

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**HASHİMOTO TİROİDİTİNDE “TRANSFORMING
GROWTH FACTOR BETA 1” GEN POLİMORFİZMİNİN
İNCELENMESİ**

SEVGİN DEĞİRMENCİOĞLU

**DANIŞMAN
PROF.DR. PERVİN VURAL**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Sevgin DEĞİRMENCİOĞLU tarafından hazırlanan "Haşimoto Tiroididinde -Transforming Growth Factor Beta1-Gen Polimorfizminin İncelenmesi" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

08 / 07 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.Prof.Dr. Necla TOKER (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Necla Toker

2.Prof.Dr. Semra DOĞRU ABBASOĞLU (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Semra Doğru

3.Prof.Dr. Pervin VURAL (Tez Danışmanı) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Pervin Vural

4.Prof.Dr. Serdar ÖZTEZCAN (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Serdar Öztezcan

5.Prof.Dr. Hikmet KOÇAK (Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Hikmet Koçak

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sevgin DEĞİRMENCİOĞLU

(İmza)

İTHAF

Şu an hayatta olmayan fakat desteğini her zaman hissettiğim, bu günlere gelmemde büyük katkısı olan sevgili Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezimin tüm aşamalarında her türlü bilgi, destek ve tecrübelerini benimle paylaşan, bilimsel olarak beni aydınlatan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Pervin VURAL**’ a ve değerli hocam **Prof. Dr. Semra Doğru Abbasoğlu**’ na;

Başta Anabilim Dalı başkanımız sayın **Prof. Dr. Müjdat UYSAL** olmak üzere her zaman desteklerini hissettiğim **saygıdeğer hocalarıma**, birlikte güzel günler geçirdiğim **asistan arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın diğer çalışanlarına**;

Beni bu günlere getiren, destek ve güvenlerini her zaman hissettiğim canım aileme ve biricik eşime;

ÇOK TEŞEKKÜR EDERİM.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 7784

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET.....	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA	33
KAYNAKLAR.....	36
FORMLAR	43
ETİK KURUL KARARI	45
ÖZGEÇMİŞ	46

TABLÖLAR LİSTESİ

1. **Tablo 2.1.** Otoimmün tiroidit tipleri
2. **Tablo 3.1.** TGF β 1 Leu10Pro (c.869T>C) ve TGF β 1 Arg25Pro (c.915G>C) gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR ortamı (final hacim 30 μ L)
3. **Tablo 3.2.** TGF β 1 PCR- Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).
4. **Tablo 4. 1.** HT hastalarının ve sağlıklı kontrollerin demografik bilgileri (ortalama $\pm$ standart sapma)
5. **Tablo 4.2** Hardy-Weinberg eşitliğine göre kontrol grubu ve Hashimoto Hastalarının (HT) p değerleri
6. **Tablo 4.3.** Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) gen polimorfizminin Kontrol ve Hashimoto tiroditinde genotip dağılımları ve allel sıklıkları
7. **Tablo 4. 4.** Hashimoto tiroiditi hastalarında polimorfizmler ile tiroid hormon düzeyleri ve anti tiroid antikorları arasındaki ilişki [Ortalama (aralık)]

ŞEKİLLER LİSTESİ

1. **Şekil 2. 1.** Hashimoto hastalarının genel görünümü
2. **Şekil 2. 2 .** Hashimoto patogenezi: Genetik yatkınlık ve çevresel faktörler birlikte tiroid bezini ve immün sistemi etkileyerek HT oluşmasını tetiklemektedir
3. **Şekil 2. 3.** Hashimoto Tiroditi Etiyopatogenezi
4. **Şekil 2.4.** Hashimoto Tiroditi patolojik görünümü
5. **Şekil 2. 5.** TGFβ' nin sentezi
6. **Şekil 2. 6.** TGFβ sinyalizasyon yolunun sitoplazmik ve nükleer kolları
7. **Şekil 2. 7.** TGFβ'nin antiproliferatif etkisini sağladığı aracı moleküller
8. **Şekil 2. 8.** TGFβ' nin immün-süpresif etkisi
9. **Şekil 3.1.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)' nin basamakları.
10. **Şekil 3.2.** *MspA1I* [Leu10Pro (c.869T>C)] kesim enzimi ile yapılan ve %15 poliakrilamid jelde yürütülüp, gümüş boyama yapıldıktan sonra bantların görünümü
11. **Şekil 3.3.** *BglI* [Arg25Pro (c.915G>C)] kesim enzimi ile yapılan ve %15 poliakrilamid jelde yürütülüp, gümüş boyama yapıldıktan sonra bantların görünümü

KISALTMALAR LİSTESİ

AMH	Anti müllerian hormon
ANA	Antinükleer antikor
Anti-TG	Anti-tiroglobulin
Anti-TPO	Anti-tiroid peroksidaz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BÇ	Baz çifti
BMP	Kemik morfojenik protein
BMI	Vücut kütle indeksi
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DC	Dendritik hücre
FT3	Serbest Triiyodotironin
FT4	Serbest tiroksin
GH	Graves Hastalığı
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
Hb	Hemoglobin
HDL-K	Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol
HLA-I	İnsan lökosit antijen I
HLA-II	İnsan lökosit antijen II
HT	Hashimoto tiroiditi
İİAB	İnce iğne aspirasyon biyopsisi
ICAM-1	İntrasellüler adhezyon molekülü-1
IFN γ	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin 1
IL-1 β	İnterlökin 1 beta

IL-2	İnterlökin 2
IL-4	İnterlökin 4
IL-6	İnterlökin 6
LAP	Gecikme ilişkili peptid
LDL-K	Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol
LTBP	Latent TGF beta bağlanma proteini
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
NIS	Sodyum iyot simporter
NK	Doğal öldürücü hücreler
NO	Nitrik oksit
OD	Optik dansite
PCR/PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE2	Prostaglandin E2
PP2A	Protein fosfataz 2A
RFLP	Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
TβR	TGF beta reseptör
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
Tg	Tiroglobulin
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör beta
Th1	T yardımcı hücre 1
Th2	T yardımcı hücre 2
TIEG-1	TGF beta uyarımlı erken gen 1
TNF-α	Tümör nekroz edici faktör alfa
TRH	Tirotropin salınım hormonu
TSH	Tiroid stimülan hormon
USG	Ultrasonagrafi
VCAM-1	Vasküler hücre adhezyon molekülü-1

ÖZET

DEĞİRMENCİOĞLU Sevgin (2015). Hashimoto Tiroiditinde Transforming Growth Factor- β 1 Gen Polimorfizminin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

“Transforming growth factor β 1” (TGF β 1) immünoşüpresif ve anti-inflamatuar bir sitokindir. TGF β 1, T ve B hücrelerinin aktivasyonunu baskılamakta ve vücudun kendi antijenlerine karşı tolerans sağlamaktadır. TGF β 1’nin düzeyleri genetik kontrol altında olup sinyal peptidin amino asit dizisinin değişmesine neden olan kodon 10 ve kodon 25 polimorfizmleri, bu sitokinin ekspresyon hızını etkilemekte ve otoimmün hastalıkların gelişmesinde etkili olmaktadır.

Hashimoto tiroiditi (HT) popülasyonun % 18’ inde görülen bir otoimmün tiroid hastalığıdır. HT’ lı hastalarda tiroid bezinde görülen yaygın lenfosit infiltrasyonu ve vücudun kendi-tiroid antijenlerine karşı intolerans gelişmesi, tiroid hücrelerinin harabiyetine ve tiroid fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Bu bilgilerin ışığında amacımız, HT tanısı konmuş hastalarda kodon 10 (c.869T>C) ve kodon 25 (c.915G>C) polimorfizmleri ile HT arasındaki ilişkiyi incelemek ve genotipler ile hastalığın bazı klinik ve laboratuvar belirtileri arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmaktır.

Çalışmamızda HT tanısı konmuş 178 hasta ve 197 sağlıklı kişi incelendi. Her iki grupta kodon 10 (c.869T>C) ve kodon 25 (c.915G>C) polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları “restriction fragment length polymorphism” (RFLP)-PCR ile saptandı. Çalışmamızda kontrol grubu ve HT hastalarında kodon 10 (c.869T>C) genotip ve allel dağılımlarının istatistiksel bir fark göstermediği saptandı. Buna karşılık, HT’ de ilk kez incelenen kodon 25 (c.915G>C) polimorfizmi sonuçlarına göre, HT hastalarında C alleli sıklığının G alleleline göre yaklaşık 2 kat, CG genotipinin GG’ ye oranla 2.5 kat fazla hastalık riski ile ilgili olduğu bulundu. Ayrıca, CG heterozigot HT hastalarında TSH düzeylerinin GG genotipine göre daha yüksek olduğu bulundu.

Sonuç olarak, diğer çevresel ve genetik faktörlerle birlikte, TGF β 1 kodon 25 polimorfizminin HT gelişmesi için bir risk faktörü olabileceği ve bu polimorfizmin yüksek TSH düzeyleri ile bir ilişki gösterdiği bulundu.

Anahtar kelimeler: TGF β 1, Polimorfizm, Hashimoto tiroiditi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 7784)

ABSTRACT

DEGIRMENCIOGLU Sevgin. Investigation of Transforming Growth Factor- β 1 gene polymorphisms in Hashimoto's thyroiditis. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Biochemistry, Ph.D. Thesis; Istanbul. 2015

“Transforming growth factor β 1” (TGF β 1) is a immunosuppressive and anti-inflammatory cytokine. TGF β 1 suppresses the activation of T and B cells and provides tolerance to self-thyroid antigens. TGF β 1 levels are under genetical control. Polymorphisms at codons 10 and 25, related with changes of amino acid sequence of signal peptide, affect the expression rate of this cytokine and there is a relationship with many autoimmune diseases.

Hashimoto's thyroiditis (HT) is an autoimmune thyroid disease seen in 18% of population. There is a heavy lymphocyte infiltration and loss of tolerance to self-thyroid antigens in HT patients, leading to progressive destruction of thyrocytes and thyroid dysfunction. According to this information, the aim of the present study was to investigate the relationship between polymorphisms at codons 10 (c.869T>C) and 25 (c.915G>C) of TGF β 1 gene and HT, as well as some clinical/laboratory parameters of HT.

One hundred seventy eight patients with HT and 197 healthy controls were included in the study. The genotype and allele frequencies of polymorphisms at codon 10 and 25 in both groups were assayed by using PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). There was no notable risk for HT afflicted by codon 10 (c.869T>C) polymorphism of TGF β 1 gene. Regarding polymorphism at codon 25 (c.915G>C), the C allele frequency was almost 2-fold increased in HT patients according to controls, and there was an 2.5-fold increased disease risk in CG genotype when compared to GG. In addition, TSH levels in CG heterozygous patients were increased in comparison with GG genotype.

As a conclusion, we suggest that the polymorphism at codon 25 of TGF β 1 gene interacting with other genetic and environmental factors may be related with increased susceptibility to HT and higher TSH levels.

Key words: TGF β 1, polymorphism, Hashimoto's thyroiditis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: 7784)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik lenfositik tiroidit adıyla da bilinen Hashimoto tiroiditi (HT) populasyonun % 18' inde görülen bir otoimmün tiroid hastalığıdır (31). Bu hastalarda tiroid bezinde görülen yaygın lenfosit infiltrasyonu serumda anti-tiroid antikorlarının artışına ve tiroid fonksiyonlarının bozulmasına eşlik etmektedir (31, 76).

“Transforming growth factor $\beta 1$ ” (TGF $\beta 1$) hücre gelişimi ve homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynayan bir sitokindir. 25 kDa homodimerik protein olan TGF $\beta 1$, hücrelerde proliferasyon, differansiasyon ve migrasyonu düzenleyerek apoptozu kontrol eder (4, 21). TGF $\beta 1$ embriyonik gelişim, tümör oluşumu, fibrozis ve immün sistemin regülasyonu gibi birçok süreci de etkilemektedir (21, 61).

TGF $\beta 1$ ' in ekspresyonu inflamatuvar ve otoimmün süreçlerin regülasyonunda hayati önem taşımaktadır. TGF $\beta 1$ sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu ve farklılaşmasını baskımlarken, T süpresör hücrelerini aktive etmektedir (28, 61). Ayrıca B hücrelerinde antikor üretimi ve salgılanmasını baskıladığı da bildirilmiştir (28, 61). TGF $\beta 1$ bir yandan T ve B hücreleri, diğer yandan çeşitli pro-inflamatuvar sitokin ve adezyon molekülleri üzerine olan etkileri ile inflamatuvar ve immün cevabın baskılanmasına neden olmaktadır. Bu çerçevede TGF $\beta 1$ ' in interlökin-1 β (IL-1 β) ve tümör nekroz faktörü α (TNF α)' nın proinflamatuvar etkilerini baskıladığı, intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM1), vasküler adezyon molekül-1 (VCAM1), E-selektin gibi adezyon moleküllerinin sentezini inhibe ettiği ve Th1 ve Th2 [Tip 1 ve Tip 2 helper (yardımcı) lenfositler] hücreleri aracılığıyla gerçekleşen süreçleri baskıladığı saptanmıştır (21, 64).

HT' nin patogeneğinde kronik inflamasyon, endotel disfonksiyonu, ve pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulması önemli bir rol oynamaktadır (23, 72). Bir anti-inflamatuvar sitokin olan TGF $\beta 1$, immünosüpresif özelliklere sahiptir (7, 69). HT, Th1 hücreleri aracılığıyla gerçekleşen bir hastalıktır. Bu hastalıkta tiroid bezindeki yaygın lenfosit infiltrasyonu ve vücudun kendi-tiroid antijenlerine karşı intolerans gelişmesi, tiroid hücrelerinin harabiyetine ve tiroid fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır (26). TGF $\beta 1$ ' in T ve B hücrelerinin aktivasyonunu baskıladığı ve kendi-tiroid antijenlerine karşı toleransı sağladığı için, bu sitokinin eksikliği/yetersizliği HT gelişmesinde etkili olabilir.

TGF $\beta 1$ düzeyleri genetik kontrol altındadır. 19q13 kromozomunda bulunan TGF $\beta 1$ geni, yedi ekzon içerir ve 390 amino asitten oluşan prekürsör proteinin

sentezinden sorumludur. Günümüzde, TGF β 1 geninde birçok polimorfik bölge tanımlanmıştır (8). Bu polimorfik bölgeler arasında, sinyal peptidin amino asit dizilişinin değişmesine neden olan kodon 10 ve kodon 25 polimorfizmleri de yer almaktadır. TGF β 1 geninin 869. pozisyonunda T ile C yer değiştirmesi sonucu kodon 10'da lösin (Leu) yerine prolin (Pro), 915. pozisyonunda G ile C yer değiştirmesi sonucu kodon 25'te arginin (Arg) yerine prolin (Pro) yer almaktadır. Kodon 10 ve kodon 25'deki polimorfizmler proteinin ekspresyon hızını belirlemektedir (8). TGF β 1 genindeki bazı polimorfizmler ile Graves hastalığı (GH), HT, sistemik skleroz, otoimmün hepatit ve romatoid artrit gibi birçok otoimmün hastalık arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (6,18,53,55,83).

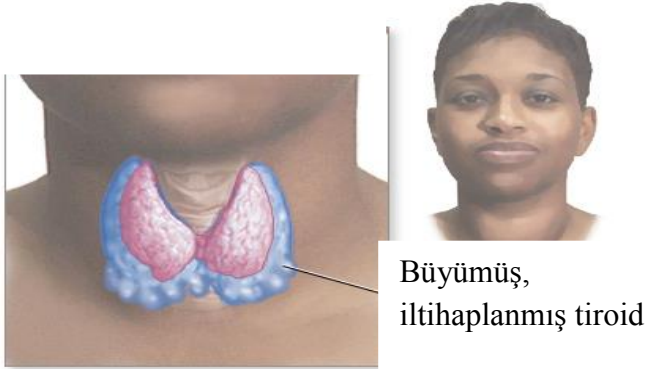
Bu çalışmada amacımız, HT tanısı konmuş hastalarda kodon 10 (Leu10Pro veya c.869T>C) ve kodon 25 (Arg25Pro veya c.915G>C) polimorfizmleri ile HT arasındaki ilişkiyi incelemek, ayrıca genotipler ile hastalığın bazı klinik ve laboratuvar belirtileri arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HASHİMOTO TİRODİTİ

1. Tanım ve tarihçe:

HT organ spesifik otoimmün bir hastalık olup hipotiroidinin en sık sebebidir. İlk kez 1912 yılında Dr. Hakaru Hashimoto tarafından dört hastanın tiroid dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi sonucu tanımlanmıştır. Tiroid bezi bu hastalıkta lenfositler tarafından infiltre edilmekte, sonrasında hormon üretimi bozulacak kadar hasar meydana gelmektedir (35). Kronik lenfositik tiroidit veya otoimmün tiroidit olarak da isimlendirilen bu hastalık en sık 30-50 yaş arasında olmak üzere her yaş grubunda görülebilir. Genel popülasyonun % 18' inden fazlasında görülen HT kadınlarda erkeklere oranla 5-7 kat daha fazla görülür ve HT' li hastaların birinci derece akrabalarının %50' sinde tiroid otoantikörleri tespit edilmektedir (36, 77). Otoimmün tiroid hastalıkları tüm organ-spesifik hastalıkların %30' undan fazlasından sorumludur.



Şekil 2. 1. Hashimoto hastalarının genel görünümü

Büyümüş,
iltihaplanmış tiroid

Otoimmün tiroidit, HT' den atrofik lenfositik tiroidite kadar uzanan geniş bir spektrum içerir. Bu hastalıklar arasındaki farklılık değişik tipte antitiroid antikörlerin üretimine bağlıdır (20). T hücre aracılı otoimmünite ile oluşan HT' de, birçok genetik ve çevresel faktör etiyolojide önemli rol oynar (15). Patolojik olarak hastalık tiroid bezinin lenfosit, plazma hücreleri ve nadiren multinükleer dev hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir (17).

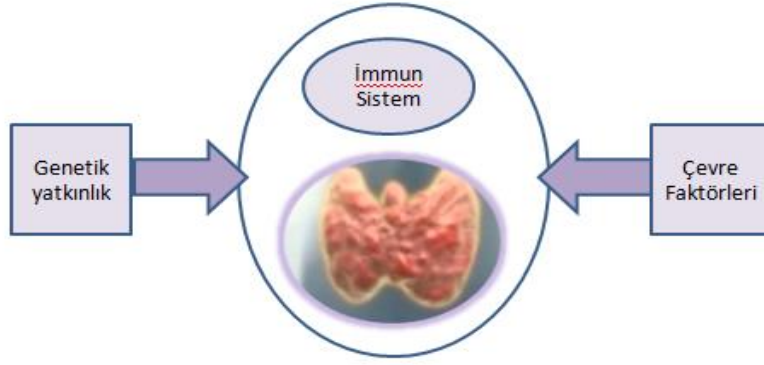
Tablo 2.1. Otoimmün tiroidit tipleri

Otoimmün Tiroidit Tipleri	Hastalığın Seyri	Görünüm
HT	Kronik	Büyümüş guatr Lenfositik infiltrasyon Tiroid hücre hiperplazisi
Atrofik Tiroidit	Kronik	Atrofi Fibrozis
Juvenil Tiroidit	Kronik	Lenfositik infiltrasyon
Postpartum Tiroidit	Geçici Kronik tiroidite dönüşebilir	Küçük guatr Lenfositik infiltrasyon
Sessiz Tiroidit	Geçici	Küçük guatr Lenfositik infiltrasyon
Fokal Tiroidit	İlerleyebilir	Otopside %20 oranında

HT; hipogonadizm, Addison hastalığı, diyabetes mellitus, hipoparatiroidizm ve pernisiyöz anemi ile birlikte sık görülür. Bu kombinasyona “poliglandüler yetmezlik sendromu” denir. Bunun 2 şekli vardır. Tip 1’ de; hipoparatiroidizm, mukokutaneoz kandidiyazis, Addison hastalığı ve nadiren hipotiroidi vardır. Tip 2 sendrom daha sık görülür ve familyal diyabetes mellitus, hipotiroidizm, hipoadrenalizm ve nadiren gonadal ve hipofizer yetmezlik vardır.

2. Etiyopatogenez

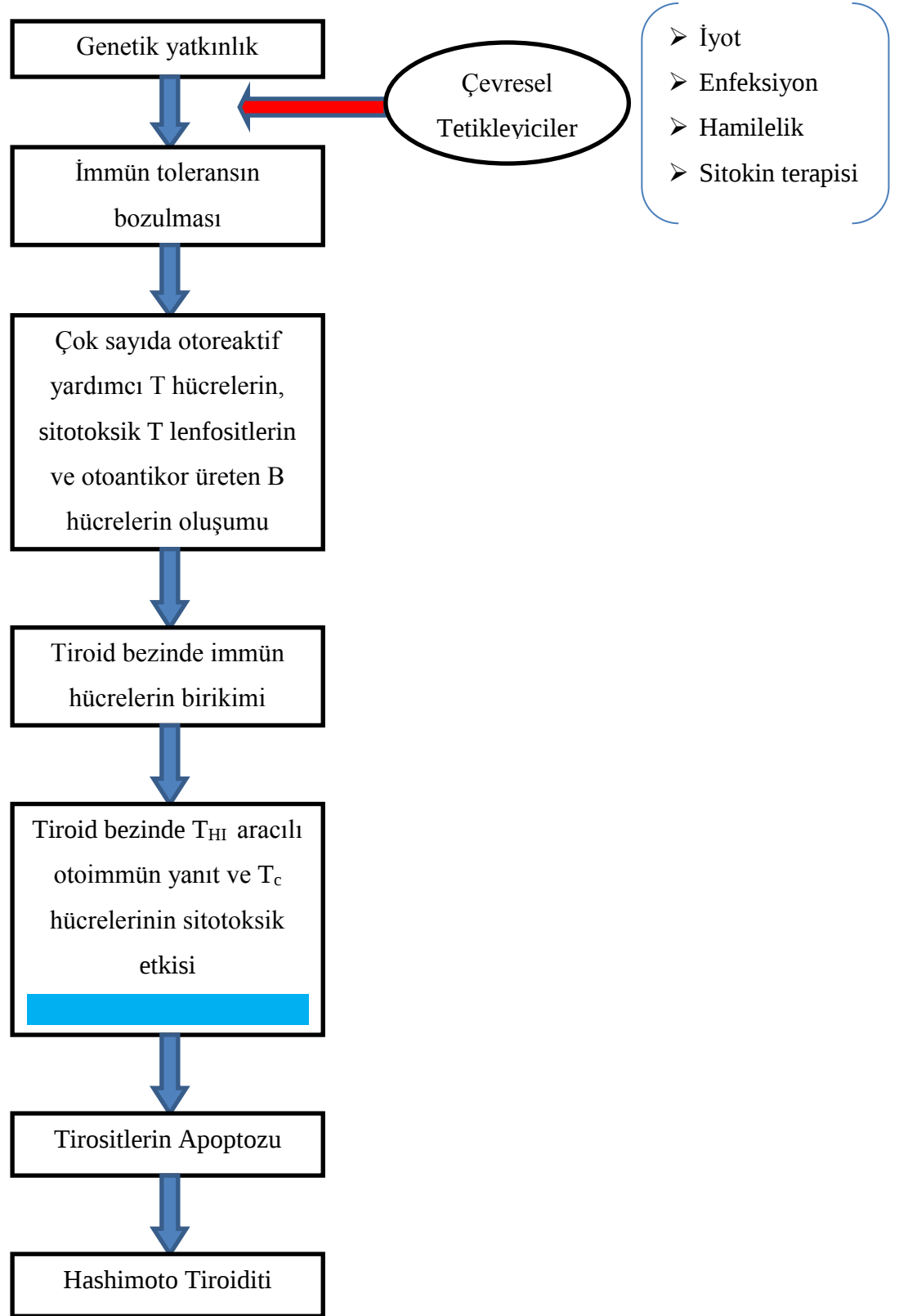
Bütün otoimmün hastalıklarda olduğu gibi HT oluşmasında internal ve eksternal faktörlerin zararlı bir etkileşimi söz konusudur. Ancak genetik yatkınlık bu kompleks hastalığın oluşmasında daha ağır basmaktadır (41).



Şekil 2. 2 . Hashimoto patogenezi: Genetik yatkınlık ve çevresel faktörler birlikte tiroid bezini ve immün sistemi etkileyerek HT oluşmasını tetiklemektedir.

HT’ de süpressör T hücrelerindeki genetik defekt sonucunda hücresel immünitenin bozulması söz konusudur. Bu defekt sonucu süpressör T lenfositleri, yardımcı T lenfositlerini baskılayamaz. Aktivasyona uğramış yardımcı T lenfositleri B lenfositleri ile ilişkiye girer ve interferon-gama (INF-g) dahil birçok sitokin salgırlarlar. Bu sitokinler tirositleri uyararak HLA-II yüzey antijenlerinin oluşmasını sağlar. Ayrıca aktivasyona uğramış B lenfositleri tiroid antijenleri ile reaksiyona giren antikorlar (otoantikorlar) oluşturur (38). Otoimmün olayın nasıl tetiklendiği bilinmemektedir. Ancak küçük yaşlarda daha düşük olan insidansın, yaş ilerledikçe belirgin olarak artması, çevresel faktörlerin etkisini çağrıştırmaktadır. Çevresel faktörler olarak, iyot alımı, stres, enfeksiyonlar ve toksinler sorumlu tutulmuştur. İkinci bir hipotez de bakteri veya virüslerde bulunan bazı proteinlerin tiroid bezindeki bazı proteinlere benzerlik göstermesi, bakteriye karşı oluşan immün yanıtın bu benzerlik sebebiyle tiroidi de etkilemesi olasılığıdır (80, 81). Hastalığın ana çizgisi, kronik düzeyde tirosit harabiyeti ve foliküllerin parçalanmasıdır. Folikül lümeninde depolanmış kolloidin interstisyuma saçılması, yeni folikül oluşumu ve bu yeni foliküllerin bir bölümünün fonksiyon yeteneği kazanması, ancak bir bölümünün yine aynı mekanizma ile tahrip olmasıdır. Bu şekilde yaşam boyu yıkım ve yapım dinamikleri sürüp gitmektedir. Hücre yıkımı ağırlıklı olduğu için immün sistemin sitotoksik kolunun ağırlığı burada önemlidir. HT’ de tiroide karşı antikorlar son derecede yüksek oranda ve yüksek titrede bulunmaktadır. Ağırlıklı olanlar Anti-TPO ve Anti-TG’ dir. Ancak Anti- Na/I cosimporter, Anti-koloid-II antikorları yanı sıra ANA dahil birçok antikor da saptanmıştır. Anti-TPO kompleman bağlamakta olup, HT patogeneziinde daha ağırlıktadır (25, 81). HT’ de tiroid hücre harabiyeti patogenezi birkaç hipotezle açıklanabilir. Anti-TPO aracılığıyla tirosit harabiyetinde üç yol öngörülebilir: 1-) Anti-

TPO hücre membranında bulunan komplemanla birleşerek, sistemi harekete geçirmekte ve tiroosit harabiyetine yol açmaktadır. Komplemana bağlanarak tiroositin IL-1, ICAM-1, PGE2 ve serbest radikal oluşumuna yol açarak tiroositi olumsuz etkilemektedir. 2-) Anti-TPO, tiroid apikal membranında bulunan TPO' ya bağlanarak sitotoksik T-lenfositlere adeta hücreyi hedef olarak işaret etmekte ve hücrenin apoptozuna yol açmaktadır. 3-) Anti-TPO ve Anti-TG, doğal öldürücü hücre (NK)' lerin Fc reseptörüne bağlanarak, onları tiroosite çekmektedir. Bu şekilde tiroosite çekilen NK' lar, onu yok etmektedir (81). Sitotoksik T-lenfositler (CD8+), hedef hücrenin (tiroosit) antijenik proteinini (TPO, TG vs) tanırlar ve ona yönelirler. Sitotoksik T-lenfositler Fas ligandları (Fas-L) ile hedef hücrenin Fas' ına bağlanırlar ve sahip oldukları yıkıcı molekülü (perforin) ona aktararak tahrip ederler. Normal tiroosit çok az Fas eksprese etmektedir. Ancak IL-1 uyarıldığında Fas ekspresyonu ileri derecede artmaktadır (81). HT' de interstisyumda çok bol bulunan T-lenfositler ve HT' nin tiroid hücreleri, sitokini aktive etme bağlamında son derece aktiftirler. İnterstisyumda bulunan T-hücreleri ve uyarılmış tiroositler INF-g, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , HLA-II, HLA-I, ICAM-1 ve NO gibi birçok sitokin ve molekülü salgılamaktadır. Bu sitokin ve molekül topluluğu, bir yandan tiroositi uyarmakta ve bir yandan da tiroositlerin harabiyetine yol açmaktadır (81).



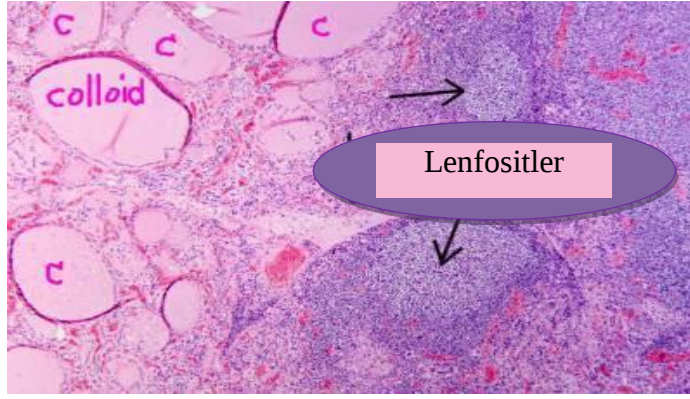
Şekil 2. 3. Hashimoto Tiroiditi Etiyopatogenezi

Etiyolojide rol alması muhtemel çevresel faktörler arasında; diyetel iyot alımı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, sitokin tedavisi ve gebelik yer almaktadır (15). Diyetel iyodun rolü birçok epidemiyolojik çalışmada ve hayvan modellerinde gösterilmiş olup en önemli çevresel faktör gibi görünmektedir (9, 63).

İyot fazlalığı tiroglobulin (Tg) moleküllerini direkt olarak etkiler ve yeni epitoplar yaratır. Yapılan çalışmalar yüksek iyotlu Tg moleküllerinin düşük iyotlu olanlara göre daha iyi bir immünojen olduğunu göstermiştir (13, 22). Yüksek iyotlu Tg molekülü antijen “uptake” ini uyarır. Ayrıca yüksek doz iyot direkt olarak makrofajları, dendritik hücreleri, B ve T lenfositlerini uyarır. Sonuçta makrofaj miyeloperoksidaz aktivitesinde artma, dendritik hücre maturasyonunda hızlanma, sirkülasyondaki T lenfositlerin sayısında ve B lenfositlerden immünglobulin üretiminde artma meydana gelir (2). İmmün ve inflamatuvar cevapların regülasyonunda esas rol oynayan sitokinlerin birçok çalışmada otoimmünitede, patojenik apoptotik proseslerde ve HT’ nin gelişmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (10, 62). GM-CSF ya da IL-2 kullanımı geçici olarak tiroid otoantikorlarının gelişimini indükler ve hipotiroidi oluşturur. Bu bulgu hematopoetik büyüme faktörü ve sitokin kullanan hastaların hipotiroidi gelişimi açısından takibini gerektirir (5,15,30). HT etiopatogenezinde rol alan diğer moleküler mekanizma apoptozistir. Apoptozis (programlanmış hücre ölümü) masif tiroisit yıkımında major rol oynar. Fas reseptörünün Fas-L ligandı ile birleşmesi apoptozisi başlatır. HT’ de tiroisitlerde apoptozise yol açan Fas ve Fas L ligandının aşırı üretimi söz konusudur (45). HLA molekülleri HT ve otoimmün tiroid hastalıklarının gelişmesinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda HT ve GH’ de tiroid epitelyal hücrelerinde HLA-II molekül ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (15). Genel popülasyona göre bazı HLA tipleri; örneğin HLADR5 Hashimoto tiroiditinde daha sık görülmektedir. Primer miks ödemi olan hastalarda HLA-DR3 prevalansı artmışken (19), hem GH hem de HT’ de HLA-AW30 prevalansı artmıştır (11).

3. Patoloji

Patolojik olarak HT, tiroid bezinin lenfosit ve plazma hücreleri tarafından infiltrasyonu, foliküler yıkım, fibrozis ve kolloid eksikliği ile karakterizedir. Bazı hastalarda ise sadece izole alanlarda lenfositik infiltrasyon olabilir ki buna fokal tiroidit denilir. Bu HT’ nin erken evresini yansıtır olabilir. Çünkü lenfositik infiltrasyon derecesi ile serumdaki antikorlar korelasyon gösterir (84). Özellikle yetişkin HT’ li hastaların tiroid bezinde Hurtle ya da Askanazy hücreleri olarak bilinen karakteristik eozinofilik epitelyal hücreler bulunur (54).



Şekil 2.4. HT patolojik görünümü. Tiroid bezinin mikroskopik görüntüsü. Sol tarafta normal bir folikül (c: kolloid folükülleri). HT olan sağ tarafta ok ile gösterilmiş foliküllerde lenfosit infiltrasyonu gerçekleşmiştir. Tiroid peroksidaz ve tiroglobuline karşı otoantikorlar yükselmiştir.

4. Klinik Belirtiler

HT' li hastalar aşağıdakilerden biri veya birkaçı ile başvurabilir (46):

- Guatr veya tiroid nodülü
- Hipotiroidi.
- Tirotoksikoz (Hashitoksikoz).

HT' de en sık bulgu tiroid büyümesidir. Hastaların %75' inde ötiroid guatr vardır. Hastalar doktora boyunda şişlik, rahatsızlık hissi yakınması ile başvurabilir ya da başka bir nedenle yapılan muayenede guatr saptanabilir. Tiroid bezi genelde diffüz olarak büyümüştür, orta sertlikte ve lastik kıvamındadır. Bazı hastalarda multinodüler guatr olabilir ya da çok nadiren tek nodül görülebilir. Piramidal lop belirgin olarak büyümüştür. Çoğu hastada guatr asemptomatik olsa da nadiren ağrı ve hassasiyet olabilir (35, 36).

Tiroid bezinde ani büyüme ve ağrı varlığında tümör ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Otoimmün tiroiditin diffüz olması, hipotiroidi bulguları, piramidal lob büyümesi ayırım sağlamazsa ince iğne aspirasyon biyopsisi (TİİAB) yapılır. Patolojik olarak lenfoma ve küçük hücreli tiroid kanserleri HT ile karışabileceği gibi uzun sürede HT lenfoma gelişimi için bir risk faktörüdür. HT' de asimetrik bez büyümesi, ağrı, ses kısıklığı, lenf nodu gelişimi tiroid lenfomasını akla getirmelidir (35).

Kliniğe ilk başvuran hastaların %20' sinde hipotiroidi semptom ve bulguları mevcuttur ya da yıllar içinde gelişir (35). Önceleri HT' den kaynaklanan hipotiroidizmin kalıcı olduğu düşünülürdü. Ancak yakın zamanda Hashimoto

tiroiditinin geçici hipotiroiditi yapabileceği yönünde kanıtlar vardır. Yaklaşık %20 hastada tiroid hormon replasmanı alırken spontan iyileşme sağlanmıştır (73).

HT olan hastalarda ve bunların yakınlarında diğer otoimmün hastalık prevalansı artmıştır. Örneğin; Addison hastalığı, tip 1 diyabetes mellitus, pernisiyöz anemi, romatoid artrit, myastenia gravis, multipl skleroz ve vitiligo HT' de daha sık görülmektedir (17, 36).

5. Laboratuvar Bulguları

HT' den şüphelenildiğinde, tiroid otoantiklorları ve tiroid fonksiyon testleri tanıyı desteklemeye yardımcı olur. HT' li olguların yaklaşık %80' inde tanı konduğunda T4, T3 ve TSH düzeyleri normaldir, ancak TRH' ya TSH cevabı artmıştır. Bu da tiroid bezi kapasitesinin azalmakta olduğunu gösterir. Antimikrozomal (Anti-TPO) antikorlar olguların % 95' inde ve anti-TG antikorlar % 60' ında pozitifdir. Atrofik formulu vakalarda antikor titreleri guatrli formdan daha yüksektir. Yaklaşık % 10 olguda antikorlar negatif olabilir. Bu tür hastalarda tanı için ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılmalıdır. Bazı olgularda TSH-R antikorları nadiren olabilir. Tiroid antikorları pozitif olguların % 50-75' i ötiroid iken % 25-50' sinde subklinik hipotiroidizm saptanmıştır. Tiroid antikorları diğer tiroid hastalıklarından daha yüksek bulunur. Antitiroid antikor titrelerinin 1:1000 ve üzerinde olması otoimmün tiroidit tanısını destekler. Çok az hastada sedimantasyon yüksekliği, poliklonal hipergammaglobulinemi veya antinükleer antikorlar saptanmıştır. HT' li olguların % 20.8' inde sodyum-iyot simporter (NIS) antikorları yüksek bulunmuştur. Ancak sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında antikor pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. O nedenle NIS antikorları tanı ve izlemde kullanılamamaktadır.

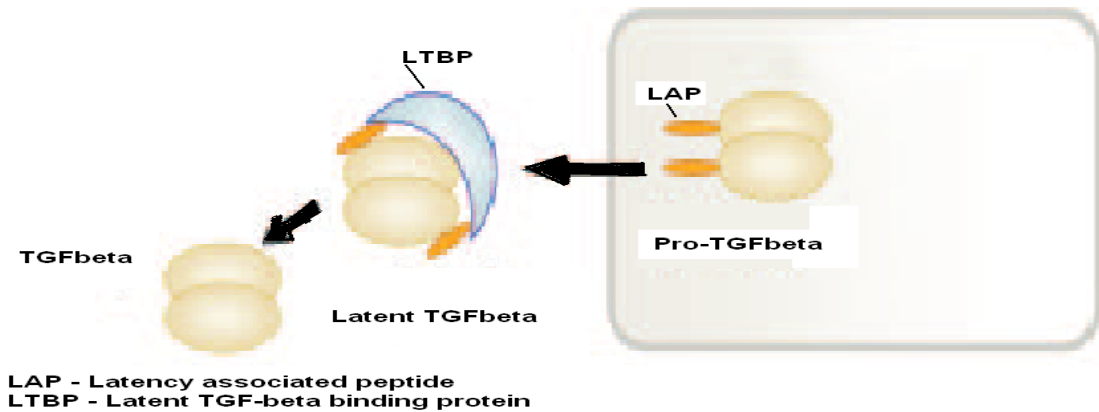
Tiroid görüntölme tetkikleri ise guatrli otoimmün tiroiditli hastalarda gerekli değildir. Tiroid sintigrafisinde GH, multinodüler guatr veya hiperfonksiyone veya hipofonksiyone nodülü taklit eden görüntüler alınabilir. Radyoizotop uptake' i normal, yüksek veya düşük olabilir. Subakut veya sessiz tiroiditte "uptake" düşüktür. USG' de büyümüş bir tiroid bezi vardır ve diffüz hipoekojenik patern gösterir. HT tanısında tiroid ultrasonu tanı koydurucu özellikler taşır. İyi bir radyolog USG ile Hashimoto tanısı koyabilir. Çocuklarda yapılan bir çalışmada Hashimoto'ya spesifik USG özelliklerinin Hashimotolu çocukların % 37' sinde tanı konduğunda mevcut olduğu, tanı konulduğunda normal USG görüntüsü olanların 7 ay içinde bazı USG değişiklikleri gösterdiği, karakteristik değişikliklerin ise 4 yıl sonra ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu nedenle çocuklarda USG her zaman tanı konulduğunda

karakteristik olmayabilir. İnce iğne aspirasyon biyopsisi bu olgularda tanı için yapılabilir. Özellikle hızlı büyüyen guatrırlı olgularda veya nodül şüphesi olan olgularda mutlaka şüpheli olan nodüle yönelik biyopsi yapılmalıdır.

2. 2. TRANSFORMING GROWTH FACTOR β 1

TGF β 1 nodal, aktivin, BMP ve AMH' yi de kapsayan, doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir. TGF β 1 bu ailenin prototipidir ve birçok hücre tarafından sentezlenen TGF β hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (differansiasyon), adezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır. Bu büyüme faktörünün sinyalizasyon yolu birçok farklı yollar ile etkileşerek hücrenin homeostazını sağlamaktadır (24, 67, 74).

TGF β Sinyalizasyon Yolu: TGF β , yapısında bir disülfid köprüsü bulunan 25 kDa' luk bir homodimerdir. TGF β hücrede inaktif pro-peptid şeklinde sentezlenir ve LTBP ile kompleks oluşturarak latent (inaktif) TGF β formunda salgılanır. Pro-peptidin N-terminalinde "latency associated protein" (LAP) olarak adlandırılan bir dizi bulunur. Latent TGF β ' nin yapısından LTBP ve LAP proteinlerinin serin proteazlar aracılığı ile uzaklaştırılması (veya LAP'ın konformasyonel değişimi) sonucu aktif TGF β oluşur (3, 48).



Şekil 2. 5. TGF β ' nin sentezi

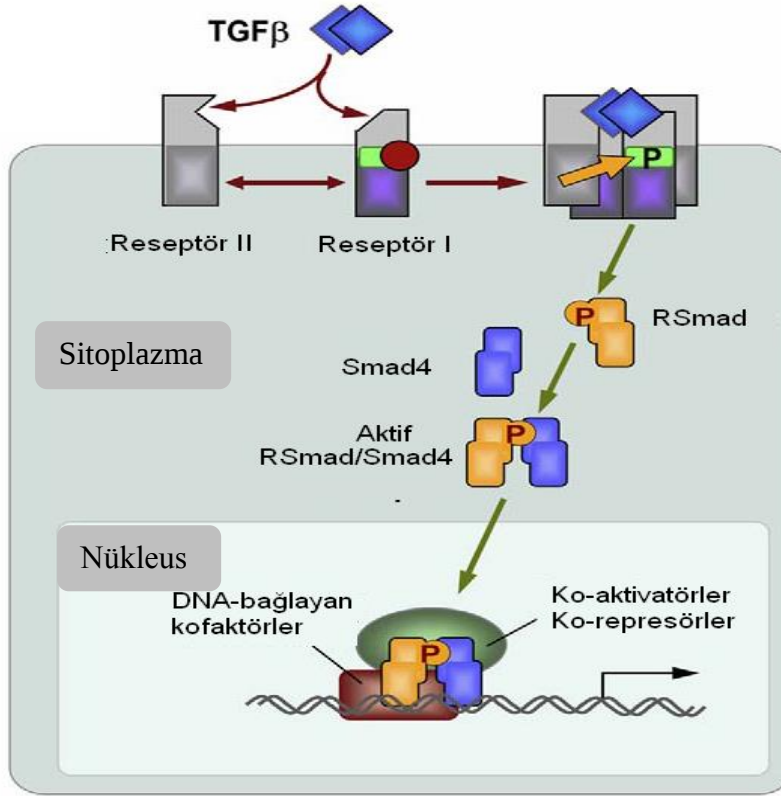
Bir kaskad şeklinde ilerleyen TGF β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Hücre membranında TGF β tip I (T β RI) ve TGF β tip II (T β RII) olmak üzere iki tip reseptör bulunur. Endoglin ve betaglikan olarak da adlandırılan TGF β tip III reseptörleri (T β RIII) TGF β ' nin ilk iki tip reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGF β tip II reseptörün membran dışı

bölgesine, sonra da tip I reseptörüne bağlanır. Oluşan ligand/reseptör kompleksi ikişer T β RI ve T β RII içeren bir heterotetramerdir. T β RI ve T β RII reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğine sahiptir. TGF β 'nın tip II reseptörüne bağlanması, bu reseptörün kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını, ve tip I reseptörün yapısında bulunan GS (glisin, serin) bölgesinin fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu şekilde aktiflenmiş T β RI sitozolde bulunan Smad proteinleri fosforiller (66). Smad proteinlerinin 8 alt tipi bilinmektedir. RSmad olarak adlandırılan Smad 2 ve 3 TGF β , Smad1, 5 ve 8 ise BMP ve AMH'nin sinyalizasyon yolunda yer almakta, ve ligand/reseptör kompleksleri tarafından fosforillenerek aktiflenmektedir. Smad4 (ko-Smad) ligand/reseptör kompleksi tarafından değil de RSmad proteinlerinin etkisi ile fosforillenmektedir. Smad proteinlerinin arasında 2 protein (Smad6 ve Smad7) Smad-reseptör veya Smad-Smad etkileşimlerini inhibe ederek TGF β yolunun kontrolüne katılırlar (49).

Smad proteinlerinin yapısında bir bağlaç bölgesi tarafından birleştirilen iki globüler bölge bulunmaktadır. N-terminalindeki MH1 bölgesi 5'-AGAC-3' nukleotid dizisini tanıyarak DNA'ya bağlanır. Bağlaç bölgesinde ubiquitin ligaz'ın bağlandığı fosforilasyon yerleri bulunmaktadır. Bu bölge, ayrıca, diğer sinyalizasyon yollarının TGF β yolu ile kesiştiği noktadır. C-terminalindeki MH2 bölgesi Smad-reseptör, Smad-Smad ve Smad-transkripsiyon faktör etkileşimlerine aracılık eder (49). MH2 bölgesinde aktif T β RI tarafından fosforile edilen Ser-X-Ser amino asit dizisi bulunmaktadır. Ser-X-Ser motifin fosforilasyonu sonrası RSmadlar Smad4'ün MH2 bölgesine bağlanırlar. RSmad/Smad4 kompleksin oluşması ile TGF β yolun sitoplazmik kolu sonlandırılır ve kompleksin nükleusa aktarılması ile TGF β yolun nükleer kolu başlatılmış olur. RSmad/Smad4 kompleksi nükleoporinlerin aracılığı ile sitozolden nükleusa aktarılır. Nükleusta RSmad/Smad4 kompleksi 300-400'e yakın genin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonu regüle eder (39, 82). RSmad/Smad4 kompleksin DNA'ya bağlanması çeşitli kofaktörler tarafından kolaylaştırılır ve kontrol edilir (16). Bu kofaktörler, komplekse çeşitli ko-aktivatör ve ko-represörlerin bağlanmasını da kolaylaştırarak transkripsiyonun regülasyonunu sağlar (24, 49). Öte yandan, Smad/Smad/DNA etkileşimini kontrol eden kofaktörlerin aktivasyonu veya ekspresyonu TGF β -Smad dışında birçok sinyalizasyon yolu tarafından kontrol edilir. Böylece TGF β -Smad yolu hücredeki diğer sinyalizasyon yolları ile karşılıklı etkileşime girer (49, 67).

TGF β -Smad yolundaki sinyal iletinin durdurulması 2 mekanizma ile gerçekleştirilir: defosforilasyon ya da ubikitinizasyon (34, 49, 74). TGF β reseptörlerinden ayrılınca, RSmad proteinleri hızla defosforile edilerek inaktive olur ve

sitozole aktarılır (34). Defosforilasyon mekanizmasına ek olarak, ubiquitin ligaz enzimin etkisi ile RSmad' ların bağlaç bölgesine ubiquitin bağlanır. Ubiquitin bağlanmış RSmadlar ise proteozomal yıkılıma uğrar (49, 74). RSmad' ların ubiquitinizasyonu hücrede TGF β ' ya olan cevabın derecesini ve süresini kontrol eder (49, 74).

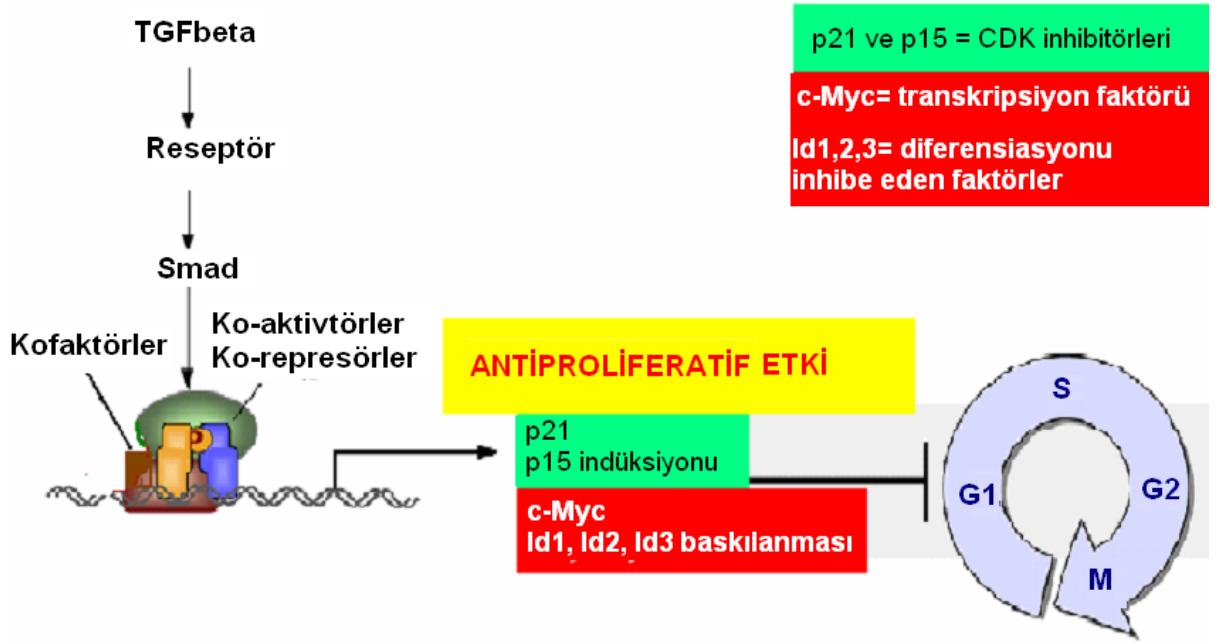


Şekil 2. 6. TGF β sinyalizasyon yolunun sitoplazmik ve nükleer kolları

Son yıllarda TGF β yolunun Smad proteinlerin aracılık etmediği birçok başka sinyalizasyon yolu ile etkileştiği öne sürülmüştür. Bu yollar arasında “Ras-extracellular regulated kinase-1” (ERK-1), “mitogen-activated protein kinase” (MAPK), “phosphoinositide-3 kinase” (PI3K)-Akt, “protein phosphatase 2A” (PP2A) ve Rho-proteinlerin aracılık ettiği yollar yer almaktadır (16, 51, 52, 59).

TGF β ' nin fonksiyonları

Antiproliferatif etki: Normal hücrelerde TGF β ' nin başlıca fonksiyonu proliferasyonu baskılaması ve differansiasyonu hızlandırması ile ilgili olmasıdır. Epitelyal ve hematopoetik hücrelerde TGF β antiproliferatif etkilidir ve hücre döngüsünün G1 fazında durmasını sağlamaktadır (67).



Şekil 2. 7. TGFβ' nin antiproliferatif etkisini sağladığı aracı moleküller

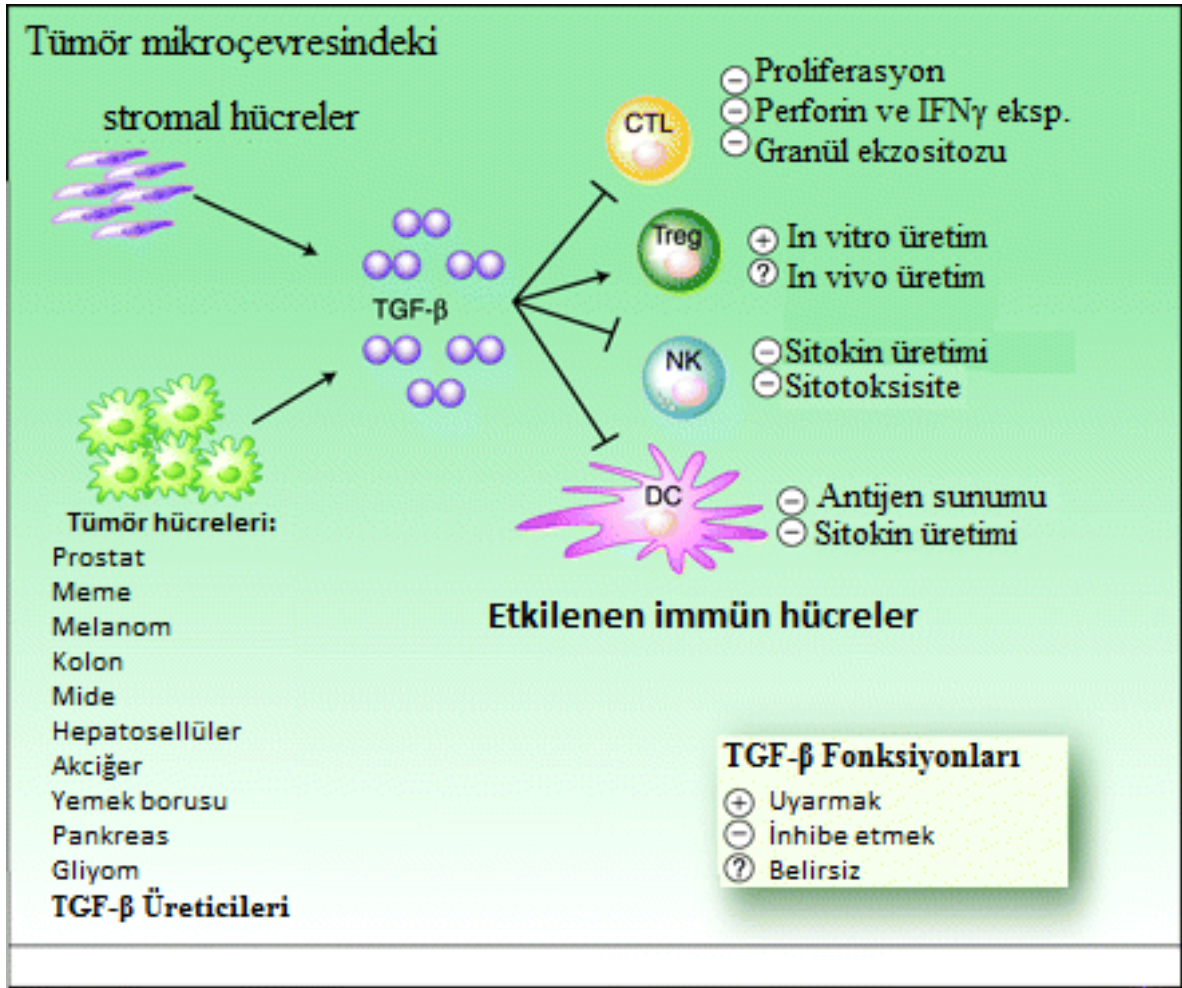
TGFβ' nin etkisi ile, hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan sikline bağımlı kinazların (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p15 proteinlerinin sentezini aktifler (56, 65). Ayrıca TGFβ, bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc ve differansiasyonu inhibe edici faktörler olan Id1, 2 ve 3 genlerinin inaktivasyonunu sağlamaktadır (14, 33).

Proapoptotik etki: Bazı hücre tiplerinde TGFβ, henüz tam olarak aydınlatılamamış bir mekanizma ile apoptozu indüklemektedir. TGFβ-Smad yolun etkisi ile TIEG-1 geni indüklenir. TIEG-1 apoptozu indükleyen ve proliferasyonu baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür (71). Hepatoma hücrelerinde ise TGFβ tarafından başlatılan apoptoz sürecinin indüksiyonu "death-associated protein kinase" (DAPK)' ın aktivasyonu ile gerçekleştirilir (37). Mide karsinom hücrelerinde TGFβ Fas reseptörlerine bağlanarak sitozolde çeşitli kaspazların aktivasyonunu ve hücrenin apoptozu uğramasını sağlamaktadır (40). Prostat karsinomu hücrelerinde TGFβ' nin başlattığı apoptoz sürecine apoptoz regülatörü (ARTS) ve Daxx (Fas reseptörlerine bağlanan) proteinlerinin de katıldığı bildirilmiştir (42, 58).

Anti-inflamatuar etki: TGFβ bilinen en güçlü immün-süpresif moleküllerden biridir. TGFβ immün sistemin efektör T (Th1 ve Th2) ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, düzenleyici Tregülatör hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuvar cevabı baskılamaktadır (44). TGFβ bu etkisini IL-2 üretimini baskılayarak gerçekleştirmektedir. IL-2 T hücrelerini, NK hücrelerini ve diğer immün sistem

hücrelerini aktifleyen bir lenfokindir (47). Ayrıca TGF β , T hücre efektörleri olan sitotoksik T lenfositleri de inhibe eder (29). TGF- β ayrıca NK hücreleri için hayati önemde olan reseptörlerin ekspresyonunu inhibe eder (50).

Aşağıdaki şekilde de görebileceğimiz gibi TGF- β inflamatuvar cevabı baskılamaktadır. Sitotoksik T hücrelerinde (CTL) proliferasyonu, porfirin ve IFN- γ ekspresyonunu inhibe etmektedir. T regülatör (Treg) hücrelerinin in vitro üretimini uyarırken in vivo olarak etkisi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Doğal öldürücü hücreler (NK) ve dendritik hücrelerinde (DC) sitokin üretimini inhibe etmektedir.



Şekil 2. 8. TGF β ' nin immün-süpresif etkisi

Tümör mikroçevresindeki TGF- β salınımı ve TGF- β ' nin hücresel düzeydeki etkisi. Antitümör cevabı içeren TGF- β ' nin immün hücreler üzerindeki immün-süpresif etkisini takiben stromal hücreler ve çeşitli tümör hücrelerden salınımının özeti. CTL; sitotoksik T lenfosit, Treg; regülatör T hücreler, NK; doğal öldürücü hücreler, DC; dendritik hücreler.

TGF β 1 polimorfizmleri ve otoimmün hastalıklarla ilişkisi

TGF β 1 geni 19q13.1-3 kromozomunda bulunur, 7 ekzon içerir ve 390 amino asitten oluşan prekürsör (ön) proteinin sentezinden sorumludur (16). TGF β 1 geninde 10' dan fazla polimorfik bölge tanımlanmıştır (8). En sık araştırılan bölgeler arasında, proteinin sinyal peptidini kodlayan kodon 10 ve kodon 25 polimorfizmleri yer alır. Kodon 10 ve kodon 25 polimorfizmleri 29 amino asitten oluşan sinyal peptidin amino asit dizisinin değişmesine neden olur. Kodon 10 polimorfizmi DNA' da +869 pozisyonunda T (timin) yerine C (sitozin) yer alması, Leu (lösin) amino asidin Pro (prolin)'e dönüşmesine neden olur (Leu10Pro). Kodon 25'de ise +915 bölgesinde G (guanin)' in yerine C geçmesi, Arg (arginin) amino asidin Pro' e dönüşmesine neden olur (Arg25Pro). Bilindiği gibi sinyal peptidler proteinin posttranslasyonel modifikasyonunu ve ekspresyon hızını kontrol eder (8). Kodon 25' te G' nin yerine C allelin geçmesi (Arg25Pro) TGF β 1' in ekspresyon ve sekresyonunun azalmasına neden olur (32, 68). Kodon 10' a gelince, bazı çalışmalarda T allelin (Leu) (32, 79), bazılarında ise C allelin (Pro) (43,55) artmış TGF β 1 üretimi ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir.

TGF β 1 genindeki kodon 10 ve kodon 25 polimorfizmleri Graves hastalığı (GH), HT, sistemik skleroz, otoimmün hepatit ve romatoid artrit gibi birçok otoimmün hastalıklarda araştırılmıştır (6,12,18,43,53,55,70,83). Kodon 10' da T allelinin romatoid artrit (70) ve sistemik skleroz (43) gelişmesi için bir risk faktörü olduğu, aynı zamanda skleroderma (12), psöriasis (6) ve GH (18) gibi hastalıklarla ilgili olmadığı bildirilmiştir. Yamada ve ark. yaptığı bir çalışmada T allelinin yüksek frekansı HT' de hastalığın ciddiyeti ile ilgili olduğu ortaya koymuşlardır (83). Yine aynı çalışmada akut (intractable) GH olan bireylerde C allelinin frekansı, remisyonda olan hastalara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (83). Kodon 25 polimorfizmi ele alındığında, bazı araştırmacılara göre Arg25Pro polimorfizmi ile skleroderma (12) ve psöriasis (6) arasında bir ilişki olmadığını gösterirken, bazıları artmış juvenil artrit riski (53), bazıları ise azalmış pediatrik otoimmün hepatit riski (55) ile ilgili olduğu bildirmiştir. Bizim daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmamızda kodon 25' te C alleli (Pro) tiroid bezin ikinci sıklıkta görülen otoimmün hastalığı olan GH gelişmesi için bir risk faktörü olduğunu bulduk (18).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

A. HASTA VE KONTROL ÖRNEKLERİ

Çalışma Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulu' nun 12.04.2011 tarih ve 9 sayılı kararınca onaylanmıştır. Çalışmaya katılan tüm hasta ve kontroller çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı izinleri alınmıştır.

Çalışmaya Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğine başvuran 16-78 yaş arası Hashimoto tiroiditi tanısıyla takipli 178 (158 kadın, 20 erkek) hasta dahil edildi. Akut veya kronik hastalığı olmayan, herhangi bir nedenle polikliniğe ya da hastanenin diğer polikliniklerine başvuran ve tetkikleri normal olarak gelen 197 (170 kadın, 27 erkek) sağlıklı gönüllü de kontrol grubuna seçildi. Her iki grup başvuru sırasına göre randomize edilerek ve yazılı olur onayı alınarak (iyi klinik uygulamalarda 'International Committee of Harmonisation Good Clinical Practice' belirtilen esaslar doğrultusunda) çalışmaya dahil edildi. Akut enfeksiyon tablosu, diyabet, kardiyovasküler hastalık, kalp yetmezliği, serebrovasküler hastalık, metabolik sendrom, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kronik karaciğer hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, anemi ($Hb < 9$ g/dL) ve malignite tanıları olan vakalar çalışmada her iki grup için dışlama kriteri olarak kullanıldı.

Hashimoto tiroiditi tanısı hastalarda tiroid otoantikör pozitifliği (Anti-TPO veya Anti-TG) ile tiroid USG' de kronik tiroidit bulgularının (parankimde hipoekojen heterojen patern, psödonodüler imaj ve ince fibröz septasyon) mevcudiyeti ile kondu. Tüm olguların anamnez bilgileri sorgulandı, demografik özellikleri kaydedilip, fizik muayeneleri yapıldı, çalışma hakkında bilgilendirilerek onam formları imzalatıldı. Beden kütle indeksi (BMI) hastanın kilosu, boyunun karesine bölünerek (ağırlık/boy^2) (kg/m^2) hesaplandı.

Hem hasta hem kontrol grubundaki bireylerde 12 saatlik açlık sonrası venöz kan örnekleri EDTA.K₂ ve kuru tüplere alındı. Elde edilen serum örneklerinde açlık kan şekeri, total kolesterol, trigliserid, LDL-K, HDL-K, üre, kreatinin, AST, ALT, FT3, FT4, TSH, Anti-TPO ve Anti-TG düzeylerine bakıldı.

B. GEREÇLER

Kullanılan Aletler :

1. Elektroforez güç kaynağı (EC250 – 90 Electrophoresis Power Supply, Thermo Electron Corp., USA).
2. UV transilluminatör ve görüntüleme sistemi (VilberLourmant, France).
3. Yatay Elektroforez cihazı (Serva BlueLine Horizontal Submarine Electrophoresis Chamber, Germany).
4. Mikrosantrifüj (Biofuge, Heraeus Instruments, Germany).
5. PCR cihazı (Techne TC412 Thermal Cyclers, Barloworld Scientific, Cambridge, UK).
6. pH metre (HANNA Instruments, Portugal).
7. Otomatik pipet takımı (Nichipet EX, Japan).
8. Su banyosu (Nüve BM 101, Türkiye).
9. Vorteks (IKA MS2 Minishaker, USA).
10. Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (IKA Labortechnik, USA).
11. Hassas terazi (Scaltec SBAC<11, Germany).
12. Otoklav (Hirayama, HVE-50, Japan).
13. Dikey Elektroforez cihazı

C. TGFβ1 KODON 10 VE KODON 25 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

- I. Periferik Kan Lökositlerinden DNA İzolasyonu
- II. DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması
 - A. PCR – TGF β1 Kodon 10 ve Kodon 25
- III. PCR Ürününün Uygun Kesim Enzimleriyle Kesilmesi (RFLP)
 - A. *MspAII* enzimi ile kesim (Kodon 10)
 - B. *BglII* enzimi ile kesim (Kodon 25)
- IV. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi
- V. Gümüş Boyama Yöntemi ile Genotipin Saptanması

C.I Periferik Kan Lökositlerinden DNA İzolasyonu

➤ *Ayırıcılar*

1. Kırmızı Kan Hücrelerini Parçalama Tamponu (Red Blood Cell Lysis Buffer – RBLB):

NH_4Cl : 8.74 g

KHCO_3 : 1 g

0.5 M EDTA : 200 μL

NH_4Cl ve KHCO_3 mezürde 800 ml bidistile suda çözüldü. 200 μL 0.5 M EDTA eklendi. 1 N NaOH ile pH: 7.4' e ayarlandı. Bidistile su ile 1 L' ye tamamlandı. 120 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

2. Beyaz Kan Hücrelerini Parçalama Tamponu (White Blood Cell Lysis Buffer – WBLB):

4 M NaCl : 10 mL

0.5 M EDTA : 20 mL

Mezür içine konulup bidistile su ile 400 mL' ye tamamlandı. 120 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. %10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi:

SDS : 10 g

Tartılan SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat edilerek behere konuldu. Bidistile su ile 90 mL' ye tamamlandı. 56 °C su banyosunda bekletilerek çözüldü. pH: 7.2' ye HCl ile ayarlandı. Bidistile su ile 100 mL' ye tamamlandı. 0.22 μm ' lik filtreden geçirilerek sterilize edildi.

4. Proteinaz K (20 mg/mL):

0.2 g Proteinaz K 10 mL bidistile suda çözüldü. 1 mL' lik porsiyonlarda -20 °C' de saklandı.

5. 9.5 M Amonyum Asetat Çözeltisi:

Amonyum Asetat : 73.226 g

Behere içine alınıp, üzerine 100 mL bidistile su konuldu. Yaklaşık 40 °C' de manyetik karıştırıcıda çözüldü. 0.22 μm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

6. Tris – EDTA (TE) Tamponu (pH: 8.0):

1 M Tris – HCl : 10 mL (A)

0.5 M EDTA : 10 mL (B)

Mezür içine aktarıldı ve bidistile su ile 1 L' ye tamamlandı. 120 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

A. 1 M Tris – HCl Tamponu:

Tris – Baz : 121.1 g

HCl (derişik) : 42 µL

Mezür içine aktarıldı ve bidistile su ile 1 L' ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözüldü.

B. 0.5 M EDTA (pH: 8.0):

EDTA : 186.1 g

Beher içine alındı ve bidistile su ile 800 mL' ye tamamlanıp manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözüldü. Yaklaşık 20 g NaOH pelletleri ile pH: 8.0' e ayarlandı ve bidistile su ile 1 L' ye tamamlandı. 120 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

7. 4 M NaCl Çözeltisi:

NaCl : 233.6 g

Mezür içine konuldu, bidistile su ile 1 L' ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı aracılığıyla çözüldü. 120 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

➤ **İşlem**

10 mL venöz kan steril falkon tüplerine konularak 1:3 oranında RBLB çözeltisi eklendi, +4 °C' de 10 dakika bekletildi ve +4 °C' de 1500 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 30 mL RBLB eklenip +4 °C' de 1500 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atılarak pellet üzerine 10 mL WBLB, 500 µL %10' luk SDS ve 50 µL proteinaz K eklendi ve 56 °C' de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 4000 µL Amonyum asetat ilave edildi. -20 °C' de 10 dakika bekletildi, daha sonra +4 °C' de 4000 rpm' de 45 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Süpernatant steril falkon tüpüne alındıktan sonra üzerine 1:1 oranında %99' luk absolü alkol eklendi. Ayrı bir ependorf tüpüne konmuş 500 µL % 70' lik alkol üzerine falkon tüpündeki süpernatantın üstünde toplanmış olan DNA transfer edildi, +4 °C' de 14000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, dipte kalan DNA pelleti 56

°C’ de etüvde kurutuldu. Kuruyan pellet üzerine 500 µL TE eklendi, 56 °C’ de etüvde 1 saat bekletildi. Böylece DNA’ nın çözülmesi sağlandı. Elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C’ de saklandı.

➤ **DNA miktar tayini**

Örneklerin miktarını ve saflığını tayin etmek için 2 µL DNA örneği üzerine 98 µL TE tamponu konularak, optik dansiteleri (OD) spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. 260 ve 280 nm’ lerdeki ölçüm değerlerinin birbirine oranı (OD_{260}/OD_{280}) nükleik asidin saflığı hakkında bir tahmin yapmamıza olanak verir. Saf DNA ve RNA örneklerinin OD_{260}/OD_{280} oranları sırasıyla 1.8 ve 2.0’ dir.

260 nm dalga boyundaki okuma ile örnekteki nükleik asit konsantrasyonu hesaplanır. Optik dansitenin 1 olması, ölçülen örnekte yaklaşık 50 µg/mL çift zincirli DNA olduğunu gösterir.

$$DNA (\mu g/mL) = 260 \text{ nm’ deki OD} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50$$

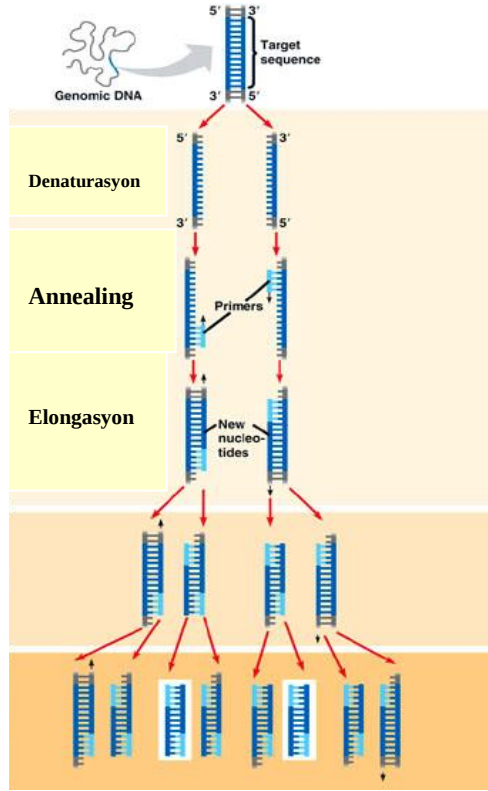
şeklinde ifade edilir.

C.II DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

PCR

İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanan PCR, bilinen bir nükleotid dizisi kullanılarak genomun seçilmiş bir bölgesindeki DNA dizisinin *invitro* koşullarda çoğaltılmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu teknik kullanılarak genomik DNA içinde yer alan nanogram düzeyindeki kalıp DNA’ nın temel miktarı 10^5 – 10^6 kat arttırılabilir.

PCR, DNA replikasyonunun temel özelliklerine göre tasarlanmıştır.



Şekil 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)' nin basamakları.

1. PCR' ın temel bileşenleri:

- Kalıp DNA,
- Öncü DNA molekülleri (primerler),
- Deoksi ribonükleozid trifosfatlar (dNTP) – dATP, dGTP, dTTP ve dCTP,
- Mg^{2+} ,
- Uygun tampon,
- DNA polimeraz (Taq polimeraz) – *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilir.

PCR, değişik sıcaklıklarda gerçekleşen 3 basamağın döngüler halinde tekrarlanması ile oluşur.

2. PCR' ın basamakları:

- Kalıp DNA' ının *denatürasyonu*: 92-95 °C' de gerçekleşen bu basamakta karışımdaki kalıp DNA iplikçiklerinin birbirinden tamamen ayrılması sağlanır.
- Primerlerin kalıp DNA' ya bağlanması *annealing*: 50-64 °C' de gerçekleşen bu basamakta primerlerin kalıp DNA üzerinde uygun yerlere bağlanması sağlanır.

- Yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesi *elongasyon* : 72 °C’ de gerçekleşen bu basamakta ortamda bulunan dNTP’ ler Taq polimeraz enziminin aracılığıyla primerlerin 3’ ucuna eklenerek kalıp DNA dizisinin kopyası sentezlenir (Şekil 3.1).

Bu 3 basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. PCR’ ın net sonucu, n sayıda tekrarlanan döngülerin sonucunda reaksiyon teorik olarak 2^n miktarında özgün primer çiftleri ile çoğaltılmış çift sarmallı DNA molekülünü içerir.

3. TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) ve TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C) gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve PCR koşulları:

a. TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C)

F: 5’ – GCC GCA GCT TGG ACA GGA TC – 3’

R: 5’ – TTC CCT CGA GGC CCT CCT A – 3’

Bu primerler 294 baz çifti (bç)’ lik PCR ürününün oluşmasını sağlamaktadır.

b. TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C)

Primerler, PCR koşulları, PCR Mix TGF β1 T869C (Leu10Pro) koşulları ile aynı.

Aynı PCR ortamında her iki lokus da (kodon10 ve kodon25) çoğaltılmış olur. PCR ürünleri daha sonra kesim işlemine tabi tutulur.

Tablo 3.1. TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) ve TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C) gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR ortamı (final hacim 30μL)

	Stok Solüsyonun Molaritesi	Çalışma Ayıracının Molaritesi	Final Molarite
PCR Tamponu	10X	——	1X
MgCl₂	25mM	——	2mM
Primerler	100μM	10μM	0.2μM
dNTP’ ler	100mM	2mM	0.2mM
Taq Polimeraz	5U/μL	——	2.5U
DANN	——	——	~50 ng

4. TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) ve TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C) gen bölgelerinin amplifikasyon ısıları:

a) Başlangıç 'melting' (erime) basamağı = 96 °C' de 10 dakika

b) 96 °C' de 75 saniye
62 °C' de 75 saniye
73 °C' de 75 saniye

} 35 döngü

c) Final uzatma basamağı = 72 °C' de 5 dakika.

C.III PCR Ürünlerinin Uygun Kesim Enzimleriyle Kesilmesi (RFLP)

Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP-PCR DNA' daki tek nükleotid değişikliklerin saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin prensibi, tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan DNA' yı küçük parçalara kesen restriksiyon enzimlerinin kullanılmasına dayanır. Restriksiyon enzimi DNA molekülünü kesmesine veya kesmemesine bağlı olarak, sonuçta kişiden kişiye değişiklik gösteren farklı uzunlukta DNA parçaları ortaya çıkar. İşte, DNA' nın restriksiyon enzimleriyle kesimi sonrasında oluşan fragmanların boyutlarındaki farklılıklar RFLP olarak tanımlanır.

A. MspA1 I (10U/μL, Promega, Madison WI, USA) Restriksiyon Enzimi ile Kesim TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) gen bölgesi

10x Restriksiyon enzimi tamponu	2μL
Steril su	16.3μL
BSA	0.2μL
MspA1 I	0.5μL
PCR ürünü	10μL

Karışım 37 °C' de 1.5 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri görüntüleme yapılana kadar +4 °C' de buzdolabında saklandı.

B. *Bgl I* (10U/ μ L, Fermentas, USA) Restriksiyon Enzimi ile Kesim

TGF β 1 Arg25Pro (c.915G>C) gen bölgesi

10x Restriksiyon enzimi tamponu	2 μ L
Steril su	17 μ L
<u><i>Bgl I</i></u>	1 μ L
PCR ürünü	10 μ L

Karışım 37 °C’ de 5 dakika inkübe edildi. Kesim ürünleri görüntüleme yapılana kadar +4 °C’ de buzdolabında saklandı.

C.IV Kesim Ürünlerinin SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile Görüntülenmesi

A. Kullanılan Çözeltiler:

1. % 40 Akrilamid/Bisakrilamid Solüsyonu (50mL)

Akrilamid : 19.45g

Metilen Bisakrilamid : 1.1g

Bir beher içine alındı ve distile su ile 50 mL’ ye tamamlandı. Oda ısısında (20 °C) koyu renkli şişede 12 ay dayanıklı.

2. “Lower Jel 4X Buffer” [1.5 M TRIS-HCl (pH: 8.8), % 0.4 SDS] (50mL):

36 mL 2 M TRIS-HCl (pH: 8.8)

2 mL % 10 SDS

12 mL Distile Su

3. 2 M TRIS-HCl (pH: 8.8) (100 mL):

24.2g Trisma base

Yaklaşık 50mL distile su ile karıştırılır, yavaşça konsantre HCl eklenerek pH: 8.8’ e ayarlanır. Daha sonra distile su ile 100mL’ ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

4. % 10 SDS (50mL):

5g SDS

Distile su ile çözülerek 50mL’ ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

5. % 10 Amonyum persülfat (1mL):

0.1g APS (amonyum persülfat)

Distile su ile 1mL' ye tamamlanır. Daha sonra 200-250µL' lik porsiyonlara ayrılarak eppendorf tüplere konularak -20 °C'de saklanır. Maksimum 1 hafta saklanabilir.

6. "Upper Jel 4X Buffer" [0.5 M TRIS-HCl (pH: 6.8), % 0.4 SDS] (50mL):

25mL 1 M TRIS-HCl (pH: 6.8)

2mL % 10 SDS

23mL Distile Su

7. 1 M TRIS-HCl (pH: 6.8) (100mL):

12.1g Trisma base

Yaklaşık 50mL distile su ile karıştırılır, yavaşça konsantre HCl eklenerek pH: 6.8' e ayarlanır. Daha sonra distile su ile 100mL' ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

8. Elektroforez Tamponu (10X Running Buffer) (25 mM TRIS-HCl, 192 mM Glisin, % 0.1 SDS) (100mL):

3g Trisma base

14.4g Glisin

1g SDS

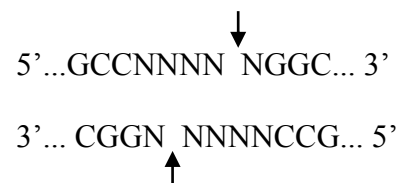
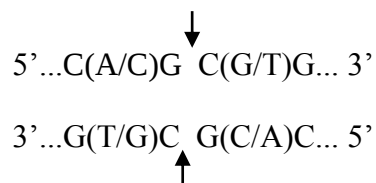
Distile suda çözülerek 100mL' ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır. Elektroforez sırasında 10 kat sulandırılarak kullanılır (1X Running Buffer).

C.V Genotip Tayini

Hem Kodon 10 hem kodon 25 için verilen ortak primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiş olan PCR ürünü 294 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Restriksiyon enzimleri bu ürününü aşağıda okla gösterilen bölgeden keser.

MspAII

BglI



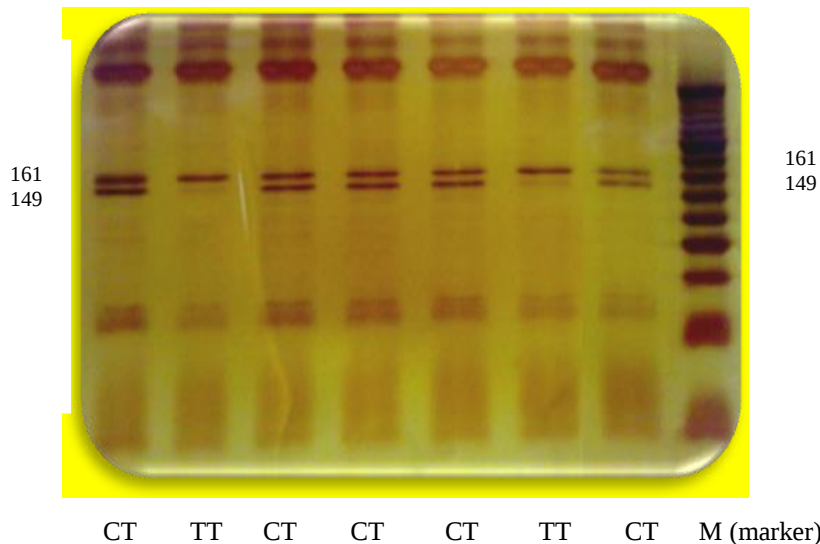
Leu10Pro (c.869T>C) – T allelin varlığı 161, 67, 40 ve 26 bç; C allelin varlığı ise 149, 67, 40, 26 ve 12 bç uzunluğundaki fragmanları (bantları) verir. T alleli 161 bç, C alleli ise 149 fragmanı ile tanımlanır (Şekil 3. 2.).

Arg25Pro (c.915G>C) – G allelin varlığı 131, 103 ve 60 bç; C allelin varlığı ise 131 ve 163 bç fragmanları verir. C alleli 131 fragmanı ile tanımlanır. G alleli ise 163 bç fragmanın kayboluşu ve 103 bç fragmanın belirmesi ile tanımlanır. Her iki allelin varlığında 131 bç uzunluğundaki fragman görülür (Tablo 3. 3.). Leu10Pro (c.869T>C) ve Arg25Pro (c.915G>C) polimorfizmlerinin RFLP detayları Tablo 3.2.’ de yer almaktadır.

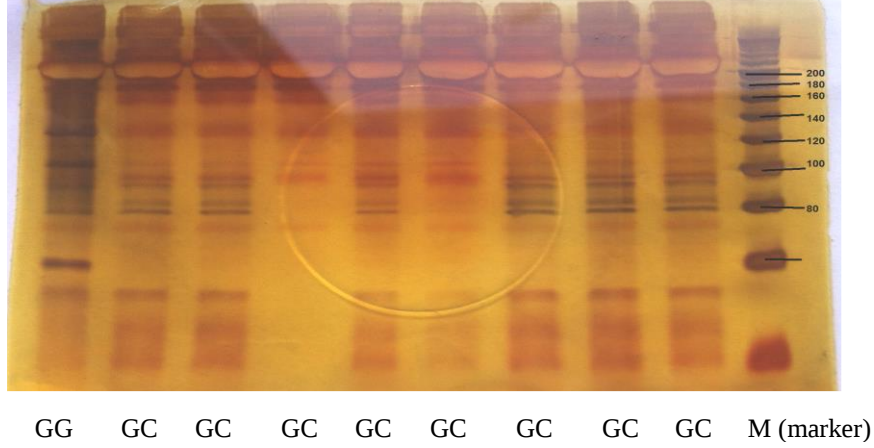
Tablo 3.2. TGFβ1 PCR- Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).

Bölge	Enzim	İnkübasyon	Polimorfizm	Genotip	Fragman uzunluğu (bç)
Leu10Pro (c.869T>C) rs1800470	<i>MspA1I</i>	3 saat 37°C	T/C	TT	161,67,40,26
				CT	161,149,67,40,26,12
				CC	149,67,40,26,12
Arg25Pro (c.915G>C) rs1800471	<i>BglI</i>	3 saat 37°C	G/C	GG	131,103,60
				CG	163,131,103,60
				CC	163,131

Şekil 3.2. *MspA1I* [Leu10Pro (c.869T>C)] kesim enzimi ile yapılan ve %15 poliakrilamid jelde yürütülüp, gümüş boyama yapıldıktan sonra bantların görünümü



Şekil 3.3. *Bgl*I [Arg25Pro (c.915G>C)] kesim enzimi ile yapılan ve %15 poliakrilamid jelde yürütülüp, gümüş boyama yapıldıktan sonra bantların görünümü



D. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatiksel analizler için SPSS paket programı kullanıldı. Çeşitli genotipler ve bunların birbiri ile kombinasyonlarını değerlendirmek için Odds Oranı (OR) ve %95 güven aralığı (CI) hesaplandı. Gruplar arası anlamlılığı karşılaştırmak için Ki kare (χ^2) testi kullanıldı. Klinik ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, parametreler arasında korelasyon olup olmadığını değerlendirmek için Spearman korelasyon testi kullanıldı.

Genotip dağılımlarının gerçek Mendeliyen popülasyonunu yansıtıp yansıtmadığını, yani Hardy – Weinberg eşitliğine uyum sağlayıp sağlamadığını kontrol etmek için gruplarda normal ve mutant allellerin sıklığı bulundu.

4. BULGULAR

Çalışmamızda HT tanısı konmuş 178 hasta ile 197 sağlıklı bireylerin periferik kan lökositlerinden izole edilen DNA örneklerinde TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) ve Arg25Pro (c.915G>C) polimorfizmleri belirlendi. HT hastalarının ve sağlıklı kontrollerin demografik bilgileri Tablo 4.1.' de verilmiştir.

Tablo 4. 1. HT hastalarının ve sağlıklı kontrollerin demografik bilgileri (ortalama ± standart sapma)

	Kontrol (n=197)	HT (n=178)
Yaş (yıl)	37.7± 10.2	40.1 ± 10.2
Aralık	18-68	16-78
HT bulgusu		
< 40 yaş n (%)	-	81 (45.5)
>40 yaş, n (%)	-	97 (54.5)
Cinsiyet		
Erkek n (%)	27 (13.7)	20 (11.2)
Kadın n (%)	170 (86.3)	158 (88.8)
Aile Öyküsü, n (%)	-	89 (50.0)
Anti-TPO (IU/mL)	-	634.4 ± 377.4
Anti-TG (IU/mL)	-	596.6 ± 379.5
Sigara, n (%)	107 (54.3)	91 (51.1)
VKİ (kg/m²)	25.7 ± 4.11	27.59 ± 5.5
Sistolik KB (mmHg)	120.2 ± 9.4	116.7 ± 11.3
Diastolik KB (mmHg)	70.5 ± 7.8	73.7 ± 7.2
TSH (mIU/L)	1.78 ± 1.1	4.5 ± 3.7*
Serbest T₃ (pmol/L)	3.5± 0.4	3.1 ± 0.4
Serbest T₄ (pmol/L)	13.9 ± 3.0	14.6 ± 3.9
Kolesterol (mg/dL)	179.1 ± 39.1	192.5 ± 34.7
Trigliserit (mg/dL)	102.5 ± 53.8	109.9 ± 55.4
HDL-K (mg/dL)	57.4 ± 12.8	59.0 ± 12.3
LDL-K (mg/dL)	106.1 ± 31.0	111.9 ± 30.5

Man- Whitney U testi, * p<0.05

Kısaltmalar: HT (Hashimoto tiroidit), anti-TPO (anti-tiroid peroksidaz), anti-TG (anti-tiroglobulin), VKİ (vücut kütle indeksi), KB (kan basıncı), TSH (tiroid stimüle edici

hormon), HDL-K (yüksek dansiteli lipoprotein- kolesterol), LDL-K (düşük dansiteli lipoprotein- kolesterol)

1) Hardy-Weinberg eşitliğine uyum

Kontrol grubunda her iki lokusun genotip dağılımlarının gerçek Mendeliyen popülasyonu yansıttığı ve Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulundu.

Tablo 4.2. Hardy-Weinberg eşitliğine göre kontrol grubu ve Hashimoto Hastalarının (HT) p değerleri

	Kontrol	HT
Leu10Pro(c.869T>C)	0.066	0.006
Arg25Pro(c.915G>C)	0.569	0.003

2) TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) Genotip Dağılımları ve Allel Sıklıkları

- Kontrol grubundaki bireylerin % 40.6' sının TT, %50.8' nin CT ve %8.6' sının CC genotipinde olduğu saptandı. Bu bireylerde T ve C allellerinin sıklıkları sırasıyla 0.66 ve 0.34 olarak hesaplandı (Tablo 4.3).
- HT hastalarının %32.6' sının TT, %57.3' nün CT ve %10.1' inin CC genotipinde olduğu saptandı. Bu bireylerde T ve C allellerinin sıklıkları sırasıyla 0.61 ve 0.39 olarak hesaplandı (Tablo 4.3).
- Kontrol ve HT hasta gruplarının TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) genotip dağılımı ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4.3).
- Kontrol grubundaki TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) T ve C allellerin sıklıklarının Kanadalı sağlıklı popülasyondaki T ve C allellerinin dağılımlarına çok yakın olduğu bulundu (53).

3) TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C) Genotip Dağılımları ve Allel Sıklıkları

- Kontrol grubunun GG, CG ve CC genotip dağılımları sırasıyla %80.2, %18.3 ve %1.5 olarak belirlendi. Kontrol grubunun G ve C allel sıklıkları sırasıyla 0.89 ve 0.11 olarak hesaplandı (Tablo 4.3).
- HT hastalarının GG, CG ve CC genotip dağılımları sırasıyla %63.5, %36.5 ve %0 olarak belirlendi. HT hastalarının G ve C allel sıklıkları sırasıyla 0.82 ve 0.18 olarak hesaplandı (Tablo 4.3).
- HT hastalar grubuna ait genotip dağılımları ve allel sıklıkları kontrol grubu ile kıyaslandığında, CG genotip dağılımı ve C allel sıklığı HT hastalarında daha

yüksek olduğu bulundu (OR: 2.53, %95 güven aralığı: 1.57-4.05, $p < 0.001$; ve OR: 1.87, %95 güven aralığı: 1.23-2.84, $p = 0.003$) (Tablo 4.3).

- Kontrol grubundaki TGF β 1 Arg25Pro (c.915G>C) G ve C allellerin sıklıklarının Arjantinli sağlıklı popülasyondaki G ve C allellerin dağılımlarına çok yakın olduğu bulundu (55).

Tablo 4.3. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) gen polimorfizminin kontrol ve Hashimoto tiroditinde genotip dağılımları ve allel sıklıkları.

	Kontrol n (%)	HT n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
Leu10Pro(c.869T>C)				
TT	80 (40.6)	58 (32.6)	1.0 ^a	-
CT	100 (50.8)	102 (57.3)	1.41 (0.91-2.18)	0.12
CC	17 (8.6)	18 (10.1)	1.46 (0.69-3.07)	0.32
CT+CC	117	110	1.42 (0.93-2.16)	0.11
T allel sıklığı	0.66	0.61	1.0 ^a	
C allel sıklığı	0.34	0.39	1.23 (0.91-1.66)	0.18
Arg25Pro(c.915G>C)				
GG	158 (80.2)	113 (63.5)	1.0 ^a	-
CG	36 (18.3)	65 (36.5)	2.53 (1.57-4.05)	<0.001
CC	3 (1.5)	0 (0)	0.20 (0.01-3.90)	0.14
CG+CC	39	65	2.33 (1.46-3.71)	0.003
G allel sıklığı	0.89	0.82	1.0 ^a	
C allel sıklığı	0.11	0.18	1.87 (1.23-2.84)	0.003

Her *p*-değeri Ki-kare (χ^2) analizine göre hesaplanmıştır.

^a OR için Referans değeri

4) HT hastalarında TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) ve Arg25Pro (c.915G>C) genotip dağılımlarına göre tiroid hormonları ve anti-tiroid antikor düzeyleri (Tablo 4. 4)

TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C) genotipleri ile tiroid hormon ve anti-tiroid antikorlarının düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü. TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C) polimorfizmine gelince, CG genotipine sahip olan hastalarda GG genotipine göre TSH düzeyleri daha yüksek olduğu bulundu (p= 0.006).

Tablo 4. 4. Hashimoto tiroidit hastalarında polimorfizmler ile tiroid hormon düzeyleri ve anti tiroid antikorları arasındaki ilişki [Ortalama (aralık)]

TGFβ1 Leu10Pro (c.869T>C)	TT	CT + CC
Serbest T ₃ (pmol/L)	3.13 (2.57-4.89)	3.14 (1.71-4.28)
Serbest T ₄ (pmol/L)	10.4 (0.56-1.71)	12.8 (0.68-1.44)
TSH (mIU/L)	3.3 (0.03-24.40)	3.8 (0.27-42.00)
Anti-TPO (IU/mL)	727.3 (10.0-1087.0)	665.0 (10.0-1000.0)
Anti-TG (IU/mL)	550.6 (10.0-3000.0)	645.4 (20.0-3000.0)
TGFβ1 Arg25Pro (c.915G>C)	GG	CG
Serbest T ₃ (pmol/L)	3.13 (1.71-4.28)	3.08 (2.4-4.89)
Serbest T ₄ (pmol/L)	15.8 (0.68-1.71)	12.3 (0.56-1.44)
TSH (mIU/L)	3.69 (0.03-24.40)	6.06 (0.27-42.00)*
Anti-TPO (IU/mL)	617.0 (10.0-1000.0)	662.0 (10.0-1087.0)
Anti-TG (IU/mL)	527.9 (10.0-3000.0)	719.6 (20.0-3000.0)

Man-Whitney U testi, *p= 0.006 CG genotipi GG genotipi ile karşılaştırıldığında

Kısaltmalar: Anti-TPO (anti-tiroid peroksidaz), Anti-TG (anti-tiroglobulin), TSH (tiroid stimüle edici hormon)

5. TARTIŞMA

TGFβ1 immün homeostazın sürdürülmesi ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynayan anti-inflamatuar ve immünosupresif bir sitokindir (61, 64). TGFβ1 tiroid fonksiyonlarını da etkileyerek iyodun tiroid bezine alınmasında, tiroid hormonlarının sentez ve salgılanmasında, tiroglobulin ve tiroid peroksidaz ekspresyonunun baskılanmasında önemli rol oynar (60). TGFβ1 ile HT' li hastalarda görülen tiroid fonksiyon bozukluğu, tiroid bezindeki yaygın lenfosit infiltrasyonu ve serumda anti-tiroid antikorlarının artışı arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (31, 76). TGFβ1, immün hücrelerde pro-inflamatuar sitokin sentezini baskılayarak ve adezyon moleküllerinin sitokinlerle başlatılan indüksiyonunu engelleyerek immünosupresif etkiler göstermektedir (4, 21). TGFβ1, T hücrelerinin proliferasyon ve differansiasyonunu inhibe ettiği gibi, B hücrelerini de baskılayarak antikor üretimini azaltmaktadır. T hücrelerinin özel bir alt tipi olan Treg, vücudun kendi-antijenlerine karşı gelişen toleransın oluşmasında ve T hücrelerinin inhibisyonunda çok önemli rol oynamaktadır (4). TGFβ1, Treg hücrelerinin fizyolojik süpresif fonksiyonlarının devamını sağlamaktadır (21,28, 61). Dolayısıyla, TGFβ1' nin azalmış ekspresyonu otoimmün hastalıkların gelişmesi için önemli bir rol oynamaktadır. Gerçekten, bizim (78) ve Akıcı ve ark' nın (1) yaptığı çalışmalarda HT' de serumda TGFβ1 düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. Öte yandan, farelerde yapılan bir çalışmada TGFβ1 üretimi ile Treg hücre sayısı arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmiştir (57). Buna göre, TGFβ1 düzeylerinde azalma Treg hücrelerinde azalmaya ve böylece bu hücrelerin fizyolojik supresif etkisinin ortadan kalkmasıyla tiroid hasarına ve hipotiroidizme neden olabilir.

Kodon 10 ve kodon 25' deki polimorfizmler 29 amino asitten oluşan sinyal peptidiyle ilgilidir. Bilindiği gibi, sinyal peptidler proteinin posttranslasyonel modifikasyonunu ve ekspresyon hızını kontrol eder, dolayısıyla yüksek veya düşük plazma konsantrasyonlarına neden olur (8). Kodon 25' te G' nin yerine C allelin geçmesi (Arg25Pro) TGFβ1' in ekspresyon ve sekresyonunun azalmasına neden olur (32, 68). Kodon 10' a gelince, bazı çalışmalarda T allelin (Leu) (32, 79), bazılarında ise C allelin (Pro)(18) artmış TGFβ1 üretimi ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Her iki polimorfizm sinyal peptidin hidrofobik α-heliksinde değişikliklere neden olur ve böylece proteinin endoplazmik retikulum boyunca transportunu ve hücre dışına salgılanışını etkiler (8, 79). Kodon 10' da alifatik yan zincire sahip olan Leu yerine

siklik yapılı Pro gelmesi, sinyal peptidin heliks yapısını değiştirir. Kodon 25'te yüklü Arg yerine polar olmayan Pro gelmesi ise sinyal peptidin karboksil bölgesindeki karakteristik polaritenin değişmesine neden olur (79). Özetle, sinyal peptidini kodlayan dizide görülen bu polimorfizmler, TGFβ1 düzeylerinde, fonksiyon ve metabolizmasında değişikliklere neden olabilir (79).

TGFβ1 genindeki polimorfizmler Graves hastalığı (GH), HT, sistemik skleroz, otoimmün hepatit ve romatoid artrit gibi birçok otoimmün hastalıklarda araştırılmıştır (6,12,18,43,53,55,70,83). Kodon 10' da T alleli ve TT genotipinin mevcudiyetinin romatoid artrit (70) ve sistemik skleroz (43) ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, kodon 10 polimorfizmi ile skleroderma (12) ve psöriazis (6) gibi hastalıklar arasında bir ilişki olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Gerçekten, biz de daha önce yaptığımız bir çalışmada GH ile kodon 10 polimorfizmi arasında bir ilişki bulamadık (18). Buna karşılık, Yamada ve ark. ise akut (intractable) GH olan bireylerde C alleli sıklığının, remisyondaki hastalara oranla daha yüksek olduğunu ve bu polimorfizmin GH ile bir ilgisi olabileceğini bildirmiştir (83). Aynı araştırma grubu, ılımlı ve ciddi HT' li hastalarda kodon 10 polimorfizmini araştırmış ve yüksek T alleli sıklığının hastalığın ciddiyeti ile bir ilişkisi olabileceğini öne sürmüştür. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma HT' de kodon 10 polimorfizmini araştıran literatürdeki tek çalışmadır. Bu nedenle, çalışmamızda HT' li hastalarda kodon 10 polimorfizmini araştırmak istedik. Yamada ve ark.' nın bulgularının aksine, çalışmamızda kontrol ve HT gruplarında kodon 10' daki allel ve genotip dağılımları arasında bir fark bulunmadığı belirlendi. Ayrıca, HT' li hastalarda serumda serbest T3, serbest T4, TSH ve tiroid otoantikor düzeyleri ile kodon 10 polimorfizmi arasında da bir ilişki olmadığı bulundu.

TGFβ1 kodon 25 polimorfizmine gelince, bazı araştırmacılar Arg25Pro polimorfizmi ile skleroderma (12) ve psöriazis (6) arasında bir ilişki olmadığını, bazıları artmış juvenil artrit (53), bazıları azalmış pediatrik otoimmün hepatit (55) riski ile ilgili olduğunu bildirmiştir. Daha önce GH' de yapmış olduğumuz bir çalışmada kodon 25' te C allelinin (Pro) hastalığın gelişmesi için bir risk faktörü olabileceği belirlendi (18). Yapmış olduğumuz literatür taramasında, HT' de TGFβ1 Arg25Pro polimorfizmi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Bu nedenle, çalışmamızda kodon 10' un yanısıra kodon 25 polimorfizmi de HT' li hastalarda incelendi. Elde ettiğimiz bulgulardan da görüldüğü gibi, C allelinin kontrollere kıyasla HT hastalarında yaklaşık 2 kat artmış olduğu saptandı. Ek olarak, CG genotipine sahip olan bireylerde GG genotipine kıyasla HT gelişme riskinin 2.5 kat arttığı bulundu. Ayrıca, CG heterozigot

hastalarda, TSH düzeylerinin GG homozigot hastalardan daha yüksek olduğu belirlendi. Gerçekten, Oen ve ark. da CG ve CC genotipli juvenil r matoid artritli hastalarda eklem hasarının daha fazla olduğunu bildirmiştir (53). Sonuçlarımıza göre, C alleleline sahip hastalarda TGF 1  retimindeki yetersizliğin, T hücre sitotoksitesindeki artış sonucu tiroid bezinde hasara ve hipotiroidiye neden olabileceği ileri sürülebilir. Gerçekten, lokal ve sistemik TGF 1 uygulaması birçok hücre-aracılığıyla gerçekleşen deneysel otoimmün hastalığın önlenmesinde başarılı bir yöntem olarak bulunmuştur (27, 75). Düşük TGF 1 üretiminden sorumlu olduğu saptanan C alleli ile otoimmün hastalıklar arasındaki bu ilişki, TGF 1' in immün homeostazın korunması ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde etkinliğinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada dünya literatüründe ilk kez HT ile TGF 1 Arg25Pro tek nükleotid polimorfizmi (SNP) arasındaki ilişki araştırılmış ve bu polimorfizmin HT gelişmesi için bir risk faktörü olduğu ve yüksek TSH düzeyleri ile bir ilişki gösterdiği bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Akıncı B, Çömlekçi A, Yener S, Bayraktar F, Demir T, Özcan MA, Yüksel F, Yeşil S. Hashimoto's thyroiditis, but not treatment of hypothyroidism, is associated with altered TGF- β 1 levels. *Arch Med Res* 2008; 39:397-401.
2. Allen EM, Apel MC, Braverman LE. The effect of iodide ingestion on the development of spontaneous lympholytic thyroiditis in the diabetes prone BB/W rat. *Endocrinology* 1986; 118:1977- 81.
3. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF-beta activation. *J Cell Sci* 2003; 116:217-24.
4. Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowlus CL, Ansari AA, Gershwin M. Transforming growth factor β (TGF- β) and autoimmunity. *Autoimmunity Rev* 2005; 4:450-59.
5. Atkins MB, Mier JW, Parkinson DR, Goul JA, Berkman EM, Kaplan MM. Hypothyroidism after treatment with interleukin- 2 and lymphokine- activated killer cell. *N Eng J Med* 1988; 318: 1557- 63.
6. Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E. TGF- β 1 gene polymorphisms in psoriasis vulgaris. *Cytokine* 2007; 38: 8-11.
7. Bidey SP, Hill DJ, Eggo MC. Growth factors and goitrogenesis. *J Endocrinol* 1999; 160: 321-32.
8. Bosco P, Ferri R, Salluzzo MG, Castellano S, Signorelli M, Nicoletti F, Nuovo SD, Drago F, Caraci F. Role of transforming- growth- factor- β 1 gene in late-onset Alzheimer's disease: implication for the treatment. *Current Genomics* 2013; 14: 147-56.
9. Boukis MA, Koutras DA, Souvatzoglou A. Thyroid hormone and immunologic studies in endemic goitre. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 859- 62.
10. Bretz JD, Baker JR Jr. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a trail to thyroid destruction? *Clin Endocrinol* 2001; 55: 1- 11.
11. Brown J, Solomon DH, Beall GN. Autoimmune thyroid disease: Graves and Hashimoto's. *Ann Intern Med* 1978; 88: 379- 82.
12. Büyük U, Ateş Ö, Dalyan L, Müsellim B, Öngen G, Topal-Sarıkaya A. Analysis of transforming growth factor beta1 (TGF- β 1) gene polymorphisms in Turkish patients with scleroderma. *Cell Biochem Func* 2010; 28: 274-77.

13. Champion BR, Page KR, Parish N. Identification of a thyroxine- containing selfepitope of thyroglobulin which triggers thyroid autoreactive T cell. *J Exp Med* 1991; 174: 363- 70.
14. Chen JR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF-beta receptor to c-myc repression. *Cell* 2002; 110: 19-32.
15. Chistiakov DA. Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *J Autoimmune Dis* 2005;2: 1.
16. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577-84.
17. Devendra D, Eisenbarth GS. Immunological endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:624- 36.
18. Doğru-Abbasoğlu S, Vural P, Baki M, Özderya A, Karadağ B, Uysal M. Arg25Pro (c.915G>C) polymorphism of transforming growth factor β 1 gene increases the risk of developing Graves' disease. *Int Immunopharmacol* 2014; 20: 366-69.
19. Doniach D. Hashimoto's thyroiditis and primary myxedema viewed as separate entities. *Eur J Clin Invest* 1981; 11: 245- 9.
20. Drexhage H, Bottazzo G, Bitensky L. Thyroid growth- blocking antibodies in primary myxedema. *Nature* 1981; 289: 594.
21. Drugarin D, Negru S, Koreck A, Zosin I, Cristea C. The pattern of a T_H1 cytokine in autoimmune thyroiditis. *Immunol Lett* 2000; 71: 73-7.
22. Ebner SA, Lueprasitsakul W, Alex S. Iodine content of rat thyroglobuline affects its autogenicity in inducing lympholytic thyroiditis in the BB/Wor rat. *Autoimmunity* 1992; 13: 209- 14.
23. Erden S, Buyukozturk S, Vural P, Degirmencioglu S. Acute-phase reactants in Hashimoto thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1863-5.
24. Feng XH, Derynck R. Specifity and versality in TGFbeta signaling through smads. *Annu Cell Dev Biol* 2005; 21: 659-93.
25. Fiducia M, Lauretta R, Lunghi R, Kyanvash S, Pallotti S. Hashimoto's thyroiditis and autoimmunity parameters: descriptive study. *Minerva Med* 2007; 98: 95-9.
26. Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopsetty A, Prabhakar B. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31: 721-31.

27. Giladi E, Raz E, Karmeli E, Okon E, Rachmilewitz D. Transforming growth factor- β gene therapy ameliorates experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 341-7.
28. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2000;98: 257-65.
29. Hmadzadeh M, Rosenberg SA. TGF- β 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* 2005;174:5215–23.
30. Hoekmank K, von Blomberg- van Der Flier BM, Wagstaff J, Drexhage HA, Pinedo HM. Reversible thyroid dysfunction during treatment with GM-CSF. *Lancet* 1991; 338: 541-2.
31. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WR, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489-99.
32. Hutchinson IV, Turner D, Sankaran D, Awad M, Pravica M, Sinnott P. Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. *Transplant Proc* 1998; 30: 3991-2.
33. Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA. The helix-loop-helix protein Id2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 1994; 8: 1270-84.
34. Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 2002; 10: 283-94.
35. Ilicin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın S, Süleymanlar G, İç Hastalıkları cilt 2 2. Baskı Ankara: Günes Kitapevi ISBN 975- 8531- 78- 6. S:2217- 19.
36. Jackson IMD, Hennessey JV, Thyroiditis. In: Becker KL, editors. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Third edition. Lippincott Williams&Wilkins. S. 456-8.
37. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 51-8.
38. Jublanc C, Beaudeau J.L, Aubart F, Raphael M, Chadarevian R, Chapman MJ, Bonnefont-Rousselot D, Bruckert E. Serum levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1, are elevated

- in patients with autoimmune thyroid disorders: Relevance to vascular inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21: 817-22.
39. Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; 11: 915-26.
 40. Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Kim NK, Hong SH, Bang YJ. Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 420-34.
 41. Koloğlu S, Erdoğan G. Tiroid: Genel görüş ve bilgiler. Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik 2nd edition. Erdoğan G (ed). MN Medikal&Nobel, Ankara 2005;155-172.
 42. Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kemer H, Ejmer LS, Tony Parks W, Gotfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danjelpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Ducked CS, Lechleider RJ, Steller H, Orly J, Kim SJ, Roberts AB. A novel mitochondrial septin-like protein ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 915-21.
 43. Lee EB, Kim JY, Lee YJ, Abdallah A, Lympany P, Song YW. Transforming growth factor- β 1 polymorphisms in Korean patients with systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 2004; 63: 491-5.
 44. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:99-146.
 45. Limachi F, Basso S. Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid disease. *Thyroid* 2002; 12: 27- 34.
 46. Lorini R, Gastaldi R, Traggiai C, Perucchin PP, Hashimoto's Thyroiditis. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003; 2: 205- 11.
 47. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 657–79.
 48. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91.
 49. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-810.

50. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000; 21: 228–34.
51. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573-84.
52. Mulder KM. Role of Ras and Mapks in TGF-beta signaling. *Cytokine Growth factor Rev* 2000; 11: 23-35.
53. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, Reed M. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2005; 44: 1115-21.
54. Okamoto Y, Hamada N, Saito H, Ohno M, Noh J, Ito K, Morii H. Thyroid peroxidase activity-inhibiting immunoglobulins in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 730-4.
55. Paladino N, Flores AC, Fainboim H, Schroder T, Cuarterolo M, Lezama C, Ballerga EG, Levi D, Tanno H, Costanzo G, Arruvito L, Fainboim L. The most severe forms of type I autoimmune hepatitis are associated with genetically determined levels of TGF- β 1. *Clin Immunol* 2010; 134: 305-12.
56. Pardali K, Kurisaki A, Moren A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakis A. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21 (Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2000; 275: 29244-56.
57. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Fox3-expressing CD4⁺CD25⁺regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4572-7.
58. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 708-14.
59. Petritsch C, Beug H, Balmain A, Oft M. TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev* 2000; 14: 3093-101.
60. Pisarev MA, Thomasz L, Guvenal GJ. Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth. *Thyroid* 2009; 19: 881-92.
61. Prud'homme GJ, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF- β 1) in autoimmune disease. *J Autoimmunity* 2000; 14: 23-42.

62. Rasmussen AK. Cytokine actions on the thyroid gland. *Dan Med Bull* 2000; 47: 94- 114.
63. Ruwhof C, Draxhage HA. Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid* 2001; 11: 427- 36.
64. Seddon B, Mason D. Regulatory T cells in the control autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC-cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* 1999; 189: 279-88.
65. Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J. TGFb influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitors p15INK4b. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 400-8.
66. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
67. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-21.
68. Stanczuk GA, McCoy MJ, Hutchinson IV, Sibanda EN. The genetic predisposition to produce high levels of TGF- β 1 impacts on the severity of eclampsia/pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol* 2007; 86: 903-908.
69. Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: a new model of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 195-204.
70. Sugiura Y, Niimi T, Sato S, Yoshinouchi T, Banno S, Naniwa T, Maeda H, Shimizu S, Ueda R. Transforming growth factor β 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 826-8.
71. Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelberg TC, Urrutia R. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 2365-74.
72. Taddei S, Caraccio N, Viridis A, Dardano A, VersariD, Ghiadoni L, Savletti A, Ferrannini E, Monzani F. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effects of levothyroxin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3731-7.
73. Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Test for recovery from hypothyroidism during thyroxine therapy in Hashimoto's thyroiditis. *Lancet* 1990; 336: 1084-6.

74. Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta- Smad signaling. Trends Biochem Sci 2004; 29: 265-73.
75. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Envolvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor β during production of collagen type II arthritis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 7375-9.
76. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present and future. Thyroid 2010; 20: 715-25.
77. Tunbridge WM, Vanderpump MP. Population screening for autoimmune thyroid disease. Endocrinol Metab Clin North Am 2000; 29: 239- 53.
78. Vural P, Degirmencioglu S, Erden S, Gelincik A. The relationship between transforming growth factor- β 1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis. Int Immunopharmacol 2009; 9: 212-5.
79. Walter P, Johnson AE. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. Annu Rev Cell Biol 1994; 10: 87-119.
80. Weetman AP. New aspect of thyroid immunity. Horm Res 1997; 4: 51-4.
81. Weetman AP. Causes of hypothyroidism. Werner & Ingbar's. The Thyroid 2005, 9.ed S:700.
82. Xu L, Massague J. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. Nat Rev mol Cell Biol 2004; 5: 209-19.
83. Yamada H, Watanabe M, Nanba T, Akamizu T, Iwatani Y. The +869T/C polymorphism in the transforming growth factor- β 1 gene with severity and intractability of autoimmune thyroid disease. Clin Exp Immunol 2008; 151: 379-82.
84. Yoshida H, Amino N, Yagawa K, Uemura K, Satoh M, Miyai K, Kumahara Y. Association of serum antithyroid antibodies and lymphocytic infiltration of the thyroid gland: studies of 70 autopsied cases. J Clin Endocrinol Metab 1978; 46: 859- 62.

FORMLAR

HASTA TAKİP FORMU

Adı Soyadı:	Dosya No.
Yaş-Cinsiyet:	Tel:
Boy:	Kilo:
	BMI:
Sistolik TA:	Diastolik TA:
Aile Hikayesi (HT):	
Özgeçmiş (DM, İKH, SVH, Malignite, Otoimmün hastalık):	
Sigara:	
TFT:	FT3:
	FT4:
	TSH:
Anti-TPO:	Anti-TG:
	Tiroid USG:
Nodül:	> 1cm
	< 1cm
Lipid Profili: T.Kol:	TG:
	HDL:
	LDL:
	VLDL:
AKŞ:	İnsülin:
	HOMA-R:
Üre:	Kreatinin:
	AST:
	ALT:
CRP:	Sedim:
	Hemogram:
Tanı yılı:	Tedavi alıyor:
	dozu:
	almıyor:

GENOTİP

TGF beta1 Leu10Pro (c.869T>C)

TGF beta1 Arg25Pro (c.915G>C)

KONTROL TAKİP FORMU

Adı Soyadı: Dosya No.

Yaş-Cinsiyet: Tel:

Boy: Kilo: BMİ:

Sistolik TA: Diastolik TA:

Aile Hikayesi:

Özgeçmiş (HT, DM, İKH, SVH, Malignite, Otoimmün hastalık):

Sigara:

TFT: FT3: FT4: TSH:

Anti-TPO: Anti-TG: Tiroid USG:

Nodül: > 1cm < 1cm

Lipid Profili: T.Kol: TG: HDL: LDL: VLDL:

AKŞ: İnsülin: HOMA-R:

Üre: Kreatinin: AST: ALT:

CRP: Sedim: Hemogram:

Tanı yılı: Tedavi alıyor: dozu: almıyor:

GENOTİP

TGF beta1 Leu10Pro (c.869T>C)

TGF beta1 Arg25Pro (c.915G>C)

ETİK KURUL KARARI

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ŞEEAH İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK DANIŞMA KURULU

Sayı:132

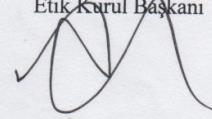
Konu: Etik kurul kararı

Tarih:10.08.2010

Uzm. Dr. Berrin Karadağ

“Otoimmün tiroid hastalıklarında kronik inflamasyon belirteçleri ve DNA tamir enzimlerini kodlayan gen polimorfizmlerinin incelenmesi” isimli çalışmanızın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.Yüksel Altuntaş
Etik Kurul Başkanı



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SEVGİN	Soyadı	DEĞİRMENCİOĞLU
Doğ.Yeri	BULGARİSTAN	Doğ.Tar.	07.12.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	45760215134
Email	esmesese_sevgin@hotmail.com	Tel	0535 897 59 31

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı	2009
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2005
Lise	Bahçeşehir Atatürk Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	İthalat-İhracat sorumlusu	Molgen Biyoteknoloji	2011-devam
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	Çok İyi		
Bulgarca	Zayıf	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	İyi
SPSS	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Erden S, Buyukozturk S, Vural P, **Degirmencioglu S**: Acute-phase reactants in Hashimoto thyroiditis. *Int Immunopharmacol* **8**, 1863-1865 (2008).

2. Vural P, **Degirmencioglu S**, Erden S, Gelincik A: The Relationship Between Transforming Growth Factor- β 1, Vascular Endothelial Growth Factor, Nitric Oxide and Hashimoto's Thyroiditis. *Int Immunopharmacol* **9**, 212-215 (2009).
3. Vural P, **Degirmencioglu S**, Parildar-Karpuzoglu H, Dogru-Abbasoglu S, Hanagasi HA, Karadag B, Gurvit H, Emre M, Uysal M: The combinations of TNF α -308 and IL-6 -174 or IL-10 -1082 genes polymorphisms suggest an association with susceptibility to sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* **120**:396-401 (2009).
4. Vural P, **Degirmencioglu S**, Dogru-Abbasoglu S, Saral NY, Akgul C, Uysal M: Genetic polymorphisms in DNA repair gene APE1, XRCC1 and XPD and the risk of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **146**:160-164 (2009).
5. Vural P, **Değirmencioglu S**, Saral NY, Akgül C: Tumor Necrosis Factor α (-308), Interleukin-6 (-174) and Interleukin-10 (-1082) Gene Polymorphisms in Polycystic Ovary Syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **150**: 61-65 (2010).
6. Kirecci SL, Simsek A, Gurbuz ZG, Mimaroglu S, Yuksel A, Vural P, **Degirmecioglu S**. Relationship between plasma melatonin levels and the efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors treatment on premature ejaculation. *Int J Urol* **21**: 917-920 (2014).

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Sinema, Yüzmek, Futbol.