

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

**DİFERANSİYE TİROİD KANSERLERİ VE NODÜLER GUATRLI HASTALARDA
VİTAMİN D RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. ABDULLAH GÜNEŞ

KOCAELİ 2014

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

**DİFERANSİYE TİROİD KANSERLERİ VE NODÜLER GUATRLI HASTALARDA
VİTAMİN D RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. ABDULLAH GÜNEŞ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ANIL ÇUBUKÇU**

**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI BAŞKANI
PROF. DR. ZAFER UTKAN**

ETİK KURUL ONAY TARİHİ : 10.06.2014

PROJE NO : 2014/168

TEŞEKKÜRLER

Genel Cerrahi eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Mustafa Dülger, Prof. Dr. Zafer Utkan, Prof. Dr. Oğuz Özbay, Prof. Dr. Zafer Cantürk, Prof. Dr. Ahmet Alponat, Prof. Dr. Nuri Gönüllü, Prof. Dr. Anıl Çubukçu, Doç. Dr. Erdem Okay, Doç. Dr. Oğuzhan Büyükgebiz, Yrd. Doç. Dr. Oktay Yirmibeşoğlu, Yrd. Doç. Dr. Utku Yılmaz, Yrd. Doç. Dr. S. Ata Güler'e, hepimizde çok ayrı bir yeri olan Fatma Uygun'a, asistanlığım süresince birlikte günler ve geceler geçirdiğim asistan arkadaşlarıma, çalışma hayatımızı kolaylaştıran tüm sekreter, hemşire ve personel arkadaşlara;

Tezim için büyük çalışma ve katkıları olan sayın Prof. Dr. Anıl Çubukçu, Yrd. Doç. Dr. S. Ata Güler, Doç. Dr. Emel Ergül'e, tezimin yapım aşamasında çok önemli katkılarda bulunan Dr. Ömer Yavuz, Dr. Emin Göksel Aydın ve Arş. Gör. Nihal Üren'e;

Tüm eğitim ve çalışma hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Tezimi, her zaman yanımda olan ve yaptığım her işte desteğini esirgemeyen eşim Ayfer Sakarya Güneş ile aramıza yeni katılan oğluma ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| TEŞEKKÜRLER | i |
| İÇİNDEKİLER..... | ii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | iv |
| TABLolar DİZİNİ | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | vi |
| ÖZET..... | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. AMAÇ VE KAPSAM..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1. Tarihçe..... | 2 |
| 2.2. Embriyoloji..... | 2 |
| 2.3. Anatomi | 3 |
| 2.4. Tiroid Fizyolojisi | 5 |
| 2.5. Benign Tiroid Hastalıkları | 6 |
| 2.5.1. Guatr tanımı ve multinodüler guatr..... | 6 |
| 2.5.2. Toksik nodüler guatr | 7 |
| 2.5.3. Graves hastalığı..... | 8 |
| 2.5.4. Tiroiditler | 8 |
| 2.6. Tiroid Kanserleri..... | 9 |
| 2.6.1. Tiroid tümörlerinin etyolojisi..... | 10 |
| 2.6.2. Tiroid tümörlerinin evrelemesi | 11 |
| 2.6.2.1. Papiller tiroid karsinomu | 12 |
| 2.6.2.2. Folliküler tiroid karsinomu..... | 13 |
| 2.6.2.3. Hurthle hücreli tiroid karsinomu | 13 |
| 2.6.2.4. Medüller tiroid karsinomu..... | 14 |

| | |
|---|----|
| 2.6.2.5. Anaplastik tiroid karsinomu | 14 |
| 2.7. D Vitamini ve Kanser | 14 |
| 2.8. Vitamin D Reseptörü | 15 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 16 |
| 3.1. Çalışmanın Tipi ve Evreni | 16 |
| 3.2. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi | 16 |
| 3.3. Çalışmanın Etik İzni | 16 |
| 3.4. Çalışmaya Alınma ve Çıkarılma Kriterleri | 16 |
| 3.5. Çalışmanın Çıkarımları | 17 |
| 3.6. Örneklerin Toplanması | 17 |
| 3.6.1. Periferik kandan DNA izolasyonu | 17 |
| 3.6.2. PCR-RFLP | 18 |
| 3.6.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 18 |
| 3.6.2.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) | 22 |
| 3.6.2.3. Kesim ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi | 24 |
| 3.6.2.4. Gümüş Boyama | 24 |
| 3.6.2.5. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan kimyasallar | 25 |
| 3.6.2.6. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan tampon ve çözeltiler | 25 |
| 3.6.2.7. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan cihazlar | 25 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz | 26 |
| 4. BULGULAR | 27 |
| 5. TARTIŞMA | 31 |
| 6. KAYNAKLAR | 34 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Tiroid anatomisi | 4 |
| Şekil 2. TaqI ve ApaI PCR şartları | 20 |
| Şekil 3. FokI PCR şartları..... | 20 |
| Şekil 4. BsmI PCR şartları..... | 21 |



TABLolar DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü guatr derecelendirmesi | 6 |
| Tablo 2. Tiroiditlerin sınıflandırılması | 9 |
| Tablo 3. Tiroid tümörlerinin WHO tarafından belirlenen sınıflaması..... | 10 |
| Tablo 4. Folliküler tiroid karsinomunda kötü prognoza işaret eden faktörler | 13 |
| Tablo 5. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları | 19 |
| Tablo 6. VDR geni SNP tespitinde kullanılan primerler | 21 |
| Tablo 7. SNP tayininde kullanılan enzimler, alleller ve bantları..... | 22 |
| Tablo 8. Enzimler ve kesim bölgeleri..... | 23 |
| Tablo 9. Enzimler ile PCR ürünlerinin kesim şartları | 23 |
| Tablo 10. Poliakrilamid jel elektroforezi koşulları..... | 24 |
| Tablo 11. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni BsmI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 27 |
| Tablo 12. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni FokI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 27 |
| Tablo 13. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni ApaI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 28 |
| Tablo 14. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni TaqI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 28 |
| Tablo 15. Nodüler guatrlı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni FokI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 29 |
| Tablo 16. Nodüler guatrlı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni BsmI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 29 |
| Tablo 17. Nodüler guatrlı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni ApaI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 30 |
| Tablo 18. Nodüler guatrlı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni TaqI polimorfizmindeki genotip dağılımı | 30 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------|---|
| VDR | : Vitamin D reseptörü |
| TSH | : Tiroid stimulan hormon |
| T4 | : Tiroksin |
| T3 | : Triiyodotironin |
| TRH | : Tirotrop serbestleştirici hormon |
| MIT | : Monoiyodotirozin |
| DIT | : Diiyodotirozin |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü |
| MNG | : Multinodüler guatr |
| LATS | : Uzun etkili tiroid uyaran antikor |
| TRAb | : Tiroid reseptör antikorları |
| DTC | : Diferansiye tiroid kanseri |
| ATC | : Anaplastik tiroid kanseri |
| EORTC | : European Organization for Research on Treatment of Cancer |
| PTC | : Papiller tiroid karsinomu |
| FTC | : Folliküler tiroid karsinomu |
| İİAB | : İnce iğne aspirasyon biyopsisi |
| MEN | : Multipl endokrin neoplazi |
| μ L | : Mikrolitre |
| PCR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RFLP | : Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi |
| dNTP | : Deoksiribonükleozid trifosfat |
| SPSS | : Statistical Package for the Social Sciences |

DİFERANSİYE TİROİD KANSERLERİ VE NODÜLER GUATRLI HASTALARDA VİTAMİN D RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Tiroid bezinin benign ve malign hastalıkları, toplumda çok sık görülmekte, izlemi, takibi ve cerrahisi ile pratiğimizde çok önemli yer tutmaktadır. Her yıl sadece ülkemizde binlerce hasta tiroid hastalıkları nedeniyle opere edilmektedir. Bunlardan daha fazlası ise polikliniklerde takip edilmektedir. Tiroid malignitelerinde radyasyon ve aile öyküsü ön plana çıkmaktadır. Erken tanı almış iyi diferansiye tiroid malignitelerinde 5 yıllık sağ kalım oranı %90'ların üzerindedir. Bu nedenle erken tanı, hastalığın prognozu açısından çok önemli bir yere sahiptir. Özellikle son 10 yılda yapılan çalışmalar sonucu genetik ile tiroid hastalıkları arasında kuvvetli bağların bulunduğu saptanmıştır. Vitamin D reseptör geni polimorfizmleri, pek çok hastalıkta özellikle mesane, kolon, meme, over kanseri gibi malignitelerde ön plana çıkmıştır. Bu polimorfizmlerin saptanması bir çok hastalıkta erken tanı veya tedaviyi mümkün kılmaktadır.

Bu çalışmada benign tiroid hastalıkları ve diferansiye tiroid kanserli vakalar ile kontrollerin Vitamin D reseptör genindeki FokI, BsmI, ApaI ve TaqI polimorfizmlerinin, benign tiroid hastalıklar ve diferansiye tiroid kanseri ile ilişkileri değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler : diferansiye tiroid kanseri, nodüler guatr, vitamin D reseptör geni, polimorfizm

EVALUATION OF VITAMIN D RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS WITH THE DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMAS AND NODULAR GOITRE PATIENTS

ABSTRACT

Benign and malign diseases of thyroid gland are highly common in society and its observation, monitoring and surgery is very important. Each year thousands of patients are operated because of thyroid diseases. Even more of them are being followed up in the outpatient clinics. For thyroid malignancies, radiation and family background stands out. Early diagnosed, good differentiated malignancies have more than %90 of five-year survival rates. Thus, it is really important to early diagnoses in the terms of prognosis. Especially in the last 10 years studies, it is shown that there was a strong connection between genetics and thyroid diseases. Vitamin D receptor gene polymorphism stands out in the bladder, colon, breast, ovarian cancers. Determination of these polymorphisms helps early diagnosis and treatment for a lot of patients.

In this study, the relation between benign thyroid diseases and differentiated thyroid cancers with control groups, and FokI, BsmI, ApaI and TaqI polymorphisms in vitamin D receptor gene within the benign thyroid diseases and differentiated thyroid cancer are evaluated.

Keywords : differentiated thyroid carcinoma, nodular goitre, vitamin D receptor gene, polymorphism

1. AMAÇ VE KAPSAM

Günümüzde benign ve malign tiroid hastalıkları nedeniyle pek çok hasta hastanelere başvurmaktadır. Bu sebeplerle tanı ve tedavi girişimleri yanında etyolojilerinin de araştırılması gerekmektedir. Yapılan literatür taramalarında D vitamini genindeki polimorfizmlerin gerek tiroid, gerekse diğer organların benign ve malign hastalıklarıyla ilişkilerine rastlanılmaktadır.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda benign veya malign tiroid hastalığı tanısı konulup, opere edilen 216 hasta ile yine 216 gönüllü sağlıklı kişi çalışmamıza dahil edildi. Bu hastalar, patoloji raporlarına göre sınıflandırılarak Vitamin D reseptör (VDR) geninin polimorfizmleri değerlendirildi.

Bu çalışmanın amacı; tiroid hastalıklarında ve özellikle diferansiye tiroid kanserlerinin etyogenezinde rol aldığı düşünülen VDR genindeki polimorfizmleri tespit ederek ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Guatr hastalığı tiroid bezinin tanımlanmasından çok daha önce Hindulara ait gözlemlerden dolayı bilinmekle beraber (1), bezi ilk kez Galen (M.S.160-200) tarif etmiştir. Leonardo da Vinci, çizimlerinde tiroidi larinksin iki yanında iki ayrı bez olarak göstermiştir. “Tiroid bezi” adı ilk kez Bartholomeus Eustachius tarafından kullanılmış; fakat çalışmaları yayınlanmadığı için, yazılı kayıtlarda tiroid adı ilk kez (1656) Thomas Wharton’un ”Adenographia” adlı eserinde (1656) geçmektedir (1, 2). Hipertiroidizm veya egzoftalmik guatrın tanımı ise; ilk kez Parry (1786), Greaves (1835) ve Basedow (1840) tarafından yapılmıştır (1, 3).

Çok yüksek ölüm oranı nedeniyle tiroid cerrahisi önceleri tehlikeli görülmüştür. İlk cerrahi girişimi 1170 yılında Roger Frugardi tanımlamıştır (1, 3). Tiroid cerrahisi ondokuzuncu yüzyılın ortalarındaki anestezi, antisepsi ve hemostaz konularındaki gelişmelere kadar %40 gibi bir mortalite ile çok tehlikeli olmaya devam etmiştir (1).

Modern anlamda tiroidektomi operasyonları ilk kez Emil Theodor Kocher ve Theodor Billroth tarafından yapılmıştır. Hastaların tiroidektomi operasyonundan sonra uzun süre yaşamaları, daha önce fark edilemeyen bazı klinik sonuçları ortaya çıkarmıştır. Total tiroidektomi yapılan hastalarda miksödem ve çocuklarda kretinizm bulguları ortaya çıkmıştır (1). George Murrey, 1891’de bir koyun tiroidinden hazırladığı ekstreyi deri altına enjekte ederek miksödemi ilk defa tedavi etmiştir (4). İlk kez Kendall, 1915 yılında tiroksini kristalize etmiş; Harrington, 1926 yılında aktif hormon olan L-triiodotironin’i tanımlamıştır (1, 2).

2.2. Embriyoloji

Brankial arkus ve faringeal poşlar gelişirken, yaklaşık 24. günde primitif farinksin tabanında orta hatta, birinci ve ikinci poşlar arasında kalan bölgede, tiroid bezi bir divertikül şeklinde başlar ve ventrale doğru büyür. Divertikülün ağzı dil köküne açıktır ve foramen caecum adını alır. Embriyolojik olarak primitif mide-barsak sisteminin bir uzantısıdır. Divertikülün distal lümeni hücrelerin hızla çoğalmasıyla kapanırken hem ventrale hem de her iki laterale doğru büyümeye devam ederek iki loblu tiroid haline döner ve boyun orta hattında hyoid kemik ve larinksi oluşturacak yapıların önünden aşağıya doğru inmeye başlar (5).

Altıncı haftadan itibaren; üçüncü faringeal poşun dorsal bölgeleri alt paratiroidlere, ventral bölgeleri ise primitif timusa döner. Dördüncü faringeal poş da dorsal ve ventral olarak iki kısma ayrılır. Dorsal kısım üst paratiroidleri, ventral kısımlar nöral kristadan gelen hücrelerle beraber ultimobrankial cismi oluşturur (5-7).

Tiroid kaudale doğru inerken, divertikülün açık kalan kısmı uzayarak tiroglossal kanal adını alır. Kanal, çoğunlukla dejenerasyona uğrayarak kaybolur ve yedinci hafta sonunda tiroid son şeklini alır. Tiroid gelişimindeki kritik devre yedinci hafta sonuna kadar olan devre olup, gelişim anomalilerinin çoğu bu süreçte ortaya çıkar (5-9).

Gebeliğin onuncu haftasının sonunda tiroidde folliküller oluşur, onikinci haftanın sonunda da tiroid iyot tutmaya ve kolloid üretmeye başlar. On üçüncü haftadan itibaren hipofiz ve serumda tiroid stimulan hormon (TSH) belirlenebilir. On sekizinci haftadan itibaren TSH ve tiroksin (T4) paralel olarak artmaya başlar ve tiroiddeki iyot konsantrasyonu yüksek düzeylere ulaşır. TSH, triiyodotironin (T3) ve T4 doğumdan sonra, birkaç hafta içinde erişkindeki normal düzeye ulaşır (5, 7, 8).

2.3. Anatomi

Erişkin tiroid bezi ortalama 15-20 gr ağırlığındadır. Sağ ve sol iki lob ve bunları birleştiren isthmustan oluşmaktadır. Ayrıca %50-80 sıklıkla bu yapılara ilave olarak isthmustan yukarıya doğru uzanan ve tiroglossal kanalın kalıntısı olan piramidal lob bulunur. Genellikle orta hattın biraz solunda ve tiroid kıkırdağına kadar uzanır (10).

Her bir lobun boyu 4-5 cm, eni 2-3 cm, kalınlığı 2-4 cm olup tiroid kıkırdağın ortası ile 6. trakeal halka arasında uzanır. Lateralinde karotis kılıfı ve sternokleidomastoid kası yer alır. Tiroid bezi yüzeyden derine doğru; deri, süperfisyel fasya, derin boyun fasyasının yüzeyel tabakası ve bu tabakanın örttüğü sternokleidomastoid, omohyoid, sternohyoid ve sternotiroid kasları (strap kasları) tarafından örtülür. Arka medialde özofagus ve trakea tarafından sınırlanmıştır (10, 11). Tiroid normalde komşu organlardan rahatlıkla ayrılabilir durumdadır. Posterior süspansuar ligament (Berry ligamenti) aracılığı ile krikoid kıkırdak ve üst trakeal halkalara sıkıca yapışıktır. Lateral lobun posterosüperiorunda süperior, posteroinferiorunda inferior paratiroidler bulunur.

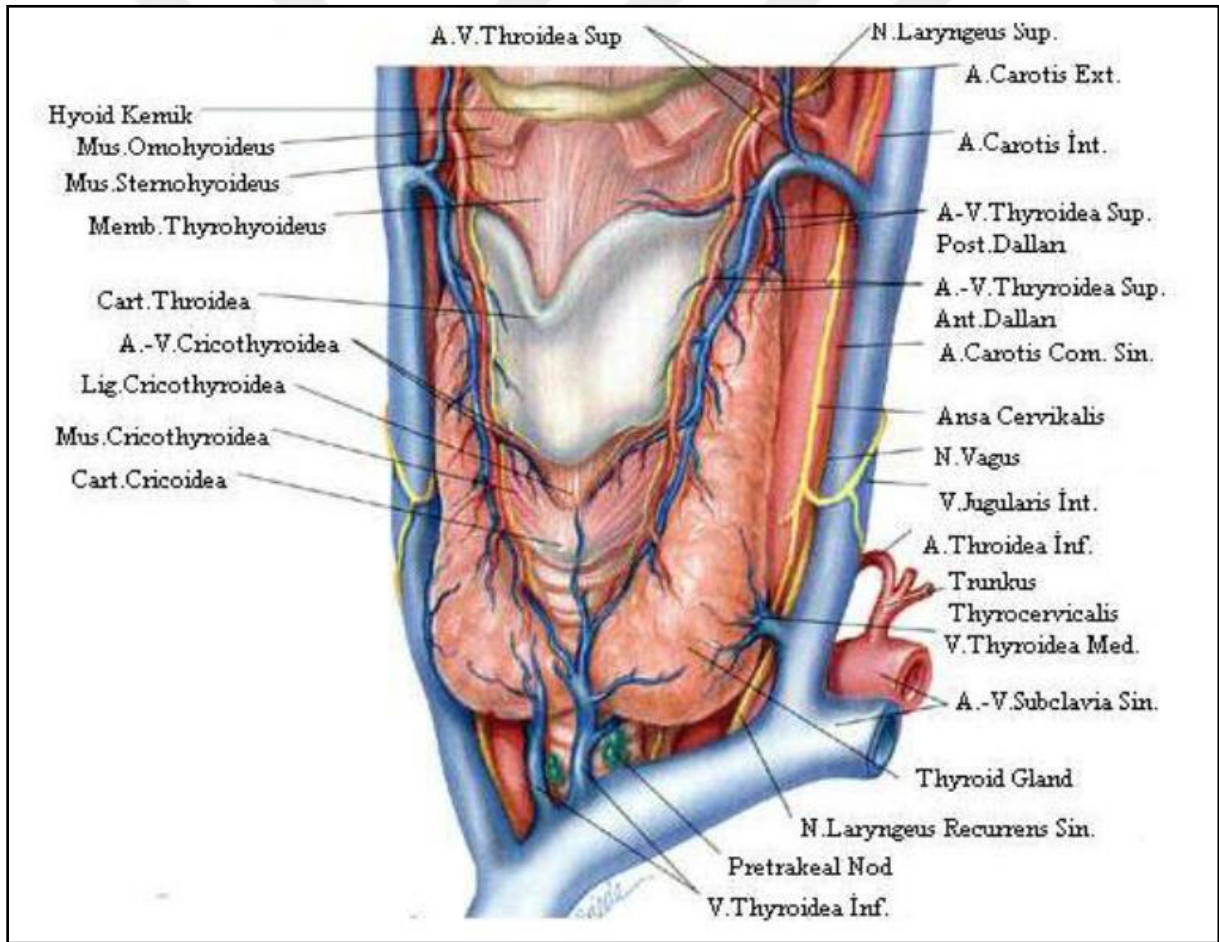
Bağ dokusundan oluşan bir kapsül, bezi sarar ve organın stromasını yapan septalar oluşturur. Buna tiroidin gerçek kapsülü denir. Gerçek kapsülün dışında pretrakeal fasyanın devamı olan ikinci bir kapsül vardır ki buna yalancı veya cerrahi kapsül adı verilir.

Tiroidektomide diseksiyon bu iki kapsül arasından yapılır.

Bezin kanlanması süperior ve inferior tiroid arterleri ile olur. Süperior tiroidal arter, bifurkasyonun hemen üzerinden eksternal karotis arterden çıkar ve aşağı doğru ilerleyerek tiroidin üst polüne girer. Bu bölgede süperior laringeal sinir, artere paralel seyrederek.

İnferior tiroidal arter genellikle truncus tirocervicalisten nadiren de subklavian arterden köken alır. Karotis arterinin ve juguler venin arkasından geçerek prevertebral fasyayı deler ve iki dala ayrılarak posterolateralden tiroide girer. Nervus laryngeus recurrens bu iki dalı ön, arka ve arasından çaprazlar. Nadir olarak arcus aortadan çıkan ve inferiordan tiroide giren beşinci bir arter (thyroidea ima) bulunur.

Tiroidin venleri tiroid yüzeyinde bir pleksus oluşturarak üst, orta ve alt tiroidal venlere dökülür. Üst ve orta venler internal juguler vene, alt venler ise pleksus oluşturarak brakiosefalik vene drene olur (12).



Şekil 1. Tiroid anatomisi

Lenfatik drenaj subkapsüler bir pleksus aracılığı ile parakapsüler bölge, pretrakeal alan, internal juguler ve rekürren sinir komşuluğundaki lenf bezlerine olur. İstmusun üzerinde

ve trakeanın önünde palpe edilen lenf bezine “Delphian Nodu” denir ve genellikle malignite veya tiroiditle birlikte görülür (10).

Innervasyonunu üst ve orta servikal sempatik gangliyonlardan gelen lifler ve vagustan kaynaklanarak laringeal sinirlerin dalları ile gelen parasempatik lifler sağlar.

Rekürren laringeal sinirler larinksin intrinsek kaslarını innerve ederler. Tiroidektomi esnasında zedelendiğinde aynı tarafta vokal kord paralizisi meydana gelmektedir. Sağ rekürren sinir sağ subklavian arterin önünde vagus sinirinden çıkar ve arterin altından dönerek arkasından yukarıya yönelir. Daha sonra trakeösefagial olukta seyrederek, tiroid sağ lobunun arkasından geçer ve krikotiroid kasının arkasından larinkse girer. Sol rekürren laringeal sinir arcus aorta düzeyinde vagustan ayrılır, aortun posterioruna dönerek trakeösefagial oluğa yönelir ve sağdaki sinire benzer şekilde tiroide girer. Aslında insanların sadece %64’ünde sağ, %77’sinde sol rekürren sinir trakeösefagial olukta seyrederek (12).

Süperior laringeal sinir, gangliyon nodosumun hemen altından nervus vagustan çıkar. Öne ve aşağı doğru ilerleyerek larinkse yaklaşıncaya iç (internal) ve dış (eksternal) olmak üzere iki dala ayrılır. İnternal dal epiglottis ve larinks mukozasında dağılan sensitif dallar verir. Eksternal dal ise krikotiroid ve farinksin konstrüktör kaslarına motor dallar verir (13).

2.4. Tiroid Fizyolojisi

Tiroidin folliküler hücrelerinden tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) hormonları salgılanır. Ayrıca parafolliküler hücrelerden de kalsiyumun metabolizmasında etkili olan kalsitonin salgılanmaktadır. T3 ve T4 genel anlamda bazal metabolizmayı düzenleyen hormonlardır. Hücre içinde bulunan nükleus reseptörlerine bağlanarak protein yapımını regüle ederler. Ayrıca mitokondrilerde oksidasyon olaylarını hızlandırır, membran yapısında yer alan enzimlerin aktivitesini kontrol etmek gibi fonksiyonları da vardır. Bu bağlamda tiroid hormonları yaşam için mutlak gereklidirler (14).

Tiroidden T3 ve T4 sekresyonu anterior hipofizden salgılanan tiroid stimulan hormonun (TSH) kontrolü altındadır. TSH uyarısı T3 ve T4 salınımını uyarırken, kandaki T3 ve T4 artışı hipofizden TSH salınımını suprese eder (negatif feed-back) ve salınımı ise hipotalamustan salgılanan tirotrop serbestleştirici hormon (TRH-tirotropin releasing hormon) kontrolü altındadır (15, 16).

Tiroid hormonlarının oluşumu eksojen iyot alımına bağlıdır. Follikül hücresinde tirozine bir iyot bağlanması ile monoiyodotirozin (MIT), iki iyot bağlanması ile diiyodotirozin (DIT) oluşur. İki DIT eşlendiğinde T4, bir MIT ile bir DIT eşlendiğinde T3 meydana gelir.

Tiroid hormonları tiroglobuline (Tg) bağı olarak follükül içindeki kolloidde depolanır. T3 ve T4 tiroglobulinden ayrılarak serbest hormon şeklinde kana salgılanırlar ve tamamına yakını plazma proteinlerine bağlanırlar. Plazmadaki tiroid hormonlarının %0,02'si serbest haldedir ve bunlar fizyolojik olarak aktif fraksiyonu oluşturur.

Tiroid bezinden salgılanan hormonun %90'ı T4, %10' u ise T3'tür. Bununla birlikte tiroksinin önemli bir bölümü (%75-85) kanda triiyodotironine çevrilir (T4'ün T3'e deiyodinasyonu). Bu çevrilme çok önemlidir çünkü T3 plazmada 10-20 kat daha az miktarda bulunsa da T4'ten dört kat daha aktiftir. Tiroid hormonları hedef hücreye pasif diffüzyonla veya ATP bağımlı aktif transportla geçer. Daha sonra hücre çekirdeğindeki tiroid hormon reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar (15, 16).

2.5. Benign Tiroid Hastalıkları

2.5.1. Guatr tanımı ve multinodüler guatr

Tiroidin herhangi bir nedenle büyümesine guatr denir. Bezin büyüklüğü, objektif bir şekilde hacim ya da boyut olarak ultrasonografi ile belirlenebilir. Büyümesi durumunda kolayca palpe edilen ve çoğu zaman gözle görülen bu bezin büyüklüğü; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 'nün derecelendirmesine göre subjektif olarak saptanır (1, 17, 18) (Tablo 1).

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü guatr derecelendirmesi

| | |
|----|---|
| 0 | Palpasyon ve gözlemlle guatr yok |
| 1 | Palpasyonla fark edilebilen guatr |
| 1A | Guatr yalnız palpasyonla fark edilebiliyor |
| 1B | Guatr palpasyonla var, boyun ekstansiyonda gözle de görülebiliyor |
| 2 | Boyun normal pozisyonda iken görülebiliyor |
| 3 | Uzaktan görülen belirgin guatr |

Guatrlar, endemik ya da nonendemik olarak sınıflandırılırlar. İyot eksikliği olan bölgelerde, nüfusun %10'undan fazlasında guatr ortaya çıkıyorsa; bu guatrlar endemik olarak adlandırılır. İyot kaynakları yeterli olan ülkelerde ise, insanlara yiyecek ve ilaçlarla fazla miktarda iyot verildiğinde, tiroid hormon sentezi azalır ve guatr gelişir; bu guatrlar da nonendemik guatr olarak adlandırılır (1, 17, 18). Multinodüler guatr (MNG) ise; tiroidin birçok alanında olan nodüllerle büyümesine verilen bir isimdir. Tiroid nodülleri; toksik ya da nontoksik, diffüz ya da nodüler ve soliter ya da multipl şeklinde sınıflandırılabilirler (19).

Diffüz ve nodüler guatr patogeneğinde; yeni follikül oluşumu için folliküler epitel hücrelerinin proliferasyonu esastır. Neoplazik olmayan tiroid büyümesinde; TSH etkisi ve tiroidi büyüten immünglobülinler üzerinde durulmaktadır. Deneysel çalışmalarda; nodüler guatrlarda, epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve transforming büyüme faktörü β 'nin arttırdığı gösterilmiştir (20).

Soliter nodüler guatrlarda, ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) ile değerlendirilen 1,5 cm'nin altındaki nodüllerde hem klinik hem de sitopatolojik malignite kriterleri yoksa; medikal tedavi ile izlem yapılabilir. Diffüz ve ötiroid guatrlarda, süpresyon tedavisinin yararı olmakla birlikte; özellikle soliter nodüllerde bu tedavinin yararı sınırlıdır (34). Süpresyon uygulanan hastalar yakından izlenilmeli, her yıl ultrasonografi ile nodülün büyüüp büyümediği belirlenmeli ve sitopatolojik olarak değerlendirilmelidir. Tedavi altında iken büyüyen nodülde; tek tedavi cerrahidir (1, 21).

Multinodüler guatrlarda, kötü kozmetik görünüm, hava yolu tıkanıklığı, malignite şüphesi varsa cerrahi tedavi önerilmektedir. Baş ve boyuna radyasyon almış veya ailede tiroid kanseri öyküsü olan multinodüler guatrlı hastalarda, kanser riski %40'tır. Ayrıca; bu hastaların yarısında kanser, dominant nodül dışındaki bir bölgede yerleşmiştir. Bu hastalarda da cerrahi tedavi endikedir (18).

2.5.2. Toksik nodüler guatr

Toksik nodüler guatr, diğer adıyla "Plummer" hastalığı; bir veya daha fazla tiroid nodülünün TSH'dan bağımsız olarak fazla miktarda iyot tutması, tiroid hormonu sentezlemesi ve salgılamasıdır. Toksik nodüler guatr olguları daha çok endemik guatr bölgesinde görülür. Toksik nodüler guatrda; hipertiroidizm genellikle Graves'ten daha hafiftir ve oftalmopati, pretibial miksödem, vitiligo veya tiroid arkropatisi gibi tiroid dışı bulgular yoktur (1, 17, 18, 19).

Antitiroid ilaçlar ve beta blokörler ile tedavi; semptomları ortadan kaldırır. Ancak Graves hastalığındaki kadar etkili değildir. İyot tutulumu az olduğundan; radyoaktif iyot tedavisi, Graves'teki kadar etkili değildir ve hastaların daha yüksek dozda iyot alması gerekir. Başarı oranı düşük olduğundan; iyot tedavisi, sadece cerrahi yapılamayacak hasta grubunda uygulanır.

Tercih edilen tedavi şekli; tiroidektomidir. Soliter nodüllerde, nodülektomi veya lobektomi yapılabilir. Toksik multinodüler guatrda çoğu hastada total tiroidektomi önerilir. Bu yöntem; nüks olan olgularda tekrar bilateral girişim yapılmasını engeller (1, 17, 22).

2.5.3. Graves hastalığı

Graves hastalığı ya da diffüz toksik guatr, en sık rastlanan tirotoksikoz tipidir. Graves hastalığı kadınlarda 6 kat fazla görülür. Her yaşta görülebilir de; genç erişkinlerde daha sık ortaya çıkar (17, 23). Graves hastalığı, tiroid follikül hücrelerindeki TSH reseptörlerine karşı, tiroidi uyaran otoantikor ve immünglobülinlerin olduğu bir otoimmün hastalıktır. Antikor bağlanması, reseptörleri uyarır ve klinik tabloyu ortaya çıkaran tiroid hormon salınımı gerçekleşir. Geçmişte sorumlu antikorun; 1956'da Adams ve Purves'in bulduğu uzun etkili tiroid uyaran antikor (LATS) olduğu sanılmıştır. Ancak bugün; geniş bir grup antikorun bu hastalığı ortaya çıkardığı saptanmıştır. Günümüzde; bu antikorların tümüne birden tiroid reseptör antikorları (TRAb) denilmektedir (1, 17). Graves hastalığının klasik triadı guatr, tirotoksikoz ve oftalmopatidir. Bu bulgular, tek başına veya birlikte olabilir. Guatr, genelde diffüz, büyük ve düzgündür. Egzoftalmi, tirotoksikozla birlikte ya da tirotoksikoz olmaksızın tek başına (ötroid veya oftalmik Graves hastalığı) görülebilir (1).

Graves hastalığında üç tedavi vardır: antitiroid ilaçlarla medikal tedavi, radyoaktif İ-131 tedavisi ve subtotal ya da total tiroidektomidir. Tedavi seçimi hastanın yaşına, hastalığın şiddetine, egzoftalmi varlığına, organ büyüklüğüne eşlik eden patolojilere ve hastanın seçimi veya gebelik faktörlerine bağlıdır (1, 17, 23).

2.5.4. Tiroiditler

Tiroiditler, akut bakteriyel enfeksiyonlardan, kronik otoimmün hastalıklara kadar uzanan geniş bir yelpazeyi kapsar. Tiroiditler hastalığın başlangıç hızına, semptom ve

bulguların şiddeti ve süresine göre akut, subakut ve kronik tiroditler olarak 3 ana grup altında sınıflandırılırlar (1, 17, 24) (Tablo 2).

Tablo 2. Tiroditlerin sınıflandırılması

| | |
|----------------------------|--|
| AKUT TİROİDİTLER | Bakteriyel tirodit |
| SUBAKUT TİROİDİTLER | Subakut granülatöz tirodit (De Quervain tiroiditi) |
| | Subakut lenfositik tirodit (Sessiz tirodit) |
| KRONİK TİROİDİTLER | Kronik lenfositik tirodit (Hashimoto tiroiditi) |
| | İnvaziv fibröz tirodit (Riedel struma) |

Tiroditlerde tedavi medikaldir. Hashimoto tiroiditinde, bası semptomu ya da malignite şüphesi varsa cerrahi tedavi endikedir. Riedel tiroiditinde bası semptomlarını ortadan kaldırmak için istmektomi yapılabilir (1, 24).

2.6. Tiroid Kanserleri

Tiroid kanserleri, over kanserinden sonra en sık görülen endokrin sistem kanseridir. Tiroid kanseri prevalansı ile ilgili klasik bilgi her yıl 100.000 kişide 4 yeni klinik tiroid kanserinin çıktığı biçimindedir. Tiroid kanserleri iki ana epitelyal hücreden kaynaklanır. Papiller, folliküler ve Hurthle hücreli kanserler primitif ön barsaktan kaynaklı hücrelerden gelişirler. Medüller tiroid kanseri, nöral krestten kaynaklanan C hücrelerinden gelişir. Folliküler hücre kaynaklı tiroid kanserleri diferansiye (DTC) ve anaplastik tiroid kanseri (ATC) gibi iki ana gruba ayrılır. Diferansiye kanserler, tüm tiroid kanserlerinin %80-90'ını oluşturur ve alt grupları ile birlikte papiller ve folliküler kanserlerden oluşur (25, 26). WHO sınıflandırılmasına göre tiroid tümörleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. Tiroid tümörlerinin WHO tarafından belirlenen sınıflaması

| <u>EPİTELYAL TÜMÖRLER</u> | <u>NON-EPİTELYAL TÜMÖRLER</u> |
|---|--|
| Benign <ul style="list-style-type: none">• Folliküler Adenom• Papiller Adenom | Benign |
| Malign <ul style="list-style-type: none">• Folliküler Karsinom• Papiller Karsinom• Skuamoz Hücreli Karsinom• İndiferansiye (Anaplastik) Karsinom• Medüller Karsinom | Malign <ul style="list-style-type: none">• Fibrosarkoma• Diğerleri |
| <u>SEKONDER TÜMÖRLER</u> | <u>NADİR GÖRÜLENLER</u> |
| <u>SINIFLANDIRILAMAYANLAR</u> | <ul style="list-style-type: none">• Karsinosarkom• Malign Hemangioma• Lenfoma• Teratomlar |
| <u>TÜMÖR BENZERİ LEZYONLAR</u> | |

2.6.1. Tiroid tümörlerinin etyolojisi

- Radyasyon
- Diyetle iyot yetersizliği
- Coğrafi bölge (İzlanda, Hawaii, volkanik bölgeler)
- Guatrojenler (kimyasal ve diyet)
- Daha önce varolan tiroid hastalıkları (kolloidal nodüler guatr, Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi)
- Daha önce geçirilen tiroid ameliyatları (parsiyel tiroidektomi)
- İlaçlar (fenobarbital, difenoksilat, griseofluvin, bisacodil, spironolakton, oral kontraseptifler, prolaktin inhibitörleri, östrojen preparatları)
- Yaş (genç-orta yaşta insidans yüksek; ama prognoz iyidir)
- Cinsiyet (kadınlarda insidans yüksek; ama prognoz iyidir)
- Irk (Yahudiler)
- Aile öyküsü
- Paratiroid Adenomu
- Obezite

- Alkolizm
- Allerji
- Multiparite
- Meme kanseri
- Tonsillektomi
- Gardner sendromu, Cowden hastalığı (27)

Yaş, cinsiyet, histolojik tip ve özellikler (kapsüler ve vasküler tutulum, atipi gibi) tümör yayılım özellikleri (tümör boyutu, çevreye yayılım, uzak metastaz gibi), tedaviye yanıt, moleküler genetik faktörler (reseptörler, onkojenler, HLA gibi), hormonlar (androjen, östrojen) tiroid kanseri prognozunda önemli yeri olan faktörlerdir (27).

2.6.2. Tiroid tümörlerinin evrelemesi

Tümör davranışını tahmin edebilmek amacıyla diferansiye tiroid kanserleri için bir çok sınıflandırma yapılmıştır.

- European Organization for Research on Treatment of Cancer (EORTC), 1979 yılında multivaryasyon analizine dayanan prognostik indeks tanımlamıştır. Çok farklı biyolojik davranışları olan diferansiye, medüller ve anaplastik kanserler beraber değerlendirildiği için bu sistem yaygın biçimde kullanılmamıştır. Bu sınıflamanın değişkenleri; yaş, cinsiyet, histolojik tip, anaplastik karsinom varlığı, tümör evre ve metastatik odaklardır.
- 1987'de Mayo Kliniği'nden Hay ve arkadaşları tarafından önerilen AGES sisteminde; Age (yaş), Grade, Extension (yaygınlık), Size (tümör boyutu) kullanılmıştır.
- 1988'de Lahey kliniğinde Cady ve Rossi'nin tanımladığı AMES sisteminde; Age (yaş), Metastasis (metastaz), Extension (yaygınlık), Size (boyut) kullanılmıştır.
- Pasiaka ve arkadaşları tek başına anlamlı olduğunu gösterdikleri nükleer DNA içeriğinin AMES sistemine eklenmesi ile DAMES biçiminde uygulanmasını önermişlerdir.

- TNM sınıflamasında; tümör boyutu ve çevreye invazyonu, lenf bezi tutulumu ve metastaz varlığı kullanılmıştır.
- AGES sistemine alternatif olarak MACIS sınıflamasında ise Metastasis (metastaz), Age (yaş), Completeness of Resection (rezeksiyonun yeterliliği), Invasion (invazyon), Size (boyut) kullanılmıştır.

TNM skorlama sistemi, kurumlar arası tiroid kanser olgularını klinik ve patolojik açıdan karşılaştırmak için uygulanan bir yöntemdir. Diferansiye tiroid kanserli tüm hastalar AMES, AGES ve MACIS sınıflamalarına göre ise nüks riskleri hesaplanmaktadır. Preoperatif olarak değerlendirildikten sonra yine aynı kriterler göz önünde bulundurularak postoperatif olarak bu hastalar tekrar değerlendirilmelidir (28, 29). Tüm çalışmalarda en önemli üç değişken hastanın yaşı, lokal invazyon ve uzak metastaz varlığıdır (30).

2.6.2.1. Papiller tiroid karsinomu

Papiller karsinom (PTC), tiroid maligniteleri içinde en sık görülenidir. Tüm tiroid kanserlerinin %30'unu oluşturur (30). Tiroid papiller karsinom etyolojisinde external radyasyonun önemli bir rolü vardır. Radyasyonla karşılaşması takiben beşinci yıldan itibaren, en çok da 10-25 yıl sonra görülmektedir. Bu insanların yaklaşık olarak %10'nunda tiroid kanseri gelişmektedir (30, 31, 32).

Papiller tiroid kanserleri makroskobik görünümüne göre okült, intratiroidal (enkapsüle) ve ekstratiroidal (masif) olarak ayrılır. WHO tarafından yapılan tiroid tümörleri sınıflandırmasında "okült" yerine "mikropapiller" kanser terimi önerilmiş ve bunun 1 cm'nin altındaki tümörleri ifade ettiği bildirilmiştir. Papiller tiroid kanserlerinin %70'ini oluşturan ve klinik önemi olan intratiroidal kanserlerin çapı çoğunlukla 1,5 cm veya daha fazladır. Kapsül içermedikleri zaman sınırları, normal tiroid dokusundan zor ayrılır. Masif ya da ekstratiroidal papiller kanserler, çoğunlukla 5 cm'nin üzerinde çapı olan ve tiroid kapsülünü geçerek servikal yumuşak dokulara infiltrate olmuş tümörlerdir (26, 30, 33, 34).

2.6.2.2. Foliküler tiroid karsinomu

Foliküler tiroid karsinomu (FTC), PTC'den sonra ikinci sıklıkta ve %5-15 oranında görülen diferansiye tiroid karsinomudur. FTC, iyot açlığı olan bölgelerde daha sık görülür (26, 35). Sadece sitolojik kriterlere dayanarak foliküler adenom, atipik adenom ve FTC ayrımı yapmak mümkün değildir. İİAB ile foliküler neoplazi, foliküler adenom gibi tanımlar konduğunda cerrahi tedavi gerekliliği ortaya çıkar. Nodülün histopatolojik incelemesinde kapsül ve damar invazyonu yoksa lezyon, foliküler adenom olarak kabul edilir. FTC'de prognoz PTC'ye göre daha kötüdür. FTC'de belirgin istatistiksel anlamı olan kötü prognostik faktörler; tanı sırasında uzak organ metastazı, yaşın 50'den fazla olması ve belirgin damar invazyonudur. Bu faktörlerden en çok birini taşıyan tümörler düşük riskli olarak kabul edilir. Bu tümörlerde 5 yıllık mortalite %1'dir. Bu faktörlerden 2 veya daha fazlasını içeren tümörlerde (yüksek riskli tümörler) ise 5 yıllık mortalite %53'tür. AMES sistemi göz önüne alındığında FTC'li hastaların %80'i düşük risk grubundadır.

Tablo 4. Foliküler tiroid karsinomunda kötü prognoza işaret eden faktörler

| | |
|--|------------------------------|
| İleri yaş (>50) | Multifokalite |
| Cinsiyet | Büyük tümör (>5 cm) |
| Belirgin damar invazyonu | Anöploidi |
| Lenf düğümü metastazı | Tiroid kapsülü infiltrasyonu |
| Yüksek grad | Çevre dokuda infiltrasyon |
| Uzak organ metastazı (kemik, akciğer, beyin) | |

2.6.2.3. Hurthle hücreli tiroid karsinomu

Hurthle hücreli tiroid karsinomu bütün iyi diferansiye tiroid karsinomlarının %0,4-10'unu oluşturur. Medüller tiroid kanseri hariç diğer iyi diferansiye tiroid kanserlerine göre daha agresiftir. Literatürde, Hurthle hücreli neoplazmaları tanımlamak için çeşitli terimler kullanılmıştır. Bunlar; Askanazy, Langhans veya oksifilik tümör, onkositoma, mitokondrioma ve foliküler tiroid karsinomunun oksifil varyantıdır.

Hurthle hücreli tiroid karsinomu için belirgin prognostik faktörler henüz tanımlanmamıştır. Anöploid Hurthle hücreli tiroid karsinomları daha agresif seyreder. 60 yaş ve üstündeki kadınlarda, 5 cm'den büyük çaplı tümör varlığında prognoz daha kötü olduğu belirtilmektedir (26).

2.6.2.4. Medüller tiroid karsinomu

Medüller tiroid karsinomu, parafoliküler C hücrelerinin malign lezyonu olup tüm tiroid malignitelerinin yaklaşık %10'unu oluşturur. Herediter ve sporadik olmak üzere iki farklı klinik tablo oluşturur. Herediter formu, multipl endokrin neoplazi tip 2 sendromunun bir parçasıdır (MEN-2) veya non-MEN formu ailevi olabilir (26).

Medüller tiroid karsinomu'nda kalsitonin düzeylerinin ölçülmesinin iki ana nedeni vardır. Birincisi, serum kalsitonin düzeyi tanıyı kesinleştirir. Palpabl tiroid tümörleri varlığında, bazal kalsitonin konsantrasyonu çoğunlukla 1000 pg/L'den fazladır. Tümör büyüklüğü ve bazal kalsitonin düzeyini saptamak ve pentagastrin uyarı testini yapmak, postoperatif dönemde cerrahinin yeterliliğini, lokal rekürrensi veya metastazları değerlendirmek açısından önemlidir.

2.6.2.5. Anaplastik tiroid karsinomu

Anaplastik tiroid karsinomu, hızlı büyüme göstererek çevre dokulara kısa zamanda invazyon yapan ve seyrek rastlanan indifferansiye tümördür. Tiroid kanserlerinin en agresif tipidir. Primer tiroid kanserleri arasında %5-14 görülme oranına sahiptir. Anaplastik kanserler, ya doğrudan primer olarak veya iyi diferansiye tiroid karsinomunun anaplastik kansere transformasyonu sonucu ortaya çıkar. Genelde anaplastik karsinomda 2 yıllık yaşam süresi %0-17,5 yıllık yaşam süresi %10 civarında bildirilmektedir.

2.7. D Vitamini ve Kanser

D vitamininin iki majör formu vardır: D2 [kalsiferol ya da 1,24-dihidroksivitamin D(2)] ve D3 [kalsitriol ya da 1,25-dihidroksivitamin D(3)]. Antikanser özellikler, primer olarak D3 vitamini ile ilişkilendirilmiştir (36). D3 vitamini, vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. Bu ligand-reseptör kompleksi; hücre ve hücre siklusu üstünde anti-proliferatif, anti-metastatik ve pro-apoptotik etkileri olan 60 kadar genin transkripsiyonunu düzenler (37-40). D3 vitamini ve

analoglarının, kültürdeki kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe edip apoptozisi teşvik ettiğini gösteren laboratuvar çalışmaları mevcuttur (41-45). Bu bulgular, insanlarda tiroid kanseri tedavisinde, potansiyel yeni terapötik ajan olarak yarar sağlayabilecek D vitamini analoglarının geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. Yüksek D vitamini seviyesine sahip olanlarda kanser riskinin daha düşük olarak gözlenmesi de, D vitamini'nin kanser gelişmesinde kritik bir rol oynadığı hipotezini destekler (46-48).

2.8. Vitamin D Reseptörü

Vitamin D reseptörü (VDR) 1969 yılında keşfedilmiştir (49). VDR reseptör geni 12.kromozomun uzun kolunda (12q12-14), en az 5 promotor bölgeyle beraber bulunmakta ve DNAnın 60 kb sini kapsayan en az 11 eksondan oluşmaktadır (50, 51). İlk ekson translyasyona uğramazken (52) 2-8. eksonlar VDR proteinini kodlarlar. VDR geninin polimorfizmleri birkaç kanser formu ve diğer kronik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (49). VDR gen polimorfizmlerinin hem kanser görülme riskini hem de kanser prognozunu etkileyebildiği varsayılmıştır.

2.9. Genel VDR Polimorfizmleri ve İlişkili Allelleri

VDR gen polimorfizmlerinin meme ve renal kanserlerle ilişkili yapılan çoğu çalışma, 7 polimorfizm üzerine yoğunlaşmıştır: ekson II deki FokI (53), intron VIII deki BsmI (54) ve ApaI (55), ekson I deki Cdx2 (56), ekson IX daki TaqI (57), intron VIII deki Tru91 (58) ve genin 3'-UTR bölgesinde bulunan poly(A) (59) mono-nükleotid tekrarı. TaqI polimorfizmi açısından bireyler tt, Tt ya da TT şeklinde genotiplendirilir (T alleli : TaqI restriksiyon konumunun bulunmaması; t alleli : TaqI restriksiyon geninin bulunması). FokI polimorfizmi, genin 5'-UTR bölgesine yakın bulunmaktadır. FokI polimorfizmin f alleli, F allelinden daha az transkripsiyonel aktivite gösterir (60, 61). Diğer bütün polimorfizmler, genin 3'-UTR bölgesine yakın olarak bulunmuştur (62). 3'-UTR bölgesindeki polimorfizmlerin allel frekansları popülasyonlar arasında değişkenlik gösterir (63). BsmI polimorfizmine sahip bireyler; bb, Bb ve BB şeklinde genotiplendirilir. B-alleli polimorfizm olan poly(A) ya gelince bireyler; S (kısa, 18'den az A) ve L (uzun, 168'den fazla A) poly(A) uzantıları diye sınıflandırılırlar (61). ApaI polimorfizmindeki bireyler ise aa, Aa ve AA şeklinde genotiplendirilir. Genel olarak VDR genindeki polimorfizmlerin çoğu kodlayıcı eksonlardan ziyade düzenleyici kısımlarda bulunur (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Tipi ve Evreni

Araştırma vaka-kontrol çalışması olarak planlanmıştır. Çalışmada kullanılan kan örnekleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Servisi'nde tiroid hastalığı tanısı almış, cerrahi tedavi uygulanmış, bilgilendirilmiş gönüllü onam alınmış; 103 diferansiyel tiroid kanseri tanılı, 113 benign tiroid hastalığı tanılı hastadan ve yaş olarak uyumlu 226 sağlıklı gönüllüden alınmıştır.

3.2. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi

Bu çalışmanın amacı; tiroid hastalıklarında ve özellikle diferansiyel tiroid kanserlerinin etyogenezinde rol aldığı düşünülen VDR genindeki polimorfizmleri tespit ederek ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutmaktır.

Çalışmanın hipotezi; Vitamin D reseptör gen polimorfizmi olan hastalar, diferansiyel tiroid kanserleri ve nodüler guatr hastalıklarına daha yatkındırlar.

3.3. Çalışmanın Etik İzni

Çalışmanın etik izni Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.06.2014 tarihinde onaylanmış ve 2014/168 proje numarası verilmiştir.

3.4. Çalışmaya Alınma ve Çıkarılma Kriterleri

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği'nde benign ve malign nedenlerle opere edilen 18-65 yaş arası 228 tiroid hastası dahil edildi. Graves Hastalığı olan bireyler çalışmaya alınmadı. İki hastanın patoloji sonucu anaplastik tiroid kanseri olarak raporlandığı için bu iki hasta çalışmadan çıkarıldı.

Kontrol grupları oluşturulurken bireylerin hiçbir malign hastalık nedeniyle opere edilmemiş veya tedavi görmemiş olmalarına dikkat edildi.

3.5. Çalışmanın Çıkarımları

1. FokI, BsmI, ApaI, TaqI polimorfizmlerinin benign tiroid hastalıklarında etkisi.
2. FokI, BsmI, ApaI, TaqI polimorfizmlerinin diferansiye tiroid karsinomlarında etkisi.

3.6. Örneklerin Toplanması

Polimorfizm çalışmaları için her bir hasta veya kontrol grubu katılımcısından 6 mL tam kan örneği EDTA'lı tüplere (Becton Dickinson, USA) alınarak DNA izolasyonu yapılncaya kadar -20 °C'de saklandı. DNA izolasyonu tuz çöktürme yöntemi (amonyum asetat) kullanılarak yapıldı.

3.6.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

1. 6 mL kan 50 mL'lik Falcon tüpe (Greiner Bio-One, Almanya) aktarıldı. Üzerine 40 mL oranında eritrosit lizis çözeltisi eklendi. +4 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra 10 dakika 405 x g'de santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası üst kısımda kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan pellet üzerine tekrar 30 mL eritrosit lizis çözeltisi eklendikten sonra 405 x g'de 10 dakika kadar santrifüj edildi. Ardından tekrar süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Bu hipotonik solüsyon, eritrositlerin lizisine neden olurken beyaz küreler intakt olarak dipte kalmaktadır.
3. Dipte kalan pellet üzerine 500 µL %10'luk SDS (Sodium dodecyl sulfate [CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na], 50 µL proteinaz K (20 mg/mL) ve 10 mL WBC lizis solüsyonu (*White Blood Cell Lysis Solution*, WBL) eklenerek 56 °C'de gece boyu bekletildi. Bu sayede lökositlerin parçalanarak, DNA-protein kompleksinin ayrılması sağlanmıştır.
4. İnkübasyon sonrası geride proteinlerin çöktürülerek uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla üzerine 4 mL amonyum asetat (9.5M) eklenerek karıştırıldı. Ardından 25 dakika 3645 x g'de santrifüj edildi.
5. Bu kez süpernatant kısım yeni bir falkon tüpe aktarılırken pellet kısmı atıldı. Süpernatant üzerine 20 mL %100 etanol eklenerek DNA'nın toplanması beklendi.

Toplanan DNA'lar eppendorf tüpüne alınarak üzerine 1 mL %70 etanol konuldu. Maksimum hızda (15700 x g) 5 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü. Üstte kalan süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan az miktardaki etanol ise uçurularak uzaklaştırıldı.

6. Elde edilen DNA üzerine 200 µL TE (Tris-EDTA) tamponu eklendi. 56 °C'de 1 saat bekletildikten sonra saklanmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

3.6.2. PCR-RFLP

Genotip tayini, alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan, PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlendi.

3.6.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA molekülünün daha önce belirlediğimiz bir hedef bölgesinin canlı organizma dışında çoğaltılma işlemidir. Bu selektif çoğaltma işlemi öncelikle çift iplikli DNA moleküllerinin sıcaklık artışı ile ayrılması sağlanır. DNA molekülünün yüksek sıcaklıkta denatüre edilmesiyle ortaya çıkan tek iplikli kalıp DNA'lara, oligonükleotid polimerlerin komplementer olarak bağlanması ile devam eder. Bağlanma sonrası uzamanın gerçekleşebilmesi için yüksek sıcaklıkta stabilitesini koruyabilen bir DNA polimeraz enzimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak sıcak sularda yaşayan *Thermus Aquaticus*'un DNA polimeraz I'i olan Taq polimeraz kullanılır. Enzimin uzama işlemini gerçekleştirmesinde tamponlar, dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) karışımı ve MgCl₂'nin de rolü vardır. dNTP karışımları yüksek saflıkta dATP, dGTP, dTTP ve dCTP içermektedir. Ticari olarak tek tek veya karışım olarak sağlanabilir. Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturur, primer/kalıp etkileşimini sağlar, enzim aktivitesini ve doğru eşleşmiş baz çiftinin yarısının ayrıldığı sıcaklık olan T_m değerini artırır (Bağlanma sıcaklığı T_m değerinin hemen altındaki sıcaklık olarak kabul edilir).

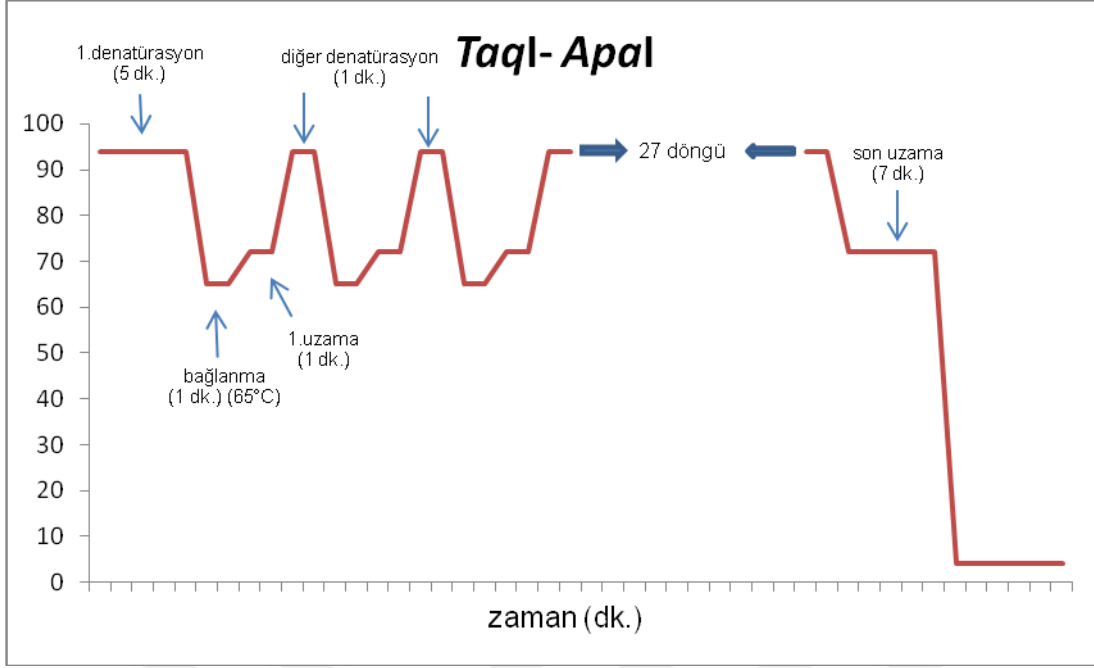
PCR reaksiyonunda 100 ng genomik DNA (2 µL), 10 pmol forward ve reverse primerler (1 µL) kullanıldı. Toplam miktarı 25 µL olan PCR ürünüde; 15,3 µL distile su, 2,5 µL 10X Taq Buffer [(NH₄)₂SO₄ (+)], 2,5 µL dNTP mix (2nM), 1,5 µL MgCl₂ (25nM) ve

0.2 µL Taq DNA polimeraz (5U/µL) (Thermo Scientific, ABD) bulunmaktadır. PCR koşulları, Tablo 5 ve Şekil 2-3-4'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

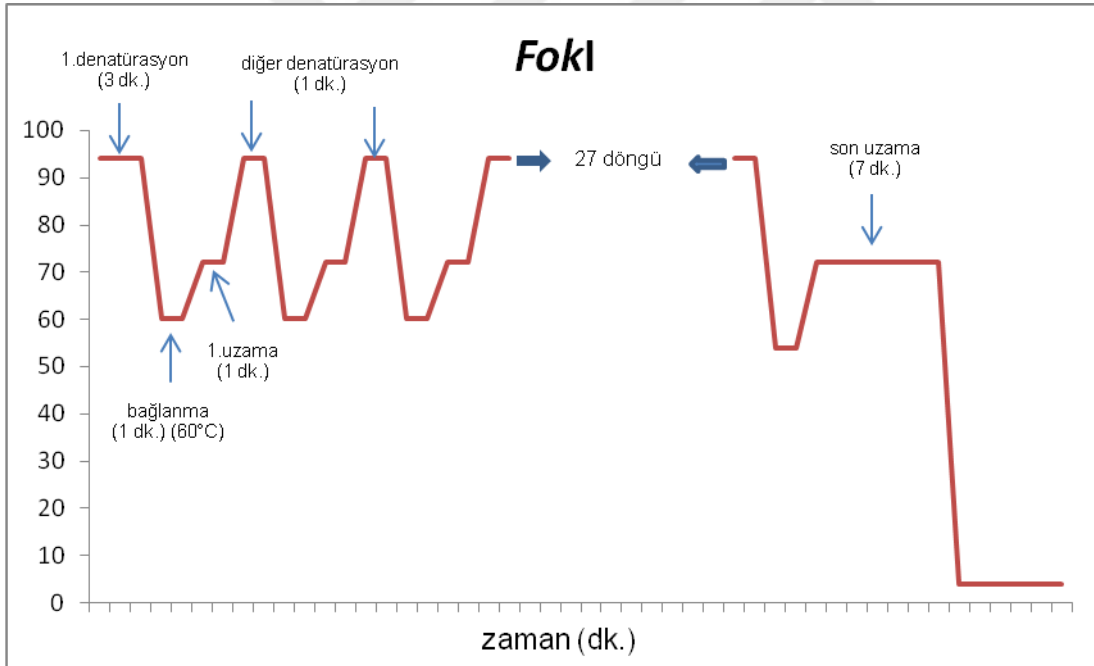
Tablo 5. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

| | Denatürasyon Sıcaklığı (°C/dk) | | Bağlanma Sıcaklığı (°C/dk) | | Uzama Sıcaklığı (°C/dk) | | Siklus Sayısı |
|------|--------------------------------|------------------|----------------------------|------------------|-------------------------|------------------|---------------|
| | Birinci Döngü | Sonraki Döngüler | Birinci Döngü | Sonraki Döngüler | Birinci Döngü | Sonraki Döngüler | |
| TaqI | 94/5 | 94/1 | 65/1 | 65/1 | 72/7 | 72/1 | 30 |
| ApaI | 94/5 | 94/1 | 65/1 | 65/1 | 72/7 | 72/1 | 30 |
| FokI | 94/3 | 94/1 | 60/1 | 60/1 | 72/7 | 72/1 | 30 |
| BsmI | 94/3 | 94/1 | 54/1 | 54/1 | 72/7 | 72/1 | 30 |

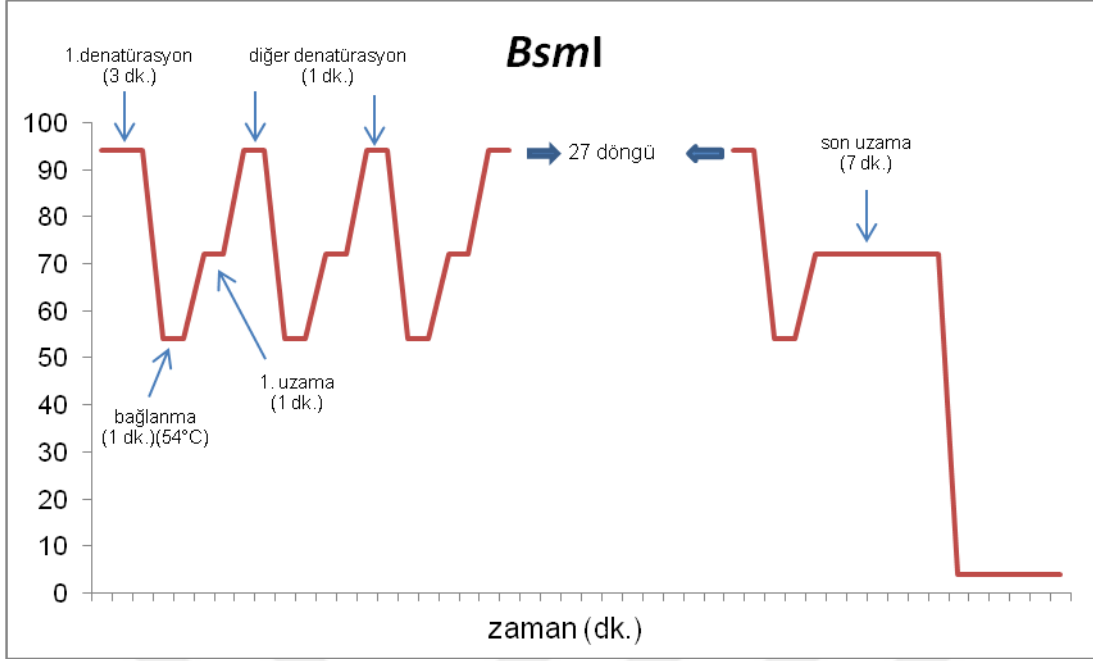
Çalıştığımız tüm bölgelerde denatürasyon sıcaklığı 94 °C, uzama sıcaklığı 72 °C olup toplam 30 siklustan oluşmaktadır. TaqI ve ApaI enzimi ile kesilen polimorfik bölgelerin, polimeraz zincir reaksiyonu koşulları, gerek sıcaklık değerleri, gerekse bu sıcaklıklarda kaldıkları süreler açısından birebir örtüşmektedir. Sıcaklık değerleri açısından farklı olarak, FokI bölgesinde bağlanma ısısının 60 °C, BsmI bölgesinde ise 54 °C olduğu gözlenmiştir (Tablo 5). Polimorfik bölgelerin sıcaklık-zaman açısından polimeraz zincir reaksiyonu koşulları, TaqI ve ApaI için Şekil 2'de, FokI için Şekil 3'te, BsmI içinse Şekil 4'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. TaqI ve ApaI PCR şartları



Şekil 3. FokI PCR şartları



Şekil 4. BsmI PCR şartları

VDR gen polimorfizmi varlığını belirlemede, polimeraz zincir reaksiyonu aşamasında kullanılacak primerler Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. VDR geni SNP tespitinde kullanılan primerler

| SNP | Primer |
|-------------------------------|---|
| rs731236 (<i>Taq I</i>) | F: 5’-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3’ R: 5’-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3’ |
| rs7975232 (<i>Apa I</i>) | F: 5’-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3’ R: 5’-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3’ |
| rs2228570 (<i>Fok I</i>) | F: 5’-GAT GCC AGC TGG CCC TGG CAC TG-3’ R: 5’-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TTC CTC-3’ |
| rs1544410 (<i>Bsm I</i>) | F: 5’-GGG AGA CGT AGC AAA AGG-3’ R: 5’-AGA GGT CAA GGG TCA CTG-3’ |

3.6.2.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

DNA moleküllerinin yapısının uzun olması, doğrudan analizlerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, restriksiyon endonükleazlar denilen kesim enzimleri ile küçük fragmanlara ayrılabilirler. Bu enzimler DNA'da özel nükleotid dizilerini tanır ve her iki ipliğini de keserler. Genellikle 37 °C'de aktiftirler. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında VDR geni üzerinde olası farklı DNA dizilerinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi, restriksiyon sonrası farklı fragmanların varlığının, poliakrilamid jel elektroforezi ile gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. SNP tespitinde kesim amacıyla kullanılan enzimler ve kesim sonrası oluşan fragmanların büyüklükleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. SNP tayininde kullanılan enzimler, alleller ve bantları

| Gen | Restriksiyon Enzimi | SNP | Alleller ve Bantları |
|----------|---------------------|-----------|--|
| VDR geni | <i>TaqI</i> | rs731236 | TT (496-247) Tt (496-291-247-205) tt (291-247-205) |
| VDR geni | <i>ApaI</i> | rs7975232 | AA (70) Aa (740, 529, 211) aa (529, 211) |
| VDR geni | <i>FokI</i> | rs2228570 | FF (265) Ff (265, 196, 69) ff (196, 69) |
| VDR geni | <i>BsmI</i> | rs1544410 | BB (360) Bb (360, 191, 169) bb (191, 169) |

Tablo 8. Enzimler ve kesim bölgeleri

| Enzim Adı | Kesim Bölgesi | Konsantrasyon | Üretici Firma |
|-------------|--|---------------|-------------------|
| <i>TaqI</i> | 5'...T C G A...3' 3'...A G C T...5' | 10 U/μL | Fermantes |
| <i>ApaI</i> | 5'...G G G C C C...3' 3'...C C C G G G...5' | 10 U/μL | Thermo Scientific |
| <i>FokI</i> | 5'...G G A T G N N...3' 3'...C C T A C N N...5' | 10 U/μL | Thermo Scientific |
| <i>BsmI</i> | 5'...G A A T G C N...3' 3'...C T T A C G N...5' | 10 U/μL | Thermo Scientific |

Restriksiyon enzim kesiminde toplam hacim 15 μL olup, her enzime uygun tampon çözeltisi, enzim, PCR ürünü ve steril distile su içerecek şekilde hazırlandı. Kesim, Tablo 9’da belirtilen sıcaklıklarda gece boyunca (16 saat) bekletilerek yapıldı. Kesim ürünleri, poliakralamid jelde yürütülüp gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi.

Tablo 9. Enzimler ile PCR ürünlerinin kesim şartları

| SNP no | Enzim Adı | Enzim Miktarı | Enzim Tamponu | Distile su (μL) | PCR Ürünü | Kesim sıcaklığı | Son Hacim |
|-----------|-------------|---------------|---------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| rs731236 | <i>TaqI</i> | 0.2 | 1.5 | 11.3 | 2 | 65 | 15 |
| rs7975232 | <i>ApaI</i> | 0.2 | 1.5 | 11.3 | 2 | 37 | 15 |
| rs2228570 | <i>FokI</i> | 0.2 | 1.5 | 11.3 | 2 | 55 | 15 |
| rs1544410 | <i>BsmI</i> | 0.5 | 1.5 | 10.5 | 2.5 | 37 | 15 |

3.6.2.3. Kesim ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi

Dikey elektroforez cihazında kullanılacak 35x10 cm ebatlarında jel hazırlandı. Jel kalınlığı 0.5 mm olacak şekilde hazırlanan cam aralığına döküm yapıldı. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 30 dakika beklendi.

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel cam içerisine elektroforez düzeneğine yerleştirildi. 1XTBE içeren yürütme tamponu eklendi. Beraberinde yükleme tamponu içerisinde bulunan ve elektriksel alanda hareket eden bromfenol mavisi ve ksilen siyanol boya ile de yürüdükleri mesafe takip edilerek akım Tablo 10'da olduğu şekilde ayarlandı. Daha sonra jel çıkartılarak gümüş boyama yöntemine geçildi.

Tablo 10. Poliakrilamid jel elektroforezi koşulları

| SNP | Akım | | PAGE(%) | Yürüme zamanı (dk.) |
|-----------|------|-----|---------|---------------------|
| | V | W | | |
| rs731236 | ~220 | ~20 | % 11 | 50 dk. |
| rs7975232 | ~220 | ~20 | % 11 | 50 dk. |
| rs2228570 | ~220 | ~20 | % 12 | 50 dk. |
| rs1544410 | ~220 | ~20 | % 8 | 30 dk. |

3.6.2.4. Gümüş Boyama

1. A solüsyonu; %5 asetik asit ve %95 absolüt etil alkol ile hazırlanan stok solüsyonundan 200 mL distile suya 15 mL ilave edilerek hazırlandı. Elektroforez sonrası jel ilk olarak bu solüsyonla 5 dk. muamele edildi.
2. B solüsyonu; %1'lik gümüş nitrat stok solüsyonundan 10 mL, 200 mL distile suya ilave edilerek hazırlandıktan sonra jel bu solüsyonda 10 dakika muamele edildi.
3. C solüsyonu; 200 mL distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edilerek kullanmadan hemen önce taze olarak stok solüsyon hazırlandı. Jel stok solüsyon ile muamele edildiği sırada 1 mL %0.2'lik formaldehid ilave edildi. Bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu. Tüm aşamalar arasında ve bu aşama sonrasında jel distile su ile yıkanarak asetat arasına alındı. Değerlendirilmek üzere kurumaya bırakıldı.

3.6.2.5. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan kimyasallar

Agaroz, bisakrilamid, bromfenol mavisi, EDTA, ksilen siyanol, sodyum bikarbonat, trizma baz, TEMED (Sigma Aldrich, ABD), etanol (Merck, Almanya), amonyum asetat, asetik asit, formaldehit, borik asit, sodyum hidroksit, sodyum klorid (Riedel-de Haen, Almanya), gümüş nitrat (Carlo Erba, İtalya) ve sodyum dodesil sülfat, amonyum persülfat, akrilamid (Fluka, Almanya) ve proteinaz K (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

3.6.2.6. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan tampon ve çözeltiler

1. RBCL (Eritrosit lizis çözeltisi) : 0.15 M NH_4Cl , 0.01 M KHCO_3 ve 0.01 M EDTA karışımından hazırlandı (pH = 8.0).
2. WBL (Lökosit lizis solüsyonu) : 0.1 M NaCl ve 0.025 M EDTA karışımı ile hazırlandı (ph = 8.0).
3. Amonyum asetat çözeltisi : 9.5 M $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$, 0.2 mikron çaplı filtre ile filtrelendi.
4. TE tamponu : 10 mM Tris-Cl ve 1 nM EDTA (ph = 8.0) (+20 °C'de)
5. SDS Stok Solüsyonu : %10 SDS 0.2-0.45 μm membran ile filtre edildi.
6. 5xTBE: 0.45 M trisma base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 0.45 M borik asit ($\text{B}(\text{OH})_3$) ve 0.01 M EDTA (pH=8.0)
7. %12'lik non denatüre poliakrilamid jel solüsyonu: (29/1 akrilamid/bisakrilamid) karışımından %12 ve 1xTBE ile hazırlanır. Polimerizasyon için 0.001M amonyum persülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve %0.1 TEMED (Tetramethylethylenediamine, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ilâve edildi.
8. %11'lik non denatüre poliakrilamid jel solüsyonu : (29/1 akrilamid/bisakrilamid) karışımından %11 ve 1xTBE ile hazırlanır. Polimerizasyon için 0.001 M amonyum persülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ve %0.1 TEMED (Tetramethylethylenediamine, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ilâve edildi.

3.6.2.7. DNA izolasyonu ve PCR-RFLP aşamalarında kullanılan cihazlar

1. Dikey Elektroferez (Biorad)
2. Güç Kaynağı (Biorad Power Pac 3000)

3. Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)
4. Santrifüjler (Eppendorf 5415R, 5840R)
5. Canon Scanner N670U
6. Bilgisayar

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel verilerin analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımına bakılarak Kikare testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi.



4. BULGULAR

103 diferansiye tiroid karsinomlu hastanın VDR geninin BsmI polimorfizmi (rs1544410) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (BB, Bb, bb) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni BsmI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | BsmI | | | Toplam | Chi-2 | p |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | BB | bb | Bb | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 16 | 41 | 46 | 103 | 2,468 | 0,291 |
| | | % | 15,5% | 39,8% | 44,7% | 100,0% | | |
| | Hasta | Sayı | 25 | 37 | 41 | 103 | | |
| | | % | 24,3% | 35,9% | 39,8% | 100,0% | | |
| | Toplam | Sayı | 41 | 78 | 87 | 206 | | |
| | | % | 19,9% | 37,9% | 42,2% | 100,0% | | |

103 diferansiye tiroid karsinomlu hastanın VDR geninin FokI polimorfizmi (rs2228570) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (FF, Ff, ff) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 12).

Tablo 12. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni FokI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | FokI | | | Toplam | Chi-2 | p | |
|------|----|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| | | | FF | ff | Ff | | | | |
| Grup | 44 | 11 | 48 | 41 | 46 | 103 | 0,573 | 0,751 | |
| | | 42,7% | 10,7% | 46,6% | 39,8% | 44,7% | | | 100,0% |
| | 47 | 8 | 48 | 37 | 41 | 103 | | | |
| | | 45,6% | 7,8% | 46,6% | 35,9% | 39,8% | | | 100,0% |
| | 91 | 19 | 96 | 78 | 87 | 206 | | | |
| | | 44,2% | 9,2% | 46,6% | 37,9% | 42,2% | | | 100,0% |

103 diferansiye tiroid karsinomlu hastanın VDR geninin ApaI polimorfizmi (rs7975232) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (AA, Aa, aa) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 13. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni ApaI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | ApaI | | | Toplam | Chi-2 | p |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | AA | aa | Aa | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 34 | 22 | 47 | 103 | 1,300 | 0,522 |
| | | % | 33,0% | 21,4% | 45,6% | 100,0% | | |
| | Hasta | Sayı | 39 | 16 | 48 | 103 | | |
| | | % | 37,9% | 15,5% | 46,6% | 100,0% | | |
| | Toplam | Sayı | 73 | 38 | 95 | 206 | | |
| | | % | 35,4% | 18,4% | 46,1% | 100,0% | | |

103 diferansiye tiroid karsinomlu hastanın VDR geninin TaqI polimorfizmi (rs731236) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (TT, Tt, tt) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 14).

Tablo 14. Diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni TaqI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | TaqI | | | Toplam | Chi-2 | p |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | TT | tt | Tt | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 44 | 12 | 47 | 103 | 3,785 | 0,151 |
| | | % | 42,7% | 11,7% | 45,6% | 100,0% | | |
| | Hasta | Sayı | 36 | 22 | 45 | 103 | | |
| | | % | 35,0% | 21,4% | 43,7% | 100,0% | | |
| | Toplam | Sayı | 80 | 34 | 92 | 206 | | |
| | | % | 38,8% | 16,5% | 44,7% | 100,0% | | |

Nodüler guatr nedeniyle opere ettiğimiz 113 hastanın incelenmesinde VDR geninin FokI polimorfizmindeki FF genotipinin istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.033$) şekilde daha fazla olduğu saptandı (Tablo 15).

Tablo 15. Nodüler guatrılı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni FokI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | FokI | | | Toplam | Chi-2 | p | OR |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | | | FF | ff | Ff | | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 47 | 13 | 53 | 113 | 4,534 | 0,033 | 1,769 |
| | | % | 41,6% | 11,5% | 46,9% | 100,0% | | | |
| | Hasta | Sayı | 63 | 8 | 42 | 113 | | | |
| | | % | 55,8% | 7,1% | 37,2% | 100,0% | | | |
| | Toplam | Sayı | 110 | 21 | 95 | 226 | | | |
| | | % | 48,7% | 9,3% | 42,0% | 100,0% | | | |

113 nodüler guatrılı hastanın VDR geninin BsmI polimorfizmi (rs1544410) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (BB, Bb, bb) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 16).

Tablo 16. Nodüler guatrılı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni BsmI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | BsmI | | | Toplam | Chi-2 | p |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | BB | Bb | Bb | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 16 | 37 | 60 | 113 | 1,794 | 0,408 |
| | | % | 14,2% | 32,7% | 53,1% | 100,0% | | |
| | Hasta | Sayı | 23 | 31 | 59 | 113 | | |
| | | % | 20,4% | 27,4% | 52,2% | 100,0% | | |
| | Toplam | Sayı | 39 | 68 | 119 | 226 | | |
| | | % | 17,3% | 30,1% | 52,7% | 100,0% | | |

113 nodüler guatrılı hastanın VDR geninin ApaI polimorfizmi (rs7975232) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (AA, Aa, aa) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 17).

Tablo 17. Nodüler guatrılı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni ApaI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | ApaI | | | Toplam | Chi-2 | p |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | AA | aa | Aa | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 39 | 19 | 55 | 113 | 1,906 | 0,386 |
| | | % | 34,5% | 16,8% | 48,7% | 100,0% | | |
| | Hasta | Sayı | 47 | 13 | 53 | 113 | | |
| | | % | 41,6% | 11,5% | 46,9% | 100,0% | | |
| | Toplam | Sayı | 86 | 35 | 108 | 226 | | |
| | | % | 38,1% | 14,2% | 47,8% | 100,0% | | |

113 nodüler guatrılı hastanın VDR geninin TaqI polimorfizmi (rs731236) açısından genotiplendirildi. Hasta ve kontroller karşılaştırıldığında üç genotip dağılımının (TT, Tt, tt) hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 18)

Tablo 18. Nodüler guatrılı hastalarda ve kontrol popülasyonundaki VDR geni TaqI polimorfizmindeki genotip dağılımı

| | | | TaqI | | | Toplam | Chi-2 | p |
|------|---------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | TT | tt | Tt | | | |
| Grup | Kontrol | Sayı | 40 | 14 | 58 | 113 | 2,706 | 0,258 |
| | | % | 35,7% | 12,5% | 51,8% | 100,0% | | |
| | Hasta | Sayı | 34 | 23 | 56 | 113 | | |
| | | % | 30,1% | 20,4% | 49,6% | 100,0% | | |
| | Toplam | Sayı | 74 | 37 | 114 | 226 | | |
| | | % | 32,9% | 16,4% | 50,7% | 100,0% | | |

5. TARTIŞMA

Gelişen teknoloji, genetik bilimlerinin ortaya çıkması ve genlerdeki değişikliklerin hastalıklarla ilişkilendirilmesi klinisyen hekimleri, hastalıkları değerlendirirken bu antiteleri de göz önüne almaya zorlamaktadır.

Günümüzde tiroid hastalıkları, genel cerrahi pratiğinde çok önemli bir yer tutmaktadır. Çok sayıda hasta tiroid bezinin malign ve benign hastalıkları nedeniyle opere edilmekte ve daha fazlası polikliniklerde takip edilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda diğer birçok hastalıkta olduğu gibi tiroid hastalıklarında da genetik değişiklikler üzerinde durulmaktadır.

D vitamini düzeyleri ve D vitamini reseptör geni polimorfizmleri de son yıllarda kanserle ilişkilendirilmiş, çok çeşitli kanser tiplerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

VDR gen polimorfizmleri farklı popülasyonlarda farklı özellikler göstermektedir (51). Uitterlinden ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Afrikalı, Kafkas ve Asyalı bireyleri karşılaştırmış. Çalışma sonucu her ırkta anlamlı farklılıklar saptamışlardır (65).

Lei Li ve arkadaşları Kuzey Çin popülasyonunda pankreatik kanserlerde FokI ve BsmI polimorfizmlerine bakmışlar ve bu genlerdeki polimorfizmlerin pankreatik kanser riskini Kuzey Çin popülasyonunda arttırdığını saptamışlardır (66). Yine aynı çalışmada genler kombine olarak değerlendirilmiş ve kontrol grupları ile bu şekilde karşılaştırılarak da anlamlı sonuçlar elde edilmiş.

Daha önce de bahsettiğimiz gibi VDR gen polimorfizmleri bir çok kanser türünde araştırılmış ve meme, prostat, malign melanom, kolorektal, over kanserlerinde anlamlı verilere ulaşılmış (67).

Taylor ve arkadaşları prostat kanseri için TaqI üzerine yaptıkları çalışmada tt genotiplerinin kontrol hastalarında, kanser hastalarına göre anlamlı olarak fazla bulunduğunu tespit etmişler (68). Yayılım-Eraltan ve arkadaşları kolorektal kanserler üzerine çalışmış ve (TaqI-FokI) tt-ff genotiplerine sahip bireylerin kolorektal kanserler için daha riskli olduğunu saptamışlar (69).

Kai Zhang ve arkadaşlarının yaptığı meta-analiz çalışmasında FokI polimorfizminin ff genotiplerine sahip bireylerin, FF ve Ff genotiplerine oranla meme kanserine daha sık yakalandıkları gösterilmiştir (70).

Beyin tümörü olan Türk hastalarla yapılan bir çalışmada Toptaş ve arkadaşları meningioma hastalarında FokI polimorfizmindeki ff genotipinin anlamlı olarak fazla olduğunu tespit etmişlerdir (71).

Biz çalışmamızda VDR geninin 4 bölgesini inceledik (TaqI, FokI, ApaI, BsmI). Yapılan çalışmalarda en çok incelenen ve anlamlı sonuçlara ulaşılan polimorfizmler bu dördü olduğu için biz de TaqI, FokI, ApaI, BsmI polimorfizmlerini değerlendirdik.

Hasta gruplarını oluştururken sadece diferansiye tiroid malignitelerini değil opere ettiğimiz nodüler guatr hastalardan da bir grup oluşturduk. Bu iki grubu sağlıklı kontrol hastaları ile karşılaştırdık. İstatistiksel olarak malignite hastalarının olduğu gruba kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulmadık. Marissa Penna-Martinez ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada diferansiye tiroid kanserleri değerlendirilmiş (72). Tiroid papiller kanserli (PTC) ve tiroid folliküler kanserli (FTC) hastalar ayrı ayrı gruplandırılmıştır. Çalışmanın sonucunda PTC hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı genotip farklılığına rastlanmamış. FTC grubunda ise ApaI ve FokI polimorfizmlerindeki AA ve FF genotiplerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir biçimde daha az olduğu tespit edilmiştir. Çalışma gruplarımızı oluştururken biz de benzer gruplar kurmayı denedik, ancak FTC'li hastaların PTC'li olanlara göre sayıca çok az olması nedeniyle tüm diferansiye tiroid kanserli hastaları tek bir grupta topladık. İlerki çalışmalarda hasta sayıları artırılarak (özellikle FTC) daha anlamlı istatistiksel verilere ulaşılabileceğine inanıyoruz.

Marissa Penna-Martinez ve arkadaşlarının yaptığı aynı çalışmada D vitamini düzeylerine de bakılmış, herhangi bir istatistiksel anlamlılık tespit edilmediği için biz de değerlendirmeye uygun görmedik.

Tiroid malignitelerinde olduğu gibi benign hastalıkları için de VDR gen polimorfizmlerine bakılmış. Türkiye'de yapılan bir çalışmada Yazıcı ve arkadaşları (TaqI-FokI) TT ve FF genotiplerinin Hashimoto Tiroiditi'ne yakalanma riskini arttırdığını ve BbAaTtFf haplotipinin bu hastalığa karşı koruyucu özelliği olduğunu göstermişlerdir (73).

Ramos-Lopez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Graves Hastalığı'nda üç ayrı ırkın (Alman-Polonyalı-Sırp) VDR gen polimorfizmlerine bakılmış (74). Tab haplotipinin Alman ve Polonyalı'larda hastalıkla ilişkili olduğu ancak Sırp'lar'da tAB haplotipinin bu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiş.

Kliniğimizde nodüler guatr nedeniyle opere ettiğimiz hastalarda da TaqI, ApaI, BsmI ve FokI polimorfizmlerine baktık. TaqI, ApaI, BsmI polimorfizmlerinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptamadık. Ancak FokI polimorfizmindeki ff genotipini sağlıklı kontrol hastalarında, opere ettiğimiz hastalara göre sayısal olarak yüksek bulduk. FF genotipi ise nodüler guatr nedeniyle opere ettiğimiz hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla saptandı ($p=0,033$; OR:1,769).

Bu bulgular sonucunda ortaya koymuş olduğumuz hipotezi sadece nodüler guatr hastalarında kabul edebileceğimizi gördük, diferansiye tiroid kanserli hastalar için hipotezimizi reddetmiş olduk.

Sonuç olarak diferansiye tiroid kanserlerinde yaptığımız VDR gen polimorfizmi değerlendirilmesinde FokI, BsmI, ApaI, TaqI polimorfizmlerinin diferansiye tiroid kanseri gelişimi ile ilişkisinin olmadığını gördük. Hasta sayısının artırılması ve haplotip analizlerinin yapılması ile daha anlamlı sonuçların elde edileceğini umuyoruz.

Opere ettiğimiz nodüler guatr tanılı hastalarda VDR gen polimorfizmi değerlendirilmesinde sadece FokI'in FF genotipinin daha fazla olduğunu, diğer üç polimorfizmde ise ilişkinin olmadığını gördük.



6. KAYNAKLAR

1. Sadler GP, Clark OH. Thyroid and parathyroid. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC (ed). Principles of Surgery. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 1661-1687.
2. Clark T, Savı N. History, ontogeny and anatomy. Wener I (ed). The Thyroid. 8th ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins; 2000. p. 1-5.
3. Basedow CA. Exophtalmos durch hypertrophie des Zelgewebes in der Augenhohle. Wochenschr Heilkd 1840; p. 197-220.
4. Murray GR. Note on the Treatment of Myxoedema by Hypodermic Injections of an Extract of the Thyroid Gland of a Sheep. Br Med J. 1891 Oct 10;2(1606):796-7
5. İşgör A. Fonksiyonel embriyoloji. İşgör A (ed). Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. 1.baskı. İstanbul: Avrupa tıp kitapçılık; 2000. p. 3-12.
6. Yılmaz C. Embriyoloji. Yılmaz C (ed). Tiroid, Paratiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. 1.baskı. İstanbul: Nobel tıp kitabevi; 2005. p. 6-8.
7. Henry JF. Surgical anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands and recurrent and external laryngeal nerves. Clark OH, Duh QY (ed). Textbook of endocrine surgery. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997. p. 8-14.
8. Sanders LE, Cady B. Embryology and developmental abnormalities. Cady B, Rossi RL (ed). Surgery of the Thyroid and Parathyroid Glands. 3th ed. Philadelphia: WB Saunders comp; 1991. p. 5-12.
9. Buckman LT. Lingual Throid. Laryngoscope; 1986. p. 765-784.
10. Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ. Anatomy of the thyroid gland. Gn Surgical Anatomy and Technique. New York: Springer-Verlag; 1995. p. 31-44.
11. Dere F. Glandula Thyroidea ve Parathyroidea. Dere F (ed). Anatomi. 2.baskı. Adana: Okullar Pazarı Kitabevi; 1990. p. 497-502.
12. Henry JF. Surgical anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands and recurrent and external laryngeal nerves. Clark OH, Duh QY (ed). Textbook of Endocrine Surgery. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 8-14.
13. Kuran O. Sistematik Anatomi. 3.baskı. İstanbul: Filiz kitabevi; 1993. p. 631-632.
14. Tezelman ST, Siperstein AE. Signal transduction in thyroid neoplasms. Clark OH, Duh QY (ed). Textbook of Endocrine Surgery. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 214-227.
15. Kaynaroğlu ZV. Tiroid fizyolojisi ve fonksiyon testleri. Sayek İ (ed). Temel Cerrahi. 2.baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1996. p. 1523-1524.

16. Guyton AC. Tiroid bezi ve Metabolik Hormonlar. Tıbbi Fizyoloji. 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1989. p. 1293-1309.
17. Hanks JB. Thyroid. Sabiston DC (ed). Textbook of Surgery. 16th ed. Philadelphia: WB Saunders comp; 2001. p. 603-628.
18. İşgör A. Multinodüler Guatr. İşgör A (ed). Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. 1.baskı. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2000. p. 233-238.
19. Day TA, Chu A, Hoang KG. Multinodular goiter. Otolaryngol Clin North Am. 2003 Feb;36(1)35-54.
20. Peter HJ, Burgi U, Gerber H. Pathogenesis of nontoxic diffuse and nodular goiter. Brawerman LE, Utiger RD (ed). The Thyroid. 7th ed. New York: Lippincott-Raven. 1996;890-908.
21. Molitch ME, Beck JR, Dreisman M, Gottlieb JE, Pauker SG. The cold throid nodule: an analysis of diagnostic and therapeutic options. Endocr Rev. 1984 Spring;5(2):185-99.
22. van Soestbergen MJ, van der Vijver JC, Graafland AD. Recurrence of hyperthyroidism in multinodular goiter after long-term drug therapy: a comparison with Graves' disease. J Endocrinol Invest. 1992 Dec;15(11):797-800.
23. O'Donnell AL. Hyperthyroidism: Systemic Effects and Differential Diagnosis. Falk SE (ed). Thyroid Disease. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 241-252.
24. Oğuz M, Cihan A, İşgör A. Tiroiditler. İşgör A (ed). Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. 1.baskı. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2000. p. 465-473.
25. Hurng-Seng Wu J, Young MT, Clark OH. Tiroid Kanserlerine Genel Bakış. İşgör A (ed). Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2000. p. 367-372.
26. Baskan S, Koçak S. Papiller Tiroid Karsinomu. İşgör A (ed). Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2000. p. 383-426.
27. Collins SL. Thyroid cancer: controversies and etiopathogenesis. Falk SE (ed). Thyroid Disease. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 495-564.
28. Kukora JS. Tiroid Kanseri. Cameron JL (ed). Güncel Cerrahi Tedavi-1. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2001. p. 583-589.
29. Blake Cady MD. Predictors of Thyroid Tumor Aggresiveness. Clark OH, Duh OY (ed). Textbook of Endocrine Surgery. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 197-216.
30. Sadler GP, Clark OH. Thyroid and Parathyroid. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC (ed). Principles of Surgery. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 1661-1687.
31. Beaugie JM. Principles of Thyroid Surgery. London: Pitman Medical Publishing Co. Oxford; 1975. p. 32-33.

32. Hempelmann LH, Pifer JW, Burke GJ, Terry R, Ames WR. Neoplasms in persons treated with x-rays in infancy for thymic enlargement. A report of the third follow-up survey. *J Natl Cancer Inst.* 1967 Mar;38(3):317-41.
33. Robbins J, Merino MJ, Boice JD Jr, Ron E, Ain KB, Alexander HR, Norton JA, Reynolds J. Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. *Ann Intern Med.* 1991 Jul 15;115(2):133-47.
34. Rosen Y, Rosenblatt P, Saltzman E. Intraoperative pathologic diagnosis of thyroid neoplasms. Report on experience with 504 specimens. *Cancer.* 1990 Nov 1;66(9):2001-6.
35. Ünal A. Tiroid Kanserleri. *Klinik Cerrahi Onkoloji.* Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1997: (27)351-360.
36. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of Vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Jun;39(2):401-18.
37. Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther.* 2007 Oct-Dec;3(4):225-30.
38. Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996 Jul;58(4):367-76.
39. Thibault F, Cancel-Tassin G, Cussenot O. Low penetrance genetic susceptibility to kidney cancer. *BJU Int.* 2006 Oct;98(4):735-8.
40. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Colston KW. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer.* 2005 May;41(8):1164-9.
41. Chouvet C, Vicard E, Devonec M, Saez S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cells lines (MCF-7, BT-20). *J Steroid Biochem.* 1986 Jan;24(1):373-6.
42. Eisman JA, Sutherland RL, McMenemy ML, Fragonas JC, Musgrove EA, Pang GY. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cell-cycle kinetics of T 47D human breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 1989 Mar;138(3):611-6.
43. James SY, Mackay AG, Colston KW. Vitamin D derivatives in combination with 9-cis retinoic acid promote active cell death in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol.* 1995 Jun;14(3):391-4.
44. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Smyczek S, Romu S, Tribble E, Welsh JC, Byrne B, Narvaez CJ. Impact of the Vitamin D₃ receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;83(1-5):85-92.
45. Sergeev IN. Vitamin D and cellular Ca²⁺ signaling in breast cancer. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):299-302.

46. Freedman DM, Looker AC, Chang SC, Graubard BI. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in United States. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Nov 7;99(21):1594-602.
47. John EM, Schwartz GG, Koo J, Wang W, Ingles SA. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and breast cancer risk in a multiethnic population. *Am J Epidemiol.* 2007 Dec 15;166(12):1409-19.
48. Shao T, Klein P, Grossbard ML. Vitamin D and breast cancer. *Oncologist.* 2012;17(1):36-45.
49. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006 Dec;147(12):5542-8.
50. Zhou H, Xu C, Gu M. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and Graves' disease: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 Jun;70(6):938-45.
51. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):203-17.
52. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, Mitsuhashi N, Irimoto M, Yamamori S, Miura M, Watanabe T, Kuwabara Y, Yabuta K, Eisman JA. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese woman. *J Bone Miner Res.* 1996 Jul;11(7):1003-9.
53. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res.* 1996 Dec;11(12):1850-5.
54. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Aug 1;89(15):6665-9.
55. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res.* 1989 Mar 11;17(5):2150.
56. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani H, Morita K, Kubota M, Yoshida S, Ikeda M, Watabe F, Kanemasa Y, Takeda E. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res.* 2001 Jul;16(7):1256-64.
57. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994 Jan 20;367(6460):284-7.

58. Gong YL, Xie DW, Deng ZL, Bostick RM, Miao XJ, Zhang JH, Gong ZH. Vitamin D receptor gene Tru9I polymorphism and risk for incidental sporadic colorectal adenomas. *World J Gastroenterol.* 2005 Aug 21;11(31):4794-9.
59. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jan 15;89(2):166-70.
60. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1997 Jun;12(6):915-21.
61. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol.* 2000 Mar;14(3):401-20.
62. Slattery ML. Vitamin D receptor gene (VDR) associations with cancer. *Nutr Rev.* 2007 Aug;65(8 Pt 2):S102-4.
63. Sweeney C, Curtin K, Murtaugh MA, Caan BJ, Potter JD, Slattery ML. Haplotype analysis of common vitamin D receptor variants and colon and rectal cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Apr;15(4):744-9.
64. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JP, Jehan F, Pols HA, Uitterlinden AG. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet.* 2005 Nov;77(5):807-23.
65. Uitterlinden AG¹, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004 Sep 1;338(2):143-56.
66. Li L¹, Wu B, Yang L, Yin G, Wei W, Sui S, Liu J. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with pancreatic cancer: A pilot study in a North China Population. *Oncol Lett.* 2013 May;5(5):1731-1735.
67. Köstner K, Denzer N, Müller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.* 2009 Sep;29(9):3511-36.
68. Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res.* 1996 Sep 15;56(18):4108-10.

69. Yaylim-Eraltan I, Arzu Ergen H, Arikan S, Okay E, Oztürk O, Bayrak S, Isbir T. Investigation of the VDR gene polymorphisms association with susceptibility to colorectal cancer. *Cell Biochem Funct.* 2007 Nov-Dec;25(6):731-7.
70. Zhang K, Song L. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis of 39 studies. *PLoS One.* 2014 Apr 25;9(4):e96125.
71. Toptaş B, Kafadar AM, Cacina C, Turan S, Yurdum LM, Yiğitbaşı N, Gökçe MO, Zeybek U, Yaylım I. The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Turkish brain cancer patients. *Biomed Res Int.* 2013;2013:295791.
72. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N, Hansmann ML, Selkinski I, Grünwald F, Vorländer C, Wahl RA, Bechstein WO, Zeuzem S, Holzer K, Badenhop K. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2009 Jun;19(6):623-8.
73. Yazici D, Yavuz D, Tarcin O, Sancak S, Deyneli O, Akalin S. Vitamin D receptor gene ApaI, TaqI, FokI and BsmI polymorphisms in a group of Turkish patients with Hashimoto's thyroiditis. *Minerva Endocrinol.* 2013 Jun;38(2):195-201.
74. Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarczuk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhop K. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid.* 2005 Oct;15(10):1125-30.