67	2,52	189	92
19	52	E	-	+	-	3,02	0,78	0,39	98	155
20	52	K	+	-	-	-	-	-	-	>1024
21	43	K	-	-	-	-	-	-	-	-
22	47	K	-	+	-	-	-	-	-	-
23	32	K	-	-	-	3,6	0,81	8,85	8,14	784
24	44	K	-	-	-	2,77	0,6	5,38	10	64
25	32	K	-	+	-	-	-	-	-	-
26	40	K	-	-	-	-	-	-	-	-
27	45	E	-	+	-	3,75	1,11	1,27	1,39	358
28	59	K	+	+	-	2,79	0,95	5,82	9,9	119
29	44	K	-	-	-	3,32	0,86	1,52	20,53	324
30	38	K	-	-	-	3,35	0,89	3,75	≤0,9	180
31	48	K	-	+	-	5,36	16,65	57	>4000	>600
32	27	K	-	-	-	1,5	0,66	2,72	18,6	270
33	21	K	+	-	-	2,94	1	9,25	1,9	1013
34	24	K	-	-	-	4,37	0,79	4,11	103	327
35	41	K	-	-	+	4,48	1,05	1,23	523	971
36	45	K	+	-	-	3,65	0,91	1,63	258	442
37	28	K	+	-	-	2,51	0,77	3,19	88	1,86
38	41	K	-	+	-	3,46	0,58	3,38	1728	5,160

39	21	K	-	-	-	-	-	-	-	-
40	38	K	-	-	-	-	-	-	-	-
41	37	E	-	-	-	-	-	-	-	-
42	32	K	-	-	-	-	0,7	5,02	-	-
43	36	K	+	-	-	-	-	-	-	-
44	30	K	+	-	-	1,28	2,86	2,44	3,5	97
45	59	K	-	-	-	3,2	0,76	8,6	-	236
46	42	K	-	-	+	-	-	-	-	-
47	48	E	+	-	-	2,68	0,56	15,55	1,4	994
48	67	E	-	-	-	2,5	1,17	1,56	1	405
49	35	K	+	-	-	-	-	-	-	-
50	18	K	+	-	-	-	-	-	-	-
51	35	K	+	+	-	-	-	2,33	-	44
52	39	K	+	-	-	5,45	0,77	1,38	3,1	1,3
53	55	K	-	-	-	4	0,9	0,19	47	1077
54	21	K	-	-	-	-	-	5,6	0,9	116
55	42	K	-	-	-	-	-	-	-	-

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 çalışmaya girinceye kadar 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 çevirilerek iyi bir şekilde karıştırıldı. Nükleer peleti çöktürmek için 2000 rpm'de 10 dakika çevirildi. Pelet oynatılmaksızın süpernatant döküldü. Pelet 800 µl solüsyon 2 ile hafif bir biçimde 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 karıştırıldı. 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 ve ark. 1988).

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ilk olarak Kary Mullis ve ark. (Mullis ve ark. 1986) tarafından uygulanan ve hedef DNA veya RNA parçasının 20-30 nt'lik oligonükleotit primerler kullanılarak *in vitro* şartlarda kopyalanmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem üç aşamadan oluşur:

1. Çift iplikli DNA'nın denatürasyonu,
2. Primerlerin DNA üzerinde kendilerine özgü bölgelerine bağlanması,
3. Yeni DNA zincirlerinin sentezi.

Polimeraz zincir reaksiyonunun ilk aşamasında çift iplikli DNA yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilir. Denatürasyon aşamasından sonra reaksiyon ortamı kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülür ve oligonükleotit primerler komplementer bölgelere bağlanır. Son aşamada Taq DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP varlığında primerleri 5' – 3' yönünde uzatmaya başlar. Her döngü sonucunda ilgili DNA bölgesi iki katına çıkar (Schochetman ve ark. 1988).

PZR yöntemi ile TSHR D727E ve IL1RN^{VNTR} polimorfizmlerini içeren ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bunun için PZR reaksiyon karışımları hazırlandı.

TSHR gen polimorfizmi için;

50 µl'lik bir reaksiyon karışımı

- 0,1-1 µg kalıp DNA
- 10XPZR tamponu
- 10 pmol ileri ve geri primerlerini

- 200 µM dNTP karışımı
- 1,5 mM MgCl₂
- 1 ünite Taq polimeraz enzimi
- dH₂O içermektedir.

IL1RN gen polimorfizmi için;

25 µl'lik bir reaksiyon karışımı

- 0,1-1 µg kalıp DNA
- 10XPZR tamponu
- 10 pmol ileri ve geri primerlerini
- 200 µM dNTP karışımı
- 1,5 mM MgCl₂
- 1 ünite Taq polimeraz enzimi
- dH₂O içermektedir.

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

TSHR D727E gen polimorfizmi için;

95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon

95 °C'de 30 saniye.....(denatürasyon)

60 °C'de 30 saniye.....(eşleşme)

72 °C'de 30 saniye.....(sentez)

} 35 döngü

72 °C'de 10 dakika final uzaması olarak uygulandı.

IL1RN^{VNTR} gen polimorfizmi için;

96 °C'de 1 dakika ön denatürasyon

94 °C'de 1 dakida.....(denatürasyon)

58 °C'de 1 dakika.....(eşleşme)

72 °C'de 1 dakida.....(sentez)

} 35 döngü

72 °C'de 5 dakika final uzaması olarak uygulandı.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi ile DNA tayininde çözünmüş haldeki DNA parçaları; elektrik akımında jelde oluşan porlar sayesinde büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine göre farklı hızlarda hareket etmektedirler. Bu sayede çeşitli boyutlardaki DNA molekülleri tanımlanabilmektedir. Jel oluşturmada kullanılan agarozun konsantrasyonu değiştirilerek jelde oluşacak olan porların çapları ayarlanabilmektedir. Bu nedenle küçük DNA fragmanları için yüksek agaroz konsantrasyonu, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz konsantrasyonu ile agaroz jeller hazırlanarak DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. Ayrıca agaroz jel hazırlanırken DNA'nın görünür hale gelmesi için etidyum bromür (EtBr) kullanılmaktadır. Agaroz jeldeki EtBr, DNA'ya bağlanarak 300-360 nm dalga boylu UV ışık altında fluoresan etki gösterir ve bu sayede DNA agaroz jelde görünür hale gelmektedir (Sambrook ve Russell 1989).

Bu çalışmada PZR ile amplifiye edilen ürünlerin doğruluğunu tespit etmek için jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla 50 ml 1x TBE içerisinde 1 g agaroz ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. 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 30 dakika 130 volt sabit voltajda yürütüldü ve oluşan DNA bantları UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi.

3.2.4. PZR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesimi

Restriksiyon enzimleri DNA'yı özgül bölgelerden kesen, doğal olarak bakterilerde bulunan ve yabancı DNA'ya karşı savunma görevi gören enzimlerdir. Bugün bilinen 100'den

fazla kesim yüzeyine sahip 400'ü aşkın restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Herbiri izole edildikleri türe göre adlandırılmakta ve aynı türden izole edilen restriksiyon enzimlerinin birbirinden ayırt edilebilmesi için numaralandırılmaktadır. Tanıma yüzeyleri genellikle 4 - 6 baz çifti uzunluğunda ve kesim sonucu küt veya yapışkan uç oluşmaktadır. Geleneksel olarak; N herhangi bir nükleotid için, R purinler için, Y primidin için, A, T, C, G özgül bazlar için kullanılarak 5' → 3' olarak yazılmaktadır (Cooper 1997, Connor ve Smith 1997).

TSHR geni D727E polimorfizminin belirlenebilmesi için PZR sonrasında HSP92 II enzimi ile kesim gerçekleştirildi. Kesim termal döngü cihazında dört saat süre ile inkübe edildi. HSP92 II enzimini tanıma bölgeleri Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.

Her bir kesim için reaksiyon tüpüne;

- 10X Tampon
- Asetile BSA (bovin serum albumin)
- Restriksiyon enzimi
- dH₂O eklenmiştir.

Kesim ürünleri % 2,5'luk agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.



Şekil 3.1. HSP92 II (NlaIII) restriksiyon enziminin tanıma bölgeleri ve kesim noktaları (Roberts ve Macelis 1991)

3.2.5. İstatistiksel analizler

Tez çalışma kapsamındaki hasta ve kontrol gruplarının 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. Ayrıca TSHR gen polimorfizmi için toplam populasyonun (hasta ve kontrol grubu) Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumluluğu kontrol edildi ve ‘‘p’’ değerinin 0,05’den küçük olduğu durumların Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olmadığı kabul edildi (Rodriguez ve ark. 2009). İstatistik hesapları için SPSS 16.0 bilgisayar programı kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hasta Grubu

Çalışmaya Hashimoto tiroiditi tanısı konulmuş 55 hasta dahil edilmiştir. Hastaların 47'si kadın 8'i erkektir. Hastaların 23 tanesinde aile öyküsü bulunmaktadır. 13 tane hastada sigara kullanımı mevcutken alkol kullanımı 4 hastada mevcuttur. Hastaların yaş ortalaması 72 ± 18 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu hastalardan 39'u 45 yaş altı, 13'ü 45-60 yaş arası, 3 tanesi 60 yaş üstü olarak belirlendi. TSHR D727E polimorfizmi için hasta ve kontrol grubundaki bireylerin FT3, FT4, TSH, AntiTG ve AntiTPO değerleri dikkate alınarak tek tek değerlendirildi. 14 tane hastanın FT3, FT4, TSH, AntiTG ve AntiTPO değerleri mevcut değildir. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda yaş, cinsiyet, aile öyküsü, sigara ve alkol değerleri incelendi.

Kontrol grubuna 49 kişi dahil edilmiştir. Kontrol grubunun 24'ünü kadınlar, 25'ini erkekler oluşturmaktadır. 12 kişide aile öyküsü (Graves, HT, hipotiroiditi) bulunmaktadır. Sigara kullanan 21 kişi, alkol kullanan 21 kişi mevcuttur. Bireylerin yaş ortalaması 83 ± 18 arasında olduğu belirlenmiştir.

4.2. PZR ve RFLP Sonuçları

4.2.1. TSHR D727E polimorfizmi

Araştırma kapsamında hasta ve kontrol gruplarının kan dokusundan izole edilen DNA'ların TSHR D727E polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve kesimi yapıldı. Beklenen bantlar %2,5'luk agaroz jel elektroforezinde gösterildi.

Şekil 4.1.'de 13 olguya ait PZR-RFLP ve agaroz jel elektroforezi sonucu örnek olarak verilmiştir. Tüm hasta ve kontrol bireylerinde genotip belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

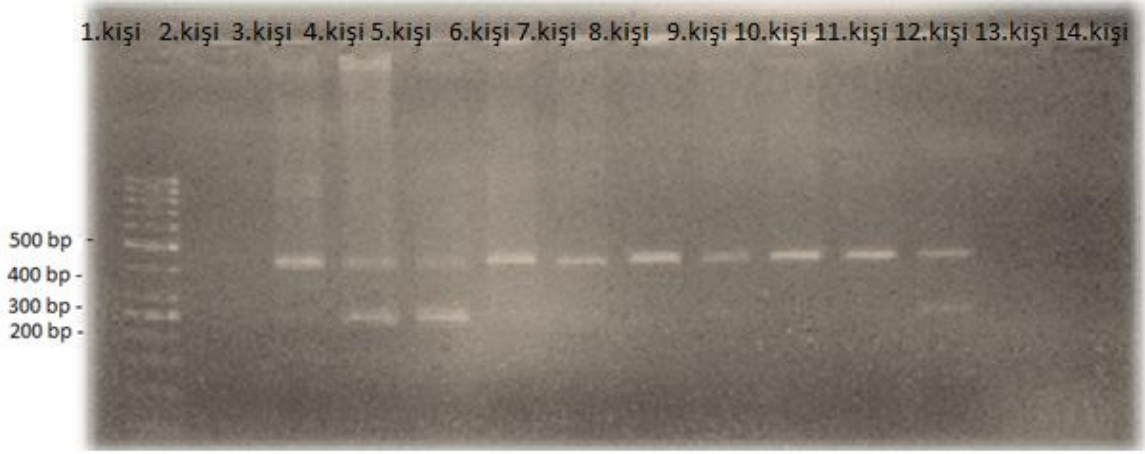


Şekil 4.1. TSHR D727E polimorfizmi için PZR ürünlerinin HSP92 II restriksiyon enzimi ile kesiminin %2,5'luk agaroz jel elektroforezi sonuçları

Kesim sonucunda CC genotipleri için 255, 51 ve 21, GG genotipi için 276 ve 51, CG genotipi için 276, 255, 51 ve 21 bç'lik bantlar oluştu.

4.2.2. IL1RN^{VNTR} polimorfizm

Araştırma kapsamında hasta ve kontrol gruplarının kan dokusundan izole edilen DNA'ların IL1RN^{VNTR} polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve %2'lik agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi için PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları

Çoğaltılan ilgili gen bölgelerinin jel sonucunda beklenildiği gibi 595 bç, 500 bç, 410 bç, 325 bç ve 240 bç'lik bantlar oluştu.

4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları

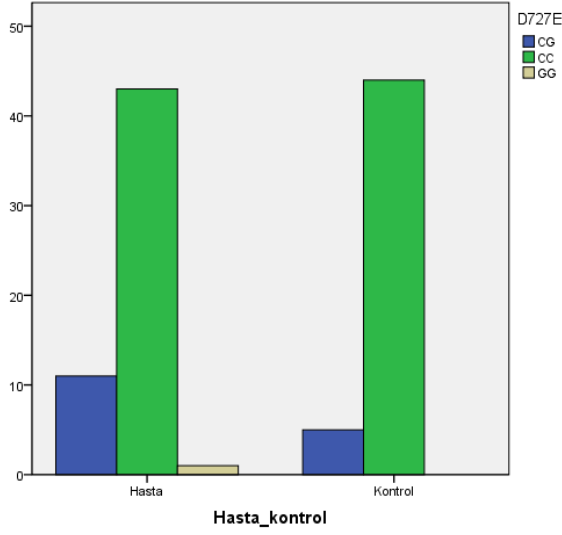
Çalışılan polimorfizmler için Hashimoto hastası 55 kişi ile sağlıklı 49 bireyden oluşan kontrol grubu arasında, tez kapsamındaki polimorfizmlerin genotipleri ve alleleri açısından anlamlılık analizleri ki-kare testi ile yapıldı. TSHR D727E polimorfizmi için toplam popülasyonun Hardy-Weinberg eşitliğine uyumluluğu kontrol edildi.

4.3.1. TSHR D727E polimorfizmi

TSHR D727E polimorfizmi kapsamında 55 bireyden oluşan hasta grubunda 45 CC (wild typen), 9 CG (heterozigot genotip), 1 GG (homozigot genotip); 49 bireyden oluşan kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla 44 CC ve 5 CG olarak belirlendi (Çizelge 4.1). Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu ile kontrol grubu arasında genotip (Çizelge 4.1) ve allel (Çizelge 4.2) açısından istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilemedi. Toplam popülasyonun Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olmadığı tespit edildi. Klinik veriler ile TSHR D727E polimorfizmi genotipleri kıyaslandığında hiçbir klinik veri ile genotipler arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilemedi.

Çizelge 4.1. TSHR D727E polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi p değeri

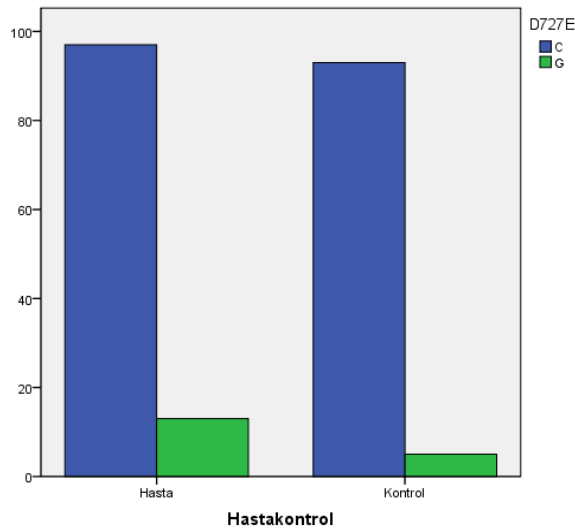
		D727E Genotipleri			Toplam	p
		CC	CG	GG		
Hasta	Sayı	45	9	1	55	0,232
Kontrol	Sayı	44	5	-	49	
Toplam	Sayı	89	14	1	104	



Şekil 4.3. TSHR D727E polimorfizmi genotip değerlendirme grafiği

Çizelge 4.2. TSHR D727E polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi p değeri

		D727E Allelleri		Toplam	p
		C	G		
Hasta	Sayı	99	10	109	0,069
Kontrol	Sayı	93	5	98	
Toplam	Sayı	192	15	207	



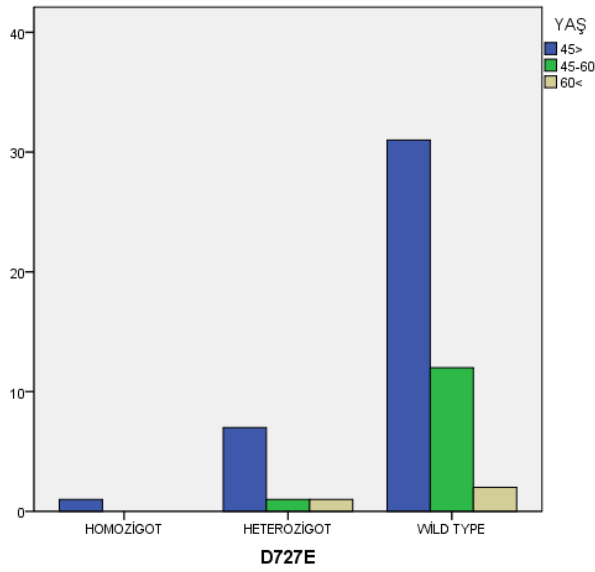
Şekil 4.4. TSHR D727E polimorfizmi allel değerlendirme grafiği

Çizelge 4.3. TSHR D727E polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu

Genotip	Beklenen	Gözlenen	Ki-kare	p
CC	88,62	89	5,99	0,595
CG	14,77	14		
GG	0,62	1		

Çizelge 4.4. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

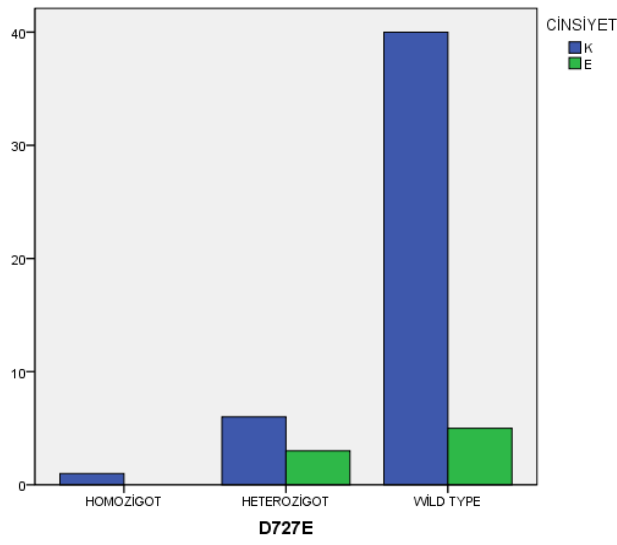
	YAŞ			Toplam	p
	45>	45-60	60<		
D727E HOMOZİGOT	1	0	0	1	0,207
HETEROZİGOT	7	1	1	9	
WİLD TYPE	31	12	2	45	
Toplam	39	13	3	55	



Şekil 4.5. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme grafiği

Çizelge 4.5. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirme ve ki-kare testi p değeri

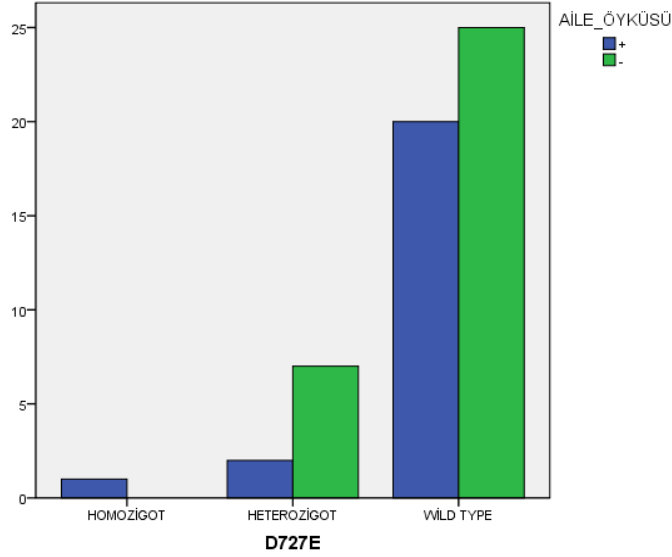
	CİNSİYET		Toplam	P
	K	E		
D727E HOMOZİGOT	1	0	1	0,207
HETEROZİGOT	6	3	9	
WİLD TYPE	40	5	45	
Toplam	47	8	55	



Şekil 4.6. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği

Çizelge 4.6. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme ve ki-kare testi p değeri

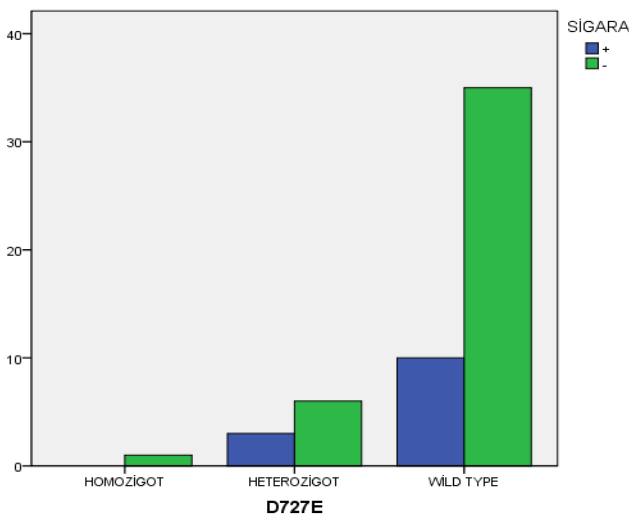
	AİLE ÖYKÜSÜ		Toplam	p
	+	-		
D727E HOMOZİGOT	1	0	1	0,230
HETEROZİGOT	2	7	9	
WİLD TYPE	20	25	45	
Toplam	23	32	55	



Şekil 4.7. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği

Çizelge 4.7. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

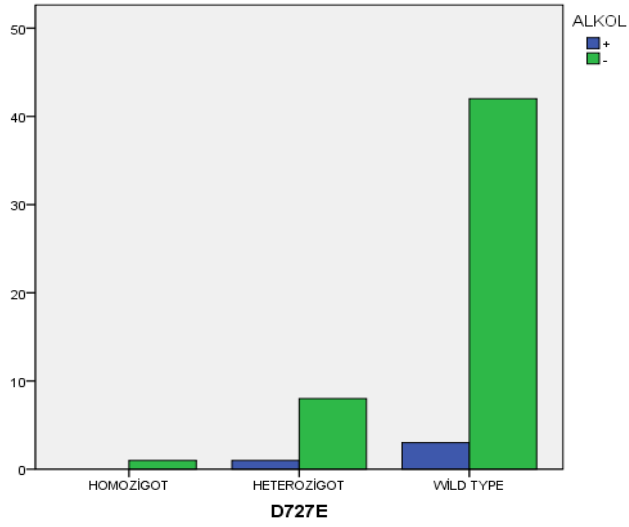
	SİGARA		Toplam	p
	+	-		
D727E HOMOZİGOT	0	1	1	0,661
HETEROZİGOT	3	6	9	
WİLD TYPE	10	35	45	
Toplam	13	42	55	



Şekil 4.8. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.8. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

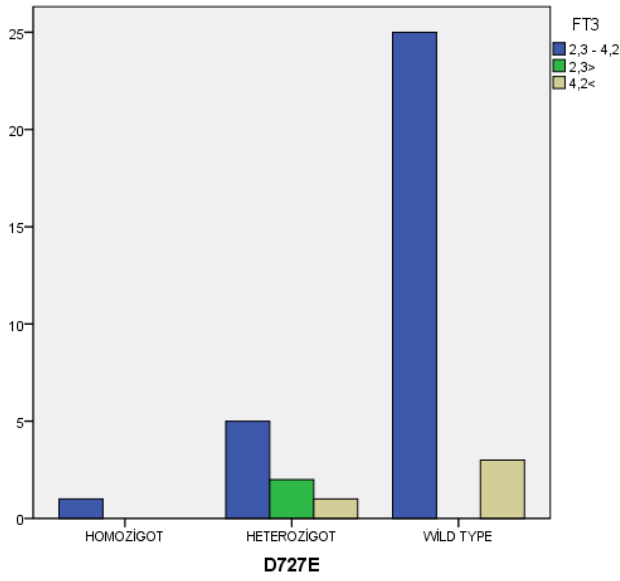
		ALKOL		Toplam	P
		+	-		
D727E	HOMOZİGOT	0	1	1	0,861
	HETEROZİGOT	1	8	9	
	WİLD TYPE	3	42	45	
Toplam		4	51	55	



Şekil 4.9. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.9. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT3 değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

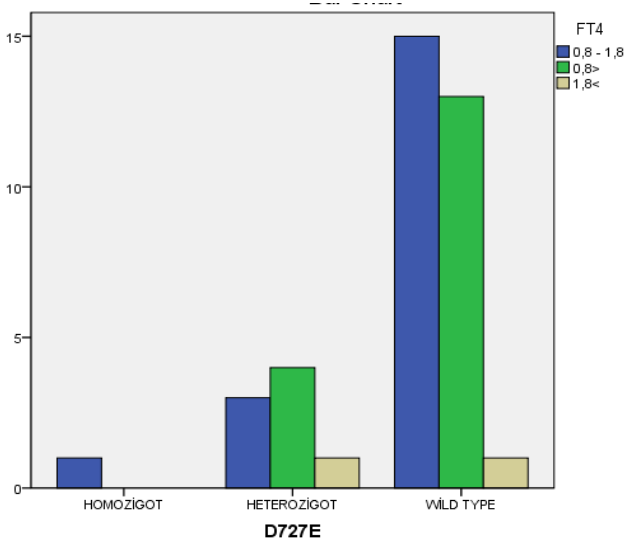
		FT3			Toplam	P
		2,3 - 4,2	2,3>	4,2<		
D727E	HOMOZİGOT	1	0	0	1	0,094
	HETEROZİGOT	5	2	1	8	
	WİLD TYPE	25	0	3	28	
Toplam		31	2	4	37	



Şekil 4.10. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT3 değerlendirme grafiği

Çizelge 4.10. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT4 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

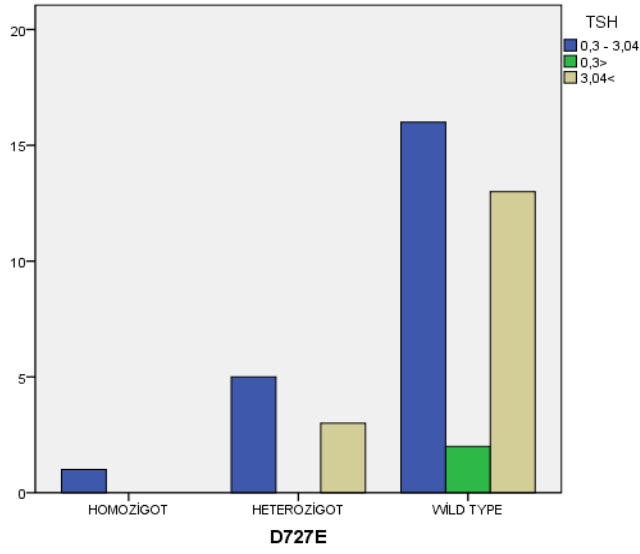
	FT4			Toplam	p
	0,8 - 1,8	0,8>	1,8<		
D727E HOMOZİGOT	1	0	0	1	0,682
HETEROZİGOT	3	4	1	8	
WİLD TYPE	15	13	1	29	
Toplam	19	17	2	38	



Şekil 4.11. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri FT4 değerlendirme grafiği

Çizelge 4.11. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri TSH değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

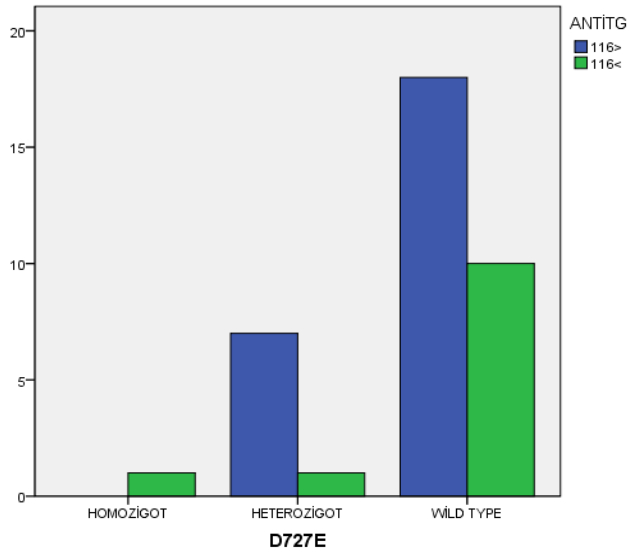
		TSH			Toplam	P
		0,3 - 3,04	0,3>	3,04<		
D727E	HOMOZİGOT	1	0	0	1	0,820
	HETEROZİGOT	5	0	3	8	
	WİLD TYPE	16	2	13	31	
Toplam		22	2	16	40	



Şekil 4.12. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri TSH değerlendirme grafiği

Çizelge 4.12. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTG değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

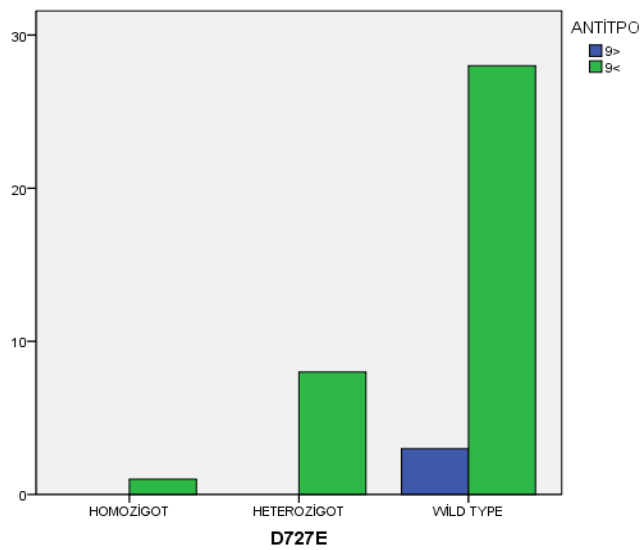
		AntiTG		Toplam	P
		116>	116<		
D727E	HOMOZİGOT	0	1	1	0,160
	HETEROZİGOT	7	1	8	
	WİLD TYPE	18	10	28	
Toplam		25	12	37	



Şekil 4.13. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTG değerlendirme grafiği

Çizelge 4.13. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTPO değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

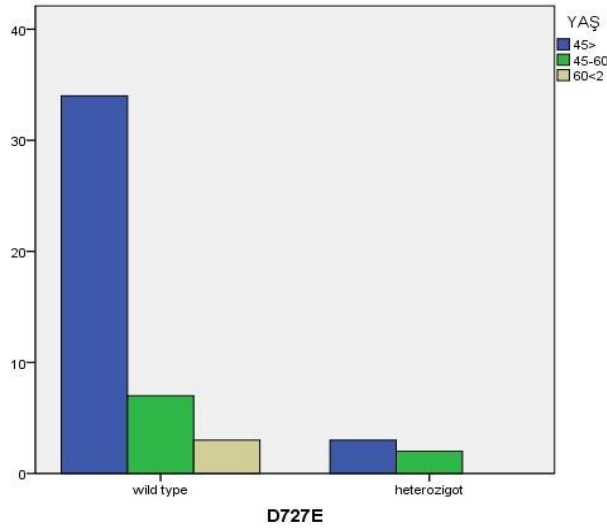
	AntiTPO		Toplam	p
	9>	9<		
D727E HOMOZİGOT	0	1	1	0,625
HETEROZİGOT	0	8	8	
WİLD TYPE	3	28	31	
Toplam	3	37	40	



Şekil 4.14. TSHR D727E polimorfizmi hasta klinik veri AntiTPO değerlendirme grafiği

Çizelge 4.14. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

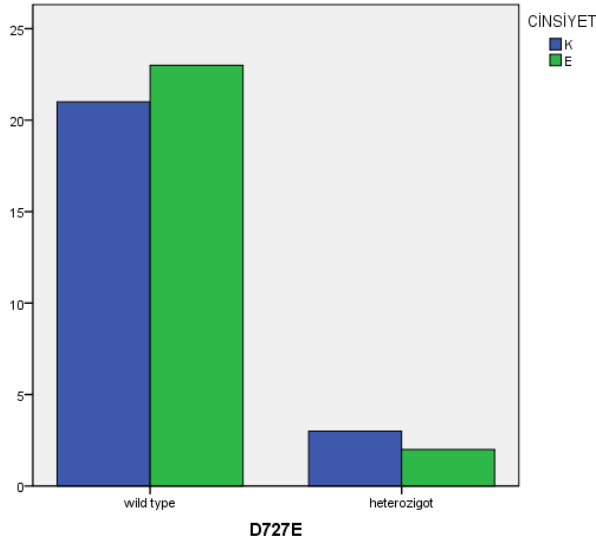
	YAŞ			Toplam	P
	45>	45-60	60<2		
D727E WİLD TYPE	34	7	3	44	0,380
HETEROZİGOT	3	2	0	5	
TOPLAM	37	9	3	49	



Şekil 4.15. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş grafiği değerlendirme

Çizelge 4.15. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

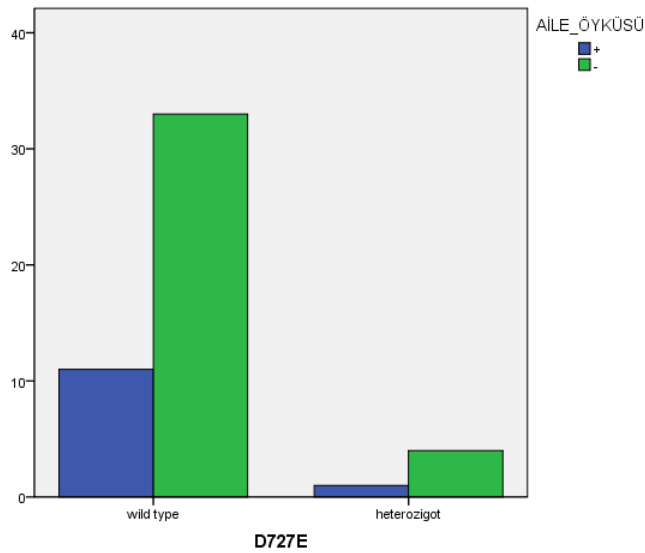
	CİNSİYET		Toplam	P
	K	E		
D727E WİLD TYPE	21	23	44	0,480
HETEROZİGOT	3	2	5	
Toplam	24	25	49	



Şekil 4.16. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği

Çizelge 4.16. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

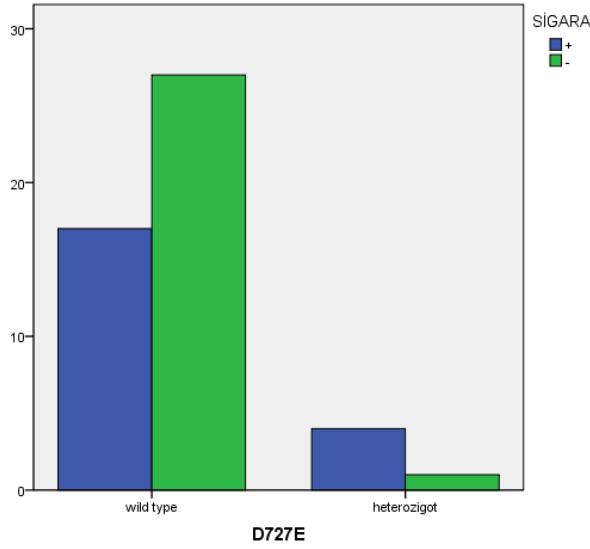
	AİLE ÖYKÜSÜ		Toplam	P
	+	-		
D727E WİLD TYPE	11	33	44	0,644
HETEROZİGOT	1	4	5	
Toplam	12	37	49	



Şekil 4.17. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği

Çizelge 4.17. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

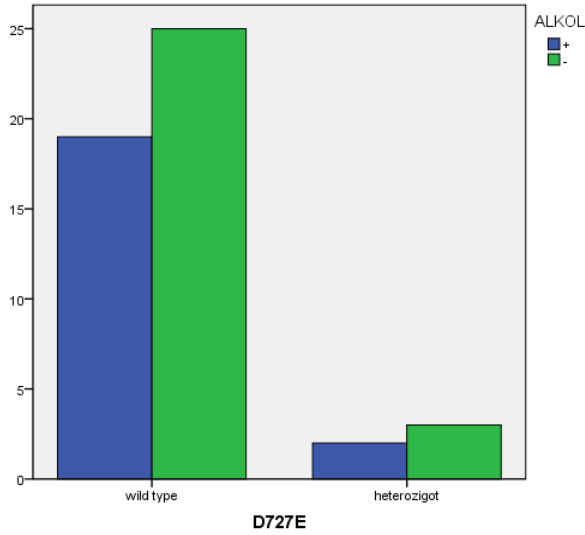
	SİGARA		Toplam	P
	+	-		
D727E WİLD TYPE	17	27	44	0,99
HETEROZİGOT	4	1	5	
Toplam	21	28	49	



Şekil 4.18. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.18. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

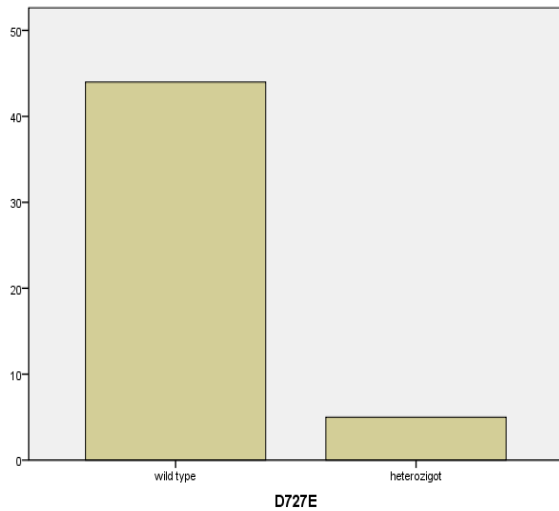
	ALKOL		Toplam	P
	+	-		
D727E WİLD TYPE	19	25	44	0,638
HETEROZİGOT	2	3	5	
Toplam	21	28	49	



Şekil 4.19. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.19. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT3 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

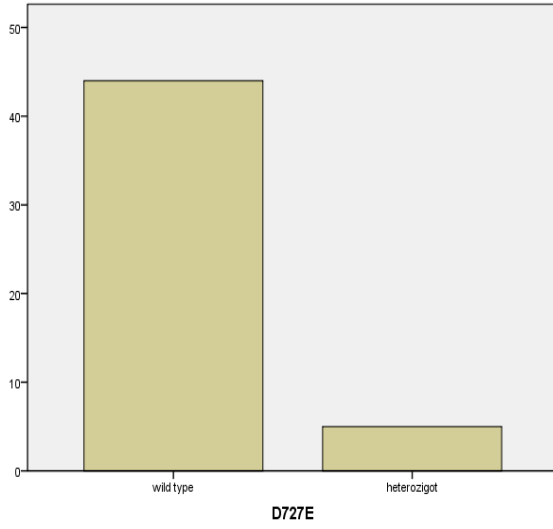
	FT3		Toplam	P
	2,3-4,2			
D727E WILD TYPE	44		44	-
HETEROZİGOT	5		5	
Toplam	49		49	



Şekil 4.20. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT3 değerlendirme grafiği

Çizelge 4.20. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT4 değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

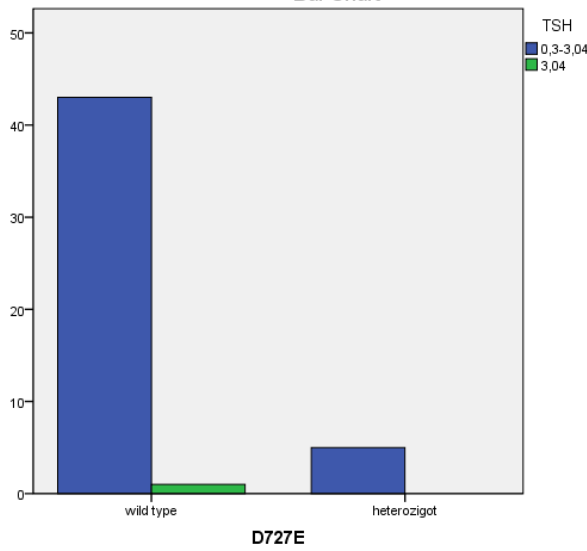
	FT4		Toplam	P
	0,8-1,8			
D727E WİLD TYPE	44		44	-
HETEROZİGOT	5		5	
Toplam	49		49	



Şekil 4.21. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri FT4 değerlendirme grafiği

Çizelge 4.21. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri TSH değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

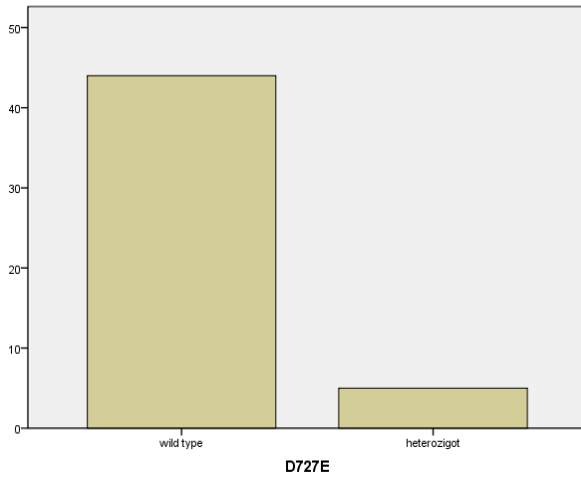
	TSH		Toplam	P
	0,3-3,04	3,04		
D727E WİLD TYPE	43	1	44	0,898
HETEROZİGOT	5	0	5	
Toplam	48	1	49	



Şekil 4.22. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri TSH değerlendirme grafiği

Çizelge 4.22. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTG değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

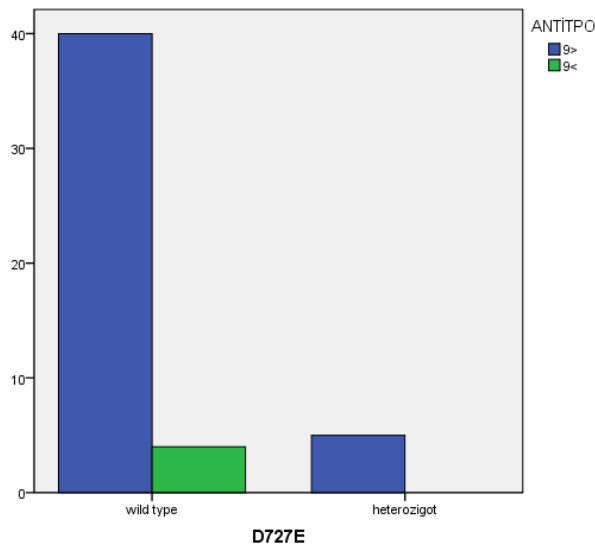
	ANTİTG		Toplam	P
	116>			
D727E WİLD TYPE	44		44	-
HETEROZİGOT	5		5	
Toplam	49		49	



Şekil 4.23. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTG değerlendirme grafiği

Çizelge 4.23. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTPO değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

	ANTİTPO		Toplam	p
	9>	9<		
D727E WİLD TYPE	40	4	44	0,641
HETEROZİGOT	5	0	5	
Toplam	45	4	49	



Şekil 4.24. TSHR D727E polimorfizmi kontrol grubu klinik veri AntiTPO değerlendirme grafiği

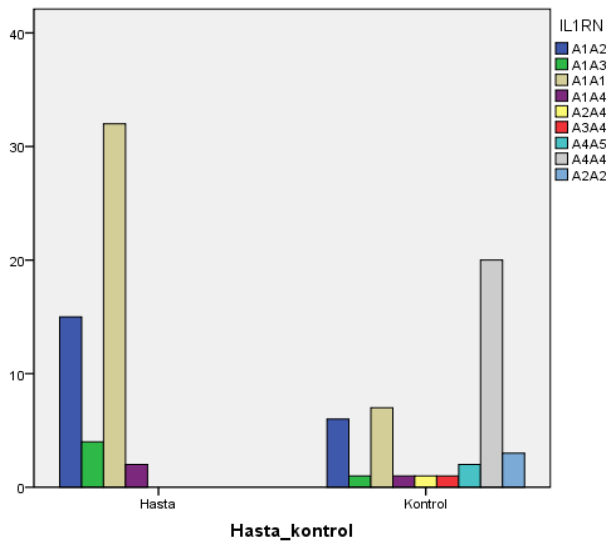
4.3.2. IL1RN^{VNTR} polimorfizm

IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kapsamında 55 bireyden oluşan hasta grubunda 32 A1A1, 15 A1A2, 4 A1A3, 2 A1A4 genotipi; 49 bireyden oluşan kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla 7 A1A1, 3 A2A2, 20 A4A4, 2 A4A5, 1 A3A4, 6 A1A2, 1 A1A3, 1 A2A4 ve 1 A1A4 genotipi olarak belirlendi (Çizelge 4.4). 2 hastada ve 7 kontrol grubu bireyde sonuçlar değerlendirilemedi. Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu ile kontrol grubu arasında genotip (Çizelge 4.4) ve allel (Çizelge 4.5) açısından istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi.

Çizelge 4.24. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi p değeri

		IL1RN Genotipleri									Toplam	p
		A1A1	A1A2	A1A3	A1A4	A2A4	A3A4	A4A5	A4A4	A2A2		
Hasta	Sayı	32	15	4	2	0	0	0	0	0	53	0,000*
Kontrol	Sayı	7	6	1	1	1	1	2	20	3	42	
Toplam	Sayı	39	21	5	3	1	1	2	20	3	95	

*: İstatistiksel olarak önemli p değeri.

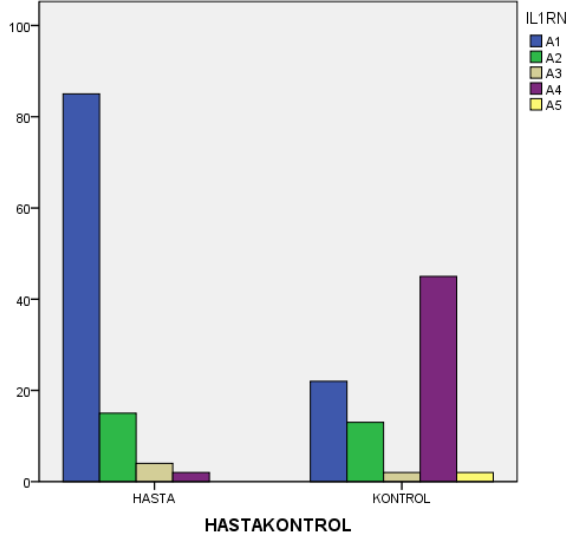


Şekil 4.25. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi genotip değerlendirme grafiği

Çizelge 4.25. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi p değeri

		IL1RN Allelleri					Toplam	p
		A1	A2	A3	A4	A5		
Hasta	Sayı %	85	15	4	2	0	106	0,000*
Kontrol	Sayı %	22	13	2	45	2	84	
Toplam	Sayı %	107	28	6	47	2	190	

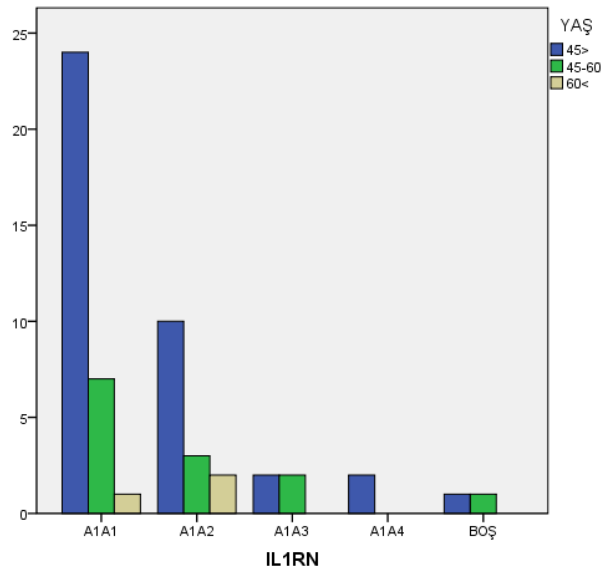
*: İstatistiksel olarak önemli p değeri.



Şekil 4.26. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi allel değerlendirme grafiği

Çizelge 4.26. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme ve ki-kare testi p değeri

	YAŞ			Toplam	p
	45>	45-60	60<		
IL1RN A1A1	24	7	1	32	0,698
A1A2	10	3	2	15	
A1A3	2	2	0	4	
A1A4	2	0	0	2	
BOŞ	1	1	0	2	
Toplam	39	13	3	55	

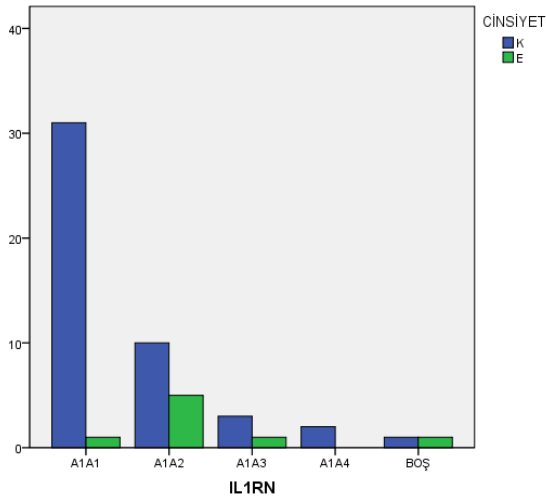


Şekil 4.27. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri yaş değerlendirme grafiği

Çizelge 4.27. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirme ve ki-kare testi p değeri

	CİNSİYET		Toplam	P
	K	E		
IL1RN A1A1	31	1	32	0,035*
A1A2	10	5	15	
A1A3	3	1	4	
A1A4	2	0	2	
BOŞ	1	1	2	
Toplam	47	8	55	

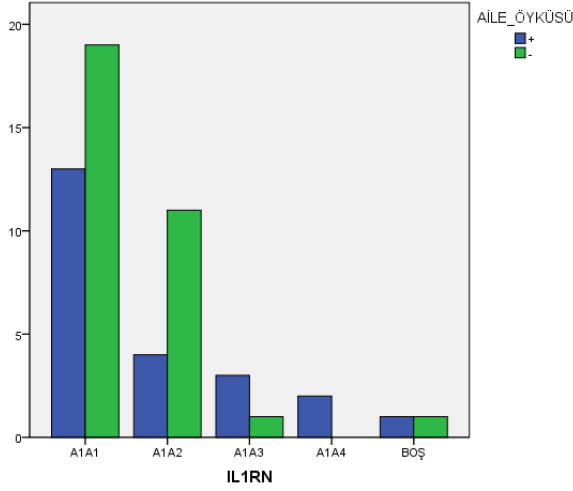
*: İstatistiksel olarak önemli p değeri.



Şekil 4.28. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği

Çizelge 4.28. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme ve ki-kare testi p değeri

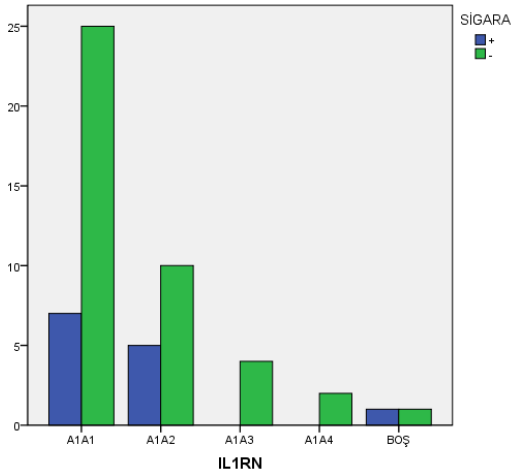
	AİLE ÖYKÜSÜ		Toplam	P
	+	-		
IL1RN A1A1	13	19	32	0,193
A1A2	4	11	15	
A1A3	3	1	4	
A1A4	2	0	2	
BOŞ	1	1	2	
Toplam	23	32	55	



Şekil 4.29. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği

Çizelge 4.29. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

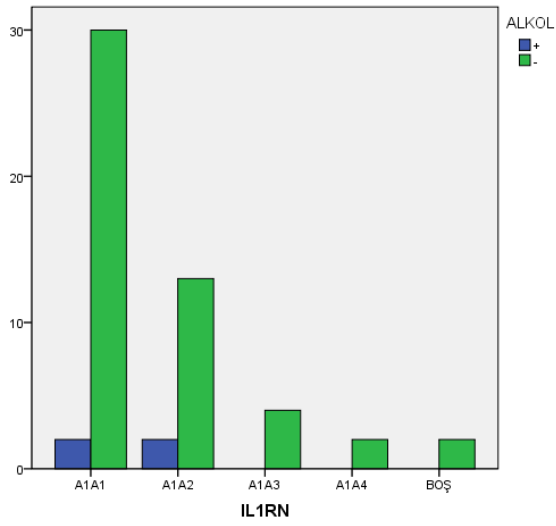
		SİGARA		Toplam	p
		+	-		
IL1RN	A1A1	7	25	32	0,483
	A1A2	5	10	15	
	A1A3	0	4	4	
	A1A4	0	2	2	
	BOŞ	1	1	2	
Toplam		13	42	55	



Şekil 4.30. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.30. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

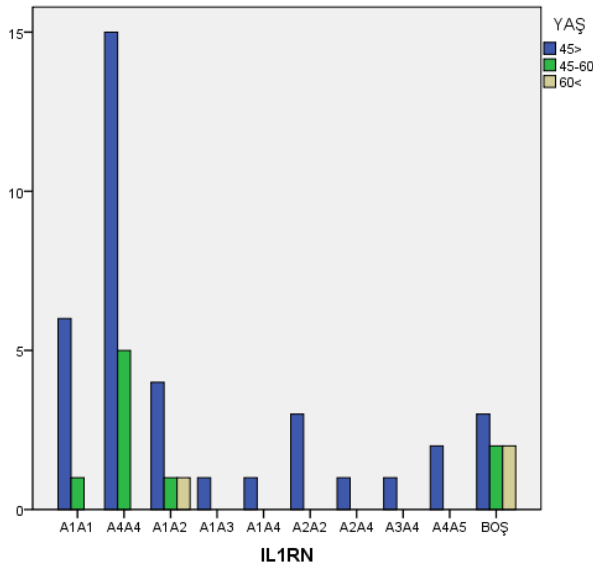
	ALKOL		Toplam	P
	+	-		
IL1RN A1A1	2	30	32	0,828
A1A2	2	13	15	
A1A3	0	4	4	
A1A4	0	2	2	
BOŞ	0	2	2	
Toplam	4	51	55	



Şekil 4.31. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi hasta klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.31. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirme ve ki-kare testi p değeri

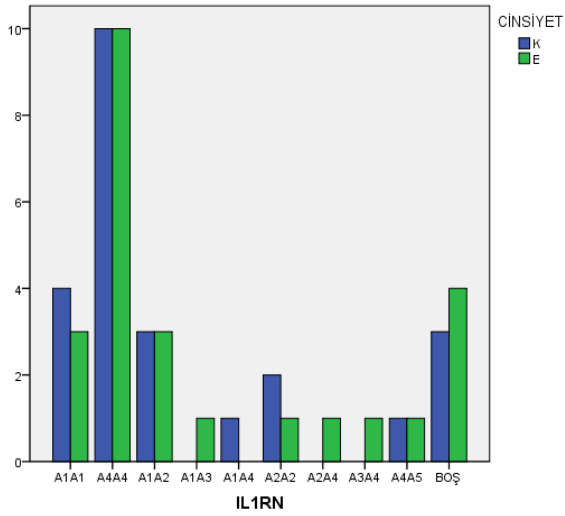
		YAŞ			Toplam	p
		45>0	45-60	60<		
IL1RN	A1A1	6	1	0	7	0,760
	A4A4	15	5	0	20	
	A1A2	4	1	1	6	
	A1A3	1	0	0	1	
	A1A4	1	0	0	1	
	A2A2	3	0	0	3	
	A2A4	1	0	0	1	
	A3A4	1	0	0	1	
	A4A5	2	0	0	2	
	BOŞ	3	2	2	7	
Toplam		37	9	3	49	



Şekil 4.32. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri yaş değerlendirme grafiği

Çizelge 4.32. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirmesi ve ki-kare testi p değeri

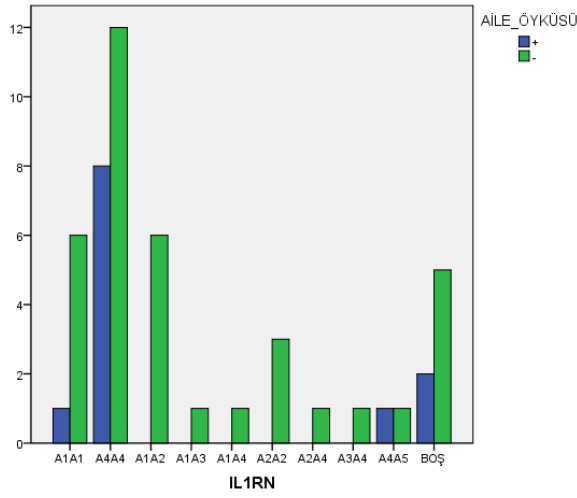
	CİNSİYET		Toplam	P
	K	E		
IL1RN A1A1	4	3	7	0,868
A4A4	10	10	20	
A1A2	3	3	6	
A1A3	0	1	1	
A1A4	1	0	1	
A2A2	2	1	3	
A2A4	0	1	1	
A3A4	0	1	1	
A4A5	1	1	2	
BOŞ	3	4	7	
Toplam	24	25	49	



Şekil 4.33 . IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri cinsiyet değerlendirme grafiği

Çizelge 4.33. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

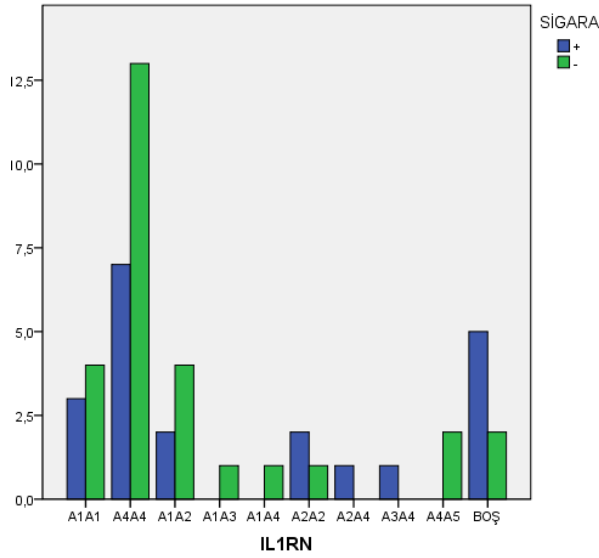
	AİLE_ÖYKÜSÜ		Toplam	p
	+	-		
IL1RN A1A1	1	6	7	0,536
A4A4	8	12	20	
A1A2	0	6	6	
A1A3	0	1	1	
A1A4	0	1	1	
A2A2	0	3	3	
A2A4	0	1	1	
A3A4	0	1	1	
A4A5	1	1	2	
BOŞ	2	5	7	
Toplam	12	37	49	



Şekil 4.34. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri aile öyküsü değerlendirme grafiği

Çizelge 4.34. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

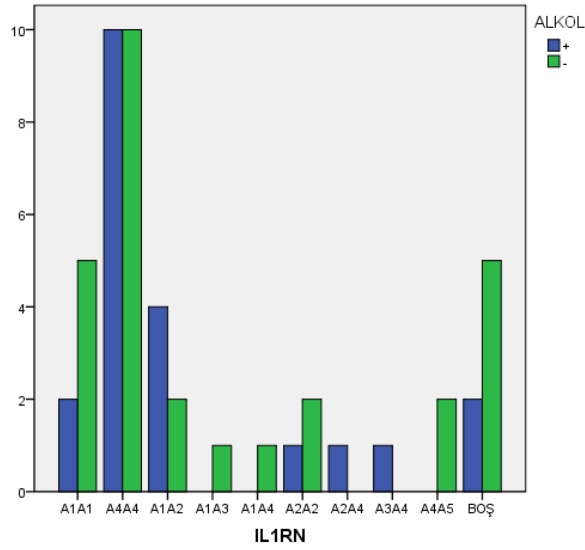
	SİGARA		Toplam	P
	+	-		
IL1RN A1A1	3	4	7	0,399
A4A4	7	13	20	
A1A2	2	4	6	
A1A3	0	1	1	
A1A4	0	1	1	
A2A2	2	1	3	
A2A4	1	0	1	
A3A4	1	0	1	
A4A5	0	2	2	
BOŞ	5	2	7	
Toplam	21	28	49	



Şekil 4.35. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri sigara kullanımı değerlendirme grafiği

Çizelge 4.35. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirilmesi ve ki-kare testi p değeri

	ALKOL		Toplam	p
	+	-		
IL1RN A1A1	2	5	7	0,461
A4A4	10	10	20	
A1A2	4	2	6	
A1A3	0	1	1	
A1A4	0	1	1	
A2A2	1	2	3	
A2A4	1	0	1	
A3A4	1	0	1	
A4A5	0	2	2	
BOŞ	2	5	7	
Toplam	21	28	49	



Şekil 4.36. IL1RN^{VNTR} polimorfizmi kontrol grubu klinik veri alkol kullanımı değerlendirme grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hashimoto tiroiditi otoimmün bir hastalıktır. Hashimoto hastalığına yatkınlık çevresel ve genetik faktörlerin kombinasyonu ile belirlenir.

Son senelerde, yapılan çalışmalarda Hashimoto tiroiditinde birçok polimorfizmin etkisi araştırılmış fakat TSHR ve IL1RN^{VNTR} gen polimorfizmi ile yapılan çalışmalara rastlanılmamıştır. Sadece Ines Zaaber ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Hashimoto hastalığında TSHR VE IL1RN gen polimorfizimlerindeki risk ve prognozu incelenmiştir. 202 hasta ve 249 sağlıklı kontrol grubu ile yapılan çalışma sonucunda TSHR gen polimorfizminin Hashimoto tiroiditi için bir anlamlılık ifade etmediği sonucuna ulaşmışlardır. Biz 55 hasta ve 49 sağlıklı kontrol grubu ile yapmış olduğumuz çalışmada Ines Zaaber ve arkadaşlarına benzer bir şekilde TSHR gen polimorfizminin Hashimoto tiroiditi oluşumunda bir etkisi olmadığını belirledik (Zaaber ve ark. 2013).

Aynı makalede Ines Zaaber ve arkadaşları IL1RN gen polimorfizminin Hashimoto için risk faktörü olabileceğini, hastalığın oluşmasında etkili olabileceğini göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmalar sonucunda IL1RN gen polimorfizmi için anlamlı sonuç elde ettik. IL1RN gen polimorfizminin hastalıkta rolü olduğunu tespit ettik. Makalede IL1RN allellerinden en sık olanları A1 ve A2, genotip olarak en yaygın olanları A1A1 ve A1A2 olarak belirlenmiştir. Bizim bulgularımıza göre ise en sık görülen allel A1 ve A4, genotip olarak A1A1 ve A4A4 olarak belirlenmiştir (Zaaber ve ark. 2013).

Ines Zaaber ve arkadaşları klinik parametreler olarak sadece yaş ve cinsiyeti göz önüne alarak değerlendirme yapmıştır. Hem TSHR hem de IL1RN polimorfizmi için Hashimoto tiroiditi açısından anlamlılık bulamamışlardır. Klinik parametreler olarak bizim çalışmamızda TSHR gen için yaş, cinsiyet, sigara, alkol, aile öyküsü, FT3, FT4, TSH, AntiTG, AntiTPO değerleri incelenmiştir. TSHR gen polimorfizmi için anlamlı sonuca ulaşamamıştır. IL1RN gen için yaş, cinsiyet, alkol, sigara, aile öyküsü incelenmiştir. Ines Zaaber ve arkadaşlarının aksine IL1RN gen polimorfizmi için hasta grubunda cinsiyet parametresi anlamlı sonuç vermiştir (Zaaber ve ark. 2013).

Yin ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada da Graves hastalığında TSHR reseptör gen etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda TSHR geninin Graves hastalığı ile

ilişkili olabileceğini, Hashimoto hastalığı ile bir ilişkisi olmadığını göstermişlerdir (Yin ve ark. 2008)

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre;

- TSHR gen polimorfizminin Hashimoto tiroiditi hastalığının oluşmasında bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.
- IL1RN^{VNTR} polimorfizminin Hashimoto tiroiditi hastalığının oluşmasında etkili olduğu gösterilmiştir.
- IL1RN^{VNTR} polimorfizmi için hasta grubunda klinik parametrelerden cinsiyet için anlamlı sonuç elde edilmiştir.

IL1RN genindeki VNTR polimorfizmlerinin daha büyük hasta grupları ile çalışılması, HT patolojisine olan etkisinin kesinleştirilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca Türk popülasyonunda sıklığın belirlenmesi, daha ileri çalışmaların, klinik takipte kullanılacak yeni parametreler geliştirilmesinin önünü açacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Allahabadia A, Gough SCL (1999). The different approaches to the genetic analysis of autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol*, 163: 7-13.
- Allen EM, Apel MC, Braverman LE (1987). The effect of iodide ingestion on the development of spontaneous lymphocytic thyroiditis in the BB/W rat. *Endocrinology*, 281: 70-76.
- Anonim (2016). IL1RN gen – gen kart. <http://www.genecards.org/cdn/genomic-location/IL1RN-gene.png>. Eriřim tarihi: 10.08.2016
- Anonim (2016). Tiroid fizyolojisi. www.tipfakultesi.org. Eriřim tarihi: 08.08.2016
- Anonim (2016). TSHR gen – gen kart. <http://www.genecards.org/cdn/genomic-location/TSHR-gene.png>. Eriřim tarihi: 10.08.2016
- Antonelli A (2004). Thyroid adisorders in chronic hepatitis C. *Am J Med*, 117(1): 10-3
- Ban Y, Greenberg DA, Concepcion ES, Tomer Y (2002). A germline single nucleotide polymorphism at the intracellular domain of the human thyrotropin receptor does not have a major effect on the development of Graves' disease. *Thyroid*, 12: 1079-1083.
- Ban Y, Tomer Y (2005). Susceptibility genes in thyroid autoimmunity. *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1): 47-58.
- Barbesino G, Chiovato L (2000). The genetics of Hashimoto's disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 357-74.
- Bekfilaviođlu G (2009). Ötiroid Hashimoto tiroiditli hastalarda makroprolaktin sıklığının değerlendirilmesi.
- Birinci N (2009). Hashimoto tiroiditli çocuk hastaların demografik, klinik ve prognostik özellikleri. Uzmanlık Tezi, 7.
- Blakemore AIF, Watson PF, Weetnan AP, Duff GW (1995). Association of Graves' disease with an allele of interleukin 1 receptor antagonist gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 80: 111-115.
- Boukiss MA, Koutras DA, Souvatzoglou A (1983). Thyroid hormone and immunologic studies in endemic goitre. *J Clin Endocrinol Metab*, 57: 859-62.
- Bravermann LE, Utiger RD (2005). Werner and Ingbar's *The Thyroid*, ed 9. Lippincott, Philadelphia.
- Charles B, Dana KA, Timothy RB, David LD, John GH, Raphael EP (2005). *Schwartz's Principles of Surgery*. 8th ed. Mac Graw Hill, 1395- 1429, NY.
- Chiovato L ve Martino E (2001). Thyroiditis. *Endocrinology and Metabolism*. 189 p.
- Chistiakov DA (2005). Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *J Autoimmune Dis*, 2: 1.

- Chistiakov DA, Savostanov KV, Turakulov RI, Petunina N, Balabolkin MI, Nosikov VV (2002). Further studies of genetic susceptibility to Graves' disease in a Russian population. *Med Sci Monit*, 8: 180-184.
- Colin M, Dayan MD, Ph D, Gilbert D, M.D (2006). *Chronic Autoimmune Thyroiditis*, 2: 335.
- Connor F, Smith-Ferguson M (1997). *Essential Medical Genetics*. Blackwell Science.
- Cooper GM (1997). *The Cell: A molecular Approach*, ASM Press, DC, Washigton.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (1999). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Collins T, editors. Acute and chronic inflammation. (6th ed.), WB.Saunders Company, 50-74, Philadelphia.
- Davies TF, Ando T, Lin RY (2005). Thyrotropin receptor associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest*, 115: 1972-1983.
- Dayan CM, Daniels GH (1996). Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med*, 335: 99-107.
- De Roux N, Srah M, Ratanachayavong S, Mcgregor AM, Lgrom E (1996). Analysis of the thyrotropin receptor as a candidate gene in familial Graves' disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81:3483-3486.
- DeGroot LJ (2001). Graves disease. *Textbook of endocrinology*, 1: 1424-1445.
- Dumont JE (2005). The phylogeny, ontogeny, anatomy and regulation of the iodine metabolizing thyroid. *The Thyroid and Its Diseases*.
- Fang XM, Schroder S, Hoeft A, Stuber F (1999). Comparison of two polymorphisms of the interleukin 1 gene family: Interleukin 1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med*, 27: 1330-1334.
- Gabriel EM, Bergert ER, Grant CS (1999). Germline polymorphism of codon 727 of human thyroid-stimulating hormone receptor is associated with toxic multinodular goiter. *J. Clin Endocrinol Metab*, 84: 3328-3335.
- Gokhan N (1989). *Tiroit bezi ve Metabolik Hormonlar*. Gokhan N, Cavuşoğlu H (ceviri ed). *Tıbbi Fizyoloji*. 3. baskı. Nobel tıp kitabevi, 1293-1309, İstanbul.
- Guyton AC, Hall JH (2001). Çeviren: Cavuşoğlu HN, Yeğen BÇ, Aydın Z, Alican, İ): *Tıbbi Fizyoloji*. Cilt 1, 1. Basım, Nobel Tıp Kitapevi, 463-464, İstanbul.
- Güleryüz B (2014). Hashimoto tiroiditi olan hastalarda D vitamini düzeyi, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- GAMA, TNF- ALFA düzeyleri ve D vitamini reseptör gen polimorfizminin araştırılması. *Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Pamukkale Üniversitesi, Denizli*.
- Harach HR, Eslacante DA, Onativia A (1985). Thyroid carcinoma and thyroiditis in an endemic goitre region before and after iodine prophylaxis. *Acta Endocrinol*, 108: 55-6048.
- Henry JF (1997). "Surgical Anatomy and Embryology Of The Thyroid And Parathyroid Glands And Recurrent And External Laryngeal Nerves" of *Endocrine Surgery*. Clark, OH, Duh, QY, WB Saunders Company, Philadelphia.

- Hoelzel AR (1998). Molecular genetic analysis of populations. 2. Edition, IRL Press, 237-260, Oxford.
- Imaizumi M, Pritsker A, Kita M, Ahmad L, Unger P, Davies T (2001). Pregnancy and murine thyroiditis: thyroglobulin immunization leads to fetal loss in specific allogeneic pregnancies. *Endocrinology*, 142: 823-829.
- İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G (1996). İç Hastalıkları Cilt 23. Baskı, Ankara Güneş Kitabevi ISBN 978 – 975 – 277 – 419 – 3. S: 2019-2021.
- İşgör A (2000). “ Tiroit Fizyolojisi”, Tiroit Hastalıkları Ve Cerrahisi. İşgör, A. Avrupa Tıp Kitapçılık, 69-122, İstanbul.
- Jacobson EM, Tomer Y (2007). The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. *J Autoimmun*, 28: 85-98.
- Jaiswal D, Trivedi S, Singh R, Dada R, Singh K (2012). Association of the IL1RN gene VNTR polymorphism with human male infertility. *7(12): 2.*
- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR (1988). A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acid Research*, 2: 408.
- Kabalak T (2009). Tiroid ve Otoimmünite. *Tiroid El Kitabı*, 353-360.
- Kakizaki S, Takagi M, Murakami M, Takayama H, Mori M (1999). HLA antigens in patients with interferon - alpha- induced autoimmune thyroid disorders in chronic hepatitis. *C. J Hepatol*, 30: 794-800.
- Karakurt F (2012). Hashimoto tiroiditi hastalarında adiponektin düzeyleri üzerine PARP – 1 gen polimorfizmlerinin etkisinin araştırılması. *Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.*
- Keskindemirci G (2010). Otoimmün tiroiditi olan çocukların klinik, laboratuvar ve epidemiyolojik olarak değerlendirilmesi ve selenyum destek tedavisinin hastalığın seyrine etkisi. *Uzmanlık Tezi*, 16-18.
- Kopp P (2001). Human genome and disease : Review, The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci*, 58: 1301-1322.
- Kotsa K, Watson PF, Weetman AP (1997). A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol*, 46: 551-554.
- Kraiem Z, Baron E, Kahana L (1992). Changes in stimulating and blocking TSH receptor antibodies in a patient undergoing three cycles of transition from hypo to hyperthyroidism and back to hypothyroidism. *Clin Endocrinol*, 36: 211.
- LaFranchi S (2004). Disorders of the thyroid gland/thyroiditis. *Nelson Textbook of Pediatrics (17th edition) Eds, Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB WB Saunders Company, 1870-1890.*

- Laurberg P, Pedersen KM, Vestergaard H, Gurdson G (1991). High incidence of multinodular toxic goitre in the elderly population in a low iodine intake area vs. high incidence of Graves' disease in the young in a high iodine intake area: comparative surveys of thyrotoxicosis epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland. *Journal of Internal Medicine*, 229: 415-420.
- Mark HB, Robert B (1999). Thyroid disorders. In *The Merck Manual*, 17th ed. Edit. Mark HB, Robert B. Merck Research Laboratories. NJ, 81-100.
- Meller J ve Becker W (2002). The continuing importance of thyroid scintigraphy in the era of high – resolution ultrasound. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29(2): S425-438.
- Mine H, Kawai H, Yokoi K, Akaike M, Saito S (1997). High frequencies of human tymphotropic virus type I (HTLV-I) infection and presence of HTLV-II proviral DNA in blood donors with antithyroid antibodies. *J Mol Med*, 74: 471-477.
- Mousa U (2012). Ötiroid tiroid patolojilerinde metabolik parametreler ve vücut yağ dağılımı. Yandal uzmanlık tezi, Ankara.
- Muhlberg T, Herrmann K, Joba W (2000). Lack of association of nonautoimmune hyperfunctioning thyroid disorders and a germline polymorphism of codon 727 of human thyrotropin receptor in a European Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2640-2643.
- Muller AF, Drexhage HA, Berghout A (2001). Postpartum thyroiditis and autoimmune thyroiditis in women of childbearing age: recent insights and consequences for antenatal and postnatal care. *Endocr Rev*, 605-30.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1:263-273.
- Oğuz M, Cihan A, İşgör A (2002). Tiroiditler. İşgör A(ed) *Tiroid hastalıkları ve cerrahi tedavisi*. 1.baskı, Avrupa Tıp Kitapçılık, 465-72, İstanbul.
- Orgiazzi J (2000). Anti-TSH receptor antibodies in clinical practice. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 29: 339–355.
- Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Goula M, Papamichali M (2004). Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*, 11: 209–213.
- Pirro MT, Filippis VD, Cerbo AD, Scillitani A, Liuzzi A, Tassi V (1995) Thyroperoxidase microsatellite polymorphism in thyroid disease. *Thyroid*, 5:461–464.
- Rapoport B, McLachlan SM (2001). Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*, 1253-9.
- Rhodin JAG (1995). “ An Atlas Of Ultrastructure” . WB Saunders Company, Philadelphia, 80.
- Roberts RJ, Macelis D (1991). *Nucl Acids Res*. 19: 2077.

- Robin PP, Wendy M, Vander D, Theo JV (2006). Genetic variation in thyroid hormone pathway genes; polymorphisms in the TSH receptor and the iodothyronine deiodinases. *European Journal of Endocrinology*, 155: 655–662.
- Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN (2009). Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*, 169: 505-514.
- Rose NR, Bonita R, Burek CL (2002). Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev*, 1:97-103.
- Rose NR, Saboori AM, Rasooly L, Buek CL (1997). The role of iodine in autoimmune thyroiditis. *Crit Rev Immunol*, 17: 511-517.
- Sambrook J, Russell DW (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory, New York.
- Schochetman G, Ou CY, Jones WK (1988). Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 158: 1154-1157.
- Stagnaro GA, Roman SH, Cobin RH, El HE, Wallenstein S, Davies TF (1992). A prospective study of lymphocyte-initiated immunosuppression in normal pregnancy: evidence of a T-cell etiology for postpartum thyroid dysfunction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74: 645–653.
- Steinkasserer A, Koelble K, Sim RB (1991). Length variation within intron 2 of the human IL-1 receptor Q1 antagonist protein gene (IL1RN). *Nucleic Acids Res*, 19: 5095.
- Takasu N, Yamada T, Sato A (1990). Graves disease following hypothyroidism due to Hashimoto's disease: studies of eight cases. *Clin Endocrinol*, 33: 687.
- Tamai H, Kasagi K, Takaichi Y (1989). Development of spontaneous hypothyroidism in patients with Graves disease treated with antithyroidal drugs: clinical, immunological and histological findings in 26 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 69-49.
- Tamai H, Ohsako N, Takeno K (1980). Changes in thyroid function in euthyroid subjects with a family history of Graves disease: a follow-up study of 69 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 51: 1123.
- Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A (1993). Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum. Genet*, 91: 403-404.
- Tomer Y (2002). Genetics dissection of familial autoimmune thyroid diseases using whole genome screening. *Autoimmun Rev*, 1:198-204.
- Tomer Y, Barbesino G, Keddache M (1997). Mapping of a major susceptibility locus for Graves disease (GD -1) to chromosome 14q31 *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1645 - 1648.
- Tomer Y, Davies TF (2003). Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes from gene mapping to gene function. *Endocrin Reviews*, 24(5): 694-717.
- Tomer Y, Huber A (2009). The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *Journal of Autoimmunity*, 32: 231-239.

- Tonacchera M, Pinchera A (2000). Thyrotropin receptor polymorphisms and thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2637-9.
- Tuli A, Aksoy K, Kayrın L, Attila G (2001). Tanıda DNA teknikleri. ÇÜ Tıp Fak Yayınları, 1-86, Adana.
- Tunbridge WM, Vanderpump MP (2000). Population screening for autoimmune thyroid disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 29: 239- 253.
- Vamvakopoulos J, Taylor C, Morris-Stiff GJ (2002). The interleukin-1 receptor antagonist gene: a single-copy variant of the intron 2 variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism. *Euro J Immunogenet*, 29: 337-340.
- Volpe R (1991). Autoimmune thyroiditis. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid*, 5th ed. JB Lippincott, 921, Philadelphia.
- Wang C ve Crapo LM (1997). The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 189-218.
- Wang CC, Goalstone ML, Draznin B (2004). Molecular mechanism of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*, 53: 2735-40.
- Yılmaz C (1999). Tiroit, paratiroit hastalıkları ve cerrahisi. 1. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, 6-8, İstanbul.
- Yin X, Latif R, Bahn R (2008). Influence of the TSH receptor gene on susceptibility to Graves' disease and Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*, 18: 1201-1206.
- Zaaber I, Mestiri S, Marmouch H, Mahjoub S, Abid N, Hassine M, Jrad B, Said K (2013). Polymorphisms in TSHR and IL1RN genes and the risk and prognosis of Hashimoto's thyroiditis. *Early online*, 1-6.
- Zimmerman RS (1986). Hashimoto's thyroiditis. An uncommon cause of painful thyroid unresponsive to corticosteroid therapy. *Ann Intern Med*, 355-7.

ÖZGEÇMİŞ

Bahar GÜRSU 24.05.1990 tarihinde Silivri/İSTANBUL'da doğdu. İlköğrenimini Hasan Özvarnalı İlköğretim okulunda, lise eğitimini Silivri Süper Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2014 yılında tamamladı. 2014 yılından günümüze Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik alanında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.