



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİROİD HASTALARINDA SİRKÜLER HÜCRE DIŞI DNA MİKTARI
VE BU DNA'NIN METİLASYON DERESESİNİN BELİRLENMESİ**

Hazırlayan

GÜNER BEGÜM ÇILGIN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. AKIN ÇAYIR

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE - 2019



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİROİD HASTALARINDA SİRKÜLER HÜCRE DIŞI DNA MİKTARI VE BU
DNA'NIN METİLASYON DERESESİNİN BELİRLENMESİ**

Hazırlayan

GÜNER BEGÜM ÇILGIN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. AKIN ÇAYIR

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 2017/2 sayılı karar ile desteklenmiştir.

ÇANAKKALE – 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Adı :

Programın Seviyesi :Yüksek Lisans () Doktora ()

Anabilim Dalı :

Tez Sahibi Adı ve Soyadı:

Tez Başlığı :

Sınav Yeri :

Sınav Tarihi :

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name :

Programme Level : Master of Science () Doctor of Philosophy ()

Department :

Student Name and Surname: :

Title of the Thesis :

Examination Place :

Examination Date :

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved

as a Master of Science / Doctor of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Members of Examination Jury (Titles and Names)		

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated and numbered

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih:

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Güner Begüm Çılgın

İmza:

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans tezim boyunca hiçbir zaman bilgisini, sabrını, desteğini benden esirgemeyen ve bu yolda ufkumu açan, akademik anlamda hayatıma yön veren Danışmanım Doç. Dr. Akın Çayır'a ve kıymetli hocam Prof. Dr. Mahmut Coşkun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarın inceliklerini ve engin tecrübelerini benimle sabırla paylaşan Öğretim Görevlisi Münevver Coşkun'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana destek olan Patoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nihal Kılınç'a çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarında yardımını ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Özge Çağlar ve Uzman Hayal Çobanoğlu'na çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans yolunda adım atmam için yol gösteren her türlü desteğini benden esirgemeyen her zaman yanımda olan eşim Öğretim Görevlisi Sedat Çılgın'a sonsuz teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Gülüşi ile bana enerji veren, hayatıma anlam katan biricik oğlum Aydın Evren Çılgın'a ithafen.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-1114 nolu ve 2017/2 sayılı karar ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
İÇ KAPAK	I
TEZ ONAY FORMU	II
THESIS APPROVAL FORMU	III
BEYAN FORMU	IV
TEŞEKKÜRLER SAYFASI	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IX
TABLolar LİSTESİ	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tiroid Tanımı	4
2.1.1. Tiroid Bezi Embriyolojisi	4
2.1.2. Tiroid Bezi Anatomisi	4
2.1.3. Tiroid Fonksiyon Testleri	5
2.2. Tiroid Hastalıkları	7
2.2.1. Benign Tiroid Hastalıkları Nodülleri	7
2.2.2. Malign Tiroid Hastalıkları Nodülleri	9
2.2.3. Kronik Tiroidit Hastalıkları	11
2.3. Epigenetik Mekanizmalar	15
2.3.1. DNA Metilasyonu	16
2.3.2. Histon Modifikasyonu	17
2.3.3. MicroRNA (miRNA)	18
2.4. DNA Metilasyonu ve Kansere İlişkisi	18
2.5. Hücre Dışı Sirküler DNA	21
2.5.1. Hücre Dışı Sirküler DNA Nasıl Oluşur	21
	VI

2.5.2. Hücre Dışı Sirküler DNA Biyolojik Mekanizmalar	22
2.5.3. Hücre Dışı Sirküler DNA ve Hastalıklarla İlişkisi	23
2.5.4. Hücre Dışı Sirküler DNA ve Kanser İlişkisi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Araştırma Türü	26
3.2. Etik	26
3.3. Verilerin Toplanması ve Araştırma Gruplarının Oluşturulması	26
3.3.1. Kontrol Grubu	26
3.3.2. Tiroidit Hasta Grubu	26
3.3.3. Benign Nodüllü Tiroid Hasta Grubu	26
3.3.4. Malign Nodüllü Tiroid Hasta Grubu	27
3.4. Verilerin Deneysel Sürece Hazırlanması	27
3.4.1. Hücre Dışı Serbest DNA Ölçümü	27
3.4.2. Plazma DNA İzolasyonu	28
3.4.3. Plazma DNA Miktarının Belirlenmesi	29
3.4.4. DNA Metilasyon (5mC) Miktarının Belirlenmesi	29
3.5. Verilerin değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR	31
4.1. Kontrol Grubu ve Hasta Gruplarının Hücre Dışı Serbest DNA Miktarı	32
4.2. Kontrol Grubu ve Hasta Gruplarının 5mC Değişimi	35
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
6.1. Sonuç	43
6.2. Öneri	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	57
Ek-1. Etik Kurul Karar Formu	57
Ek-2. Spiralli Tez Kontrol Formu	58
Ek-3. Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi	59
Ek-4. Özgeçmiş	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

CcfDNA: Circulating cell-free DNA

CpG: Sitozin Fosfat Bağı Guanin

DNMT: DNA Metiltransferaz enzimi

DNMT3A: DNA Metiltransferaz 3A

DNMT3B: DNA Metiltransferaz 3B

T4: Tiroksin

T3: Triiodotironin

TSH: Tiroid Uyarıcı Hormon

RIA: Radyoimmün Analiz

sT4: Serbest Tirokson

sT3: Serbest Triiodotironin

TBG: Tiroksin Bağlayıcı Globülin

TG: Tiroglobülin

USG: Ultrasonografi

STG: Tiroid Sintigrafi

BT: Bilgisayarlı Tomografi

BPA: Bisphonal A

G: Guanin

C: Sitozin

CG: Sitozin Guanin

BWS: Beckwith-wiedemann

SNRPN: Ribonucleoprotein-associarel Protein N

UBE3A: Ubiquitin-Protein Lipa E3A

FRAXA: Frajil X Sendrom

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

MLH1: Humon Mult Protein Homolog

06-MGMT: 06 Metil Guanin Metil Transferaz

mtDNA: Mitokondrial DNA

μ l: Mikrolitre

nm: Nanometre

μ g: Mikrogram

ml: Mililitre

5mC: 5-Metil Sitozin

bp: Baz Çifti

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Negatif ve pozitif kontrollerin miktarları	30
Tablo 2. Kontrol ve hasta grupları temel özellikleri	31
Tablo 3. Kontrol grubu ve tiroid hastalıkları ccfDNA miktarları	33
Tablo 4. Kontrol grubu ve tiroid hastalıkları DNA 5mC değişimi	36



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Tiroid Bezi Anatomisi	5
Şekil 2: Tiroid Bezi Hormon Şeması	8
Şekil 3: Sitozinin Metilasyonu	17
Şekil 4: Histon Metilasyonu Şeması	18
Şekil 5: ThermoFisherQubitDsdnaHs (High Sensitivity) Assay Kit Ve Qubit2.0 Cihazı Protokolü	19
Şekil 6: Tiroid Hastalıkları Ve Kontrol Grubunda Ölçülen CcfDNA Miktar Dağılımları	33
Şekil 7: Cinsiyete Göre Ölçülen CcfDNA Miktar Dağılımları	34
Şekil 8: Sigara Kullanımına Göre Ölçülen CcfDNA Miktar Dağılımları	35
Şekil 9: Tiroid Hastalıkları Ve Kontrol Grubunda Ölçülen Dna 5mc Yüzde Dağılımları	36

ÖZET

Farklı vücut sıvılarında bulunan nükleik asitler farklı özellikleri nedeni ile araştırılmıştır. Bunlar arasında sirküler serbest DNA (ccfDNA) 1948 yılında keşfedilmiştir. Fakat birçok yetersizliklerden dolayı uzun yıllar çalışılmamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ccfDNA'nın hastalıklar için önemini ortaya koymuştur. Dolaşım sistemindeki ccfDNA'nın varlığı tiroid hastalıkları için yeni biyobelirteçler araştırmada kusursuz bir fırsat sunmaktadır. Tez çalışmasının ilk amacı, farklı tiroid hastalıklarının ccfDNA miktarlarını belirlemek, bu miktarların hastalık grupları ve kontrol grubu arasında değişip değişmediğini değerlendirmektir. Bu çalışmanın ikinci amacı ise ccfDNA'da bulunan total DNA metilasyon miktarını ölçerek tiroid hastalıkları için biyomarker olma potansiyelini değerlendirmektir. Bu amaçla hasta grupları ve sağlıklı bireylerinden kan örnekleri alınmıştır. Qubit 2.0 cihaza kullanılarak plazma örneklerindeki ccfDNA miktarı ölçülmüştür. İzole edilen DNA'lardan Elisa yöntemine dayalı kit yardımıyla total 5mC miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre benign, tiroidit ve malign hastalarının kanlarındaki ccfDNA miktarının istatistiksel olarak kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı alınan örneklerdeki ccfDNA miktarı tiroid hastalıkları için farklılık göstermekte ve bir biyomarker olma potansiyeli taşımaktadır. Diğer taraftan, tiroidit hastalarından elde edilen DNA metilasyon (5mC) miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Malign ve benign grupları kontrol grubu ile metilasyon dereceleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Hastalık grupları da kendi arasında karşılaştırıldığında malign ve benign grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken, tiroidit ve benign ile tiroidit ve malign grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmüştür. Yapılan değerlendirmeler sonucunda bu çalışmada tiroid hastalarının tedavisinde ve kanser teşhisinde ccfDNA'nın ve onun metilasyon derecesinin biyobelirteç olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Epigenetik, 5mC, ccfDNA, Tiroid, Kanser

ABSTRACT

Nucleic acids in different body fluids have been investigated for their different properties. Among these, circulation cell free DNA (ccfDNA) was invented in 1948. However, it has not been studied for many years due to many deficiencies. Recent studies have been indicated the importance of ccfDNA for diseases. Thus, the presence of ccfDNA in the circulatory system provides an excellent opportunity to investigate new biomarkers for thyroid diseases. The first aim of this study was to determine the ccfDNA levels of different thyroid diseases and to determine whether these amounts vary between disease groups and control groups. The second aim of the study was to evaluate total the DNA methylation (5mC) level in ccfDNA as biomarker of thyroid diseases. For this purpose, blood samples were taken from patients and healthy individuals. The amount of ccfDNA in plasma samples was measured with the Qubit 2.0 instrument. A total of 5mC in ccfDNA was determined by means of the Elisa based kit. According to the results, the amount of ccfDNA in the plasma samples of benign, thyroiditis and malignant patients was statistically higher than the control group. Therefore, the amount of ccfDNA in plasma samples of thyroid diseases vary and has the potential to be a biomarker. On the other hand, the amount of DNA methylation (5mC) obtained from thyroiditis patients was found to be statistically higher than the control group. When the malign and benign groups were compared with the control group, no significant difference was observed. When the disease groups were compared, there was no statistically significant difference between benign and malignant groups, whereas thyroiditis and benign groups were statistically different between thyroiditis and malignant groups. As a result of the data, it is suggested that ccfDNA and its degree of methylation can be used as biomarkers for diagnosis of thyroid patients.

Keywords: Epigenetics, 5mC, ccfDNA, Thyroid, Cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid bezi kaynaklı hastalıklar, tüm dünyada yaygın olarak görülen hastalıklar arasında olup özellikle nodüllerine çok sık rastlanmaktadır (Larsen, 2003). Ayrıca, endokrin düzensizliklere yol açma potansiyelinde olan hastalıklardır (Garmendia Madariaga ve ark., 2014). Tiroid bezi hastalıkları popülasyonun %3-5'ini etkilemekte ve diabetes mellitustan sonra en sık görülen endokrin hastalık olma özelliğini taşımaktadır (Thomusch ve ark., 2000). Yapılan tahminlere göre, Avrupa popülasyonunun %6.71'i ve Amerika popülasyonunun ise %4.78'inde ise tiroid bezine bağlı düzensizlikler olduğu ve bunların da hala teşhisinin yapılmamış olduğu tahmin edilmektedir (Díez ve ark., 2005). Teşhis edilmeyen bu bireylerin sayıları, günümüzde var olan ve teşhis edilmiş bireylerin sayılarının neredeyse yarısı kadardır (Cooper ve Ridgway, 2002). Amerika'da yapılmış bir popülasyon çalışmasında, 13344 bireyin incelendiği ve tiroid hastalığı teşhisi için analiz edilmemiş insan popülasyonunun %4,6'sı hipotiroidizm ve %1.3'ü ise hipertiroidizm olduğu bildirilmiştir (Hollowell ve ark., 2002). Başka bir çalışmada da, benzer sonuçlar elde edilmiş, incelenen popülasyonun %4.94 ve %1.72'si hipotiroidizm ve hipertiroidizm olarak teşhis edilmiştir (Garmendia Madariaga ve ark., 2014). Tüm bu bulgular, toplumlarda, tiroid bezine bağlı hastalıkların yaygın olmasının dışında, hala teşhis edilmemiş ancak tiroid bezinde düzensizlik yaşayan bireyler olduğunu göstermektedir.

Tiroid fonksiyon bozukluğu ve hipotiroidizm toplumda yaygınlaşmakla birlikte, özellikle orta yaş ve kadınlarda daha fazla görülmektedir. Bu durum, daha çok tiroid inflamasyonuna bağlanmaktadır. Tiroidit, kısacası tiroid bezinin iltihaplanması olarak bilinmektedir. İyileşme durumuna göre akut, gecikmiş ve kronik tiroiditis şeklinde 3 gruba ayrılmaktadır. Farklı sebepleri olmakla birlikte, Hashimoto Tiroiditi yaygın ve aynı şekilde yaşamı tehdit eden bir türdür. Hashimoto Tiroiditi bağışıklık sisteminin belli olmayan nedenlerle bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bazı faktörlerin de örneğin; iyotlu tuzun aşırı alımı, radyasyon maruziyeti, genetik yapı ve çeşitli hormonların Hashimoto Tiroiditinin gelişmesinde etkili olduğu bilinmektedir.

Genel olarak, tiroid nodülü, tiroid bezini oluşturan hücrelerin anormal şekilde bölünmesi ve sonunda bezin büyümesi ile karakterize edilir. Birçoğu toplumda iyi

huyulu olarak da adlandırılan, benign karakterde nodüllerdir. Günümüzde, tiroid nodülleri kadınlarda %5 oranında gözükürken, erkeklerde %1 oranında gözükmektedir. Kadınlara kıyasla, erkeklerde görülen nodüllerin %95'i çoğunlukla benign karakterdedir. Yaklaşık %5-8'i benign nodül ise tiroid kanseri haline dönüşmektedir (Cooper ve ark., 2009). Tiroid malignansileri, endokrin sistemin en önemli malignant tümörleridir ve %1 oranında görülmektedir. Tiroid bezinde dört farklı tümör tipi görülmektedir. Bunlar papillar, foliküler, medullar ve anaplastik karsinoma olarak sınıflandırılmaktadır. Kanserlerin büyük bir kısmı, foliküler hücre kaynaklıdır (Cooper ve ark., 2009). Papillar ve foliküler karsinomaları içeren farklılaşmış tiroid kanserleri, tüm tiroid kanserlerinin > %90'nını oluşturmaktadır (Sherma, 2003). Amerika'da yapılan bir çalışmada, 2014 yılında yaklaşık 63.000 yeni tiroid kanseri vakasının olduğu tahmin edilmiştir (Siegel ve ark., 2014). Uzun yıllar takip edilen artış düzeyleri dikkate alındığında, 1975 ve 2009 yılları arasında, tiroid kanserlerinde her yıl yaklaşık olarak 3 kat artış olduğu tespit edilmiştir (Davies ve Welch, 2014). Son zamanlarda, yapılan popülasyon çalışmasında, 2000 ile 2012 yılları arasında, tiroid kanseri oranının iki kat arttığı tespit edilmiştir (Brito ve ark., 2015).

Günümüzde tiroid hastalıklarının tanısı için temelde ultrason ve/veya iğne biyopsisi kullanılmaktadır. Tanı amacıyla, yüksek çözünürlüklü ultrason sıklıkla kullanılan bir yöntem olup, tesadüfî seçilen bireylerin %19-68'ini teşhis edebilmektedir. İğne biyopsisi yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, malignant tümörlerin tanı ve tedavisinde yeteri kadar doku ve spesifik doku alamama, doku alınsa bile yetersiz sitolojik teknikler gibi nedenlerden dolayı başarısızlık oluşmaktadır. Bu durumda, yeniden örnek alımı süreci yaşanmaktadır. Bu şekildeki başarısızlıklar yaklaşık olarak %20 civarındadır. Tüm bu süreçler dikkate alındığında, hem tiroid hastalıkların teşhisi zorlaşmakta, hem de büyük popülasyonların taranması zorlaşmaktadır. Nitekim günümüz toplumlarında, hala teşhis edilmemiş belli oranda bireyin olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile ulaşılabilir, tekrar edilmesi kolay ve güvenilir sonuç veren, tiroid hastalıklarının spesifik olan yeni markırların bulunması, tiroid hastalıkları için önemlidir.

Hastalıklarda, özellikle de kanserde, erken ve kesin tanının moleküler düzeyde belirlenmesi bilim çevreleri için öncelikli araştırma konuları arasında yer almaktadır. Kanserin tipine ve gelişimine göre vücut sıvılarında elde edilebilecek biyobelirteçlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla proteomik, genomik, epigenetik, immunogenetik ve diğer moleküller üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bazı başarılar elde edilmiştir fakat elde edilen bu çalışmalardan %100 başarı oranı sağlanamamıştır. CcfDNA 1948 yılında literatüre girmiştir ancak teknolojik yetersizlikler nedeniyle uzun yıllar üzerinde pek çalışma yapılmadan kalmıştır (Koffler ve ark., 1973). Son on yıldaki teknolojik gelişmelerle, özellikle genom dizileme işlemlerindeki ilerlemelerle ccfDNA tekrar bilim dünyasının ilgisini çekmiştir (Davis Jr ve Davis Iv, 1973). Bu gelişmelere bağlı olarak metastazın mekanizması tekrar tartışılır konuma getirilmiş, genometazdan söz edilmeye ve bu alanda yeni çalışmaların yapılması gerektiği ifade edilmiştir (García-Olmo ve ark., 2010). CcfDNA bu konuda önemli bir biyomoleküldür. Kanserin tipiyle, gelişimiyle, kan plazmasındaki miktarıyla, plazmada bulunan diğer moleküllerle olan ilişkisiyle, metilasyon ve asetilasyon derecesiyle kanser çalışmalarında oldukça fazla ilgi çekmektedir. CcfDNA'dan yola çıkılarak, kişinin kanser olup olmadığı, kanser gelişmiş ise vücutta metastazın olup olmadığını belirlemek, tedavi sürecinin izlenmesinde başarının elde edilip edilmediğini, cerrahi müdahale için karar verilip verilemeyeceğini belirlemede oldukça umut vaat etmektedir. Bu kapsamda, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi, troid hastalarının kanser teşhisinde ve tedavisinde ccfDNA'nın ve onun metilasyon derecesinin moleküler biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemeye yönelik önemli katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLİGİLER

2.1. Tiroid Tanımı

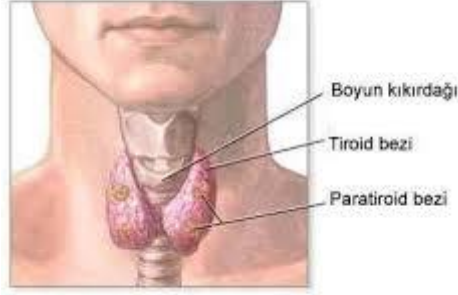
Tiroid bezi boynun ön tarafında vertebra arasına yerleşmiş damarlarla zengin bir organdır. Vücudun enerji kullanımında ve depolamasında Tiroid bezi iki önemli hormon salgılamaktadır. Bu hormonlar tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3).

2.1.1. Tiroid Bezi Embriyolojisi

Tiroid bezi endokrin bezler içinde ilk oluşan bezdir. Gebeliğin 24. gününde gelişmeye başlamaktadır. Bu bez, gelişen yutak tabanının median yüzünde endodermal epitelyum hücrelerinin çoğalması ile oluşmaya başlar. Bu ilk gelişim bölgesi iki önemli yapının (tuberkulum impar ve kopula) arasındadır (Üstün, 2002). Tiroid bezinin ilk yapısı orta hatta basit bir epitelyum kalınlaşması olarak görülmeye başlar. Tiroid bezi oluşumunu ortalama 8. ve 9. haftalarda tamamladığı, tiroksin sentezini ise 10. haftalarda gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Üstün, 2002). Tiroid bezinin gebeliğin 10. haftasının sonunda oluşmaktadır. Gebeliğin onüçüncü haftasından itibaren hipofiz ve serumda TSH'nin bulunacağı, gebeliğin onsekizinci haftasından itibaren TSH ve T4'ün artmaya başladığı ve tiroiddeki iyot konsantrasyonunun yüksek seviyelere çıktığı belirtilmiştir (İşgör, 2000). Ortalama 30-35. Haftalardan itibaren hipotalamus, hipofiz ve tiroidin oluştuğu ve TSH, T3, T4 düzeylerinin doğumdan sonraki bir iki hafta içinde erişkinlerdeki gibi normal seviyeye ulaştığı bilinmektedir (İşgör, 2000).

2.1.2. Tiroid Bezi Anatomisi

Tiroid bezi kahverengi-kırmızı renkte ve kan damarlarından oluşan boynun alt kısmında anteriorda, 5. servikal vertebra ile birinci torasik vertebra arasında bulunmaktadır. H ve U şeklinde olan tiroid bezi 2 adet lateral lob ve bunları bağlayan median bir istmustan oluşmaktadır. Tiroid bezi endokrin bezlerin en büyüğüdür. Ortalama 25 g ağırlığındadır. Tiroid bezinin boyutları, bireyler arasında değişiklik göstermektedir. Tiroid bezi genellikle kadınlarda erkeklere göre daha ağırdır. Kadınlarda menstrüasyon ve gebelik dönemlerinde ağırlık daha da artmaktadır (Gray, 1918).



Şekil 1: Tiroid bezi anatomisi (<https://www.inplod.com/t/tiroid-bezi-nedir-ve-ne-ise-yarar-tiroid-rahatsızlıklarının-belirtileri-nelerdir/39773/>)

2.1.3. Tiroid Fonksiyon Testleri

Tiroid bezi tiroksin (T4) ve tri-iyodotironin (T3) olarak adlandırılan hormonlar salgılamaktadır. T3 hormonu aktif bir hormondur. Tiroid hormonları neredeyse tüm dokuların normal fonksiyonu için gereklidir (Gardner ve ark., 2007). Tiroid hormonlarının işlevlerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- ✓ Normal büyüme ve gelişmeyi sağlar
- ✓ Kalp hızını düzenler
- ✓ İskelet ve kas sisteminin normal gelişimini sağlar.
- ✓ Hamilelik sırasında erken fetal beyin gelişimi için önemli bir belirleyicidir.
- ✓ Kadın fertilitate fonksiyonlarını etkiler (ovulasyon, düşük riski, ölü doğum, prematurite).

Tiroid fonksiyon testleri, tiroid işlev bozukluğu, tiroid nodüllerinin yaygın olması ve tüm branşların hastalık ayırıcı tanısı ve taramalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Tiroid fonksiyon laboratuvar testleri 5 katagoride incelenebilir;

- ✓ Hipotalamo-hipofizer-tiroid aksın durumunu belirleyen test: TSH
- ✓ Serum T4 ve T3 konsantrasyonu
- ✓ Tiroid otoantikör testleri
- ✓ Tiroid iyot metabolizmasını yansıtan testler
- ✓ Tiroid hormonlarının dokudaki etkisini yansıtan testler (Larsen, 2003).

A- TSH

TSH hipofiz bezinden salgılanan bir hormon olarak bilinmektedir. Bu hormon kan yolu ile tiroid bezine giderek tiroid hormonu üretimini sağlamaktadır. TSH

düzeyleri, serbest T3 ve serbest T4 düzeylerindeki değişikliklere yanıt verdiğiinden ilk tarama testi olarak kullanılmaktadır (Celik ve Kadioglu, 2010). TSH ölçümlerinde Klinik Biyokimya Kılavuzlarında ölçümlerin 0.02 mU/L'den daha düşük düzeyleri gösterebilmesini öngörmektedir. Genellikle immunoradyometrik analiz (IRMA) ve radyoimmun analiz (RIA) olmak üzere 2 ölçüm yöntemi kullanılmaktadır (Ortiga-Carvalho ve ark., 2005).

Anormal TSH düzeyleri saptandığında hipotiroidi veya hipertiroidi hormon düzeylerine bakılması gerekmektedir. TSH hormon seviyesi yaşa ve cinsiyete bağlı olarak ortalama 0.4- 4.0 mIU/L olarak kabul edilmektedir. TSH değeri 0.1 mIU/L değerinin altında ise sT4 ve sT3 hormon değerleri yüksek olduğunu göstermektedir. Bu da hastanın hipertiroidi olduğu anlaşılmaktadır. TSH değeri 10-15 mIU/L arasında veya yüksek ise sT4 ve sT3 değerlerinin düşük olduğu anlaşılır ve hipotiroidi olduğunu göstermektedir.

B- Total T4 ve T3

T4 bağlayan en büyük protein olan TBG (Tiroksin Bağlayıcı Globulin) değişimlerinden etkilenmektedir. TBG tiroid hormonlarını taşıyan en büyük proteindir. Örneğin gebe bir kadında östrojen hormon seviyesinin yüksek olması TBG seviyesini yükseltir ve total T4 düzeyinin de yükselmesine sebep olmaktadır. Total T3 değişimleri de TBG değişimlerinden etkilenmektedir. Klinik hipertiroidi durumlarında T3 artışı T4 artışından daha belirgin ancak tiroditlerde T4'e oranla daha hafif artışlar görülmektedir. Hipotiroidinin erken dönemlerinde Total T4 düşerken T3 normal kalabilir. Normal bir erişkinde T4 64-142 nmol/L (5-11 µg/dl), total T3 1.1–2.9 nmol/L'dir (70-190 ng/dl) (Larsen, 2003).

C- Serbest T4 ve T3

Serbest tiroid hormon konsantrasyonları IRMA veya equilibrium dialysis ile ölçülmektedir (Nelson ve ark., 1994). ST4 ve sT3 değerlerinin ölçülmesi tiroid hastalıklarının tanı konulmasında önemli bir yeri vardır (Celik ve Kadioglu, 2010). ST3 düzeyi hipertiroidinin şiddetini göstermede, tedaviye yanıtının izlenmesinde, bazı hipertiroidili hastaların ayırıcı tanısında daha çok işe yarar. ST3 özellikle Graves hastalığında ve bazı toksik nodüller guatr hastalarında daha yükselmektedir. Graves

hastalığı proteinin yapısındaki antikorların anormal şekilde artmasından dolayı vücuda zarar vermesidir.

D- Tiroglobülin (TG)

Tiriglobülin 0.1ng/ ml kadar düşük düzeyleri ölçebilecek hassasiyette IRMA veya RIA ile ölçülebilmektedir. TG ölçümünün iki önemli endikasyonu vardır (Cooper, 2007).

1. Tiroid epitelyal kanserlerin (papiller, folliküler, Hürtle hücreli karsinomlar) saptanması.
2. Eksojen tiroid hormon alımının gerçek hipertiroididen ayrımıdır.

Tiroglobülin değerlerinde IRMA ölçümünde düşük, RIA ölçümünde yüksek değer elde edilmektedir. Serum TG düzeyi malign nodülleri benign nodüllerden ayırt ettirmez (Celik ve Kadioglu, 2010). Kadınlarda bu değer erkelere göre daha yüksek çıkmaktadır. Gebe ve yeni doğanlarda bu değer oldukça yüksektir.

2.2. Tiroid Hastalıkları

2.2.1. Benign Tiroid Hastalıkları Nodülleri

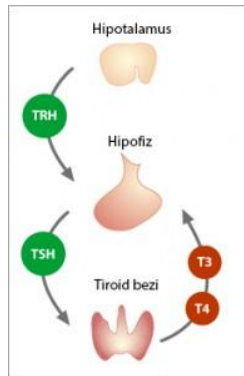
Tiroid nodülleri jelatimsi kolloid materyalden zengin olup, çevre dokudan farklı yapıda ve radyolojik olarak etraf tiroid parenkiminden ayrılabilir lezyonlardır (Cooper, 2009). Tiroid nodülünün fazlalığı iyot alımına bağlı olarak değişmektedir. Ülkemizde tiroid hastalığı olduğu bilinen 1831 hastada yapılan bir çalışmada, hastaların %67'sinin ötiroid ve diffüz guatrı, %33'ünün nodüller guatrı olduğu görülmüştür (Urgancıoğlu, 1997). Yapılan çalışmalara göre tiroid nodülü kadınlarda (20-40 yaş) erkelere göre 2 kat fazla olduğu bulunmuştur.

Hasta sorgulanmasında genellikle aşağıdaki özelliklere bakılmaktadır. Bu özellikler:

- ✓ Yaş
- ✓ Cinsiyet
- ✓ Başlangıç ve büyüme hızı
- ✓ Radyasyon
- ✓ Aile hikayesi
- ✓ Ailede geçirilmiş tiroit hikayesi

- ✓ Ses kısıklığı
- ✓ Öksürük
- ✓ Yutma güçlüğü
- ✓ Dispne, stridor
- ✓ Boyunda şişlik
- ✓ Nodülde sertlik
- ✓ Fizik muayene bulguları
- ✓ Boyun muayenesi: Nodülün özellikler, Lenf nodları Pemberton bulgusu, ağrı, cilt (hiperemi)
- ✓ Larenks muayenesi
- ✓ Ateş
- ✓ Kalp atım hızı
- ✓ Solunum sayısı
- ✓ Göz muayenesi
- ✓ Ellerde tremor
- ✓ HT (MEN sendromu, hipertiroidi)

Tiroid hastalarında metabolik ve etyolojiyi araştırmasında ilk yapılması gereken ölçüm TSH ölçümüdür. TSH ölçümü durumu belirlemek için ideal bir yöntemdir. Hipotalamus – hipofiz- tiroid aksındaki bütünlüğün bilinmesinde TSH en iyisidir. Ötiroit bir hastada TSH seviyesi 0.3-0.5 mU/L aralığında olmaktadır (Özbilen Acar ve Çam, 2011).



Şekil 2: Tiroid bezi hormon şeması (<http://drhalilerturk.com/hipotiroidi-tani-tedavi-ve-takibi/>)

Tiroid bezinin anatomisini daha iyi görebilmek için tiroid ultrasonografisi (USG), tiroid sintigrafisi (STG) veya bilgisayarlı tomografiye (BT) bakılmaktadır. Bu

yöntemler nodüllerin büyüklüğünü, lokalizasyonu malign şüphesi, solid, kistik, ve mistik yapıda nodüllerin ayırımında, tiroid bezinin kan akımının görüntülenmesinde bize yardımcı olmaktadır.

A- Nodül Tipleri

a) Kistik Nodüller: Bu nodül tipi genellikle içi kolloid sıvısı ile dolu nodüllerdir. Sıvının rengi çikolata, saman sarısı ve kanlı renkte olabilmektedir. Kistik nodüllerin içindeki sıvı peruktan ethanol tedavisi ile boşaltılabilir. Kistik nodüllerin sonradan kanser riski oluşturduğuna dair fikir birliği henüz yoktur. Bir çalışmada pür kistik nodüllerin (tüm nodüller içinde < %2) beklenmeyen şekilde malignensi oranı yüksek bulunmuştur (Frates MC ve ark., 2006).

b) Mikst Nodüller: Mikst nodüllerin solid ve kistik komponentleri mevcuttur. Semptomatik hastalarda kistik bölümün aspirasyonu ile kist boşaltılabilir (Özbilen Acar ve Çam, 2011).

c) Otonom Nodüller: Hastaya yapılan laboratuvar sonuçlarında TSH düşük veya sınıra yakın ise otonom nodül düşünülmelidir. Yapılan tetkiklere otonom nodülün fonksiyonu araştırılmalıdır. Otonom nodül hipertiroidiye neden oluyorsa radyoaktifot veya cerrahi girişim ile tedavisi zorunludur ve bu girişim genellikle antitiroit ilaçla tedavi sonrası yapılır (Özbilen Acar ve Çam, 2011). Büyük otonom nodülü olan hastaların (nodül 3 cm veya daha büyük) %20 kadarı hipertiroit olmaktadır. Bu nodüllerin ve mevcut hipertiroidizm riskinin azaltılması radyoaktifot ile tahrip edilmeleridir.

A- Tiroid Nodüllerinde Tedavi Yöntemleri

Yapılan tetkikler sonucunda benign nodüllü gösteriyor ise belli aralıklarda tiroid ultrasonografisi (USG) çektirilmelidir. Bu aralıkta nodül stabil bir seyir seyrediyor ise 3-5 yıl da bir tiroid ultrasonografisi tekrarlanmalıdır.

2.2.2. Malign Tiroid Hastahkları Nodülleri

Her yıl dünyada yaklaşık 122.000 tiroid kanseri ortaya çıkmaktadır. Kanserlerin büyük bir çoğunluğu foliküler hücre kökenli olup bunların önemli bir bölümü oldukça yavaş seyirlidir (Kurnaz ve Tekat, 2011). Malign nodüllü hastaların yaş ortalaması genç ve orta yaş arasında sık görülmektedir. Yapılan bir çok çalışmada malign nodüllü kanserlerin kadınlarda erkeklere göre 2-4 kat daha fazla olduğu göstermektedir. Bu cinsiyet ayrımı çocuklarda ve yaşlılarda görülmemektedir. Bu

cinsiyet farklılığı akla tiroid kanser patogeneğinde seks hormonlarının ve reseptörlerinin etkinliği var mı sonucu getirmekle birlikte bunu destekleyecek fazla bir çalışmada bulunmamaktadır (Negri ve ark., 1999). Malign nodüllü tiroid hastalığı dünyada Danimarka, Hollanda gibi ülkelerde oran düşükken, Amerika, Japonya, Fransa, Avustralya'da yüksektir. Türkiye'de bu dağılımda orta sıralarda yer almaktadır. 1970 yılından itibaren tiroid kanser tanısı artmıştır.

Malign nodüllü tiroiditler papiller, foliküler, medüller ve undiforamsiye (anaplastik) olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Bu grupların altında yatan farklı morfolojik ve klinik özelliklerinin olması ve moleküler düzeyde farklı gen gruplarının olmasıdır (Kurnaz ve Tekat, 2011).

Papiller tiroid kanserin gelişmesinde çevresel, genetik ve hormonal faktörlerin etkileri mevcuttur. Çevresel faktörlerin etkileri genotoksik ve nongenotoksik olarak sınıflandırılmaktadır. Tiroid bezinin çevreden iyot ihtiyacı alması tiroid bezi üzerinde radyoaktif iyotun genotoksik (DNA hasarı) etkisine ve iyot eksikliğinde nongenotoksik etkisine (TSH stimülasyonu) neden olabilmektedir (Kurnaz ve Tekat, 2011). Çocukluk döneminde radyasyona maruz kalma ile iki tiroid kanserinde risk oluşturmuştur. 1986 Çernobil faciasından sonra Beyaz Rusya'daki çocuklarda tiroid kanserinin arttığı bildirilmiştir (Williams, 2002). İkinci dünya savaşında atom bombası sonrasında tüm vücut radyasyona (gama ve nötron ışınları) maruz kalırken, çernobilde özellikle *I-131* ve *I-132* maruziyet söz konusudur. Tiroid dokusu vücudun diğer dokularına göre iyotu bin kat daha fazla tutmaktadır. Radyasyon faciasında 1 yaş altı çocuklarda tiroid kanser oranında büyük bir artış olmuştur. On yaş çocuklarda bu oran daha da düşüktür. Bunun nedeni küçük çocukların yetişkinlere göre iyot alımının daha fazla olması radyoaktif iyotdan zengin süt ile beslenmeleridir. Süt radyoaktif iyotun vücuda ulaşmasında en önemli besin maddesidir (Kurnaz ve Tekat, 2011).

Radyasyon DNA'da çifte kırılmalara neden olmakta ve *RET* ve *TRK*'nin tekrar dizilimine neden olmaktadır (Kurnaz ve Tekat, 2011). Bu da kanserin neden olduğu açıklanabilmektedir. İyot eksikliği kansere neden olmaktadır (Medeiros-Neto ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda yaş, tiroid kanserinin en önemli faktörleri arasındadır. Papiller tiroid kanserleri ileri yaşlarda seyretmektedir. Kadınlarda bu sınır 50 erkeklerde 40'tır (Cady, 1981). Cinsiyet önemli bir faktördür. Tiroid kanserlerinde

kadınlarda daha az nüksettiği ve daha uzun bir yaşamla seyrettiği gösterilmiştir (Cady, 1981).

Foliküler nodüllü tiroid kanserleri tiroid kanserlerinin %10-15'ini oluşturmaktadır. Kadınlarda sık görülmektedir. Bu tip kanser iyot eksikliği olan bölgelerde daha sık görülmektedir. Bu tip kanser genel olarak akciğer ve kemiklere metastaz yapmaktadır.

Medüller tiroid kanseri tiroid hormonun orta kesiminde c hücrelerinin predominant olduğu bölgelerde görülmektedir (Kurnaz ve Tekat, 2011). Bu kanser türü tüm tiroid kanser türlerinin %5-10'unu oluşturmaktadır. Bireylerde görülme yaşı 50 civarında seyretmektedir ve kadınlarda biraz daha fazla görülmektedir. Bu kanser türü karaciğer, akciğer, kemiklere daha az olarak da beyin, yumuşak doku ve kemik iliğine metastaz yapmaktadır.

Undiferansiye (anaplastik) kanser türü agresif tümör olarak tanımlanmaktadır. Genellikle yaşlılarda görülmektedir. Hastaların sadece %25'i 60 yaşın altındadır. (Kurnaz ve Tekat, 2011). Kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre biraz daha fazladır. Tüm tiroid kanser türlerinin %5'den az oluşturmaktadır.

Hastaların tümünde hızla büyüyen kitle ile kendini göstermektedir. Tanı olarak solunum sıkıntısı, disfaji, servikal ağrılar olarak kendini göstermektedir. En çok akciğer, kemik ve beyne metastaz yapmaktadır.

2.2.3. Kronik Tiroidit Hastalıkları

Tiroid organının mikroplu ya da mikropsuz iltihaplanması olayı tiroidit hastalığını meydana getirmektedir. Tiroidit en sık karşılaşılan endokrin bozukluklardır. Tiroidit tipleri:

1. Akut süpüratif tiroidit
2. Subakut lenfositik tiroidit
3. Subakut granülomatöz tiroidit
 - Sporadik sessiz tiroidit
 - Postpartum tiroidit
4. İnvaziv fibröz tiroidite
5. Kronik lenfositik tiroiditi (Hashimoto hastalığı)

A- Akut Süpüratif Tiroidit

Akut Süpüratif Tiroidit, bakteri ve fungusların oluşturduğu akut iltihabı bir tiroid hastalığıdır (Elias ve ark., 1985). Bakteriler tiroide başlıca;

- ✓ Kan yoluyla
- ✓ Lenf yoluyla
- ✓ Tiroglossal kanal artıkları yoluyla
- ✓ Çevre dokudan yayılmayla
- ✓ Piriform sinüs fistülü yoluyla gelmektedir (Goudreau ve ark., 1986).

Akut süpüratif tiroidit her yaşta ve ırkta görülmektedir. Genetik ile oluşumu çok düşüktür (Pearce ve ark., 2003). Akut tiroiditler için en sık bilinen türleri basit guatr, nodüler guatrdır. (Jeng ve ark., 1994).

B- Subakut Tiroidit

Subakut tiroidit virüs kaynaklı tiroid bezi hastalığı olarak bilinmektedir. Genellikle üst solunum yollunun virüslerle oluşan iltihabın boyun çevresinde şiddetli ağrıyla kendini gösteren, tiroid bezinin iltihaplı bir hastalığıdır (Anonim, 2019). Literatür de 1904 yılında ilk kez Fritz de Quervain tarafından tanımlanmıştır (Lazarus 1995). Tiroid hastalıklarının %5-6'sını oluşturmaktadır. Kadınlardaki oran erkeklere nazaran 2-3 kat daha fazladır. Her yaş grubunda görülse de 40-50 yaş arasında daha sıklıkla görülmektedir (Lazarus, 1995). Subakut tiroiditte görülen belirtiler;

Boyun bölgesinde

- ✓ Boyun ağrısı
- ✓ Boğaz ağrısı
- ✓ Boyunda şişlik
- ✓ Ağrının dişlere, çeneye ve kulağa vurması
- ✓ Yutkunma ve baş hareketleri ile ağrı
- ✓ Boyunda baskı hissi

Tüm vücuda

- ✓ Halsizlik,
- ✓ Üşüme, titreme, ateş

- ✓ İştahsızlık
- ✓ Kas, kemik, eklem ağrıları

Tiroid hormon fazlalığı

- ✓ Sinirlilik
- ✓ Çarpıntı
- ✓ Sıcağa tahammülsüzlük
- ✓ Terleme
- ✓ Titreme
- ✓ Zayıflama

Laboratuvar testlerinde, genellikle eritrosit sedimentasyon hızı artmaktadır (Singer, 1991). Beyaz küre hücreleri normal veya artmış durumdadır. Anemi mevcuttur. Yapılan testlerde T4 seviyesi yüksek çıkmaktadır.

C- Klinik Sessiz Tiroidit (Postpartum Tiroidit)

Tiroid bezinde geçici özellikle fonksiyonel bozuklukların olduğu, subakut tiroidite benzer klinik evreler ile karakterize ancak ağrısız bir enflamasyondur (Özbilen Acar ve Çam, 2011). Postpartum vakası ilk defa 1977 yılında saptanmıştır. Postpartum tiroiditi en çok Japonya, İsveç, Kuzey Amerika gibi ülkelerde görülmektedir. Yapılan araştırmalara göre kadınlarda 2-3 kat erkeklere göre daha fazla görülmektedir.

Postpartum tiroiditlerde özellikle otoimmün hastalıklarda tip I diabet ile birlikte görülme sıklığı fazladır (Alvarez-Marfany ve ark., 1994). Yine postpartum tiroiditler de ailevi hikaye görülmektedir (Lervang ve ark., 1987). Yine sigara içen gebelerde bu hastalık için risk fazladır (Browne-Martin ve Emerson, 1997).

D- Riedel Tiroidit

Tiroidit bezinde aşırı ve invaziv fibrozisi ile karakterize inflamatuvar bir hadisedir (Özbilen Acar ve Çam, 2011). İlk defa 1893 yılında Bernhard Riedel tarafından tanımlanmıştır (Güney ve ark., 2008). Riedel tiroiditi kadınlarda 3-4 kat erkeklere oranla daha fazla görülmektedir. Klinik tanılarda özellikle solunum güçlüğü, ses kısıklığı ve yutma güçlüğü bulgularla ortaya çıkmaktadır. Fiziksel muayenede ele aşırı sert bez gelmektedir. Riedel tiroiditi tedavisinde genellikle cerrahi müdahale yapılmaktadır.

E- Hashimoto Tiroiditi

Hashimoto tiroiditi hastalığı otoimmün tiroid bezi hastalığıdır. Hashimoto hastalığı 1912 yılında Japon bilim adamı Akira Hashimoto tarafından tanımlandığı için bu ismi almıştır. Bu hastalık tiroid bezi yetmezliğinin en büyük sebeplerindedir. Hastalığın başlangıcında tiroid bezi büyümekte daha sonrada küçülmekte ve yok olmaktadır. Tiroid bezine birçok iltihap hücresi birikmektedir. İltihap sonucu tiroid hücreleri hasar görür ve tiroid hormonu azalmaya başlamaktadır. Tiroid bezinin küçülmesiyle ortaya hormon yetmezliği çıkmaktadır. Vücut tiroid bezini yok etmek için çok miktarda anti-TPO antikor ve anti-tiroglobulin antikor üretmektedir. Bu antikorlar tiroid bezine bağlanarak tiroid hücrelerine zarar vermektedir.

Gen, hormonlar, aşırı iyot tüketimi, radyasyona maruz kalma hastalığın gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmektedir. Hastalarda görülen semptomları halsizlik, kilo alımı, baş ağrısı, kalınlaşmış ve ödemli cilt, dilde hipertrofi, kas krampları görülebilmektedir. Hastalığın ileri boyutlarında kalp yetersizliği ve akciğer ödemi de görülmektedir. Şuan hashimoto hastalığının tedavisi bulunmamaktadır. Hormon seviyeleri ve metabolizma değerleri ilaçlarla düzenlenmektedir.

F- Hipertiroidizm ve Tirotoksikoz

Hipertiroidi kanda yüksek düzeyde tiroid hormonları taşınması iken, tirotoksikoz ise dolaşımdaki yüksek düzeyde bulunan tiroid hormonlarına vücudun vermiş olduğu biyokimyasal reaksiyonların neden olduğu klinik tablodur.

Hipertiroidizm belirtileri;

- ✓ Sinirlilik, aşırı heyecan ve duygusallık
- ✓ Kilo kaybı
- ✓ Sıcağa tahammülsüzlük
- ✓ Titreme
- ✓ Çarpıntı
- ✓ Saç dökülmesi
- ✓ Cilt ve tırnaklarda değişiklik
- ✓ Barsak hareketlerinde hızlanma

- ✓ Kuvvet azalması
- ✓ Adet düzensizliği
- ✓ Cinsel isteksizlik
- ✓ Apatetik hipertiroidizm
- ✓ Göz bulguları
 - Üst göz kapak kasılması
 - Gözlerin öne doğru fırlaması
- ✓ Laboratuvar testlerinde bozulma

Hipertiroidinin anlaşılması için tiroid sintigrafisi çekilmelidir. Tiroid sintigrafisinde radyoaktif iyot uptake'inin (RAIU) artması hipertiroidi olarak yorumlanır. Hipertiroidi tanısında da laboratuvar sonuçlarında düşük TSH, yüksek sT4 ve sT3 değerleri önemlidir.

2.3. Epigenetik Mekanizmalar

1950'li yıllarda ilk olarak Conrad Waddington tarafından ortaya atılan epigenetik kavramı günümüzde "DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile katılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler" olarak tanımlanmıştır. Başka bir tanımlama ile epigenetik, DNA sekansında bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerin incelenmesi, yani genotipi değiştirmeden fenotipin değiştirilmesi olarak tanımlanır (Bohacek ve Mansuy, 2013).

Son yıllarda epigenetik alanında yapılan çalışmalarda birçok bakış açısı kazandırmıştır. Proceedings of the National Academy of Sciences dergisinin Temmuz 2005 sayısındaki yayınında ikizler ile ilgili araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada 3-74 yaş arasında oluşan 15'i kız 25'i erkek 40 ikiz çift üzerinde çalışma yapılmıştır. Bilim insanlarının bu çalışmada ulaştığı temel sonuç, ikizlerin bulunduğu yer, hayatlarının ilk senelerinde genellikle aynıdır ve çevre şartları genlerin çalışmasını etkilemektedir. Farklı özelliklere sahip yerlerde yaşamış olmaları, değişik çevre şartlarına maruz kalmalarıyla sonuçlanmaktadır. Beslenme ile ilgili alışkanlıkları, sigara durumları veya fiziksel aktivite düzeyleri gibi etkenler bu önemli birkaç farklılıklardandır. Bundan dolayı da çevresel faktörlerin ikizlerin genlerinin çalışmasına da yansımaktadır (Cooney, 2006).

Epigenetik mekanizmalar, özellikle canlıların embriyosundan gelişimi boyunca yetişkin bir bireye doğru gözlemlenen hücre farklılaşmalarıyla çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli bir rol üstlenmektedirler. Gen ifadesinde görülen bu değişimler, DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarında bulunan kromatin yapılarının oluşması ile ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklikler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, miRNA gibi değişimleri içermektedir (Egger ve ark., 2004).

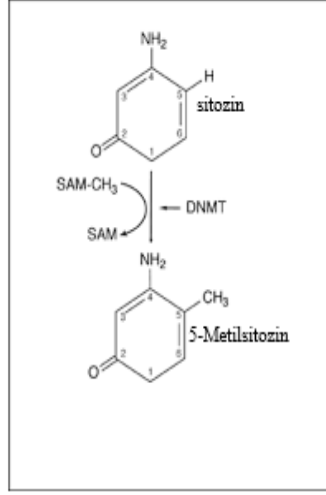
2.3.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, edinilmiş epigenetik bilginin kuşaksal aktarımı için güçlü bir aday mekanizmadır (Paoloni-Giacobino ve Chaillet 2006). DNA diziliminin aynı olması koşuluyla DNA'nın çalışması sonucu ortaya çıkan bu farklılığın, metil adı verilen ve bir karbon atomu ile üç hidrojen atomundan oluşan ufak bir molekülün DNA'ya eklenmesiyle keşfedilmiştir (Karaçay 2010). Bir başka deyişle DNA metilasyonu; DNA *metiltransferaz* (*DNMT*) katalizinde bir *CpG* dinükleotidindeki *sitozin* halkasının 5. karbonuna metil grubunun kovalent olarak bağlanmasıyla oluşmakta ve sonuçta 5-metilsitozin (5mC) meydana gelmektedir (Şekil 3) (Reamon-Buettner ve ark., 2008).

CpG adaları genellikle 500 bp'den daha büyük bir uzunluk, G + C içeriği %50'den büyük, *CpG*'ye kadar gözlemlenen bölgeler olarak tanımlanmaktadır (Gardiner-Garden ve Frommer, 1987). Tekrarlanan sekanslar hariç, insan genomunda yaklaşık %25'i 850 bp'den daha az olan yaklaşık 25.000 *CpG* adacığı vardır (Bird, 1986).

DNA metilasyonu, embriyonik gelişim sırasında genlerin anlatım yapıp yapmamasında, transkripsiyonda, kromozom stabilitesinde, x kromozomu aktivasyonunda ve genomik imprinting'de önemli rol oynamaktadır (Esteller, 2007).

DNA metilasyon modellerinin kurulmasında, korunmasında ve sürdürülmesinde görevli en az üç enzim vardır. DNA metiltransferaz 3A (*DNMT3A*) ve DNA metiltransferaz 3B (*DNMT 3B*) enzimlerinin erken gelişiminde görevli olduğu, hemimetil ve metillenmemiş DNA (bir zinciri metillenmiş diğer zincir metillenmemiş) için metil gruplarının kullanıldığı düşünülmektedir. *DNMT1*'in öncelikle bir onarım enzimi olarak hareket ettiği düşünülmektedir (Holliday, 1987).



Şekil 3: Sitozinin metilasyonu

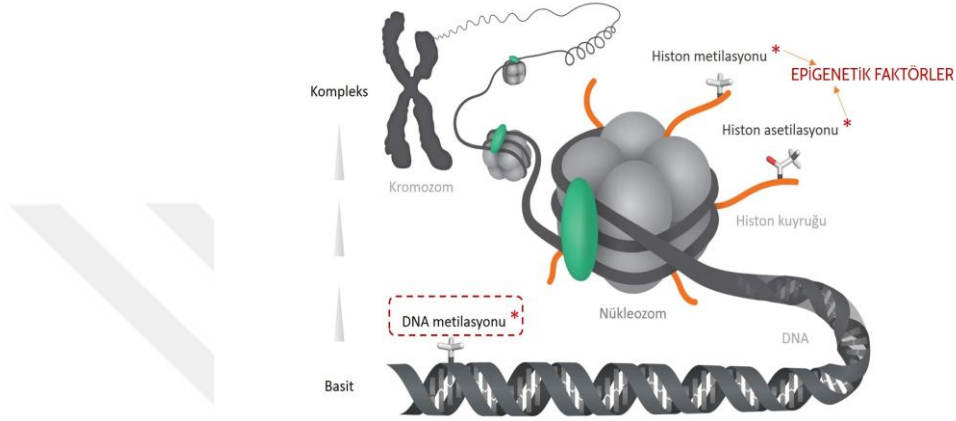
İkiz fareler ile yapılan bir çalışmada, zamansal değişim ile birlikte farklılıklar da ortaya çıkmıştır. Farelerden birinin rengi sarı diğere rengi kahverengi-sarı karışımı olmuştur. Sarı renkli farenin sarı-kahverengi fareye göre daha fazla hastalıklara duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Kıl rengindeki farklılıklar yapılan çalışmalarda sorumlu olunan genin çalışmasıyla ilgilidir. Renk veren *agoti* genin Sarı kılarda çalışması, kahverengi genin susmuş olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada diğere bir bulgu ise anne farenin beslenmesinde yavru farelerin genlerini etkilediği düşünülmektedir. Çevresel kirleticilerden Bisphenol A (BPA)'nın farelerin yiyeceklerine eklenmesi ile sarı renkli farelerin sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumda da kıl rengindeki genin etkilendiği gözlemlenmiştir. Metilasyon işlemi sırasında metil grupları DNA'nın *sitozinine* eklenir.

2.3.2. Histon Modifikasyonu

Biyolojide, histonlar, DNA'yı nükleozom olarak adlandırılan yapısal birimlere paketleyen ve düzenleyen ökaryotik hücre çekirdeklerinde bulunan yüksek oranda alkali proteinlerdir (Youngson, 2006). Histon modifikasyonları, kromatinlerle proteinler etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenini sağlamaktadır (Segré ve Chiocca, 2010).

İnsanların genetik materyallerinin korunması, paketlenmesi, DNA transkripsiyon düzenleme, replikasyon ve tamir gibi önemli süreçler histon proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Shahbazian ve Grunstein 2007).

En yaygın histon modifikasyonları *H3* ve *H4* histonunun amino terminalindeki lizin kalıntılarının asetilasyon ve metilasyonudur (Glozak ve Seto 2007). Histon asetilasyonunda, genlerin transkripsiyonuna ve kromatin katlanmasının regülasyonunda görevlidir. Histonların metilasyonu, lizin kalıntı durumuna bağlı olarak transkripsiyonun baskı veya aktivasyonu ile ilişkilidir (Yan ve Boyd 2006).



Şekil 4: Histon metilasyonu şeması (<https://www.drozdogan.com/genler-icin-de-egitim-sart-kanser-de-epigenetik-tedaviler/>)

2.3.3. MicroRNA (miRNA)

MikroRNA genomda intron protein kodlayan veya protein kodlamayan ekzon bölgelerinin RNA genlerindeki transkripsiyonu sağlayan, ancak protein translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. Günümüzde insan genomunda binin üstünde mikroRNA tanımlanmıştır (Kim, 2005). Lee ve arkadaşları ilk mikroRNA'ları 1993 senesinde 47 yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans*'ta isimlendirilen *lin-4* geninin protein kodlamamasına karşın, 22 nükleotid uzunluğunda ufak bir RNA'yı transkribe etmesiyle bildirmişlerdir (Lee ve ark., 1993). Bulunan bu genomik yapı için ilk kez 2001 yılından itibaren mikroRNA terimi kullanılmaya başlanmıştır (Lee ve ark., 1993). MikroRNA'lar kromatin yapısının değişiminde kilit role sahiptirler ve genom düzeninin korunmasına katılmaktadırlar. Hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, apoptoz ve metabolizma gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik olayları düzenlerler (Backes ve ark., 2010).

2.4. DNA Metilasyonu ve Kansere İlişkisi

Metilasyon, memeli DNA'da gerçekleştiği bilinen tek kovalan mekanizmadır ve çoğunlukla CG (*CpG*) yapısındaki *sitozinler* de meydana gelir (Szyf ve ark., 2000).

Ayrıca, *CpG* adacıkları dışında bulunan sitozinlerin ise metillendiği bilinmektedir. Bu kapsamda, nükleer DNA ile birlikte mitokondrial DNA'da da metilasyon meydana geldiği ve farklı hastalık süreçleri ile ilgili olduğu bilinmektedir. Normal hücrelerde ekstra genik DNA (*CpG di nükleotidleri*) metileyken, gen promotorlarında bulunan *CpG* adacıkları demetiledir. X inaktivasyonu ve genomik imprintinge uğrayan genler istisnadır; bunlar, normal hücrelerde de tek alelden ekspresyonun sağlanması için sadece bir alelde metillidir (Sulewska ve ark., 2007). Promotor, bir genin 5' ucunda bulunan ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraza bağlanma bölgesi oluşturan DNA dizisidir ve gen ekspresyonunun kontrolünde önemli role sahiptir. Normal hücrelerde gözlenen promotor bölge metilasyonunun hücre farklılaşmasında, dokuya özgü genlerin ekspresyonunu düzenleyerek etkili olduğu düşünülmektedir (Shen ve ark., 2007). *CpG* adacıkların da doku ve gene özgü metilasyon derecesinin yaşla arttığı bu artışın rastgele olmadığı ve yaşlanmaya bağlı oluşan kanserlerde demetilasyonun etkili olduğu düşünülmektedir (Kang ve ark., 2003).

Kanser oluşumunu bir hücrenin büyüme avantajı kazanması ile ardı ardına oluşan değişikliklerin sonucu olarak açıklanabilmektedir. Bu durumda en etkili iki gen sınıfından bahsedilmektedir. Bunlar, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler hücre büyümesini ve yaşama süresini arttırırken tümör bunun tam tersini yapmaktadır. Her ikisinde kanser yapıcı etki yapabilmektedir. Kanser oluşumunda bir başka hipotez de Knud Son'un iki vuruş hipotezidir. Bu hipoteze göre, malign dönüşümün oluşabilmesi için organizmada tümör baskılayıcı genlerinin iki alelinin işlev kaybetmesi gerekmektedir. Bugün, bu iki vuruşun birinin genetik (nokta mutasyonu, delesyon, çerçeve kayma mutasyonu...) diğerinin epigenetik (promotor metilasyonu) ya da her ikisinde genetik veya epigenetik mekanizmaların rol alabileceği bilinmektedir (GRØNBÆK ve ark., 2007). Kanser oluşum süreci ile genomik metilasyon kalıbı değişiklikleri arasında ki ilişki 1980'li yılların başından beri bilinmektedir (Warnecke ve Bestor, 2000). Kanser hücrelerinde, genomda genel hipometilasyonun yanısıra, bazı özel genlerin promotor bölgelerindeki *CpG* adacıkların da hipermetilasyon gözlenmektedir (Park ve ark., 2007). *CpG* adacık metilasyonunun, o genin transkripsiyonunu önlediği bilinmektedir (Bird, 1996).

Meme kanserine yatkınlık yaratan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde gözlenen binden fazla mutasyonun *CpG/CpNpG* motiflerinde saptanmış olması da 5mC'in artmış mutasyon riski oluşturduğunu desteklemektedir (Cheung ve ark., 2007)

DNA metilasyonu; karsinogenlerin DNA'ya bağlanmasını arttırarak, DNA'nın ultraviyole ışınlarını daha fazla emmesine neden olarak da mutasyon hızını arttırır ve gen inaktivasyonuna neden olur (Baylin, 2005).

Kanser hücrelerinin tümörü baskılayıcı genlerinde, hücre döngüsünü kontrol altına alan ve apoptosisi engelleyen genler ile DNA onarım genlerini, gelişim sürecinde etkili yolların normal işleyişini sağlayan genlerin hipermetilasyon ile susturulduğu bilinmektedir (Zhu ve Yao, 2007). Kanserlerde hipermetilasyon saptanan 90 kadar gen bulunmaktadır (Sulewska ve ark., 2007). DNA metilasyonu izole bir olay değildir ve aynı anda yüzlerce promotor bölgeyi etkileyebilmektedir (Esteller ve ark., 2001).

CpG adacıkları metilasyon derecesi, farklı tümör tiplerini de değişebildiği gibi aynı tümöre sahip kişilerde, çevresel etmenlere, genetik yatkınlığa ve epigenetik kontrolü etkileyen faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Ballestar ve Esteller, 2002). Farklı kanserlere özgü epigenetik değişimler tanımlanmıştır. Kolorektal kanserlerde gözlenen mikro satellit instabilitesinden, yanlış eşleşme onarımında görev yapan “*human Mutl protein homolog1 (hMLH1)*” geninin; kolon, meme, beyin, akciğer kanserlerinde, alkile edici ajanların yol açtığı mutasyonun tamirinde etkinliği olan *O6 Metil Guanin Metil transferaz (O6-MGMT)* geninin promotor bölgesinde hipermetilasyonunun etkili olduğu bildirilmiştir (Herman ve ark., 1998).

Kanserin ilerlemesinde mitokondrial DNA (mtDNA) miktarının azalmasının etkili olduğu bilgisi üzerine Xie ve ark.'nın yaptığı çalışma ile mtDNA'sı çıkarılmış prostat kanseri hücrelerinde, *DNMT1* ekspresyon artışı ile birlikte, çekirdek DNA'sında endotelin *B reseptör (EDNRB)*, *Ekaderin*, *O6-MGMT* genlerinin promotor bölgelerinde hipermetilasyon gözlemlendiği ortaya konmuştur (Xie ve ark., 2007).

2.5. Hücre Dışı Sirküler DNA

2.5.1. Hücre Dışı Sirküler DNA Nasıl oluşur

Hücesiz nükleik asitlerin (ccfDNA) ilk keşfi Mandel ve Metais'in sağlıklı bireylerin ve hastaların plazmasında dolaşan DNA ve RNA 1948'de tespit edilmiştir (Mandel 1948). Bununla birlikte, bulgunun temeli anlaşılmamış olunması nedeniyle, bu çalışma o dönemde büyük oranda göz ardı edilmiştir. CcfDNA üzerine ikinci bulgu Tan ve ark. (1966), sistemik muzdarip hastalarda ccfDNA'nın anormal bir paternini gözlemlemişlerdir.

1990'lı yıllara kadar ccfDNA'lar ile ilgili bilgi çözülmeye başlamamıştır, ancak kanserli hastaların plazmasında tümör kaynaklı kanserojen DNA'nın bulunması (Sorenson ve ark., 1994) ve maternal dolaşımda fetal orijinli DNA tespit edilmesi ile ccfDNA ile bilgi edinilmiştir (Lo ve ark., 1997). Daha sonra otoimmün hastalıklar, inme ve travma dahil olmak üzere kronik ve akut patolojileri olan hastalarda ccfDNA düzeylerinin belirgin şekilde arttığı keşfedilmiştir (Butt ve Swaminathan, 2008). Bu nedenle, ccfDNA konsantrasyonunun, doku hasarı, hücre ölüm oranını yansıtacak bir invaziv olmayan kan biyobelirteçi görevi yapabileceği sonucuna varılmıştır. CcfDNA'nın araştırması genetik materyal davranışındaki paradigma kaynaklarına katkıda bulunmuştur. Yatay olarak aktarılan endojen DNA ve RNA'nın alıcı hücrelerde içselleştirilmesi biyolojik aktivite sergilediği gösterilmiştir (GARCÍA-OLMO ve GARCÍA-OLMO, 2001, García-Olmo ve ark., 2010). Bununla birlikte, biriken veri birikimlerine rağmen, ccfDNA'ların kaynağı, metabolizması ve doğal özellikleri ile ilgili birçok temel konu belirsiz ve tartışmalı kalmıştır.

Virtozom olarak adlandırılan lipoprotein yapısı, içerdiği DNA'nın biyolojik ilgisi ve miktarı daha az belirgin olmasına rağmen, bir DNA içeren yapı olarak da tanımlanmıştır (Gahan ve Stroun, 2010), nükleer genomik kökenli ccfDNA'nın dolaşımda bulunmasına karşın, dolaşımdaki mitokondrial DNA'yı (mtDNA) hem özgür hem de parçacıklara bağlı formlarda var olabileceğini göstermiştir (Chiu ve ark., 2003).

Bununla birlikte, ccfDNA'nın baskın şekli organizmanın durumuna göre değişebileceğinden oldukça tutarlı bir görüş mevcuttur (Holdenrieder ve ark., 2008). Diyabetli çocuklarda ve romatoid artritli, lenfoma ve miyelomlu hastalarda jel

elektroforezi, ccfDNA'nın apoptotik hücrelerde görülen nükleozomal veya merdiven benzeri bir model elde ettiği gösterilmiştir (Deligezer ve ark., 2006). Dolaşımdaki nükleosomların nicelleştirilmesi, sağlıklı bireylerde sayılarının oldukça düşük, çeşitli otoimmün hastalıklar ve kanserli kişilerde daha yüksek seviyelerde olduğu görülmektedir (Holdenrieder ve ark., 2008).

2.5.2. Hücre Dışı Sirküler DNA Biyolojik Mekanizmalar

Patolojik koşullarda, ccfDNA'nın birincil kaynakları apoptotik ve nekrotik hücrelerdir (Jahr ve ark., 2001). İçinde indüklenen karaciğer hücre ölümünün fare modeli, Jahr ve ark. (2001) ccfDNA'nın oluşumunda nekrozun belirgin bir şekilde yer aldığını göstermiştir (Jahr ve ark., 2001). Oysa Pachl ve ark. (2005) kritik hastalığı olan yoğun bakım ünitesindeki hastalarda apoptozun total ccfDNA havuzuna katkısının nekrozunkinden 16 kat daha fazla olduğunu bildirmiştir (Pachl ve ark., 2005). Bununla birlikte, çeşitli patolojilerde, bir apoptotik merdiven veya nükleozomal görünüşün baskınlığı ccfDNA'nın apoptozdan türetilen ccfDNA için kanıt olduğu düşünülmektedir (Gormally ve ark., 2007). Hücre ölümü, sağlıklı bireylerde dolaşımdaki ccfDNA havuzuna katkıda bulunur ve günlük olarak birkaç yüz milyondan fazla hücrenin apoptozise uğradığı gözlemlenmiştir (Nagata ve ark., 2010). Dolaşımdaki nükleoza katkıda bulunan ek bir mekanizma, nötrofil antimikrobiyal savunmasının yeni tanımlanmış modu NETOZIS'dir (Wartha ve ark., 2007).

Belirli canlı hücreler ccfDNA'yı da serbest bırakabilir. Eritrosit olgunlaşması sürecinde eritroblastlar, çekirdeklerini enükleasyon adı verilen bir süreçte dışarı atarlar (Nagata ve ark., 2010) ve dışarı atılan kromatin makrofaj-muamele edilmiş işleme tabi tutulur (Yoshida ve ark., 2005). Bu şekilde üretilen ve dolaşıma bırakılan DNA'nın kesin miktarı belirsizdir. Bununla birlikte, makrofajlarda bozunacak toplam DNA miktarı günlük olarak 1 g'dan fazla olduğu tahmin edilmektedir (Nagata ve Kawane, 2011). Yeni sentezlenen DNA'nın (lipo) nükleoprotein kompleksleri şeklinde aktif hücre salınımı için kanıtlar da vardır. 1970'li yılların başlarında, Anker ve ark. (1975) ve Rogers ve ark. (1972), kültürde yaşayan lenfositlerin, kültür ortamına DNA-protein kompleksleri saldığını bildirmiştir (Rogers ve ark., 1972). Daha yakın zamanlarda, virtozomlar olarak adlandırılan aktif olarak salgılanan yapıların DNA, RNA, lipoproteinler ve DNA ve RNA polimerazları içerdiği

gösterilmiştir (Gahan ve Stroun, 2010). Bununla birlikte, insanlardaki aktif ccfDNA sekresyonunun büyüklüğü ve önemi şu an bilinmemektedir.

Hücrel ölüm ve doku hasarından sonra dolaşıma salınan hücrel DNA (ccfDNA) kısa süre önce hasar derecesinin umut verici yeni bir göstergesi olarak ortaya çıkmıştır. CcfDNA'nın dolaşımdaki miktarlarının değerlendirilmesine ek olarak, ccfDNA metilasyon seviyesi ve parça boyutu dağılımı gibi nitel özellikler, çeşitli patolojilerde yararlı tanı ve prognostik belirteçler olduğu gösterilmiştir. Vücuttaki neredeyse her hücrenin ccfDNA'yı serbest bırakması, bu önlemi homeostatik bozuklukların ve hücrel ölüm hızındaki değişikliklerin oldukça hassas bir göstergesi yapar. Bununla birlikte, ccfDNA değerlendirmesinin artmasına rağmen, dolaşımdaki ccfDNA düzeylerinin düzenlenmesi gibi fizyolojik koşullardaki toplam ccfDNA havuzunun bileşimindeki değişiklikler ile ilgili pek çok husus halen bilinmemektedir. Benzer şekilde, ccfDNA'nın sadece bir risk belirleyici biyobelirteç olup olmadığı veya belirli koşullarda patojenik bir rol oynayıp kazanamayacağı belirsizdir.

2.5.3. Hücre Dışı Sirküler DNA ve Hastalıklarla ilişkisi

Plazma / serumda (ya da kanda) hücrel DNA, dolaşımdaki miktarı çeşitli patolojilerde doku hasarı, hücre ölümü ve enflamasyon ölçüde gösteren güçlü bir belirteç olarak kanıtlanmıştır. Otoimmün hastalıklardan miyokard enfarktüsüne kadar uzanan birçok akut ve kronik hastalığın ccfDNA düzeylerinde yükselme gözlenmiştir (Wagner, 2012). CcfDNA miktarındaki artışın sepsis, bazı kanserler ve akut kardiyovasküler hastalıkların sonuçlarında öngörücü bir değere sahip olduğu gösterilmiştir (Butt ve Swaminathan, 2008). CcfDNA'nın metilasyon modelleri, mutasyonları ve fragman boyu uzunluğu için karakterizasyonu, çeşitli kanser türlerinin teşhisi için invaziv olmayan bir "sıvı biyopsisi (ince iğne aspirasyon biyopsisi)" sağlamıştır (Schwarzenbach ve ark., 2011). Tiroid hastalarıyla ilgili olarak ccfDNA seviyesinde ve kompozisyonundaki değişikliklerle ilgili veriler çok azdır.

Günümüzde, klinik uygulamada ccfDNA değerlendirmelerini yapma konusuna büyük ilgi gösteren alanlar onkoloji ve doğum öncesi tanılardır. Bununla birlikte, ccfDNA izlemenin değerli olduğu düşünülen biyomedikal alanların listesi

büyümektedir. Bu alanlar, transplantasyon ilacı, kardiyovasküler bakım, travmatoloji ve bazı otoimmün ve mikrobik hastalıkların izlenmesini içerir (Tsang ve Dennis Lo, 2007). İçine giren patolojilerin çoğunda yukarıda bahsedilen kategorilerde, ccfDNA düzeylerinin, hastalık ciddiyetinin belirgin bir özelliği olduğu görülmüştür (Butt ve Swaminathan, 2008). CcfDNA'nın nitel özellikleri, özellikle metilasyon paternleri, daha iyi teşhis amaçlarına hizmet etmektedir (Schwarzenbach ve ark., 2011).

2.5.4. Hücre Dışı Sirküler DNA ve Kanser ilişkisi

Göğüs, over (yumurtalık), kolonik, akciğer, prostat, pankreas ve lösemi gibi çeşitli tümör tipleri olan hastaların sağlıklı kontrollerle ilişkili olarak ccfDNA düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (Schwarzenbach ve ark., 2011). Bununla birlikte, veriler tamamen net değildir ve benign lezyonlu hastalarda ccfDNA seviyelerinde yükselme saptanmıştır (Schwarzenbach ve ark., 2011). Bununla birlikte, bazı çalışmalar, yüksek ccfDNA konsantrasyonları tipik olarak metastatik kanserlere atfedilir ve tümör boyutu, evresi, yeri ve agresifliği arasındaki korelasyonlar gözlemiştir. Bu tutarsızlıklardan bazıları, özellikle tümör oluşumunun başlangıç safhasında dolaşıma, çok sayıda tümör dışı DNA'nın salındığı gerçeğine bağlı olabilir; bu da, tümör ve komşu tümör olmayan hücreler arasında bir etkileşim olduğunu düşündürür (García-Olmo ve ark., 2008). Tümör kaynaklı ccfDNA'nın oranı, düşük toplam plazma ccfDNA konsantrasyonları olan durumlarda %0.2 gibi düşük bir seviyeden %90'a kadar yüksek bir aralıkta gözlemlenmiştir (Gormally ve ark., 2007). Ameliyat veya kemo veya radyoterapi alan hastalarda tedavinin etkinliği konusunda, ccfDNA izlemesi, kanserin durumu ve/veya müteakip ilerlemesi ile ilgili ipuçları sağlamıştır.

CcfDNA araştırması tarihin kilometre taşlarından biri, (Sorenson ve ark., 1994) ccfDNA'nın tümör hücresi DNA'sındaki onkogen ve tümör süpresör mutasyonlarını izlemek için kullanılmasıydı. Yüksek mutasyon sıklığına sahip genler (*KRAS* ve *TP53*), birkaç kanserde, hedef doku DNA'sı ile ccfDNA'sı arasında %0-75'lik bir uyum gösteriyor ve bu da var olmayan teşhis potansiyelini göstermektedir (Schwarzenbach ve ark., 2011). Kanser DNA'sı ile ccfDNA mutasyon durumu arasındaki uyumlu düzeyi, yalnızca daha ileri tümörlerde elde edilebilecek gibi gözükmemektedir (Schwarzenbach ve ark., 2011). Kansere spesifik metilasyon belirteçleri açısından, anormal metilasyon sergileyen "*prototipik*" genler, örneğin

akciğer ve göğüs kanserinde *p16* ve kolon kanserinde *SEPT9* ve *APC*, teşhis ve prognostik araçlar olarak göstermektedir. Bununla birlikte, maksimum tanı duyarlılığı (%80), birden fazla metilasyon belirteçlerinin birlikte değerlendirilmesi ile elde edilir (Schwarzenbach ve ark., 2011). CcfDNA metilasyon analizinde potansiyel olarak çelişkendirici bir faktör, sağlıklı bireylerin %8-20'sinin de anormal metilasyon belirteçleri sergilediği bildirilmiştir. Hoque ve ark. (2004)'nın yaptığı bir çalışmada (2004), böyle sapmalı ccfDNA metilasyon örüntüleri sigara içimine atfedilmiştir (Hoque ve ark., 2004).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Türü

Çalışmada tiroit hasta grupları ve kontrol grubundan alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmanın temel amacı, plazma örneklerinde hücre dışı DNA miktarı ve total kandan izole edilen plazma DNA'sından total DNA metilasyon miktarlarını belirlemektir.

3.2. Etik

Tez çalışması, deneysel türde çalışma olup Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan rapor ile yürütülmüştür (2011-KAEK-27/2016-E.70096 no'lu).

3.3. Verilerin Toplanması ve Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz (KBB) polikliniğine başvuran bireyler dahil edilmiştir. Çalışmanın amaçları doğrultusunda deneylerde kullanılan kan örneklerinin alındığı bireylerin özellikleri belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen her bir bireyin yaş, cinsiyet, sigara alışkanlığı (içiyor, içmiyor, pasif içici), alkol alışkanlığı (var veya yok) ve diğer içecekler (çay ve kahve) ile ilgili alışkanlıkları tespit edilmiştir.

3.3.1. Kontrol Grubu

Tez çalışmasına, herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmadığı bilinen ve 18 yaşından büyük bireyler kontrol grubuna dahil edilmiştir. Bu kapsamda 21 kişi kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve her bir bireyden 5 ml kan alınmıştır. Kontrol grubunun 9 tanesi erkek ve 13 tanesi kadındır.

3.3.2. Tiroidit Hasta Grubu

Tiroidit hasta grubu 32 kişiden oluşmuştur. Her bir bireyden 5 ml kan alınmıştır. Gruba dahil edilen bireylerin 29 tanesi kadın 3 tanesi de erkektir. Hastaların yaş ortalaması 38'dir. Tiroidit hastalarının tanıları endokrin polikliniğinde kan tahlili (TSH, T4, T3) ile ele alınmıştır.

3.3.3. Benign Nodüllü Tiroid Hasta Grubu

Çalışmaya, 37 benign nodüllü tiroid hastası dahil edilmiştir. Bu grupta, hastaların 24 tanesi kadın ve 13 tanesi erkektir. Benign nodüllü tiroid hastalarının

tanısı, tiroid ultrasonografisi (USG) ve alınan ince iğne aspirasyonu biyopsisi ile konulmuştur.

3.3.4. Malign Nodüllü Tiroid Hasta Grubu

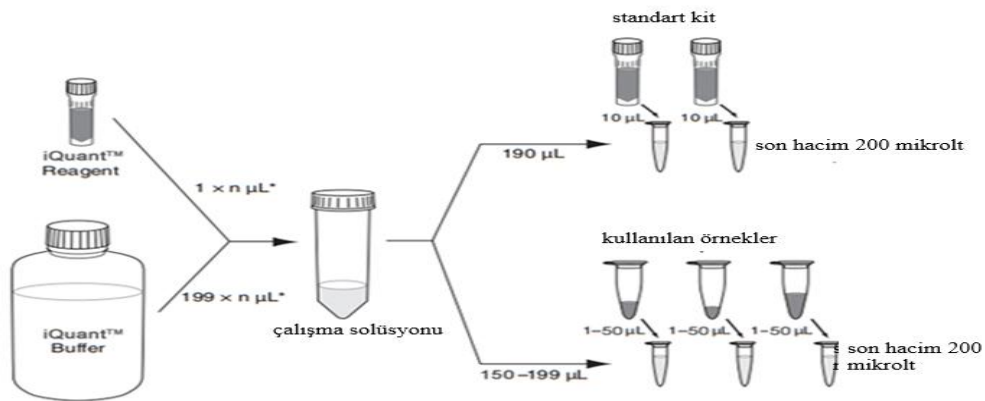
Malign nodüllü tiroid 30 hasta bu gruba dahil edilmiştir. Hastaların, 23 tanesi kadın ve 7 tanesi erkektir. Grubun yaş ortalaması 48'dir. Malign nodüllü tiroid hastalarının tanısı ameliyat sonrası patoloji ile saptanmıştır.

3.4. Verilerin Deneysel Sürece Hazırlanması

Bu çalışmada, hücre dışı DNA miktarı ölçümü tam kandan elde edilen plazmada ölçülmüştür. Hastalardan alınan kanlar steril mikropipet yardımıyla steril falkon tüplere alınmıştır. Kan örnekleri 3.000 rpm de (1.200 g) 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrası, bileşenlerine ayrılan örneklerdeki üst sarı sıvı kısım alınmış ve steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra, örnekler soğutmalı santrifüjde +4 derecede 16.000 g'de 10 dk çöktürülmüştür. İşlem bittikten sonra steril mikropipetle tüpteki üst kısım (altta 0.5 ml'lik bırakılarak) temiz steril tüplere alınmış ve plazma örnekleri -80 derecede saklanmıştır.

3.4.1. Hücre Dışı Serbest DNA ölçümü

Hücre serbest DNA miktarı, bir önceki aşamada hazırlanmış plazma örneklerinde ölçülmüştür. Ölçümler, Thermo Fisher Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ve Qubit 2.0 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan kitin çalışma yönergesine göre deneyler planlanmış ve ölçümler gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, içerisinde DNA miktarı bilinen örnek kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri kullanılarak, örneklerdeki DNA miktarları belirlenmiştir. Deneysel süreçte uygulanan protokol aşağıda verilmiştir.



Şekil 5: ThermoFisherQubitdsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ve Qubit 2.0 cihazı protokolü

Genel prensip olarak, hazırlanan çözelti ile standart ve örnekler karıştırılmış ve belli bir süre sonra ölçüm yapılmıştır. Bu kapsamda, örnek sayısına göre çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Standart olarak kullanılan standart 1 ve standart 2 için 190 µl karışım ile 10 µl standart 1'den, 190 µl karışım ile 10 µl standart 2'den tüplerde mikro pipet yardımı ile karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler yardımı ile içinde DNA miktarı bilinen örneklerden absorpsiyonlar belirlenerek, standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri Qubit 2.0 cihazında, kalibrasyonda kullanılan iki standart arasındaki ilişkiye göre konsantrasyon verileri üretmektedir. Standart eğri oluşturulduktan sonra kontrol grubu ve her bir hasta grubuna ait DNA örnekleri kullanılarak miktarları Qubit 2.0 cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.4.2. Plazmadan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, DNA Mini Kit (Qiagen, 50, 51304, USA) kullanılarak yapılmıştır. Kit kullanımı ile ilgili yönerge takip edilerek DNA izolasyonu yapılmış ve DNA miktarı belirlenme aşamasına geçilmiştir. İzolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir.

- ✓ DNA izolasyon ölçümünde ilk önce -20 derecede saklanan plazma örnekleri +4 dereceye getirilerek çalışmaya başlanmıştır.
- ✓ Ölçümde mikrotüpe 20 µl P-K (proteinase-k) eklenmiştir.
- ✓ 20 µl P-K eklenen tüpe 200 µl plazma eklenmiştir.
- ✓ Karışım karıştırıcı ile 15 sn karıştırılmıştır.
- ✓ 200 µl AL çözeltisi eklenmiş ve 15 sn karıştırılmıştır.
- ✓ Bu aşamadan sonra, örnekler 56 derecedeki su banyosunda 10 dk bekletilmiştir.
- ✓ Bu sürenin sonunda, her bir örneğe 200 µl %100 etanol eklenmiştir.
- ✓ 15 sn karıştırılmış 15 sn santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Karışım DNA izolasyon kiti içerisinde bulunan filtreli mikro tüpelere aktarılmıştır.
- ✓ Karışım 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Filtreden aşağıya inen su atılmıştır.
- ✓ Tüpün içine AW1 çözeltisinden 500 µl eklenmiş ve 8.000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Filtreden aşağıya inen sıvı kısım atılmıştır.

✓ Tüpün içine 500 µl AW2 eklenmiş ve 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
✓ Filtreli kısmı başka bir mikro tüpe alınarak içine 200 µl AE çözeltisi eklenip 10 dk bekletilmiştir.

✓ 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
✓ Süzütünün bulunduğu tüplerde DNA miktarının belirlenmesi işlemine geçilmiştir.

3.4.3. Plazma DNA Miktarının Belirlenmesi

Total DNA miktarının ölçümü hücre dışı serbest DNA miktarında ki yönerge takip edilerek yapılmıştır. Qubit 2.0 cihazı ve ThermoFisherQubitdsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit kullanılarak kontrol grubu ve her bir hasta grubu için DNA miktarları belirlenmiştir. DNA miktarları hesaplanmış ve 5mC ölçümüne geçilmiştir.

3.4.4. DNA Metilasyon (5mC) Miktarının Belirlenmesi

Total DNA Metilasyon miktarı, ZYMO 5mC DNA Elisa kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kit içinde bulunan prosedür doğrultusunda önceden belirlediğimiz DNA örnek miktarları hesaplanmıştır.

✓ Her örnek miktarı 100 ng ve son hacmi ise 100 mikrolitre olmuştur.
✓ Her bir örnek için total 100 mikrolitre olacak şekilde tüplere 5mC kaplama tamponu ve DNA örneği konulmuştur.
✓ Bu aşama her bir örnek için tekrarlanmıştır.
✓ Tüpler su banyosunda 98 derece sıcaklıkta 5 dk bekletilmiştir.
✓ Tüpler hemen 10 dakika buzluğa konulmuştur.
✓ Örnekler ZYMO 5mC DNA Elisa kiti içerisindeki Plate-layoutuna aktarılmadan önce tüpün içinde buharlaşan ve yan yüzeye yapışan damlacıklar kısa bir santrifüjle aşağıya indirilmiştir.
✓ Örnekler olduğu gibi ilgili kuyulara aktarılmıştır.
✓ Pozitif ve negatif kontroller (0% , 25% , 50% , 100%) hazırlanmıştır.
✓ Negatif ve pozitif kontroller için son hacim 10 mikrolitre olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Negatif ve pozitif kontrollerin miktarları

% 5-mC	Negatif kontrol (100ng/μl)	Pozitif kontrol (100ng/μl)
0%	10,0 μ l	0 μ l
25%	7,5 μ l	2,5 μ l
50%	5,0 μ l	5,0 μ l
100%	0 μ l	10,0 μ l

✓ Negatif, pozitif ve tüm örnekler kuyucuklara eklendikten sonra üzeri alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

✓ Etüv içerisinde 37 derecede 1 saat bekletilmiştir.

✓ Her bir kuyudaki 100 mikrolitre çözelti atılmıştır.

✓ Kuyucuklara 200 μ l 5mC Elisa buffer eklenmiştir.

✓ Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.

✓ Bu işlem sonunda kuyulara 200 μ l 5mC elisa tamponu eklemiştir ve kuyu alimünyum folyo ile kaplamıştır.

✓ 37 derecede 30 dakika bekletilmiştir.

✓ Antikor hazırlanmıştır.

✓ Kuyulardaki çözelti uzaklaştırılmıştır.

✓ Antikor karışımı kuyulara 100 mikrolitre eklenmiştir.

✓ Alimünyum folyo ile kaplanmış ve 37 derecede 1 saat bekletilmiştir.

✓ Antikor karışımı her bir hasta ve kontrol grubu için ayrı ayrı hazırlanmıştır.

✓ Antikor karışımı uzaklaştırılmıştır.

✓ 3 kez 5mC Elisa tamponu ile yıkanmıştır.

✓ Her kuyuya 100 μ l HRP Developer eklenmiştir.

✓ 10-60 dk renk değişimine izin verilmiştir.

✓ Bir elisa plaka okuyucu kullanılarak 405-450 nm de absorbans ölçülmüştür.

3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Her bir grup için elde edilen ccfDNA ve total 5mC miktarları Mann Whitney U kullanılarak yapılmıştır. Spearman Rho testi parametreler arasındaki korelasyon ilişkisi belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında değerlendirilen her bir gruba ait özellikler Tablo 2’de verilmiştir. Her bir bireyin yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, alkol ve içecek tüketim bilgileri belirlenmiştir. 21 kişiden oluşan kontrol grubunda 8 bireyin sigara içtiği, 12 bireyin içmediği ve 1 bireyin ise sigarayı eskiden içtiği tespit edilmiştir. Aynı grupta, 2 kişinin alkol kullandığı, 1 kişinin gazlı içecek kullandığı ve 21 kişinin ise çay ve kahve tükettiği belirlenmiştir. 32 tiroidit hastasında, 8 kişinin sigara kullandığı, 17 kişinin ise sigara içmediği belirlenmiştir. Bu grup içinde 6 kişinin eskiden sigara kullandığı tespit edilmiştir. Tiroidit hastalarında, 7 kişinin alkol kullandığı, 1 kişinin gazlı içecek kullandığı ve 32 kişinin ise çay ve kahve tükettiği belirlenmiştir. Benign nodüllü hastalarda sigara kullanan birey sayısı 5 iken, 25 kişinin sigara içmediği tespit edilmiştir. Bu grupta 6 kişinin ise eskiden sigara kullandığı belirlenmiştir. Benign grubunda, 4 kişinin alkol kullandığı ve çay ve kahve tüketen birey sayısının ise 37 olduğu belirlenmiştir. Malign nodüllü hastalarda 13 kişinin sigara içtiği, 16 kişinin sigara içmediği ve 3 kişinin ise eskiden kullandığı tespit edilmiştir. Bu grupta, 8 kişi alkol kullanırken, 3 kişi gazlı içecek tüketmekte ve 30 kişi ise çay ve kahve tüketmektedir.

Tablo 2. Kontrol ve hasta grupları temel özellikleri

	Kontrol grubu		Troidit grubu		Benign grubu		Malign grubu	
	Sayı (n)	Ort.	n (%)	Ort.	n (%)	Ort.	n (%)	Ort.
Toplam	21	28.62	32	38.2	37	54.2	30	48.6
Erkek	9	14.42	3 (10%)	47.3	13 (35.1%)	59,38	7 (23.3%)	46.14
Kadın	12	11.13	29 (62.5%)	5.44	24 (64.9%)	51,75	23 (76.%)	47.1

Tablo 2'nin devamı

İçecek Alışkanlığı	Sayı (n)	Ort.	n (%)	Ort.	n (%)	Ort.	n (%)	Ort.
Alkol tüketimi	2	-	7	-	4	-	8	-
Gazlı içecek tüketimi	1	-	1	-	-	-	3	-
Çay ve kahve Kullanımı	21	-	32	-	37	-	30	-
Sigara Tüketimi	Sayı (n)	Ort.	n (%)	Ort.	n (%)	Ort.	n (%)	Ort.
Sigara İçiyor (günde)	8 (38.09 %)	-	8 (25%)	-	5 (13.5%)	-	13 (43.3 %)	-
Sigara içmiyor	12 (57.14 %)	-	17 (53.12 5%)	-	25 (67.56 %)	-	16 (53.3 %)	-
Eskiden kullanmış	1 (4.76 %)	-	6 (18.75 %)	-	6 (16.2%)	-	3 (10%)	-

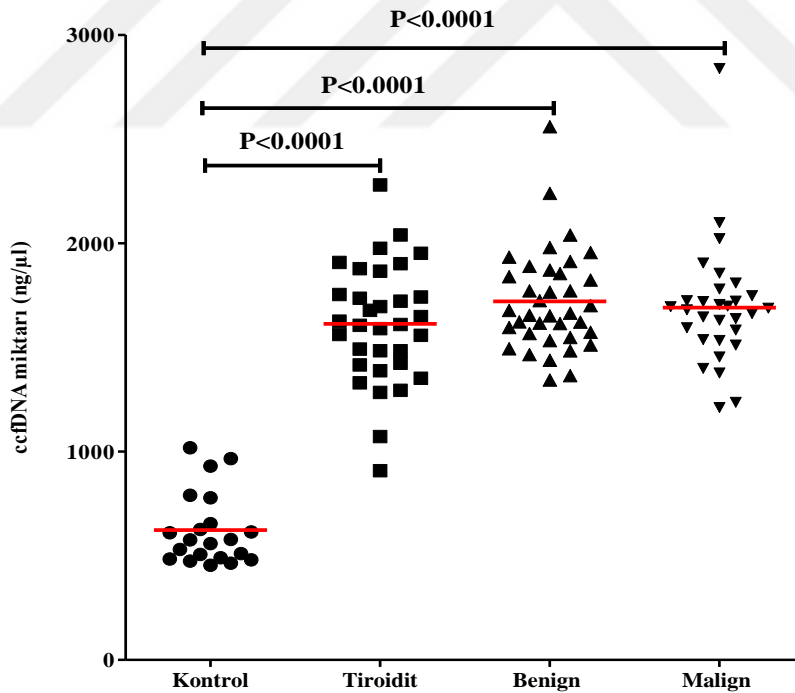
4.1. Kontrol Grubu ve Hasta Gruplarının Hücre Dışı Serbest DNA Miktarı

Kontrol ve hasta gruplarında elde edilen veriler Tablo 3'de verilmiştir. Tüm bireylere ait verilerin dağılımı ve grubun ortalamasına ait değerler Şekil 6'da verilmiştir. Buna göre, serbest DNA miktarı hasta gruplarında daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. Ortalama ccfDNA miktarı kontrol, tiroidit, benign ve malign gruplarında sıra ile 623.3, 1613, 1721.3 ve 1691 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Kruskal-Wallis testi ve daha sonra uygulanan Dunn's çoklu karşılaştırma testi, hasta

gruplarının her birinin sahip olduğu DNA miktarından istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konulmuştur (Her bir karşılaştırma grubu için $P < 0.0001$ olarak tespit edilmiştir). Üç hastalık grubu içerisinde, en yüksek ccfDNA miktarı sıra ile benign, malign ve tiroidit gruplarında elde edilmiştir. Bu üç hastalık grubu kendi arasında karşılaştırılmış ve aralarında bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 3. Kontrol grubu ve tiroid hastalıkları ccfDNA miktarları

ccfDNA miktarı (ng/ml)	Kontrol (n=21)	Tiroidit (n=32)	Benign (n=37)	Malign (n=30)
Ortalama	623.3	1613	1721.3	1691
En az	454	908	1344	1212
En çok	1081	2280	2560	2840
Erkek	608.0	1667	1825.4	1687
Kadın	634.8	1608	1664.9	1692

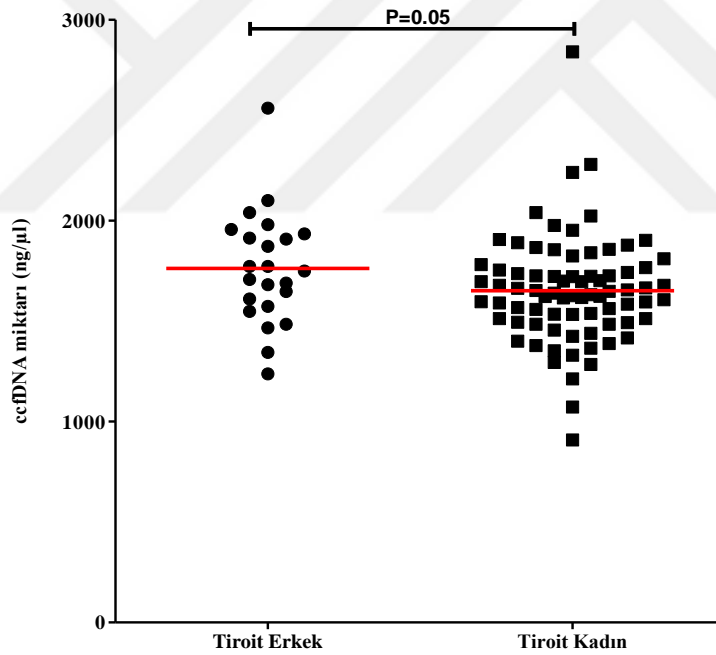


Şekil 6: Tiroid hastalıkları ve kontrol grubunda ölçülen ccfDNA miktar dağılımları

Üç hastalık grubunda elde edilen ccfDNA miktarları ile bireylerin yaşları arasında ilişki olup olmadığı Spearman Rho testi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her üç hastalık grubuyla yaş arasında istatistiksel bir ilişki bulunmamıştır

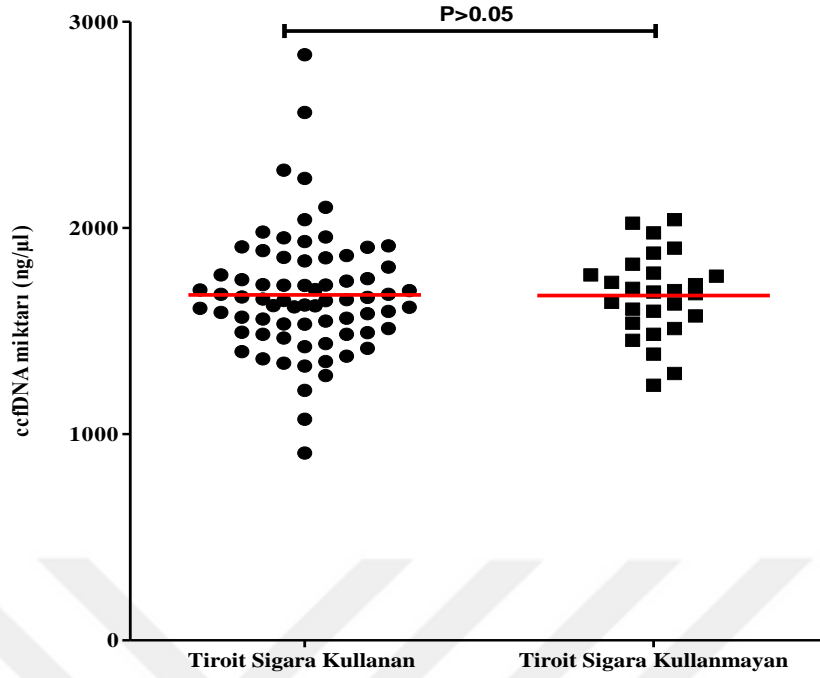
($P>0.05$). Diğer taraftan, tiroid hastalıklarını ayırmadan, genel olarak kontrol ve tiroid hastalıkları şeklinde karşılaştırıldığında yaş ile ccfDNA miktarı arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($n=99$, $r=0.21$, $P<0.05$)

Tiroidit hastaları cinsiyet dikkate alınarak ccfDNA bakımından karşılaştırılmıştır. Erkek ccfDNA miktarı daha yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($P=0.7$, Mann Whitney U test). Benign erkek hastaların ccfDNA miktarları, kadınlara göre yüksektir. Aralarında anlamlı olma eğilimi olduğu tespit edilmiştir ($P=0.06$, Mann Whitney U test). Malign bireylerde ise benzer bir durum tespit edilmiş olup, cinsiyet bakımından bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$, Mann Whitney U test). Üç hastalık grubu birleştirildiğinde, cinsiyet bakımından erkeklerin ccfDNA miktarları istatistiksel olarak anlamlı olabilecek şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir ($n=99$, $P=0.05$)



Şekil 7: Cinsiyete göre ölçülen ccfDNA miktar dağılımları

Sigara kullanımı dikkate alındığında, hasta gruplar sigara içip içmeme durumuna göre Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmışlardır. Tüm gruplar için, sigara kullanımı dikkate alındığında, ccfDNA miktarları bakımından bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, üç tiroit hastalığı bir grup olarak dikkate alındığında da sigaranın ccfDNA miktarı üzerine bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır ($P>0.05$).



Şekil 8: Sigara kullanımına göre ölçülen ccfdNA miktar dağılımları

4.2. Kontrol Grubu ve Hasta Gruplarının 5mC Değişimi

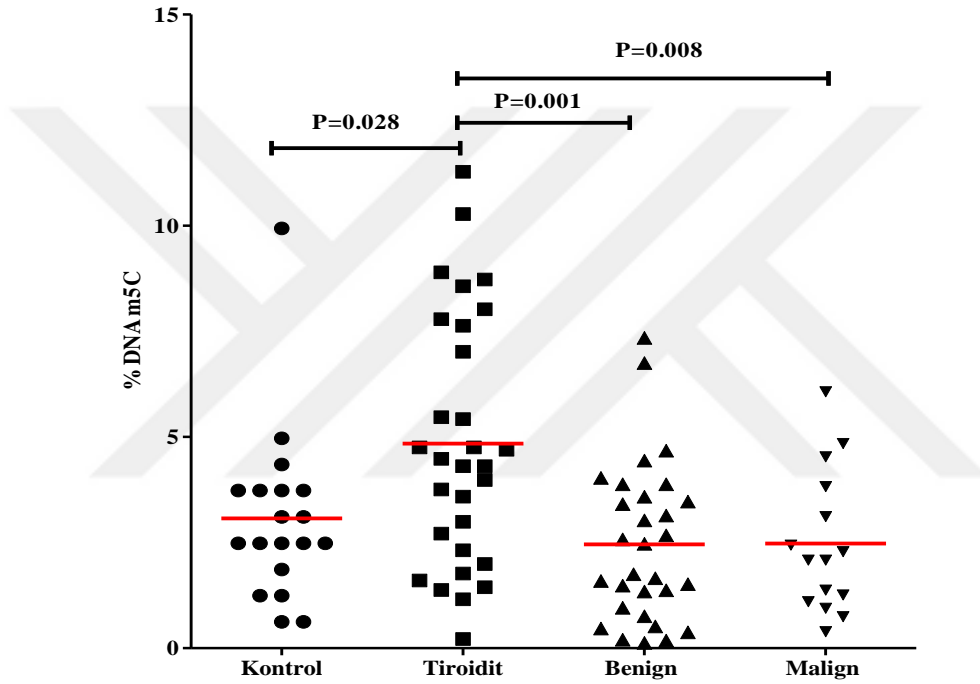
Kontrol ve hasta gruplarında elde edilen veriler tablo 4’de verilmiştir. Buna göre, total DNA metilasyonu yüzdesi dikkate alındığında, kontrol, tiroidit, benign ve malign gruplarında sıra ile %3.07, 4.84, 2.46, ve 2.48 olarak tespit edilmiştir. Mann Whitney U testi uygulandığında, tiroidit grubunda tespit edilen DNA 5mC miktarı, kontrol grubundan istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($P=0.028$). Ancak, benign veya malign grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Benign ve Kontrol grubu için $P=0.29$, Malign ve Kontrol grubu için $P=0.34$).

Tiroid ile ilgili ele alınan hastalık grupları arasında fark olup olmadığı araştırılmıştır. Bu bağlamda, Mann Whitney U testi uygulanmış ve şu sonuçlar elde edilmiştir. Öncelikle benign ile malign gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($P=0.94$). Ancak, tiroidit grubu ile benign grubu arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($P=0.001$). Benzer şekilde, tiroidit grubu ile malign grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($P=0.008$).

Tablo 4. Kontrol grubu ve tiroid hastalıkları DNA 5mC değişimi

m5C (%)	Kontrol (n=19)	Tiroidit (n=30)	Benign (n=30)	Malign (n=15)
Ortalama	3,07	4,84	2,46	2,48
En az	0,62	0,22	0,13	0,39
En çok	9,94	11,28	7,35	6,07
SS	2,05	2,96	1,86	1,68

SS: Standart Sapma



Şekil 9: Tiroid hastalıkları ve kontrol grubunda ölçülen DNA 5mC yüzde dağılımları

Üç hastalık grubunda elde edilen DNA 5mC yüzdeleri ile bireylerin yaşları arasında ilişki olup olmadığı Spearman Rho testi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tiroidit ve benign gruplarda, yaş ile anlamlı olma eğilimi görülmüştür (tiroidit grubunda $P=0.07$ ve benign grubunda $P=0.08$). Diğer taraftan, malign hastalarda, yaşın tek başına DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ($r=0.70$, $P=0.004$). Diğer taraftan, tiroid hastalıklarını ayırmadan, genel olarak kontrol ve tiroid hastalıkları şeklinde karşılaştırıldığında, yaş ile DNA 5mC yüzdesi bakımında negatif ve anlamlı olma eğiliminde bir ilişki tespit edilmiştir ($r=0.19$, $P=0.06$).

Tiroidit hastaları cinsiyet dikkate alınarak DNA 5mC yüzdeleri bakımından karşılaştırılmıştır. Buna göre hastalık gruplarında, DNA metilasyonu bakımında bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde, tüm tiroid hastalık grupları bir arada değerlendirildiğinde, DNA metilasyonunun her iki cinsiyette benzer olduğu görülmüştür ($P>0.05$).

Sigara kullanımı dikkate alındığında, hasta gruplar sigara içip içmeme durumuna göre Mann Whitney U testi ile DNA metilasyonu bakımından karşılaştırılmışlardır. Tüm gruplar için, sigara kullanımı dikkate alındığında, 5mC yüzdeleri bakımından bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, üç tiroid hastalığı bir grup olarak dikkate alındığında da sigaranın DNA metilasyonu üzerine bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır ($P>0.05$).



5. TARTIŞMA

Son yıllarda genomik ve epigenomik değişimler dikkate alınarak hastalıkların farklı süreçleri ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve günümüzde bu süreçler devam etmektedir. Ancak teknolojik yetersizlikler nedeniyle araştırılmayan veya açıklanamayan noktalar bulunmaktadır. Bu noktalardan bir kaçı da ccfDNA ile ilgili konulardır. Son gelişmelerin ardından genometastazdan bahsedilmiş ve bu alanda araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. CcfDNA hücresel ölüm ve doku hasarından sonra dolaşıma salınan ve kısa süre önce hastalıklar ile ilgili bazı süreçleri aydınlatması potansiyeli nedeni ile umut verici yeni bir gösterge olarak ortaya çıkmıştır. Neredeyse vücuttaki her hücreden DNA'nın serbest hale geçmesi, homeostatik bozuklukların ve hücresel ölüm hızındaki değişikliklerin oldukça hassas bir göstergesi yapmaktadır. CcfDNA'nın farklı özellikleri ile bireylerin cinsiyet ve yaşlanma gibi faktörlerin yanında diğer hastalıklar ile ilişkisi fizyolojik ve patolojik olarak halen araştırılmaktadır. Bu bağlamda hücreden çeşitli mekanizmalar ile dışarı çıkmış DNA'nın varlığının önemli bir biyomolekül olduğu tahmin edilmektedir. Bundan dolayı tez çalışmasının birinci amacında, sirküler kandaki bulunan serbest DNA miktarını, tiroid hastalıkları için yeni biyomarker olup olmadığı araştırılmıştır. Tiroid ile ilgili üç farklı hastalık grubundan alınan kan örnekleri ile sistemik bir hastalığı olmayan, sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri kullanılmış ve plazmalarındaki total serbest DNA miktarı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında benign, tiroidit ve malign hastaların kanlarındaki serbest DNA miktarının istatistiksel olarak kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle alınan örneklerdeki ccfDNA miktarı tiroid hastalıkları için farklılık arz etmekte ve bundan dolayı biyomarker olma potansiyeli taşımaktadır.

Kanser başta olmak üzere, birçok hastalığın teşhis ve diğer süreçlerini takip etmek amacıyla kullanılabilir yeni doku, hücre veya moleküllerin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Günümüzde, sağlıklı bireylerin plazma, serum, tükürük ve idrar örneklerinde DNA'nın var olduğu ve ölçülebildiği bilinmektedir. Diğer taraftan, serbest haldeki DNA miktarı, yapısında bulunan mutasyonlar, epigenetik değişimler, DNA parça büyüklüğü gibi bazı parametreleri bazı kanser türlerinde araştırılmıştır. Böylece, ccfDNA'nın, hastalıkların teşhisi ve ilerlemesi için önemli olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Hastalıkların birçoğunda özellikle kanser için non-

invasif, kolay ulaşılabilir, tekrarlanabilir, hastalıkla doğrudan ilgili veri sağlayan biyolojik örnek bulmak oldukça önemlidir. Tiroid kanseri dışında, son 20 yılda, meme, kolorektal, pankreas, over, beyin ve melanoma kanserlerinde ccfDNA ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Dawson ve ark., 2013, Panka ve ark., 2014, Tie ve ark., 2015). CcfDNA ve tiroid hastalıkları ile ilgili çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında mutasyonlar ve çok az çalışmada DNA metilasyon analizi yapılmıştır. Sirküler DNA'daki metilasyon değişiminin, mutasyonlara göre kalıcı olması sebebiyle daha iyi bir gösterge olduğu bildirilmiştir (Warton ve Samimi 2015). Bir çalışmada, ccfDNA'nın bütünlüğü ve miktarının tiroid kanserleri için farklı özellik gösterip göstermediği araştırılmış ve hem miktarsal hem de bütünlüğü bakımından ccfDNA'nın tiroid kanserli bireylerde yüksek olduğu bildirilmiştir (Salvianti ve ark., 2017).

Bir çalışmada, ccfDNA miktarı hem sağlıklı grupta hem de tiroid kanserli bireylerde ölçülmüştür. Sağlıklı grup ve tiroid gruplarında ccfDNA medyan değerleri sıra ile 5.14 ve 22.54 ng/ml bulunmuş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Zane ve ark., 2013). Bir diğer çalışmada, hem DNA bütünlüğü hem de DNA miktarının, tiroid nodüllü bireylerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Salvianti ve ark., 2017). Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar, tez çalışmasındaki bulgularla uyum içindedirler. Çalışmaların birçoğunda, tiroid kanserlerinin yaygın özelliklerinden olan $BRAF^{V600E}$ mutasyonu araştırılmıştır. CcfDNA'nın bir biyomarkır kaynağı olarak potansiyel özellikte olduğu ile ilgili en önemli çalışmada, $BRAF^{V600E}$ mutasyonu, papillary tiroid kanser ve benign kanserlerinde karşılaştırıldığında, papillary tiroid kanserli bireylerde daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Pupilli ve ark., 2013). Bazı çalışmalarda, ccfDNA miktarının hastalık evresi ile korele olduğu, ayrıca primer tümör hacmi ile sirküler DNA salınımı arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Catarino ve ark., 2008, Bettegowda ve ark., 2014). Bir başka çalışmada, ccfDNA'da ölçülen $BRAF^{V600E}$ mutasyonunun tiroid kanserin ilerlemiş klinik evresi ile uyum içinde olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2012). Bu çalışma, sirküler ccfDNA'nın özellikle agresif ve ilerlemiş tiroid kanserleri için non-invasif bir göstergesi olacağını işaret etmektedir. Tiroid hastalıkları ile ilgili yapılan başka çalışmalarda, tedavi sonrası hastalık sürecinin takip edilmesinde ccfDNA'nın kullanılmasıdır. Diğer kanserler ile ilgili yapılan

çalışmalarda, tedavi sonrası ccfDNA miktarındaki düşüşlerin, tedavinin cevabının değerlendirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Tie ve ark., 2015). Benzer sonuçlar, tiroid kanserlerin tedavi öncesi ve sonrası süreçleri için de değerlendirilmiştir (Pupilli ve ark., 2013).

Tiroid kanserlerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, bazı faktörlerin tiroid kaynaklı hastalıklarda etkili olduğu bilinmektedir. Radyasyon maruziyeti, çevre kirliliği ve beslenme bu faktörlerden en önemlileridir. Birçok çevresel faktörün, hücrenel strese neden olduğu ve dolayısı ile hem sitotoksik hem de genotoksik süreçleri başlattığı bilinmektedir. Anılan bu çevresel faktörler, özellikle hücreleri ölüme götüren en önemli mekanizma olan apoptosis ile ilişkilidir (Wang ve Baker Jr, 2007). CcfDNA'nın hücreden serbest kalmasına neden olan mekanizmaları, aynı zamanda tiroid hastalıklarında da görölmektedir. Örneğin, apoptosis tiroid bezin homeostasisinde önemli rol oynamaktadır. Benzer şekilde, apoptosis, tiroid kanserleri ile otoimmün tiroiditisin önemli bir mekanizmasıdır (Lin, 2001). Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen yüksek miktardaki DNA miktarı, apoptotik mekanizma ile açıklanabilir. Ancak, konu ile ilgili araştırma yapılması gerekmektedir.

Tez çalışmasının ikinci amacında, sirküler DNA'da tespit edilmiş total DNA metilasyonun, tiroid hastalıkları ve kontrol grubu arasında farklı olup olmadığını araştırılmıştır. Tez çalışmasında üç farklı hastalık grubunun kontrol grubuna göre metilasyon dereceleri karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada tiroidit hastalarında elde edilen DNA 5mC miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca, maling ve benign grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görölmemiştir ($P<0.05$). Çalışmada hastalık grupları arasında karşılaştırma yapıldığında malign ve benign grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken, tiroidit ve benign ile tiroidit ve malign arasında istatistiksel olarak fark görölmüştür.

Farklı kanserlerde DNA metilasyonun meydana geldiği bilinmektedir. İnsan genomunun farklı yerlerinde meydana gelen metilasyon değişmelerinin birçok kanser hücrelerinin ortak özelliği olduğu görölmüştür. Başta tümör supresör ve proto-onkogenler olmak üzere özellikle bazı genomik bölgelerin metillendiği veya daha az

metillendiği görülmüştür. İnsan genomunda yaklaşık olarak 4 milyon *Alu* tekrarlı dizileri ve yarım milyon uzun araya serpiştirilmiş nukleotid (*LINE-1*) dizlerinin var olduğu dolayısı ile bu yapılardaki metilasyon derecelerinin global DNA metilasyonunu temsil ettiği kabul görmektedir (Yang ve ark., 2004, Weisenberger ve ark., 2005). İnsan genomundaki *Alu* ve *LINE-1* tekrarlı dizilerin aşırı miktarda metillendiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2004). *LINE-1* ve *Alu* elementlerinde meydana gelen demetilasyon bu elementlerin retrotransposon aktivitelerinde artışa neden olmakta, bu durum insersiyon ve/veya homolog rekombinasyon ile genomik kararsızlıkla sonuçlanmaktadır (Ostertag ve Kazazian Jr, 2001). Bununla birlikte global DNA hipometilasyonunun gen transkripsiyonunda deregulasyona neden olduğu bildirilmiştir (Han ve ark., 2004). Memeli genomunda bulunan bütün *sitozinlerin* % 2-5'i, 5mC şeklinde ve çoğunlukla *CpG* adacıklarında bulunmaktadır (Beck ve Olek, 2003). Sağlıklı hücre gen-promotor bölgelerindeki *CpG* adaları genel olarak metillenmemişlerdir. Buna karşın tekrarlı genomik bölgeler aşırı miktarda metillenmişlerdir. Abarent DNA metilasyonu global DNA hipometilasyon ve gen spesifik hipometilasyon veya hipermetilasyon şeklinde meydana gelmektedir. Global veya gen-spesifik DNA metilasyon paterninde meydana gelen değişimler (hipometilasyon ve hipermetilasyon) birçok kanser tipinde gözlenmiştir (Lubbert ve ark., 1992). Son yıllarda farklı malignitelerde global DNA metilasyonunda azalmaların olduğu ifade edilmiştir. Gama Sosa ve arkadaşları farklı tümörlerle yaptıkları çalışmada hipometilasyonun tümörün ilerlemesi ile ilintili olduğunu göstermişlerdir (Gama-Sosa ve ark., 1983). Proto-onkogenlerde meydana gelen hipometilasyon özellikle akciğer tümörleri ve lösemide görülmüştür. Akciğer tümörleri ile yapılan çalışmalarda *c-fos*, *c-myci* *Ha-ras* ve *Ki-ras* gibi proto-onkogenlerde DNA metilasyonunda azalmaların meydana geldiği gösterilmiştir. Bununla birlikte farklı lösemi tipleri ile yapılan çalışmada *Erb-A1* ve *bcl-2* proto-onkogenlerinde hipometilasyon tespit edilmiştir (Nambu ve ark., 1987, Rao ve ark., 1989, Vorce ve Goodman 1989). DNA hipometilasyonu gastrik kanserlerde *R-RAS* ve *MAPSIN*, kolon kanserinde *S-100* ve melanomada MAGE (melanoma-associated antigen) gibi büyüme teşvik edici genlerin aktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Wilson ve ark., 2007). Özetle DNA hipometilasyonu farklı mekanizmalar aracılığı ile kodlanmayan bölgeler ve genlerin aktivasyonuna neden olarak kanser

gelişimi ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde tümör supresör genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen hipermetilasyon gen anlatımında azalmaya neden olan yaygın bir olaydır (Reamon-Buettner ve ark., 2008). Hipermetilasyon bahsedilen genlerin transkripsiyonlarında inaktivasyona ve hücrel fonksiyonlarının kaybolmasına neden olmaktadır. Örneğin *p16* ve *MLH1* gibi birçok gende meydana gelen hipermetilasyon tümör supresör genlerinin susturulmasına neden olmaktadır (Herman ve Baylin, 2003, Feinberg ve Tycko, 2004). Farklı tümörlerle ilgili yapılan çalışmalarda *3p*, *11p* ve *17p* kromozomlarının bazı bölgelerinde hipermetilasyon tespit edilmiştir. *In vivo* koşullarda bu bölgelerde metilasyon görülmezken, kanserli dokularda metillendiği gösterilmiştir (Baylin ve ark., 1991).

Tiroid kanserleri DNA metilasyonu ile ilgili çok çalışma yapılmamıştır. Konu ile ilgili, daha çok gen spesifik DNA metilasyon analizleri mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada, tiroid kanserli bireyler ile benign nodüllü bireylerin kanlarında elde edilen DNA örneklerinde beş genin (*CALCA*, *CDH1*, *TIMP3*, *DAPK*, ve *RARβ2*) metilasyon analizi yapılmıştır. Bu beş gendeki metilasyonun %95 oranında spesifik olduğunu orta koymuştur. Bu çalışmada, sitolojik olarak tespit edilemeyen veya daha sonra kanser olduğu tespit edilen bireylerde DNA metilasyon değişiminin anlamlı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Hu ve ark., 2006). Tiroid kanserleri ile sağlıklı grubun karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, kanserli bireylerde alınan ccfDNA örneklerinde *SLC5A8* and *SLC26A4* hipermetilasyon tespit edilmiş bazı mutasyonlarla birlikte önemli bir gösterge olduğu ifade edilmiştir (Zane ve ark., 2013). Konu ile ilgili başka bir çalışma olmadığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında, elde edilen total DNA metilasyonunun tiroid hastalarında farklı olmasının yanında, farklı tiroid hastalıkları arasında farklı metilasyon derecelerinin bulunması önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında çıkan sonuçlar,

1- Üç hasta grubundaki ccfDNA miktarı kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmüştür.

2- İstatistiksel farklar nedeni ile ccfDNA miktarının, tiroid hastalıklarında farklılık arz etmesinden dolayı, bir biyomarker olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

3- Tiroidit hasta grubunda ölçülen total 5mC miktarı, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu için bir biyomarker olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

4- Ayrıca, tiroidit hastalarındaki 5mC miktarının, diğer iki hastalık grubundan farklı olması nedeni ile metilasyon değişimin tiroidit hastalığı için spesifik olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

6.2. Öneriler

1- ccfDNA'da meydana gelen gen spesifik değişimler öner arz etmektedir.

2- Bu parametrelere ek olarak, mekanizmal olarak apoptotik ve nekrotik süreçlerin belirlenmesi ile mekanizmal bir yaklaşım sağlanmış olacaktır.

3- Geniş hasta popülasyonları dikkate alınmalıdır.

4- Analizler için daha duyarlı ve gen spesifik yaklaşımlar (DNA metilasyonu için Pyrosekans ve Illumina sekanslama) izlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Alvarez-Marfany M, Roman SH, Drexler AJ, Robertson C Stagnaro-Green A. Long-term prospective study of postpartum thyroid dysfunction in women with insulin dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994; 79:10-16.
- Anonim. Türkiye endokrinoloji Metabolizma Derneği Tiroit Hastalıkları Tanı Kılavuzu 2019: 2019 Ortadoğu Reklam Tanı/m Yayıncılık Turizm Eğitimi İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş. Türkiye Klinikleri Yayın Seri No: 347 4. Baskı, Nisan 2019, Ankara-Türkiye 90; 978-605-4011-37-7. 2019.
- Backes C, Meese E, Lenhof H-P, Keller A. A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. *Nucleic acids research*. 2010; 38:4476-4486.
- Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis*. 2002; 23:1103-1109.
- Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2005; 2:24.
- Baylin SB, Makos M, Wu J, Yen R, De Bustros A, Vertino P, Nelkin B. Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer cells (Cold Spring Harbor, NY: 1989)*. 1991; 3:383.
- Beck S, Olek A, 2003. *The epigenome: molecular hide and seek*: Vch Verlagsgesellschaft Mbh.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM. Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*. 2014; 6:224ra24-224ra24.
- Bickerstaff M, Botto M, Hutchinson W, Herbert J, Tennent G, Bybee A, Mitchell D, Cook H, Butler P, Walport M. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nature medicine*. 1999; 5:694.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007; 447:396.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986; 321:209.

- Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer surveys*. 1996; 28:87-101.
- Bohacek J, Mansuy IM. Epigenetic inheritance of disease and disease risk. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38:220.
- Brito JP, Al Nofal A, Montori VM, Hay ID, Morris JC. The impact of subclinical disease and mechanism of detection on the rise in thyroid cancer incidence: a population-based study in Olmsted County, Minnesota during 1935 through 2012. *Thyroid*. 2015; 25:999-1007.
- Browne-Martin K, Emerson CH. Postpartum thyroid dysfunction. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1997; 40:90-101.
- Butt AN, Swaminathan R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum: update on potential prognostic and diagnostic value in diseases excluding fetal medicine and oncology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137:236-242.
- Cady B. Surgery of thyroid cancer. *World journal of surgery*. 1981; 5:3-12.
- Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, Medeiros R. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA and cell biology*. 2008; 27:415-421.
- Celik O, Kadioglu P. Medical therapy of acromegaly in Turkey. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2010; 33:592-598.
- Chandler SP, Kansagra P, Hirst MC. Fragile X (CGG) n repeats induce a transcriptional repression in cis upon a linked promoter: evidence for a chromatin mediated effect. *BMC Molecular Biology*. 2003; 4:3.
- Cheung LW, Lee YF, Ng TW, Ching WK, Khoo US, Ng MK, Wong AS. CpG/CpNpG motifs in the coding region are preferred sites for mutagenesis in the breast cancer susceptibility genes. *FEBS Letters*. 2007; 581:4668-4674.
- Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, Lo YD. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clinical chemistry*. 2003; 49:719-726.
- Cooney CA. Germ cells carry the epigenetic benefits of grandmother's diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103:17071-17072.

- Cooper D. American Thyroid Association (ATA) guidelines taskforce on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009; 19:1167-1214.
- Cooper DS. Approach to the patient with subclinical hyperthyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92:3-9.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, Mciver B, Pacini F, Schlumberger M. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association (ATA) guidelines taskforce on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009; 19:1167-1214.
- Cooper DS, Ridgway EC. Thoughts on prevention of thyroid disease in the United States. *Thyroid*. 2002; 12:925-929.
- Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genetics in medicine*. 2001; 3:359.
- Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA otolaryngology-head & neck surgery*. 2014; 140:317-322.
- Davis Jr GL, Davis Iv JS. Detection of circulating DNA by counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1973; 16:52-58.
- Dawson S-J, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013; 368:1199-1209.
- Deligezer U, Erten N, Akisik EE, Dalay N. Circulating fragmented nucleosomal DNA and caspase-3 mRNA in patients with lymphoma and myeloma. *Experimental and molecular pathology*. 2006; 80:72-76.
- Díez JMB, Del Val García JL, Pelegrina JT, Martínez JLM, Peñacoba RM, Tejón IG, Quintana EMR, Sajkiewicz MP, Boronat AA, Pérez BÁ. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Revista Española de Cardiología*. 2005; 58:367-373.

- Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular cancer*. 2006; 5:60.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429:457.
- Elias A, Kyaw T, Winikoff J, Gwinup G. Acute suppurative thyroiditis. *The Journal of otolaryngology*. 1985; 14:17-19.
- Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 2006; 27:1121-1125.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews genetics*. 2007; 8:286.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research*. 2001; 61:3225-3229.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4:143-153.
- Frese S, Diamond B. Structural modification of DNA—a therapeutic option in SLE? *Nature Reviews Rheumatology*. 2011; 7:733.
- Gahan PB, Stroun M. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell biochemistry and function*. 2010; 28:529-538.
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research*. 1983; 11:6883.
- García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, García-Olmo D. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer research*. 2010; 70:560-567.
- García-Olmo DC, Samos J, Picazo MG, Asensio AI, Toboso I, García-Olmo D. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats. *Cancer letters*. 2008; 272:133-140.
- García-Olmo D, García-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genometastasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001; 945:265-275.

- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*. 1987; 196:261-282.
- Gardner DG, Shoback D Greenspan FS, 2007. *Greenspan's basic & clinical endocrinology*: McGraw-Hill Medical.
- Garmendia Madariaga A, Santos Palacios S, Guillén-Grima F, Galofré JC. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014; 99:923-931.
- Glozak M, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*. 2007; 26:5420.
- Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2007; 635:105-117.
- Goudreau E, Comtois R, Bayardelle P, Beaugard H, Larochelle D. *Capnocytophaga ochracea* and group F beta-hemolytic streptococcus suppurative thyroiditis. *The Journal of otolaryngology*. 1986; 15:59-61.
- Gray H. *Anatomy of the human body* 20th ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1918.
- Grønbaek K, Hothor C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *Apmis*. 2007; 115:1039-1059.
- Güney E, Çağlı S, Yüce İ. *Tiroid Paratiroid Bez Cerrahisi Hastalıkları. İstanbul:İyışler Matbaacılık*. 2008.
- Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *The Journal of Immunology*. 2003; 171:1393-1400.
- Han JS, Szak ST Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*. 2004; 429:268-274.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349:2042-2054.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa J-PJ, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95:6870-6875.

- Hicks P, Saunero-Nava L, Du Clos T, Mold C. Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway. *The Journal of Immunology*. 1992; 149:3689-3694.
- Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, Heinemann V, Wilkowski R, Von Pawel J, Raith H, Feldmann K, Kremer AE, Müller S. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137:180-189.
- Holliday R. DNA methylation and epigenetic defects in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1987; 181:215-217.
- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, 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). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002; 87:489-499.
- Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, Califano J, Sidransky D. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer research*. 2004; 64:5511-5517.
- Hu S, Ewertz M, Tufano RP, Brait M, Carvalho AL, Liu D, Tufaro AP, Basaria S, Cooper DS, Sidransky D. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91:98-104.
- İşgör A, 2000. *Tiroit hastalıkları ve cerrahisi*: Avrupa Tıp Kitapçılık.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*. 2001; 61:1659-1665.
- Jeng L-BB, Lin J-D, Chen M-F. Acute suppurative thyroiditis: a ten-year review in a Taiwanese hospital. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1994; 26:297-300.

- Jensen K, Neal A, Owens R, Warren J. Interferon responses of chick embryo fibroblasts to nucleic acids and related compounds. *Nature*. 1963; 200:433.
- Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim J-H, Kim J-S. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *The American journal of pathology*. 2003; 163:1551-1556.
- Karaçay B, 2010. *Yaşamın sırrı DNA*: Tübitak.
- Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules & Cells* (Springer Science & Business Media BV). 2005; 19.
- Klippel J. Systemic lupus erythematosus: demographics, prognosis, and outcome. *The Journal of rheumatology*. Supplement. 1997; 48:67-71.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *The Journal of clinical investigation*. 1973; 52:198-204.
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology*. 2002; 20:709-760.
- Kurnaz S, Tekat A. Tiroit Paratiroit Cerrahisi Editör / Prof. Dr. Murat Toprak. T.K.B.B.V. Akademik Toplantıları Mezuniyet Sonrası Eğitim Kitapçıkları Seri:7 2011;. 2011:s.75: 978-975-8882-37-3
- Larsen P. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. *Williams textbook of endocrinology*. 2003.
- Lazarus JH. Guidelines for the Use of Radioiodine in the Management of Hyperthyroidism: A Summary: Prepared by the Radioiodine Audit Subcommittee of the Royal College of Physicians Committee on Diabetes and Endocrinology, and the Research Unit of the Royal College of Physicians. *Journal of the Royal College of Physicians of London*. 1995; 29:464.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993; 75:843-854.
- Lervang HH, Pryds O, Kristensen HØ. Thyroid dysfunction after delivery: incidence and clinical course. *Acta Medica Scandinavica*. 1987; 222:369-374.

- Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012; 97:4559-4570.
- Lin J-D. The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer. *Bmj*. 2001; 322:1525-1527.
- Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*. 1997; 350:485-487.
- Lubbert M, Oster W, Ludwig W, Ganser A, Mertelsmann R, Herrmann F. A switch toward demethylation is associated with the expression of myeloperoxidase in acute myeloblastic and promyelocytic leukemias. *Blood*. 1992; 80:2066.
- Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Current opinion in genetics & development*. 2003; 13:127-135.
- Mandel P. *Metais P*: [Not Available]. *CR Seances Soc Biol Fil*. 1948; 142:241-243.
- Medeiros-Neto G, Gil-Da-Costa MJO, Santos CLL, Medina AM, Costa E Silva J, Tsou R, Sobrinho-Simões M. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998; 83:4162-4166.
- Mould R, Tai P, Prysazhnyuk AY, Gristchenko V, Obodovsky I. Descriptive epidemiology of thyroid carcinoma. *Current Oncology*. 2003; 10:54-65.
- Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*. 2010; 140:619-630.
- Nagata S, Kawane K, 2011. Autoinflammation by endogenous DNA. *Advances in immunology*. Elsevier, 139-161.
- Nambu S, Inoue K, Sasaki H. Site-specific hypomethylation of the c-myc oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Japanese journal of cancer research: Gann*. 1987; 78:695.
- Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S, Mctiernan A, Kolonel L, Yoshimoto Y, Jin F. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer¶ II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes & Control*. 1999; 10:143-155.

- Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Underestimates of serum free thyroxine (T4) concentrations by free T4 immunoassays. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994; 79:76-79.
- Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001; 2:153-175.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel J. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 1991:1097-1102.
- Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Nikrodhanond A, Oliveira KJ, Machado DS, Liao X-H, Cohen RN, Refetoff S, Wondisford FE. Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115:2517-2523.
- Ostertag EM, Kazazian Jr HH. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual review of genetics*. 2001; 35:501-538.
- Özbilen Acar G, Çam O. Tiroit Paratiroit Cerrahisi Editör / Prof. Dr. Murat Toprak T.K.B.B.V. Akademik Toplantıları Mezuniyet Sonrası Eğitim Kitapçıkları Seri:7 T.K.B.B.V. Akademik Toplantıları 2011:34: 978-975-8882-37-3
- Pachl J, Duska F, Waldauf P, Fric M, Fanta J ZD, Arsky E. Apoptosis as an early event in the development of multiple organ failure? *Physiological research*. 2005; 54:697.
- Panka DJ, Buchbinder E, Giobbie-Hurder A, Schalck AP, Montaser-Kouhsari L, Sepehr A, Lawrence DP, Mcdermott DF, Cohen R, Carlson A. Clinical utility of a blood-based BRAFV600E mutation assay in melanoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2014; 13:3210-3218.
- Paoloni-Giacobino A, Chaillet J. The role of DMDs in the maintenance of epigenetic states. *Cytogenetic and genome research*. 2006; 113:116-121.
- Park S-Y, Kim B-H, Kim JH, Cho N-Y, Choi M, Yu EJ, Lee S Kang GH. Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers. *Journal of Korean medical science*. 2007; 22:311-317.
- Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348:2646-2655.

- Pisetsky DS. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clinical Immunology*. 2012; 144:32-40.
- Pupilli C, Pinzani P, Salvianti F, Fibbi B, Rossi M, Petrone L, Perigli G, De Feo M, Vezzosi V, Pazzagli M. Circulating BRAFV600E in the diagnosis and follow-up of differentiated papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013; 98:3359-3365.
- Rao P, Antony A, Rajalakshmi S, Sarma D. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis*. 1989; 10:933.
- Reamon-Buettner SM, Mutschler V, Borlak J. The next innovation cycle in toxicogenomics: environmental epigenetics. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2008; 659:158-165.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2005; 6:597.
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Cmaj*. 2006; 174:341-348.
- Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner SA, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972; 69:1685-1689.
- Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *The Journal of clinical investigation*. 1990; 86:69-74.
- Salvianti F, Giuliani C, Petrone L, Mancini I, Vezzosi V, Pupilli C, Pinzani P. Integrity and quantity of total cell-free DNA in the diagnosis of thyroid cancer: Correlation with cytological classification. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18:1350.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11:426.
- Segré CV, Chiocca S. Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *BioMed Research International*. 2010; 2011.
- Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem*. 2007; 76:75-100.

- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA Issa J-PJ. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS genetics*. 2007; 3:e181.
- Sherma SI. Thyroid carcinoma. *The Lancet*. 2003; 361:501-511.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014; 64:9-29.
- Singer PA. Thyroiditis: acute, subacute, and chronic. *Medical Clinics of North America*. 1991; 75:61-77.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ Yao S-L. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 1994; 3:67-71.
- Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Naumnik W, Niklinski J, Dabrowska K Chyczewski L. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2007; 45:149-158.
- Szyf M, Knox DJ, Milutinovic S, Slack AD, Araujo FD. How does DNA methyltransferase cause oncogenic transformation? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 910:156-177.
- Tan E, Schur P, Carr R Kunkel H. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*. 1966; 45:1732-1740.
- Thomusch O, Machens A, Sekulla C, Ukkat J, Lippert H, Gastinger I Dralle H. Multivariate analysis of risk factors for postoperative complications in benign goiter surgery: prospective multicenter study in Germany. *World journal of surgery*. 2000; 24:1335-1341.
- Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong H, Roebert J, Christie M, Tacey M, Wong R, Singh M, Karapetis C. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2015; 26:1715-1722.
- Tsang JC, Dennis Lo Y. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology*. 2007; 39:197-207.
- Urgancıoğlu İ. Tiroid hastalıkları. *Endokrinoloji Ed. Hatemi H*. 1997.

- Üstün F. Trakya Üniversitesi Nükleer Tıp Anabilim dalındaki hipertiroidi hastalarının 10 yıllık radyoaktif iyot tedavisi sonuçları. 2002.
- Vorce RL, Goodman JI. Altered methylation of *ras* oncogenes in benzidine-induced B6C3F1 mouse liver tumors. *Toxicology and applied pharmacology*. 1989; 100:398-410.
- Wagner J. Free DNA—new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? *Biochimica medica: Biochimica medica*. 2012; 22:24-38.
- Wang SH, Baker Jr JR. The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid*. 2007; 17:975-979.
- Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. *Current opinion in oncology*. 2000; 12:68-73.
- Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Current opinion in microbiology*. 2007; 10:52-56.
- Warton K, Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. *Frontiers in molecular biosciences*. 2015; 2:13.
- Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic acids research*. 2005; 33:6823.
- Williams D. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2:543.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2007; 1775:138-162.
- Xie C-H, Naito A, Mizumachi T, Evans TT, Douglas MG, Cooney CA, Fan C-Y, Higuchi M. Mitochondrial regulation of cancer associated nuclear DNA methylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007; 364:656-661.
- Yan C, Boyd DD. Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26:6357-6371.

- Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JPJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic acids research*. 2004; 32:e38-e38.
- Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*. 2005; 437:754.
- Youngson RM, 2006. *Collins dictionary of human biology*: Collins.
- Zane M, Agostini M, Enzo MV, Ide EC, Del Bianco P, Torresan F, Boschini IM, Pennelli G, Sacconi A, Rubello D. Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAFV600E: A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2013; 67:723-730.
- Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification. *BMB Reports*. 2007; 40:135-141.

EKLER

Ek-1

Etik Kurul Onay Formu

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 18920478-202.03.02-E.136331
Konu : Başvurunuz Hk.

05.12.2016

DAĞITIM YERLERİNE

2011-KAEK-27/2016-E.70096 nolu "Troid Hastaları Plazma cfDNA Miktarının ve Bu DNA'nın Metilasyon Derecesinin Belirlenmesi" çalışma ile ilgili olarak Etik kurula sunmuş olduğunuz başlık değişimi ve proje yürütücü değişikliği ile ilgili 28.11.2016 tarihli dilekçeniz 30.11.2016 tarihli toplantıda değerlendirilmiş olup; talep ettiğiniz "Tiroid Hastalarında Sirküler Hücre Dışı DNA Miktarı ve bu DNA'nın Metilasyon Derecesinin Belirlenmesi" olarak başlığın değiştirilmesi ve proje yürütücüsünün Doç. Dr. Akın ÇAYIR olarak değiştirilmesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından uygun görülmüştür.

Bilgilerinize rica ederim.

 e-izalidır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Başkan

Dağıtım:

Gereği:

Sayın Prof.Dr. Mahmut COŞKUN
Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı
Başkanlığı

Bilgi:

Sayın Doç. Dr. Akın ÇAYIR
Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı
Başkanlığı

Not: 5070 sayılı elektronik imza kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Bilgi için: Faize OTURAN
Sekreter

Ek-2

SPIRALLİ TEZ KONTROL FORMU

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.		
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.		
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.		
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.		
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.		
6) Özet ve Summary 250’şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)		
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.		
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.		
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.		
10) Tezde yazım karakteri olarak “Times New Roman” kullanılmalıdır.		
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.		
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.		

Tarih: ... / ... / 20...	Tarih: ... / ... / 20...
Öğrenci Adı ve Soyadı,	Danışmanın Adı ve Soyadı,
İmza	İmza

Ek-3

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM
KONTROL LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: ... / ... / 20...	Tarih: ... / ... / 20...	
Öğrenci Adı ve Soyadı,	Danışmanın Adı ve Soyadı,	
İmza	İmza	

Ek-4

Kişisel Bilgiler

Adı	Güner Begüm			Soyadı	Çılgın
Doğum Yeri	Sivas	Uyruğu	T.C	Doğum Tarihi	28.01.1988
E-mail	sbegumclgn28@gmail.com			Tel	05555903887

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2012

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-

Yabancı Dil Sınav Notu[#]

KPDS	ÜDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE
		32						

A-Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Diğer:

B-Katıldığı Uluslararası ve ulusal konferans ve kongreler:

C-Sertifikalar: C sınıfı İş güvenliği sertifikası 2013

D-Ödüller:

