

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

mikroRNA’LARIN HASHİMOTO TİROİDİTİ’NDEKİ ROLÜ

Uzmanlık Tezi

Dr. Hale ÖNDER YILMAZ

Trabzon – 2017

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

mikroRNA'LARIN HASHİMOTO TİROİDİTİ'NDEKİ ROLÜ

Uzmanlık Tezi

Dr. Hale ÖNDER YILMAZ
TEZ Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Alper Han ÇEBİ

Trabzon - 2017

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmada, bilgi ve deneyimlerini bana aktaran ve her konuda bana yardımcı olmaya çalışan her türlü soruma sabırla cevap veren tez danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. Alper Han ÇEBİ ve en az danışman hocam kadar destek olup bilgisi ve tecrübeleriyle yol gösterici olan Sayın Prof. Dr. Mevlit İKBAL başta olmak üzere;

Birlikte çalışmaktan zevk duyduğum çalışma arkadaşlarım Uzm.Dr. Serhat SEYHAN'a, Dr. M.Hakkı YARAR'a, Dr. Mücahit GÖKTAŞ'a

Başta Günay DİNÇ, Bediha KAYA, Elmas YAVUZ olmak üzere Tıbbi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına;

Çalışmam süresince sabrı ve fedakarlığıyla yanımda olan sevgili eşim Orkun YILMAZ'a

Hayatım boyunca bana her zaman destek olup ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan azim ve kararlılıkları ile her daim örnek aldığım çok kıymetli annem ve babama, varlıkları ile neşe kaynağım olan kardeşlerime en içten duygularım ile teşekkür eder, saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Hale ÖNDER YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖNSÖZ	1
İÇİNDEKİLER	11
KISALTMALAR	1V
TABLolar DİZİNİ	v1
ŞEKİLLER DİZİNİ	v11
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Troid Bezi	3
2.1.1 Troid Bezi Embriyolojisi	3
2.1.2 Tiroid Bezi Anatomisi	3
2.1.3 Troid Bezi Yapısı ve Fonksiyonları	4
2.1.4 Troid Hormonlarının Genel Etkileri	5
2.2 Otoimmunité ve Tiroiditler	6
2.3 Klasik İmmun Davranış	8
2.3.1 Lenfosit Antijen Reseptörleri	11
2.3.1.1 Temel Doku Uygunluğu Bileşeni	11
2.3.2 İmmun Reaksiyonlarda Adezyon Molekülleri	13
2.4 Otoimmün Tiroid Hastalıklarında Başlıca Roller Olan Antikorlar	13
2.4.1 Tiroglobulin	13
2.4.2 TSH Reseptörü	14
2.4.3 Tiroid Peroksidaz	14
2.5 Hashimoto Tiroiditi	15
2.5.1 Patogenez	15

2.5.2	Klinik Bulgular	20
2.5.3	Laboratuvar Bulguları	20
2.5.4	Tedavi	21
2.6	Küçük Kodlama Yapmayan Ribonükleik Asitler (Small noncoding RNA)	21
2.6.1	MiRNA'ların Tanımı ve Tarihçesi	22
2.6.2	MiRNA'ların Terminolojisi	24
2.6.3	MiRNA Biyogenezi	24
2.6.4	Çalıştığımız miRNA'lar	26
2.6.4.1	miR-22	26
2.6.4.2	miR-375	27
2.6.4.3	miR-155	28
2.6.4.4	miR-451	28
2.6.4.5	miR-141	29
2.6.5	miRNA'ların İmmünolojik Etkileri ve Hashimoto Tiroiditi ile İlişkisi	29
2.6.6	miRNA Profillendirme	31
2.7	Gerçek zamanlı Kantitatif Polimerz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	33
3	GEREÇ VE YÖNTEM	35
4	BULGULAR	41
5	TARTIŞMA	56
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	64
7	TÜRKÇE ÖZET	67
8	SUMMARY	70
9	KAYNAKLAR	73

KISALTMALAR

Anti-TPO	: Anti Troid Peroksidaz Antikoru
Anti-TG	: Anti Troglobulin Antikoru
APC	: Antigene Presenting Cell
cAMP	: Siklik AMP
DIT	: Diiyodotronin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ERα	: Östrojen reseptör alfa
EPO	: Eritropetin
gr	: gram
GAG	: Glikozaminoglikan
HT	: Hashimoto Troiditi
HLA	: Human Leukocyte Antigene
HSC	: Hematopoetik Stem Cell
IFN-γ	: İnterferon Gamma
Ig	: İmmunglobulin
IL	: İnterlökin
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule
LFA	: Lymphocyte Function Antigene
mm	: milimetre
MIT	: Monoiyodotronin
MHC	: Major Histocompatibility Complex

miRNA	: Mikro RNA
NK	: Naturel Killer
ncRNA	: Noncoding RNA
ORF	: Open Reading Frame
PGE2	: Prostaglandin E2
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
TRH	: Thyrotropin Releasig Hormone
TSH	: Thyroid Sytimulating Hormone
TCR	: T Cell Receptor
Th	: T helper
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TSIg	: Tiroid Stimülan İmmunglobulin
TSAb	: Tiroid Stimülan Antikor
Treg	: Regulatory T Cells
UPL	: Universal Prob Library
VLA	: Very Late Antigene
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Molecule
CI	: Confidence Interval

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Otoimmün Tiroid Hastalıkları

Tablo 2. Otoimmün Tiroid Hastalarında Sitokinlerin Etkileri

Tablo 3. Küçük RNA'ların sınıflandırılması

Tablo 4. Gruplardaki Cinsiyet, Yaş Dağılımı.

Tablo 5. Hasta grubu TSH, Anti-TPO, Anti-TG değerleri ile sağlıklı grup TSH Dağılımı.

Tablo 6. Kontrol grubu CT değerleri.

Tablo 7. HT Hastaları İlk geliş CT Değerleri

Tablo 8. HT Hastaları ikinci Geliş CT Değerleri

Tablo 9. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-22 Ekspresyon Oranları

Tablo 10. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-141 Ekspresyon Oranları

Tablo 11. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-155 Ekspresyon Oranları

Tablo 12. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-375 Ekspresyon Oranları

Tablo 13. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-451 Ekspresyon Oranları

Tablo 14. H Grubunda TSH ve miRNA Ekspresyon Korelasyonu.

Tablo 15. N Grubunda TSH ve miRNA Ekspresyon Korelasyonu.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tiroid hormonu sentez basamakları

Şekil 2. İmmun reaksiyonda görevli lenfositler.

Şekil 3. MHC Sınıf I molekülü

Şekil 4. MHC Sınıf II molekülü

Şekil 5. TSH reseptörü ve uyarılması

Şekil 6. Hashimoto Tiroiditi patogenezi

Şekil 7. Genomik DNA tarafından başlatılan ve histon aracılığı ile doğuştan ve kazanılmış bağışıklık genlerinin aktive edilmesinde önerilen model.

Şekil 8. miRNA Biyogenezi

Şekil 9. miRNA RT-qPCR yöntemleri

Şekil 10. MiR-22 Amplifikasyon Eğrileri.

Şekil 11. MiR-141 Amplifikasyon Eğrileri.

Şekil 12. MiR-155 Amplifikasyon Eğrileri.

Şekil 13. MiR-375 Amplifikasyon Eğrileri.

Şekil 14. MiR-451 Amplifikasyon Eğrileri

Şekil 15. S, H, N gruplarının miRNA değerleri (x eksen) ve fold change (y eksen) değişimi grafiği

Şekil 16. S, H, N gruplarının her bir miRNA için ekspresyon dağılım grafiği

Şekil 17. N grubunun (Grup 2), H grubuna (Grup1) göre miRNA ekspresyon değişimleri grafiği

1. GİRİŞ VE AMAÇ

MikroRNA (miRNA)'lar son yıllarda ortaya çıkan, 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlama yapmayan (noncoding) ve büyük bir çoğunluğu hücre içinde bulunmakla birlikte ekstrasellüler alanda, vücut sıvılarında ve kanda bulunabilen RNA molekülleridir. miRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolik süreçler, apoptoz, inflamasyon ve immünolojik süreçlerin düzenlenmesi gibi süreçlerde düzenleyicidirler. Çeşitli çalışmalarda yapılan gözlemler, insan plazmasında bulunan miRNA'ların yüksek bir stabiliteye sahip olduğunu ve bu örneklerde yapılan miRNA ekspresyon kalıbı analizinin çeşitli hastalıkların durumları hakkında yararlı bilgiler sunabileceğini ortaya koymuştur. miRNA'ların hasta serum/plazmasında belirlenebilmesi, tanısında mutlaka girişimsel tekniklerin kullanılmasını gerektiren hastalıklarda oldukça kolay bir örnek eldesini sağlar. Potansiyonel olarak gen veya protein sentez bozukluğu aracılı her hastalık, hücre tipi veya doku tipi miRNA tabanlı hedefleri oluşturabilirler. miRNA'lar gelişimsel açıdan mesajcı RNA'ların protein üretmesini düzenleyici rol üstlendiğinden, terapötik açıdan önemli olmalarını sağlamaktadır.

Hashimoto Tiroiditi (HT), T ve B lenfositlerin tiroid dokusunu istila ederek parçalaması sonucu Anti-TPO ve Anti-TG antikollarının üretimi ile karakterize en yaygın otoimmün ve endokrin hastalıklardan biridir.

miRNA'ların immün sistemi kontrol etmede ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde önemli bir yeri olduğunu son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar açıkça göstermektedir. HT'de bunu tiroid dokusuna infiltre olan lenfositleri aktive ederek yaptıkları düşünülmektedir. Bu sebeple sirkülatuar miRNA'nın tanımlanması klinik durumlar ve hastalık patogeneğinde önemli ve yeni bilgiler sağlayabilir.

Hashimoto Tiroiditi'nde TSH'ın yüksek olduğu tanı anında ve aynı hastaların tedavi sonrası ötroid dönemdeki miRNA profili bu güne kadar henüz çalışılmamış bir konudur. Biz de bunu göz önünde bulundurarak TSH'ın yüksek olduğu tanı anında ve aynı hastaların tedavi sonrası üç ay sonraki ötroid oldukları kontrol dönemindeki

miRNA ekspresyon düzeylerini belirleyip sağlıklı kontrol grubu ile aralarında ekspresyon düzeyi açısından bir fark olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık. Çalışmamız ile HT'nin şimdiye dek tam olarak aydınlığa kavuşmamış olan patogeneğine yeni bir bakış açısı sunarak hem literatüre katkı yapmayı planlıyoruz; hem de bu yeni bakış açısının HT güncel tedavisine yeni ufuklar açmasını bekliyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tiroid Bezi

2.1.1 Tiroid Bezi Embriyolojisi

Tiroid bezi (*Glandula thyroidea*) embryonal yaşamın 4. Haftasında pharynx'in ventral duvarının ortasında tuberculum impar ile copula arasında endodermal bir çıkıntı şeklinde oluşmaya başlar. Oluşan çıkıntı daha sonra ductus thyroglossus adlı bir divertikül olarak gelişir. Bu divertikül aşağı ve öne doğru tüp şeklinde büyümeye devam eder. Bu tüpün alt ucu, boyunda ikiye ayrılır. Daha sonra bir çok hücre sütunları oluşur. Bu hücre sütunlarından tiroid bezinin isthmus ve yan lobları gelişir. Ductus thyroglossus daha sonra kapanır ve üst açıklığı erişkinlerde dil kökünde foramen caecum olarak kalır (1).

2.1.2 Tiroid Bezi Anatomisi

Tiroid bezi; boyunda, trakeanın önünde, krikoid kıkırdak ile suprasternal çentik arasındadır. İsthmus ile birbirine bağlı olan sağ ve sol lob ile piramidal lob olmak üzere üç lobdan oluşan tiroid bezinin görünümü kelebeğe benzer. Tiroid bezi Yunanca'da kalkan biçimli anlamına gelmekte olup, “*thyreos*” kalkan, “*eidos*” ise biçim demektir. Sağlıklı kişilerde 12-20 gr ağırlığında, damardan zengin ve yumuşak kıvamlı bir yapıdır (2). Lobların boyutları: uzunluk x genişlik x derinlik olarak sırasıyla 45x18x15 mm kadardır. İki lob eşit boyutta olmayabilir. İsthmus ise 20x5x5 mm'dir (2, 3).

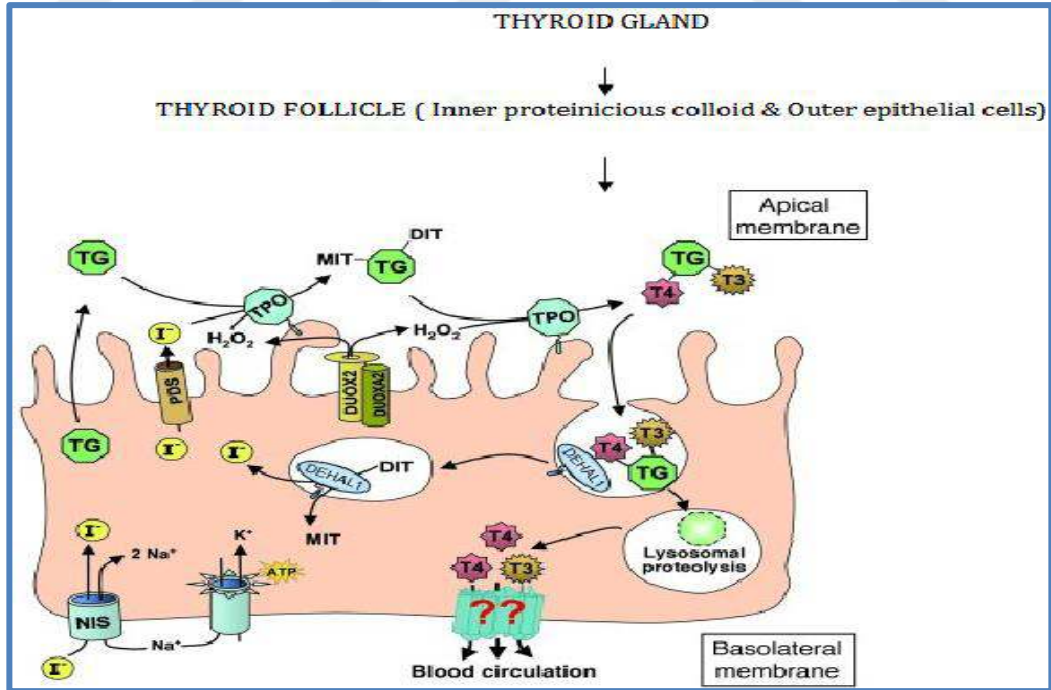
2.1.3 Troid Bezi Yapısı ve Fonksiyonları

Troid bezinin fonksiyonu hipotalamustan salgılanan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) ile hipofizden pulsatil olarak salgılanan ve diüurnal varyasyon gösteren tiroid stimülan hormon (TSH) tarafından düzenlenir (4).

Plazmada bulunan iyodun aktif transport ile troid hücrelerince alınması troid hormonlarının sentezinde ilk aşamadır. Bu işlem troid hücrelerinin membranında bulunan “Na/I symporter” proteinleri ile gerçekleştirilir.

İkinci aşamada hücre içine alınan iyot, troid peroksidaz aracılığı ile okside olur. Belli bir seviyeye ulaşan iyot, tirozin aminoasidinin aromatik zincirine bağlanır. Organifikasyon denilen bu olay sonucunda hormonal olarak inaktif olan tirozine bir iyodun bağlanmasıyla monoiyodotirozin (MIT); iki iyodun bağlanmasıyla diiyodotirozin (DIT) adı verilen moleküller oluşmuş olur (Şekil 1).

Son aşama ise MIT ve DIT moleküllerinin birleşerek triiyodotrozini (T3) veya 2 tane DIT molekülünün birleşerek tiroksini (T4) oluşturduğu eşleşme (coupling) aşamasıdır (5).



Şekil 1. Tiroid hormonu sentez basamakları (6).

Dolaşımdaki T4'ün tamamı ve T3'ün %20'si tiroid bezinde üretilmektedir. T3'ün geriye kalan kısmı karaciğer, böbrek gibi dokularda T4'ün 5' deiyodinaz enzimi aracılığı ile deiyodinizasyonu vasıtasıyla oluşmaktadır. Reseptörlere afinitede T3 T4'den daha iyidir. Tiroid hormonlarının biyolojik aktivitesinin büyük kısmı T3'ün hücrel etkileri sonucu oluşur (7).

T3 ve T4 sentezi, TSH uyarısı sonrası peroksidaz enzimleri ile gerçekleştirilir. Bu enzimler foliküler hücrelerde oksidasyon, organifikasyon ve coupling aşamalarını katalizler (8).

2.1.4 Tiroid Hormonlarının Genel Etkileri

Kalorijenik etkiler: Tiroid hormonları oksijen tüketimi ve ısı üretimini artırır. Kalorijenik etkinin Na-K ATPaz enziminin stimülasyonu ile olduğu düşünülmektedir.

Kardiyovasküler etkiler: Tiroid hormonları kalpte pozitif inotrop ve pozitif kronotrop etki gösterirler. Hipertroidi durumunda kalbin kontraktilitesi ve debisi artar, kalp kasında hipertrofi gelişir, atriyal fibrilasyon riski artar. Hipotroidide ise tam tersi söz konusudur (7, 9).

Pulmoner etkiler: Solunum merkezinde hipoksi ve hiperkapni ile normal cevabın sürdürülmesini sağlar.

Gastrointestinal etkiler: Tiroid hormonları gastrointestinal motiliteyi artırır. Hipertiroidide ishal, hipotroidide konstipasyona neden olurlar. Hipotroidide intestinal psödoobstrüksiyon görülebilir.

Hematopoetik etkiler: Tiroid hormonları kemik iliğinde eritropoietik aktiviteyi ve serum eritropoietin (EPO) düzeyini artırır. Bu yüzden hipertiroidide kemik iliğinde artmış aktivite nedeni ile eritrositoz; hipotroidide anemi sık olarak görülür (7, 10).

2.2 Otoimmünite ve Tiroiditler

Otoimmünite, immun sistemin, vücudun kendi organ, doku ve hücrelerinin yapısında bulunan protein veya lipoproteinine yönelik immun yanıt gelişmesidir. Gelişen immun yanıt sonucu oluşan hastalıklara da otoimmün hastalıklar denilir.

İmmun sistem, embriyo döneminden başlayarak organizmanın kendi proteinlerine karşı, kendinden olanı ayırt etme özelliğine sahiptir. Kendi proteinlerine karşı tepkisizliğe “kendine tolerans (self tolerans)” denir. Canlının kendi proteinlerine karşı toleransın gelişmemesi veya bir nedenle sonradan toleransın yok olması, otoimmün yanıtın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu durum, ilgili doku ve organlarda inflamasyon, patolojik hücre apoptozu, fonksiyonel bozukluk gibi patolojik süreçlerin gelişmesine neden olabilir.

Bağışıklık sistemi bir yandan vücuda yabancı proteinleri ve organizmaları tanıyıp onlarla baş edebilecek kadar güçlü olması gerekirken bir yandan da kendi hücrelerine zarar vermeyecek kadar da dengeli olmalıdır. Bunun için vücudun kendi yapıtaşını oluşturan proteinleri algılayıp bu antijenlere tolerans geliştirmesi gerekir. Bu tanıma işleminin fetal hayatta timusta gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Timustaki bazı Th hücre grupları fetal hayatta yok edilirken, istenilen özelliği olan T hücrelerin hayatta kalmasına izin verilir. Bu olay fetal hayatta kabaca 3 aşamada gerçekleşir :

1. Timusdaki T hücreleri herhangi biri antijen sunmayan HLA molekülüne sıkıca bağlanırsa bu hücre serisi inaktive olur ve yok edilir.

2. MHC tarafından sunulan yabancı antijenler ile karşılaşan T hücreler kalırlar.

3. MHC tarafından sunulunan vücuda ait antijenlere (“self”) karşı yanıt geliştiren hücrelerin bir çoğu klonal delesyona uğrarken bir kısmının TCR molekülünün geniş bir değişken yapıya sahip olabilmesi ve çok fazla sayıda T hücresinin yok edilmesinin bağışıklık sistemini olumsuz etkileyebilmesi nedeniyle yaşamasına izin verilir.

Self tolerans aşamaları için verilebilecek en iyi örnek Addison hastalığı, hipoparatiroidizm ve tiroid otoimmünitesi ile birlikte giden Otoimmün Poliglandüler Sendrom Tip –I dir (APS-I). Bu sendromun fetal hayattaki AIRE (Autoimmune Regulator Gene) genindeki bozukluk nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (11, 12).

Otoimmün yanıtın nedenleri kesin olarak bilinmemektedir. Çoğu olguda genetik bir yatkınlık gözlenmektedir. Otoimmün hastalığı olanların birinci derece akrabalarında da benzer otoimmün hastalıkların sık görülmesi genetiğin otoimmünitede etkisi olduğunu düşündürmektedir (13). Otoimmün hastalığı olanlarda, diğer otoimmün hastalıkların görülme oranı, toplumdaki genel görülme oranından daha fazla gibi görünmektedir. Örneğin Graves veya Hashimoto hastalarında Tip I Diabetes mellitus; Hashimoto hastalarında pernisiyöz anemi daha sık görülmektedir. Yaşla birlikte otoimmün hastalıkların sıklığında artışın görülmesi, çevre faktörlerinin etkisini de düşündürmektedir. Ancak bu çevresel faktörler ve bunların etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.

Tiroid bezi otoimmün hastalıkların en sık görüldüğü organların başında gelmektedir. Troidin otoimmün hastalıkları alt başlığında HT, sessiz tiroidit (silent tiroidit), postpartum tiroidit, atrofik tiroidit, Graves hastalığı, Graves oftalmopatisi ve Graves dermatopatisi yer almaktadır (Tablo 1). Tiroid otoimmünitesi, Doniach ve arkadaşları tarafından HT olan hastaların serumlarında tiroglobulin antikörlerinin gösterilmesiyle ortaya konmuştur (14).

Otoimmün hipotiroidizm (Hashimoto Tiroiditi) ile Graves hastalığının ortak özelliklerinin olduğu, bir hastalıktan diğerine geçişin görülebildiği, tiroid otoimmünitesine bağlı fakat klinik olarak daha az belirgin hastalıkların (subklinik hipotiroidizm, fokal tiroidit, postpartum tiroidit v.b.) genel popülasyonda oldukça sık görüldüğü bilinmektedir. Toplum bazında yapılan çalışmalarda subklinik tiroid otoimmünitesinin nadiren ve yavaş olarak ilerleyerek aşikar tiroid disfonksiyonuna neden olduğu rapor edilmekle birlikte; A.B.D.’de otoimmün hipotiroidizmin otopsilere tespit edilme sıklığının %0.8 olduğu ve bunların da %95’inin kadın olduğu bildirilmiştir (15).

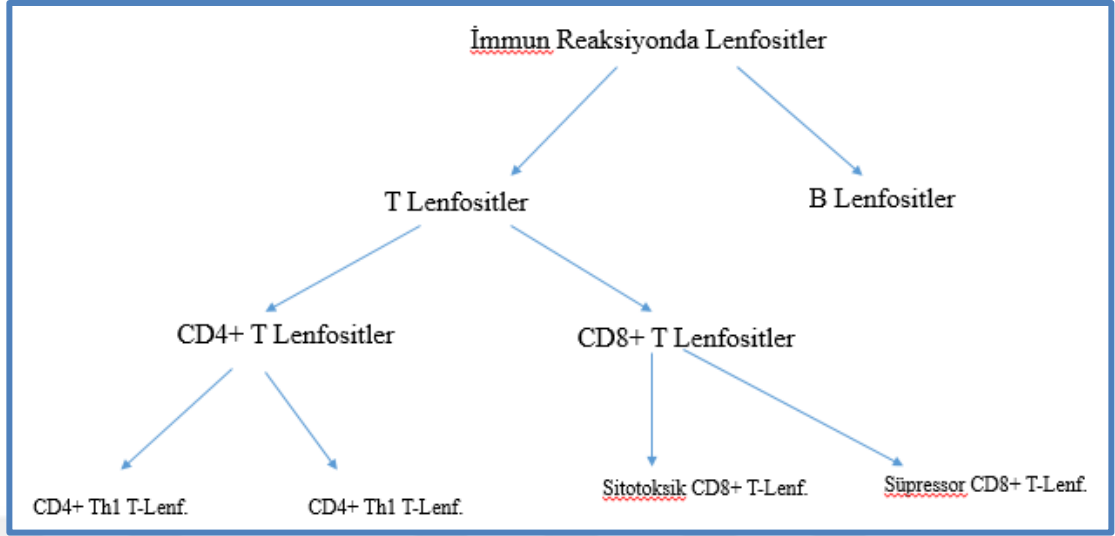
Tablo 1. Otoimmün Tiroid Hastalıkları

- Hashimoto Tiroiditi
- Sessiz tiroidit (silent tiroidit)
- Postpartum tiroidit
- Atrofik tiroidit
- Graves hastalığı
- Graves oftalmopatisi ve dermatopatisi

2.3 Klasik İmmün Davranış:

İmmün sistemimiz, vücudumuzu çevremizdeki çeşitli patojenik mikroorganizmalardan ve toksinlerden koruyan hücre, doku ve moleküllerin bir araya toplanması ile oluşmaktadır; doğal ve edinsel olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Adından da anlaşılacağı üzere, doğuştan gelen immün sistem, her zaman var olan ve enfeksiyon bölgesinde mikropları harekete geçirmeye ve savaşmaya hazır fiziksel epitel bariyerleri, fagositik lökositler, dendritik hücreler, doğal katil (NK: Naturel Killer) hücre adı verilen özel bir lenfosit türü ve dolaşımdaki plazma proteinlerinden oluşmaktadır.

Edinsel immün yanıt ise daha spesifikleşmiş ve uzmanlaşmış bir immün yanıt oluşturur; hücresel ve humoral immün yanıt olarak ikiye ayrılır. Humoral immün yanıtta B lenfositler antijene özgü antikor üretiminden sorumludur; hücresel yanıtta görevli T lenfositler ise antijenin tanınması, immün sistem hücrelerine antijenin sunumu, bu hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu, B-lenfositlerin antijen spesifik antikor üretimi için uyarılması, immün yanıtın güçlendirilmesi veya baskılanması ve sitotoksisiteyi doğrudan veya dolaylı olarak kontrol etmek gibi işlevleri bulunur (Şekil 2) (16).



Şekil 2. İmmun reaksiyonda görevli lenfositler.

T lenfositlerin aktivasyonu, antijen sunan hücrelerin (APC: Antijen Presenting Cell) etkinliği ile başlar. Makrofajlar ve dendritik hücrelerdir APC özelliği gösteren temel hücrelerdir. Antijenik özellik gösteren molekül, fagositoz yoluyla veya reseptörler aracılığıyla hücre içine alınır. Hücre içine alınan molekül parçalara (epitoplara) ayrıştırılır. Peptidler ise hücre içinde insan lökosit antijeni olan HLA sınıf-II moleküllerine yerleştirilerek, hücre yüzeyinde CD4+ T lenfositlere sunulur. Sınıf-II HLA'lar, polimorfik moleküller olup, bu özellikleri ile bir çok peptidi bağlama özelliğine sahiptirler (16).

APC tarafından T lenfositte antijen sunumu sırasında her iki hücrede bulunan çok sayıda yüzey molekülü karşı hücrede bulunan ligandlarına bağlanır. Bunlar sinyal molekülleridir. Sinyal moleküllerinin tipine göre immün yanıt ya aktivasyon ya da inhibisyon şeklinde ilerler. APC üzerinde HLA, ICAM-1, LFA-3, B7, CD40 molekülleri bulunurken, bu moleküllerin T lenfosit üzerindeki ligandları TCR, CD3, LFA1, CD2, CD28 ve CTRL 4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) molekülleridir. APC üzerindeki HLA molekülünün CD4+ T lenfositin T hücresi reseptörüne (TCR: T Cell Receptor) bağlanması, immün yanıtı aktive veya inhibe ederek kontrol eden çok sayıda molekülün APC ve T hücre tarafından salınmasına yol açar. İlk basamakta, APC hücre yüzeyindeki ICAM-1 ve LFA-3, sırasıyla T-lenfosit LFA-1

ve CD2 moleküllerine bağlanır. Bu şekilde APC ve T-lenfosit birbirine bağlanmış olur. Bunu takiben APC'nin sunacağı antijen, sınıf- II HLA ile birlikte T lenfosit sunulur. HLA-antijen kombinasyonu, T-lenfositin TCR'üne bağlanarak, antijen T-lenfositte tanıtılmış olur. Bundan sonraki evre, aktivasyonun güçlendirildiği veya baskılandığı ikincil sinyal evresidir. APC'de bir periferik membran proteini olan B7 (CD 80 veya CD 86) molekülü, T lenfosit yüzeyindeki CD28 molekülüne bağlandığında T lenfosit immun reaksiyonu uyarılır (co-stimulation); buna karşın B7, CD28 yerine CTLA-4 ile reaksiyona girdiğinde Tlenfositteki immun reaksiyon baskılanmaktadır (co-süpressor). Bu nedenle CD28 yokluğunda, T lenfosit immun yanıt gösterememektedir. CTRL-4 yokluğunda veya mutasyonunda ise immun yanıt aşırılığı ortaya çıkmaktadır. T lenfositin CD4 molekülü ise HLA+antijen+TCR kombinasyonundan sonra başlayan immun reaksiyon sinyalini başlatır. Bu reaksiyon sonucu, CD4+ Tlenfositlerde, IL-2 (İnterleukin-2) ve IL-2R (IL-2 reseptörü) veya IL-4 sentez ve salınımını başlamaktadır (17, 18).

CD4+ T lenfositlerin verdiği immun yanıt ise T helper 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) tipi yanıt olmak üzere iki çeşittir. Organ hasarı ve geç tip hipersensitivite ile giden otoimmun endokrinopatilerde, IL-2 üreten T-lenfositlerin sorumlu olduğu Th1 yolu ağırlıktadır. Th2 yanıtında ise IL-4 üreten T-lenfositler aracılığı ile antikor sentezi uyarılmaktadır. Th1 yolunda, IFN- γ (interferon gamma), TNF (tumor necrosis factor), IL-3 sentez ve salınımı; Th2 yolunda ise B lenfosit uyarılmasının yanında IL -3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 salınımı da uyarılmaktadır.

Th2 yolu ise B lenfosit, antijene karşı spesifiye eder. T lenfositin membranında ki CD 40 L proteini ile B lenfosit membranında bulunan CD 40 proteini birleşir. Birleşme sonucu antijenik sinyal B lenfositte geçer ve B lenfosit antijene özgün antikor üretmeye başlar (16, 18).

CD8+ T lenfositler sitotoksik ve süpressor özellik göstermektedir. Epiteloid tipteki hücreler sitoplazmalarında bulunan bazı proteinleri parçalayarak peptidlerine ayırır. Bu proteinler o hücrenin kendi doğal bir proteini, viral-bakteriyel bir protein veya bir malign protein olabilir. Bu peptidlerden bazıları antijeniktir. Bu antijenik peptidler, bu hücrede sentez edilip hücre yüzeyindeki HLA sınıf-I içinde CD8+ T lenfositlere sunulur. CD8+ T lenfositlerin yüzeyindeki fas-L (fas-ligant), HLA-I +

antijen kompleksini sunan hedef hücrenin Fas'ı ile bağlanarak, hedef hücrede apoptoz sürecini başlatır (16-18).

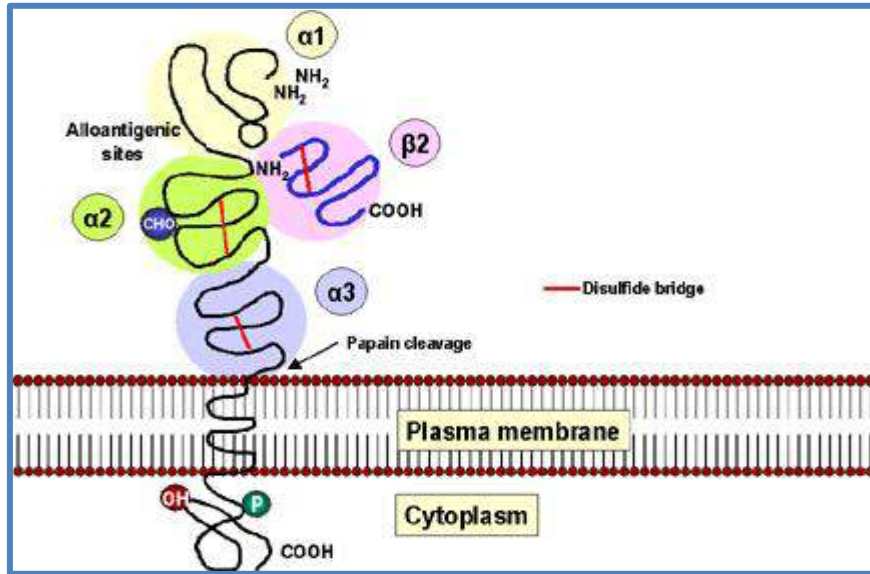
CD8+ T lenfosit dışında immun reaksiyonda sitotoksik özellikte olan NK (natural killer cell) gibi hücreler de bulunmaktadır. NK hedef hücreye 2 yolla bağlanarak onu tahrip eder. İlk yol hedef hücrenin membranındaki NK'yi bağlayan proteinler aracılığı ile hedef hücreye bağlanması ve öldürmesidir. Antikor aracılığıyla hücreye bağlanma ise İkinci yoldur. Antikor hedef hücrenin bir antijenik proteinine karşıdır ve antikor hücredeki bu proteine bağlanır (16).

2.3.1 Lenfosit Antijen Reseptörleri

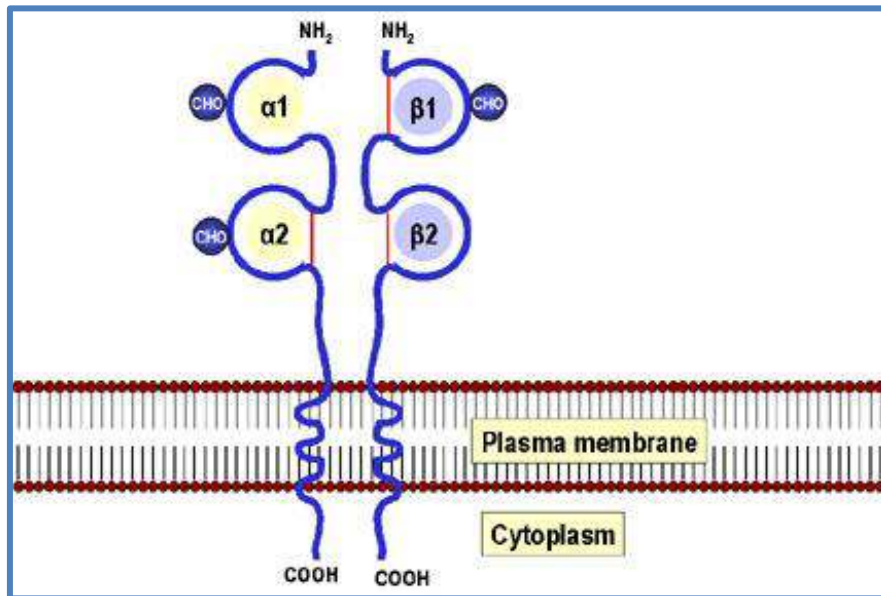
Spesifik immun reaksiyonlara aracılık ederler. B lenfositlerin membranında bulunan immunglobulin reseptörleri (IgR) ile T lenfositlerin membranındaki TCR genellikle benzerdir. Antijeni tanıyabilmesi ve bağlayabilmesi için TCR'lerin HLA'ya ihtiyacı varken, IgR'leri için böyle bir koşul yoktur (18).

2.3.1.1 Temel Doku Uygunluğu Bileşeni

Temel Doku Uygunluğu Bileşeni (MHC: Majör Histocompatibility Complex), proteinlerin veya peptitlerin sunulmasında önemli görevleri vardır. Sınıf I ve II olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sınıf I grubunda HLA-A, HLA-B ve HLA-C; sınıf II grubunda ise HLA-DP, HLA-DQ ve HLA-DR yer almaktadır. MHC-I, neredeyse tüm çekirdekli hücrelerde bulunurken, MHC-II ise sadece makrofaj, dendritik hücre gibi belirli hücrelerde yer almaktadır. MHC, antijenik proteini kanca gibi saran bir çift alfa bölümü, bunların oturduğu beta bölümü ve tümünün oturduğu globuler bölümünden oluşmaktadır (Şekil 3 ve 4) (17).



Şekil 3. MHC Sınıf I molekülü (19).



Şekil 4. MHC Sınıf II molekülü (19).

2.3.2 İmmun Reaksiyonlarda Adezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri hücrelerin birbirine tutunmasında görev almaktadır. Ayrıca sinyal iletiminde, hücrelerin aktivasyonunda ve proliferasyonunda da işlevleri vardır. Dört gruba ayrılırlar: integrinler, immunoglobulin supergen ailesi, selektinler ve CD44.

Adezyon molekülü-lenfosit etkileşiminde, antijene bağımlı olsun veya olmasın, karşılıklı olarak, integrinlerden LFA-1 (Lenfocyte function-associated antigen 1), immunoglobulin supergen ailesinden ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) ile immunoglobulin supergen ailesinden LFA-2 ve LFA-3 görev almaktadır.

İkinci derecede diğer bir adezyon yolu da, VLA-4 (Very late antijen-4) ve VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) ve fibronektin (CS1) etkileşim yoludur (17).

2.4 Otoimmün Tiroid Hastalıklarında Başlıca Roller Olan Antikorlar

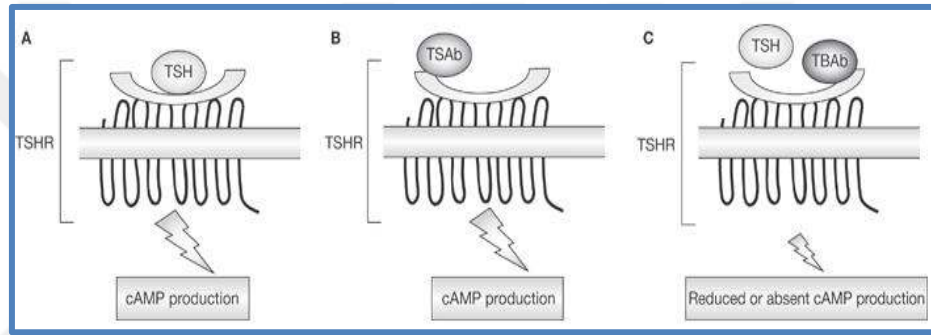
2.4.1 Tiroglobulin

Tiroid hücrelerinde T3 ve T4'ü de yapısında bulunduran bir protein olan tiroglobulin 670 KD büyüklüğündedir. Tek bir protein gibi düşünülse de yapılan çalışmalarda TG molekülünün kişiden kişiye farklılık gösterdiği tesbit edilmiştir (20). Tiroglobulin molekülünde bulunan 4 ila 8 adet epitopun, özellikle tiroit otoimmünitesinde rol aldığını düşündürmektedir (21). Saptanan Anti-TG antikor miktarı kişilerdeki tiroid dokusu lenfosit infiltrasyonu ile paralellik göstermektedir (22).

2.4.2 TSH Reseptörü

764 amino asitlik glikoprotein yapısında olan TSH reseptörü (TSH-R) bir ekstramembranöz bir kısmı, 7 transmembran halkası ve hücre içinde adenilat siklazın Gs alt biriminin bağlandığı bir iç kısmından oluştuğu gösterilmiştir (23, 24).

Bazı antikorlar TSH-R'deki bir epitopa bağlanarak reseptörü tıpkı TSH'nın yaptığı gibi aktive eder ve cAMP oluşumuna neden olur. Diğer 2 TSH-R antikoruna aynı ya da farklı epitopa bağlansa da sonuç olarak TSH'nın bağlanmasına engel olurlar ve hücredeki hormon sentezini uyarmazlar. Bu nedenle bu antikorlar Tirotropin Bağlayıcı İnhibitör İmmünglobulinler olarak adlandırılır (Şekil 5).



Şekil 5. A: Normal TSH reseptörü ve uyarılması. B: TSH reseptörünün stimülatör antikorlar ile uyarılması. C: TSH reseptörünün bloklayıcı antikorlar ile uyarılması (25).

2.4.3 Tiroid Peroksidaz

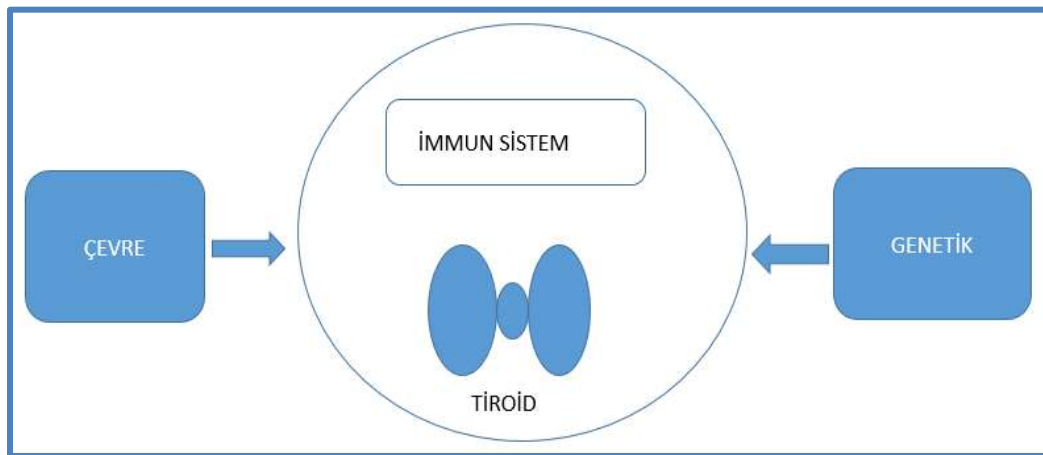
Otoimmün tiroit hastalığında en önemli antijen-antikor sistemidir. Tiroid Peroksidaz enziminin antijeni "Mikrosomal Antijen" olarak da adlandırılır. 1985'de bu antijen AntiTPO olarak adlandırılmıştır (26). mRNA'nın farklı alternatif splicingi ile 101 ve 108 KD'luk iki protein oluşturur. Tiroit hücrelerinde yüzeyde ve sitoplazmik olarak bulunan TPO, kompleman aracılıklı sitotoksitide ve antikor bağımlı hücre aracılıklı sitotoksitide rol alır (27).

2.5 HASHİMOTO TİROİDİTİ

Hashimoto Tiroiditi (HT) dünyada iyot eksikliği olmayan bölgelerde hipotiroidinin en sık nedenidir. Sıklığı yaş ile birlikte artmaktadır (28). İlk kez 1912 yılında bir Japon cerrah (Hakaru Hashimoto) tarafından tanımlanmıştır. Otoimmün bir hastalık olan HT kronik bir tiroidittir. Tiroid interstisyumunda yoğun lenfosit infiltrasyonu olması sebebi ile kronik lenfositler tiroidit de denilmektedir. En sık görülen tiroidittir. İnsidansı % 6-7 kadardır. Yapılan otopsilerde kadınlarda %5-15, erkeklerde %1-5 oranında bulunmuştur. Bu bulgu ile kadınlarda erkeklere göre çok daha sık ortaya çıktığı söylenebilir. HT vakalarının 1.derecede akrabalarında hastalığın görülme sıklığı % 18-33 arasında bulunmuş olup rölatif risk %22-47 olarak tespit edilmiştir. Tiroid antikorları bazında araştırıldığında bu rakam daha da büyümektedir. Tiroid antikor pozitifliği HT saptanan kişilerin 1.derecede akrabalarında, genel toplumdan daha yüksek bulunmuştur. Otozomal dominant bir geçişi çağrıştırmakta olup, en azında TPO'nun 5 epitopuna karşı antikor oluşması dominant özellik göstermektedir (29, 30).

2.5.1 Patogenez

Hashimoto Tiroiditi otoimmün bir hastalık olmakla birlikte patogenezini tam bilinmemektedir. Hastalığın başlangıcı ve gelişimi immunogenetik, epigenetik ve çevresel faktörleri içeren basamaklı bir yol izlemektedir (Şekil 6) (31).



Şekil 7. HT patogenezinde genetik yatkınlık, çevre faktörleri birlikte tiroid ve immün sistemi etkileyerek Hashimoto Tiroiditi oluşmasını tetiklemektedir.

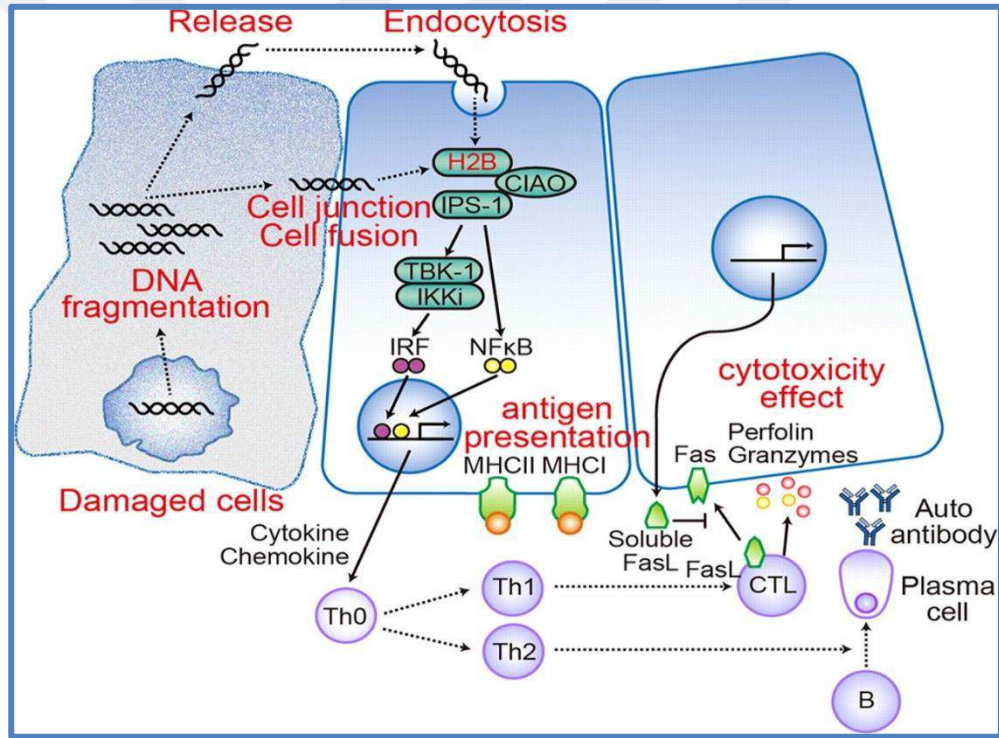
Genetik geçişi belirleyen moleküller, tüm ayrıntısıyla bilinmemektedir. Genetik marker olarak MHC'ler ön planda görülmektedir. Tiroisitlerin MHC I ve II'yi aşırı eksprese etmesi, özellikle artmış aberan MHC II ekspresyon yeteneği ve CTLA-4 bilinen genetik markerlardır. Çok sayıda yayın belli MHC alt gruplarının HT riskini artırdığını söylemektedir. HLA-DR3 ve HLA-DR5 en sık bildirilenlerdir. Bunun dışında HLA alt guruplarından DR4, DR9, DQ7 bildirilen risk guruplarıdır. HT ve diğer otoimmün tiroid hastalıkları için bildirilen bir diğer gen CTLA-4 tür. CTLA-4, T-lenfositte immün bir regülatördür. İmmün yanıt fizyolojik seviyeden daha fazla olmaması bağlamında frenleyici bir etkiye sahiptir. T lenfositte antijen sunarak immün reaksiyonu tetikleyen hücrenin B7 si ile birleşerek aktive olur ve T-hücresinde immün yanıtı baskılar. Bu baskılanma antijen sunulan T-lenfositin apoptozisine yol açarak, antijene zgnleşmiş T-hücresi ortadan kaldırılacaktır. CTLA-4 mutasyonlarında ise immün yanıt baskılanamaz ve böylece otoimmün bir hastalık oluşması kolaylaşır. CTLA-4' deki fonksiyon bozukluğunun genetik geçişli olabildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (29, 32, 33).

Tetik noktasının tam olarak bilinmediği otoimmün olayın, küçük yaşlarda daha düşük olan hastalık insidansının yaş ilerledikçe belirgin olarak artması, çevresel faktörlerin etkisini düşündürmektedir. evre faktörü olarak, iyot alımı, stres, infeksiyonlar ve toksinler sorumlu tutulmaktadır. Bu evresel faktörlerin tiroid hücresini etkileyerek, HLA-II ekspresyonuna yol açıp, tiroid antijenik proteinlerinden bazılarını parçalayıp ortama saçılan proteinlerin makrofaj veya dendritik hücrelerce fagosite edildiği, buradan da T lenfositte sunularak immün reaksiyonu tetiklediği düşünülmektedir. Bir diğer hipotez de bazı bakteriyel veya virütik proteinlerin, tiroid proteinlerine benzer olması ve bunlara karşı oluşan immün yanıtın da benzerlik sebebiyle tiroid dokusunu etkilemesi şeklinededir (33, 34).

HT'de tiroid disfonksiyonunun, Tiroit bezine infiltre olmuş T lenfositlerin yol açtığı sitotoksik etkisinden değil, sitokin aracılıklı apoptosis nedeniyle olduğu tespit edilmiştir. Apoptozisin güçlü bir bulgusu olan fragmente DNA parçacıkları HT'de tiroit folliküler hücrelerinde sıklıkla bulunur. Fas Ligandı (Fas-L) normal tiroisitlerde de bulunurken, IL-Ia'nın FAS ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. HT'de, tiroit

bezinde artmış olan sitokinlerin Fas–FasL etkileşimini artırarak tiroisitlerde apoptozisi ve tiroit disfonksiyonunu tetiklediği düşünülmektedir (Şekil 7) (35).

HT’de, antikor aracılı veya direkt hücresel immünite sorumludur. Hastalıkta, kronik tiroisit destrüksiyonu ve foliküllerin parçalanması söz konusudur. Folikül lümeninde depolanmış kolloidin intrestisyuma dağılması, yeni folikül oluşumu, yeni oluşanların bir bölümünün fonksiyon yeteneği kazanırken bir bölümünün yine aynı mekanizma ile tahrip olması şeklinde döngü görülür. Bu şekilde yaşam boyu yıkım ve yapım sürekli devam etmektedir. Hücre yıkımı daha baskın olduğu için immün sistemin sitotoksik kısmının ağırlığı burada önemlidir.



Şekil 7. Genomik DNA tarafından başlatılan ve histon aracılığı ile doğuştan ve kazanılmış bağışıklık genlerinin aktive edilmesinde önerilen model. Zarar görmüş hücrelerden salınan DNA parçaları direk veya endositoz ile komşu hücelere sızabilir. Ekstrakromozomal histon H2B sitozolde yanlış konumlanmış olan dsDNA’yı tanır, böylece inflamasyon yolağı başlatılır. Bunun bir sonucu olarak T ve B lenfositler, Fas aracılı apoptozis aktive olur ve otoimmün reaksiyon başlamış olur (36).

HT'de antikorlar yüksek oranda ve yüksek titrede bulunmaktadır. Ağırlıklı olarak bulunan antikorlar Anti-TPO (anti tiroid peroiksidaz) ve Anti-TG (anti trioglobulin) dir. Ancak anti-Na/I co-simporter, anti-kolloid-II antikorları ve ANA dahil bir çok antikor da saptanmıştır. Kompleman bağlamakta olan Anti-TPO, HT patogeneğinde daha ağırlıktadır (34, 37).

HT'de Anti-TPO aracılı tiroisit harabiyetinde öngörülen mekanizmalardan ilki, Anti-TPO'nun hücre membranında bulunan komplemanla birleşerek, sistemi harekete geçirip tiroitin destrüksiyonuna yol açmasıdır. Komplemana bağlanması tiroitin IL-1, ICAM-1, PGE2 (Prostaglandin E2) ve serbest radikal eksprese etmesine yol açarak tiroiti olumsuz etkilemektedir. İkincisi, Anti-TPO, tiroisit apikal membranında TPO'ya bağlanarak sitotoksik-T lenfositlerin yönlenmesine yol açmakta ve hücrenin apoptozuna sebep olmaktadır. Üçüncüsü, Anti-TPO ve Anti-TG, NK hücrelerin Fc reseptörüne bağlanarak, NK'ların tiroiti yok etmesine yol açmaktadır (34).

HT'de interstisyumda bol T lenfosit infiltrasyonu bulunur. Patogeneğinde IFN-g salgılayan Th1 hücrelerinin otoantikor üretimi ve tiroidit için vazgeçilmez olmasının yanısıra artık güncel çalışmalar T lenfositlerin alt gruplarını genişletmiştir. Örneğin Th17 hücrelerinin IL-17 ve IL-22 üretmek suretiyle çeşitli otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol aldıkları bildirilmiştir (38, 39). Hastaların tiroid hücreleri, sitokine bağlanmada son derecede aktiftirler. İnterstisyumda infiltratif T-hücreleri IFN-g, IL-2, IL-4, IL-6, TNF gibi çok sayıda sitokin salgırlar. Uyarılmış tiroisitler ise IL-2, IL-6, HLA-2, HLA-1, ICAM-1 ve NO (nitrik oksit) gibi bir çok sitokin ve molekül salgılamaktadır. İki kaynaklı bu sitokin ve molekül topluluğu, bir yandan tiroiti uyarmakta ve bir yandan da destrüksiyonuna yol açmaktadır. Bu sitokinlerin etkileri aşağıda verilmiştir (Tablo 2) (34).

Tablo 2. Otoimmün Tiroid Hastalarında Sitokinlerin Etkileri

	Artırıcı Etkiler	Azaltıcı Etkiler
IL-1	KRP (Kompleman regülatör protein) ICAM-1 Fas NO IL-6 IL-8 Büyüme	Na/I Fonksiyonu cAMP Tg Sentezi TPO Sentezi
IL-6		cAMP TPO Sentezi
TNF	MHC I MHC II IL-6	Na/I Fonksiyonu T3 ve T4 Sentezi
IFN-g	MHC I MHCII ICAM-1 IL-1 IL-6	Na/I Fonksiyonu Büyüme T3 ve T4 Sentezi Tg Sentezi

Hashimoto Tiroiditi'nde mikroskopiye bakıldığında ise interstisyumda bol miktarda lenfositler gözlemlenebilmektedir. Bunun yanı sıra parçalanmış foliküller ve yeni rejenere olmuş kolloid içermeyen immatür foliküller görülebilir.

HT'ye özgün değişiklikler genelde tüm tiroide yayılmıştır, ancak bazen odaksal özellik gösterebilir. Bu durumda fokal tiroiditten söz edilebilir. Bununla beraber HT'ye özgün histopatolojik değişiklikler tiroidin her yerinde eşit ağırlıkta değildir yani bir heterojenite söz konusudur.

2.5.2 Klinik Bulgular

Hashimoto Tiroiditi'nde kliniğe başvuru genelde guatr nedeni ile olmaktadır ancak her HT'de guatr bulunmayabilir. Genç ve orta yaşlarda tirotoksikoza eğilim daha fazlayken, ileri yaşlarda hipotiroidiye eğilim daha fazladır. Ötiroid olgularda hastanın şikayeti, dikkati guatrı yoğunlaştırmıştır. Bazıları ise depresyona bağlı olarak başvurabilir (40). HT'de tanı bu bulgulara ikincil olarak yapılan biyokimyasal, ultrasonografik ve patolojik tetkikler sonucuna göre konmaktadır.

Hipotroidinin klinik bulgularına bakacak olursak; Yorgunluk, halsizlik, fiziksel aktiviteleri yavaşlamıştır; soğuğa intolerans görülür. Hidrofilik glikozaminoglikanların (GAG) interstisyel sahada birikmesi sonucunda cilt bulguları ortaya çıkar. Bu GAG'ların dilde birikmesi ile makroglossi; larenkste ve mukozalarda birikmesi sonucu sesin kaba çıkması görülebilmektedir. Metabolizmanın yavaşlaması nedeniyle yara iyileşmeleri gecikmiştir; tırnak ve saçlar geç uzar sert ve kırılındırlar. HT'de tiroid bezi genellikle büyüktür, üzeri pürüzlü olabilir, hatta nodül saptanabilir. Etkilenmiş sinir sisteminde dikkat kaybı, hareketlerde ve düşünmede yavaşlama, hafıza kaybı, entelektüel fonksiyonlarda yavaşlama olabilir. Hormon sekresyon hızında yavaşlamayı kompanse etmek için hormon parçalanması da yavaşlamıştır.

2.5.3 Laboratuvar Bulguları

HT'de serum TSH seviyesi artmıştır, tiroid hormon seviyeleri azalmıştır, tiroid antijenlerine karşı tiroid antikoru Anti-TPO ve Anti-TG artmıştır. Ancak negatif değerler tanıyı ret ettirmediği gibi, her yüksek pozitif titre de mutlaka HT tanısı anlamında gelmemektedir. Anti-TPO antikor, HT'de %80-99 oranında, Anti-TG antikor ise %35-60 oranında pozitif bulunmuştur (41, 42). Fizik muayene bulgularının sınırlı olması ultrasonografinin nodüller tiroid hastalıklarının tanısında kullanımını giderek artırmaktadır. Ultrasonografi tiroid nodüllerinin saptanmasının yanı sıra, nodül boyutunun takibi, İİAB yapılması ve kistik lezyonların aspirasyonunda yol gösterici olabilmektedir. HT'de sintigrafide uptake genelde düşüktür ancak uptakein normal olduğu hastalar da olabilmektedir (30, 43).

2.5.4 Tedavi

Hastaların çoğunda tedaviye ihtiyaç yoktur. Bu durum otoimmün hadiselerin yavaş ancak süregelen bir yıkım yarattığı hipotezine dayanır, keza hastaların çoğu asemptomatiktir ve guatr boyutu küçüktür. Hormon replasman tedavisinden fayda gören guatrın büyük olduğu durumlarda tedavi ile birlikte guatrın boyutları küçülür. Ortalama 2-4 hafta içinde küçülme gerçekleşir (44). Yapılan çalışmalarda 15 aylık izlemde, profilaktik verilen tiroit hormon tedavisinin bezin boyutunda bir küçülmeye neden olduğunu ve tiroit antikor düzeylerinde de bir gerileme olduğu göstermiştir (44, 45).

Hormon replasman tedavisi alan ve serbest T4 düzeyinin normal olan ancak TSH'nın normalin üstünde seyrettiği hastalarda tedavi vermenin inflamatuvar süreci durduğu ve antikor düzeylerini yıllar içinde gerilettiği gösterilmiştir (46). Yapılan bazı çalışmalar başvuru sırasında hipotiroit olan hastaların, replasman tedavisi başlanmasının ardından kesilen tedaviye karşın tiroit fonksiyonunu devam ettirdiğini göstermiştir (47). Bu durumun, tedavi ile bir nevi istirahat halinde olan tiroit bezinde, inflamasyonun gerilemesi ve tiroide karşı gelişen sitotoksik antikorların kaybolmasına veya azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

2.6 Küçük Kodlama Yapmayan Ribonükleik Asitler (Small noncoding RNA)

2003 yılında insan genom projesinin tamamlanması ile birlikte DNA'mızda ortalama 19.000-22.000 civarında kodlayan gen olduğu ve içerdiği yaklaşık 3 milyar baz çifti içerisinde biyolojik önem taşıyan protein kodlayıcı genlerin insan genomunun sadece ~%1'lik kısmını oluşturduğu belirlenmiştir (48). Günümüzde hücre bölünmesinden, hücre farklılaşmasına, apoptozdan kansere kadar birçok hastalığın biyolojik basamaklarında ve protein kodlayan genlerin anlatımının düzenlenmesinde etkili olan RNA moleküllerinin varlığı bilinmektedir. 1990'ların başlarına kadar üç çeşit RNA (mRNA, tRNA ve rRNA) molekülü varlığı ve bunların DNA'daki genetik bilginin proteine çevrilmesi (translasyon) ile ilişkili çeşitli yollarda yer aldığı bilinmekteydi. Kodlayıcı genlerin ifade düzeylerinin

düzenlenmesinde rol oynayan protein kodlamayan RNA (ncRNA: noncoding RNA) moleküllerin keşfi ve fonksiyonlarının araştırılmasıyla diğer ncRNA'ların biyolojik süreçlerdeki rolleri daha iyi aydınlatılmaya çalışılmış ve insan genomunda transkripsiyonel verimin %98'ini küçük ncRNA'ların oluşturduğu belirlenmiştir (49).

ncRNA'ların asıl önemi 2006 yılında araştırmacıları Craig C. Melo ve Andrew Z. Fire'a fizyoloji dalında Nobel Ödülü kazandıran gen anlatım düzenleme mekanizması olarak bilinen "RNA interferans (RNAi)" mekanizmasının tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır. mRNA düzeyinde gen anlatımının post translasyonel aşamada düzenlenmesi veya post translasyonel genetik bilgi akışının düzenlenmesi RNAi mekanizması olarak tanımlanabilir. Protein kodlayan genlerin intronlarında ya da protein kodlamayan DNA dizisinden RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III aracılığıyla transkribe olan ncRNA genleri, proteinleri kodlamak yerine fonksiyonel RNA moleküllerini oluştururlar (49-51). RNAi mekanizmasında baş rolde yer alan ve küçük RNA molekülü sınıfında olan mikro RNA (miRNA) ve küçük interferans RNA (siRNA: small interfering RNA), önemli roller üstlenir. Örneğin, gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesinde veya RNA modifikasyonlarında görev alırlar (52). Küçük noncoding RNA sınıfında olan miRNA ve siRNA dışında RNA'lar da bulunmaktadır (Tablo 3) .

2.6.1 MiRNA'ların Tanımı ve Tarihçesi

miRNA'lar; 18-24 nükleotid uzunluğunda kodlama yapmayan RNA molekülleridir. İlk miRNA, 1993 yılında Lee ve ark. tarafından keşfedilmiştir. 2001 yılından itibaren miRNA terimi kullanılmaya başlanmıştır (53-55). 1993 yılında, yuvarlak bir solucan türü olan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini tarayan Lee ve ark., hiçbir protein kodlamayan lin-4 olarak adlandırdıkları genin, 22 nükleotid uzunluğunda bir RNA transkribe ettiğini bildirmişlerdir. O yıllarda bir nematodun yapısal özelliği olduğu düşünülen ve yaşam döngüsünün zamanlaması ile ilerlemesini kontrol ettiği tahmin edilen lin-4, keşfedilen ilk miRNA'dır (54, 56, 57). Bugün miRBase veritabanında insanlar için 1.881 öncü ve 2.588 olgun miRNA tanımlanmıştır (<http://www.mirbase.org/> miRBase versiyon 21).

Tablo 3. Küçük RNA'ların sınıflandırılması. (49)

İsim	Uzunluk (bç)	Ana Fonksiyon
miRNA (mikroRNA)	19-23	Translasyonel baskılama
siRNA (small interfering RNA)	19-29	mRNA yıkımı
piRNA	25-31	Transposon susturulması
RasiRNA (repeat-associated RNA)	24-29	Retrotranspozonların ve tekrarlayıcı dizilerin doğrudan susturulması
rasi/piRNA	24-31	Heterokromatin oluşumu ve transkripsiyonel susturulması
lsiRNA (long siRNA)	30-40	5'-3' degradesyonu ve decapping yolu ile mRNA stabilizasyonunun bozulması
tasiRNA	20-25	Endojen mRNA yıkımı
nat-siRNA	20-25	Yapısal transkriptlerin yıkımı
Heterokromatik siRNA	24	Doğrudan DNA ve histon metilasyonu
scnRNA (small-scan RNA)	27-30	Histon metilasyonu, DNA eliminasyonu ve genom yeniden düzenlenmesi
grna (guide RNA)	35-78	Üridin kalıntılarının insersiyon veya delesyon yöntemiyle mRNA'ya yönlendirilmesi (RNA editing)
ASRNA	Bilinmiyor	Transkripsiyonel translasyonel baskılama
IRNA (long RNA)	>200	Kromatin modifikasyonu, transkripsiyonel ve post translasyonel düzenleme

2.6.2 MiRNA'ların Terminolojisi

Yeni tanımlanan miRNA'lar için özel bir terminoloji bulunmaktadır. Deneysel olarak miRNA olduğu saptanan moleküllerin başlarına “mir” takısı getirilir ve son tanımlanan miRNA sayısı dikkate alınarak onun devamı niteliğinde “mir” takısından sonra “-” işareti koyularak bu sayı eklenir. Küçük “r” harfi ile yazılmış olan “mir” premiRNA'yı temsil ederken büyük “R” harfi ile yazılmış olan “miR” ise olgun miRNA'yı temsil etmektedir. Birbiri ile sadece tek baz veya birkaç baz farklılık gösteren miRNA'lar benzerlikleri vurgulanması adına isimlerinin sonlarına harf eklenerek isimlendirilir. Örneğin miR-156a ve miR-156b gibi. Genomda ayrıca aynı miRNA'yı kodlayan DNA dizileri bulunmaktadır. Bunların adlandırılmasında ise adlarının ardına eklenen ek sayılar kullanılmaktadır; örneğin miR-22-1 ve miR-22-2 gibi. miRNA'yı oluşturan premiRNA'nın 5' veya 3' kolundan meydana geldiğini belirtmek için miRNA'ların başlarına -3p ve -5p gibi ekler getirilmektedir. Sonuna yıldız (*) eklenen miRNA'lar ise hücrede daha düşük oranda eksprese edilirler. miRNA'ların hangi türe ait olduğunu belirtmek için isim başına türe ait isim kısaltması eklenmektedir. Örneğin insana ait bir miRNA tanımlamak için “*Homo sapiens*”in bir kısaltması olan “hsa” ismin başına eklenmektedir (örn: hsa-miR-123) (58).

2.6.3 MiRNA Biyogenezi

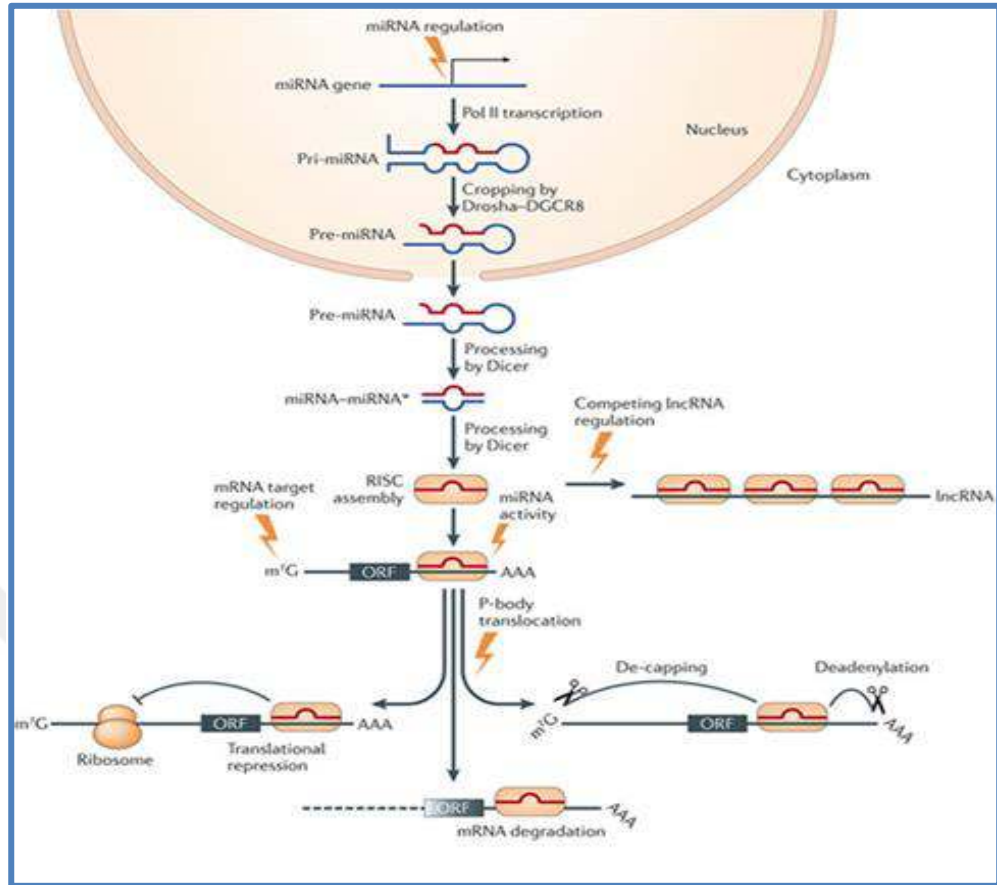
Olgun miRNA'lar miRNA genlerinden primer miRNA'ların (pri-miRNA) transkripsiyonu, pri-miRNA'lar hücre çekirdeği içinde prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) dönüşmesi ve son olarak da sitoplazma içinde olgun miRNA'ların oluşumu şeklinde kabaca üç aşamalı bir süreç sonucunda oluşur (59).

İlk aşamada miRNA genlerinden, RNA polimeraz II vasıtasıyla pri-miRNA adı verilen 1.000 nükleotid uzunluğunda öncül çift iplikli transkriptler oluşturulur. Pri-miRNA saç tokası (firkete, hairpin) yapısında olup olgun miRNA dizisini bünyesinde içerir. Çekirdekdeki pri-miRNA'ların yaklaşık 70-100 bp uzunluğundaki pre-miRNA'ya dönüştürülmesi RNAz-III enzim ailesinin bir endonükleazı olan DROSHA ve kofaktörü Di George Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) tarafından

gerçekleştirilir (60). Oluşan Pre-miRNA'lar nükleer transport reseptör 5 (Exportin-5) aracılığı ile çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada Dicer enzimi, pre-miRNA'nın 3'-yapışkan ucuna bağlanarak saç tokası yapısını keser. Kesim sonrası ~22 baz çiftlik (bç) miRNA/miRNA* dupleksi oluşur. İki iplikten birisi klavuz zincir olarak seçilir ve diğer iplik yapısı bozularak kaybolur. Klavuz zincir, multiprotein yapıdaki RNA ile uyarılmış susturucu kompleks (RNA-induced silencing complex, RISC) ile hedef mRNA susturulması için etkileşime girer. RISC, mRNA'nın komplementer dizisini saptamak için miRNA'yı kullanır. Komplementer diziyi bulduğunda ise bünyesindeki "argonaute (Ago)" isimli proteini aktive ederek çift zincirli RNA'nın zincirlerini ayırır (61). Hedef mRNA'nın hedef dizisinin 3' UTR bölgesine miRNA'nın 5' UTR bölgesindeki 6-8 nükleotidin bağlanmasıyla oluşan bu miRNA-mRNA birimi ya yazılımı baskılayıp protein ekspresyonunu azaltarak ya da mRNA'nın yapısını bozarak gen ekspresyonunu susturur (62). Ago proteinleri ise miRISC (miRNA Induced Silencing Complex) oluşumu ve işlevinde önemli olan faktörlerdir. miRNA'lar aracılığıyla translasyonel olarak baskılanan mRNA'lar sitoplazmada P-gövdeleri (processing bodies, P-bodies) ya da glisin-triptofan gövdeleri (GW-bodies) gibi farklı bölgelerde birikirler. P-gövdeleri, baskılanan mRNA'ların hem depolanmaları hem de yıkımlarından sorumludur. Yani P-gövdeleri translasyonel baskılama ile mRNA deadenilasyonu, 5'-ucu şapka bölgesinin uzaklaştırılması ve yıkımında görevli proteinlerden zengin bölgelerdir (Şekil 8) (63-65).

Bazı miRNA'ların ise belirli koşullar altında hedef mRNA translasyonunu ve hatta transkripsiyonunu aktive ettiklerine dair kanıtlar da mevcuttur. Bunu yapan miRNA'lar ise, hedef mRNA'ya daha çok kodlama sekansı veya açık okuma çerçevesi (ORF: Open Reading Frame)'deki bölgelerden bağlanırlar (66-68).

miRNA yapısı kompleks olduğundan, bir miRNA birçok farklı mRNA'yı hedef alabilir. Aynı şekilde, bir mRNA da birçok farklı miRNA tarafından etkilenebilmektedir. miRNA'ların bu kompleks yapı ve etkileşimleri kendisini farklı dokularda da ortaya koyabilir ve bu dokularda hedeflerini farklı şekillerde etkileyebilir (69).



Şekil 8. miRNA Biyogenezi.

2.6.4 Çalıştığımız miRNA'lar

2.6.4.1 miR-22

miR-22, matür hali 22 nükleotid içeren bir miRNA'dır. 17p13.3 bölgesinde lokalize edilmiştir ki bu bölge kanserde sıklıkla hipermetile olan, silinen ve heterozigosite kaybına uğrayan bir bölgedir (70-72). Yapılan Northern Blot analizlerinde farklı omurgalılarda da miR-22'nin nispeten güçlü sinyaller verdiği gösterilmiştir (73). 2006 yılında yapılan bir çalışmada, içinde karaciğer, lenf nodu, dalak, pankreas, böbrek, mide, timüs ve kalbin de bulunduğu 16 dokuda miR-22 ekspresyonunun evrensel olduğu rapor edilmiştir (74). Yapılan karşılaştırmalı genomik araştırmalarda miR-22'nin metazoalarda hayli korunmuş olduğunun

gösterilmesi ve in silico çalışmalarda geniş hedef genlerinin tanımlanması mir-22'nin korunmuş ve geniş düzenleyici bir fonksiyonu olduğunu düşündürmüştür (75). İlk olarak servikal kanser hücrelerinden derive HeLa hücrelerinde bulunmuştur. 2012 yılında Xiong'un yaptığı çalışmada, miR-22'nin tümöröenez, epigenetik modifikasyonlar, embriyonik gelişim, iskelet metabolizması, panik bozukluk, kardiyak hipertrofi ve immünolojik yollarda görev aldığı rapor edilmiştir (76). miR-22'nin otoimmün bir hastalık olan MS'de plazmada ve düzenleyici T hücrelerinde artmış olması otoimmünite patogeneğinde de rolü olabileceğini düşündürmüştür (77). miR-22'nin amfizemli hastalarda ekspresyonunun arttığının ve buna ikincil hedeflerinden biri olan HDAC4 (Histon deasetilaz) geninin ifadesinin azaldığının gösterilmesi ve böylece IL-6 ve IL-1 β sitokinlerinin artmasıyla T hücrelerinin Th17'lere dönüşmesinin gösterilmesi immünite ile olan ilişkisini kuvvetlendiren mekanizmalardan sadece biridir. Th17'lerin, IL17A'nın sentezlenmesinden sorumlu olması ve bu sitokinin de nötrofilik inflamasyona neden olması patolojik mekanizmalardan biridir. Aynı çalışmada miR-22 defisitli farelerin daha az Th17 içerdikleri de tespit edilmiştir (78).

2.6.4.2 miR-375

miR-375 iki nolu kromozomda CRYBA2 ve CCDC108 genleri arasından kodlanan 22 nükleotidlik bir miRNA'dır. Özellikle pankreatik dokuda ve beyinde sentezlendiği gösterilmiştir (79). Son yapılan fare çalışmalarında miR-375'in hipofiz bezinde yoğun bir şekilde eksprese edildiğini ve ileri çalışmalarla proopiomelanokortin ekspresyonunu ve transkripsiyonunu baskılamak için kortikotropin salgılatıcı hormon (CRF: Corticotropin releasing factor) sinyal yolağında görev aldığı gösterilmiştir (80). Ayrıca miR-375'in doğal ve Th2 uyarımlı kazanılmış bağışıklığın fonksiyonunu bağlayan önemli bir sitokin olan timik stromal lenfopoietini regüle ettiği bulunmuştur (81). Th2 aracılı hastalıklarda miR-375'in azalmış ekspresyonunun gösterilmesi ayrıca IL-5, IL-13 gibi stokinler ile mast hücre enzim düzeyleri miktarı ile ters orantılı olacak şekilde ifadesinin azalmış olması immünite ile olabilecek bağlantısını kuvvetlendirmektedir (82). Çoğunlukla pankreas beta hücrelerinde çalışılmış bir miRNA olmasına rağmen, son zamanlarda kanser patogenezi başta olmak üzere immünite ile olan bağlantısı nedeniyle üzerinde

çalışmaların yoğunlaştığı bir miRNA'dır. Ayrıca son yapılan çalışmalarda miR-375 ekspresyonunun beyinde hipotalamik hücrelerde ve hipofizde olduğunu göstermektedir (83). miR-375 ekspresyonunun hedef genleri ile hücre yolaklarındaki fosforilasyondan ekzositoza kadar görev aldığı da çalışmalarla gösterilmiştir (84).

2.6.4.3 miR-155

miR-155, 21 nolu kromozom üzerinde lokalize 22 nükleotidlik bir miRNA'dır. Şimdiye kadar en çok çalışılmış miRNA'lardan biridir. İlk kez B hücreli lenfoma genlerinin B-cell integration Cluster bölgesinde promotera eklenmiş gen olarak tespit edilmiştir. Bu bölgenin insanda, tavukta ve farede homoloji göstermesi yani korunmuş olması fonksiyon açısından önemli olduğunu göstermektedir. Şimdiye kadar inflamasyon, hematopoezis ve immünite dahil bir çok yolda görevli olduğu gösterilmiştir (85). miR-155'in timüs, dalak gibi organlarda yoğun bir şekilde eksprese edilmesi immünite ile ilişkili olduğunu kuvvetle düşündürmektedir (86). Otoimmün hastalıkların patogenezi olan sitokin sinyal yollarından olan TNF α , IL6, IL12, GM-CSF gibi sitokinlerin miR-155 hedefleri arasında olduğu gösterilmiştir (87). T hücre aktivasyonu sırasında, miR-155 eksikliği CD4 + T hücreleri IL-4'e yanıt olarak artmış Th2 alt gruplarını gösterirken, miR-155 aşırı ekspresyonu IFN- γ uyarımı üzerine Th1 yanıtlarını teşvik eder (88). Th1 yanıtının, organa özgü otoimmün hastalıklarda hücre aracılı immün yanıtta sıklıkla önemli bir rol oynadığı yaygın olarak bilinir. Bununla birlikte Th2 yolu, hormon aracılı bağışıklık ve allerjiyle ilişkili bulunmuştur (89).

2.6.4.4 miR-451

miR-451, 17 nolu kromozom üzerinde lokalize, 21 nükleotid içeren ve vertebralılar arasında mükemmel bir biçimde korunmuş miRNA'lardan biridir. Plazmada da bol miktarda eksprese edilir (90, 91). Dentritik hücreler vasıtası ile sitokin üretimini regüle ettiği gösterilmiştir (92). Yine yapılan bir fare çalışmasında miR-451'in artışı p38 MAPK fosforilasyonunu down regüle ederek nötrofil kemotaksisini baskıladığı bilinmektedir (93). Yapılan çalışmalarda SLE, RA gibi otoimmün hastalıklarda miR-451 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (94). miR-451'in hedef genlerinden olan COX-2 vasıtasıyla eritroid seri

diferensiasyonuna da katkı sağladığı gösterilmiştir. Farklı hedef genleri ile T hücreli akut lenfositik lösemi patogeneğinde de görevleri olduğu bildirilmiştir (95).

2.6.4.5 miR-141

miR-141, 12 nolu kromozom üzerinde lokalize 21 nükleotidlik bir miRNA'dır. mir-200 ailesine mensup bu mirna mir-200c ile aynı diziye sahiptir (96). Son zamanlarda artan sayıda çalışmada Th17'nin MS, RA, Psöriazis, SLE gibi birçok otoimmün hastalık patogeneğinde etkisi gösterilmeye başlanmıştır. Th17 iyi bilinen ve IL-17A, IL-17F, IL-22 ve IL-21 gibi enflamasyonlu sitokinlerin salgılayan ve ayrıca soy-spesifik transkripsiyon faktörünün eksprese edilmesini sağlayan bir CD4+ T hücre soyudur. Öte yandan, uyarılmış düzenleyici T (iTreg) soyları, aynı CD4 + T hücrelerinden farklılaşan bir anti-inflamatuar CD4 + T hücre dizisidir. Bu soy, Th17 hücreleri gibi diğer efektör CD4 + T hücrelerinin farklılaşmasını, IL-10 ve TGF- β da dahil olmak üzere anti-inflamatuar sitokinlerin salgılanması yolu ile yapıp bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesine katılır (97-100). miR-141'in hedef genlerinden bazıları ile (Stat4, RARB, Stat5a-5b, GATA3 vb.) Th17 dönüşümünü indüklemektedir (101). Ayrıca psöriasis ve diğer immünite bağlantılı hastalıklarda miR-141'in Th17 üzerinden immün sistemde etkili olduğunun gösterilmesi bu yolakta da etkin rol aldığını düşündürmüştür (102-104). Braun ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada miR-141'in transforming growth factor beta reseptör 1 (TGF β R1)'i hedef aldığının gösterilmesi (105) ve bu yolakta HT ile ilişkisi daha önceden iyi bir şekilde belirlenmiş olan IL-2'nin görev aldığının bilinmesi (106) miR-141'in çalışmamızda hedef olarak seçilmesinde yol gösterici olmuştur.

2.6.5 miRNA'ların İmmünolojik Etkileri ve Hashimoto Tiroiditi ile İlişkisi

İmmün sistemin düzenlenmesi otoimmün hastalıklar, kanser gibi bir çok hastalığın önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Günümüzde miRNA'ların immün yanıtın düzenlenmesinde ve immün hücrelerin gelişmesinde önemli rol aldıkları ortaya konmaktadır. Bugüne kadar az miktarda spesifik miRNA, immün sistemin önemli regülatörleri olarak açıklanmıştır (107). Nisan 2016 itibari ile 47.000

miRNA araştırma makalesi yayınlanmış olup bunlardan 7.666 tanesi miRNA'ların nasıl belirleneceği ve gelişim mekanizmaları hakkındadır. 47.000 makalenin %3'ünden daha azı immunité ile ilgili ve %1 kadarı ise doğuştan gelen bağışıklık mekanizması ile ilgilidir (108).

Yapılan çalışmalar miRNA'ların, B hücrelerinin erken ve efektör farklılaşmasında anahtar rol oynadıklarını ortaya koymuştur. T hücrelerinde ise proliferasyon ilişkili yollarda anahtar düzenleyiciler oldukları, Treg hücre dizilerinin indüksiyonu, fonksiyonu ve sürdürülmesinde önemli bir role sahip olduklarını göstermiştir. miRNA'lar dendritik hücrelerin ve makrofajların Toll-like reseptörler aracılığıyla farklılaşmalarının düzenlenmesinde de görev almaktadırlar. miRNA'lar ayrıca hücre içi immün mediyatörler olarak görev yapma kabiliyetine de sahiptirler (109).

Vücudun kendi antijenlerine karşı gelişen toleransı da dahil olmak üzere tanımlanmış birçok otoimmünite yolağı olmasına rağmen bu immünolojik sessizliği sürdürmede birçok çözüme kavuşmamış moleküler mekanizma bulunmaktadır. miRNA inflamasyon ilişkisi de bunlardan biridir.

Birçok inflamatuvar faktörün salınımı mRNA moleküllerinin yarı ömrünü belirleyen iyi koordine transkripsiyon sonrası düzenlemeye bağlıdır. RNA işleyicileri ve RNA kaynaklı susturucu kompleks içeren hücre içi yapılar immün hücrelerde RNA yapım ve yıkımında yapısal bir platform sağlarlar (110). Bu da bize daha önce fark edilmemiş olan miRNA katmanlarının varlığını göstermektedir (111).

miRNA'ların bağışıklık sisteminde rol oynadığı ilk kez hematopoetik stem cell (HSC) transplantasyonu sırasında B lenfositleri etkileyen HSC'lerde miRNA aşırı çoğalmasının gösterilmesi sonucu ortaya konmuştur (112, 113). Daha sonraları ise miRNA biyosentezinde anahtar rolü olan DICER enziminde T ve B lenfositlerinde yapılan koşullu inaktivasyon deneyleri lenfosit gelişimi ve farklılaşmasında miRNA'ların kritik önemini göstermiştir (110, 114, 115).

miRNA'ların bağışıklık sistemi ve otoimmünitedeki rolleri kısmen aydınlatılmış olsa da birkaç tür miRNA'nın B lenfositlerin ilk olgunlaşma aşamasında etkili oldukları tesbit edilmiştir. Bu miRNA'ların birbiri ile ilişkili üç

bölgede kümelendikleri gösterilmiştir. Bunlardan biri olan miR-17~92 grubunun hücrel düzenlemede kritik rolü olduğu ortaya çıkmıştır (116).

Örneğin 2007'den beri yapılan miRNA inaktivasyonu ve fenotip ilişkilendirme çalışmaları (117-120) sonucu adreslemesi yapılabilen miRNA'lardan biri olan miR-155'in sitokin üretiminden antijen sunumuna kadar geniş bir aralıkta etkili olduğu gösterilmiştir (117, 118).

Yine son çalışmalar miRNA'ların doza bağımlı bir şekilde dar bir aralık içinde önemli hedef proteinlerin konsantrasyonunu modüle ettiğini ortaya koymaktadır (121, 122). miRNA'ların gen ekspresyonu ve post transkripsiyonel düzenlemedeki görevlerinin tanımlanması ile mRNA'ların yaklaşık %30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (123). Yapılan çalışmalar miRNA'ların ve hedef genlerinin arasındaki ilişkiyi bir kaç temel ilkeye dayandırmaktadır. İlk olarak, bir miRNA'nın hücre konsantrasyonu, hedef genlerin protein üretimini belirler ve bu miRNA aracılı kontrol kilit öneme sahiptir. İkinci olarak, miRNA tarafından konsantrasyonu kontrol edilen proteinlerin konsantrasyonlarındaki küçük değişiklikler önemli biyolojik sonuçlara yol açabilir (124-126) .

miRNA'ların hücrel gelişim, homeostazis, immunitede spesifik yollardan düzenleyici olduğunun gösterilmesinden sonra bu yeni düzenleyici yolların ve miRNA-target gen-hastalık ilişkilerinin açıklanmasına olan ilgi her geçen gün artmıştır. Hashimoto tiroiditi gibi patogenezi tam açıklanamamış ve otoimmünite reaksiyonu ile ortaya çıktığı düşünülen hastalıkların aydınlatılmasında miRNA'ların yeni ve büyük bir adım olarak adlandırılması kaçınılmazdır.

2.6.6 miRNA Profillendirme

Spesifik dokularda tespit edilebilen miRNA'ların son yapılan yayınlarda serum dahil çeşitli vücut sıvılarında da var olabileceği gösterilmiştir (127). Serum ve plazmadaki sirkülatuvar miRNA'lar iki alt başlık altında toplayacak olursak; ilki eksozom veya mikroveziküller içindeki yıkımdan korunmuş miRNA'lar, diğeri ise

dolaşımdaki miRNA'ların %90'ını oluşturan HDL veya Ago proteini ile kompleks yapmış nonveziküler miRNA'lardır.

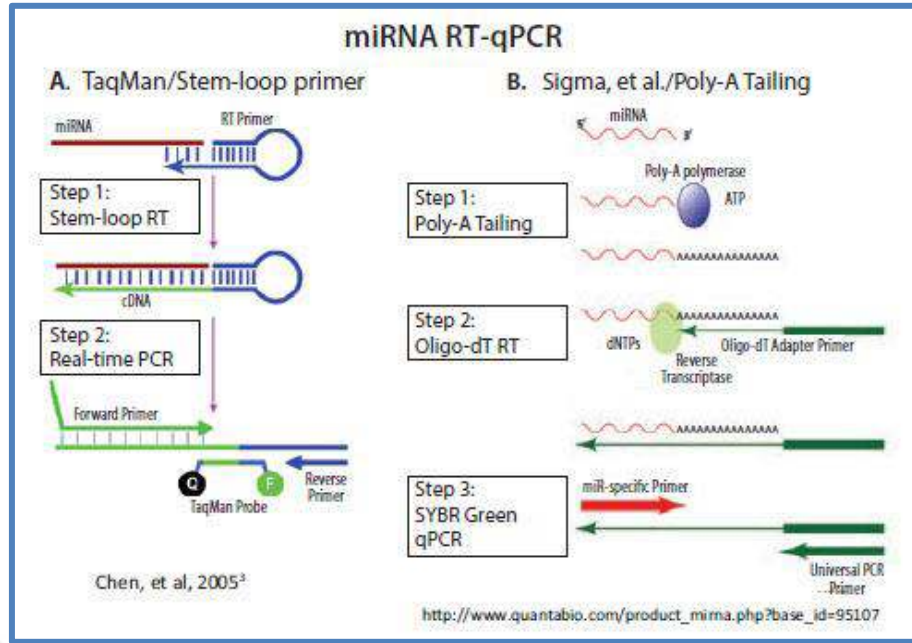
Olgun miRNA'lar kısa zincirli olmaları ve kimi zaman düşük konsantrasyonda bulunmaları nedeniyle özelleştirilmiş maddeler ve protokoller ile çalışmayı gerektirmektedir. Yarı ömürleri ise hücre kültürü ortamında 28 ila 220 saat arasında değişmektedir. Yıkım mekanizmaları ise kapsamlı çalışmalara rağmen henüz net değildir. miRNA'ların hastalık koşulları ile bağlantılı olarak ekspresyon düzeyleri arasında değişiklikler sergilediği kantitatif yöntemler ile yakın zamanda gösterilmiştir (108).

miRNA'ların yapıları gereği kısa zincirli olmaları ve mRNA'lar gibi revers transkriptazların bağlanabileceği bir poliA bölgesi içermemeleri ekspresyonlarını ortaya koymayı zorlaştırmaktadır. Buna ilaveten aynı miRNA ailesinde tek nükleotid farkı ile birbirinden ayrılan miRNA'lar bulunabildikleri gibi, biyolojik örnekler arasında tek bir miRNA için dahi dizi uzunluğu farklılıkları olabilmektedir. Bir çok olguda, bu durum "isomiR" olarak adlandırılan varyantlara bağlıdır. isomiR'ler, olgun miRNA'ların 3' ucuna post-transkripsiyonel nükleotid eklenmesi sonucu oluşurlar. 3' ucunda ekzonükleatik ayrılma gerçekleşerek standart miRNA'dan daha kısa diziler oluştuğu da varsayılır (128).

Yukarıda bahsedilen zorluklara karşın üç temel miRNA profilendirme yöntemi tanımlanmıştır (128).

- Kantitatif revers transkripsiyon PCR
- Hibridizasyon temelli metodlar (örn: DNA mikroarrayler)
- Yüksek çıktılı dizilemedir (transkriptom dizileme)

Kantitatif revers transkriptaz PCR temelli yöntemler, miRNA'nın cDNA'ya selektif revers transkripsiyonunu takiben, kantitatif PCR ile oluşan reaksiyon ürününün eş zamanlı gözlenmesi işlemine dayanmaktadır (miRNA RT-qPCR) (128) (Şekil 9).



Şekil 9. miRNA RT-qPCR yöntemleri için iki çeşit ticari kit bulunmaktadır. **A)** İlmecek primeri miRNA'nın 3' ucuna hibritleşmesinin ardından RT-qPCR başlar. **B)** miRNA'ya poliA kuyruğu eklenmesi ile oligo-dT ile birleşmiş üniversal primer zincirine başlangıç kısmı sağlar (129, 130).

2.7 Gerçek zamanlı Kantitatif Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

RT-qPCR güncel bir nükleik asit miktarı belirleme metodudur. Oluşan ürün miktarı, reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probaların verdiği sinyalin izlenmesiyle saptanır (131). Ancak belli miktarda DNA molekülünün elde etmek istiyorsak devir sayısının ayarlanması gerekmektedir. Oluşan ürün miktarının saptanması için iki tespit yöntemi kullanılmaktadır (132).

Bunlardan biri özgül olmayan DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan "SYBR Green I" yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan floresan boya çift zincirli DNA'ya nonspesifik olarak bağlanır ve eş zamanlı olarak DNA miktarı çoğaldıkça floresan ışımaya miktarı da orantılı olarak artar (132).

Bir diğer yöntem ise DNA'da spesifik bir bölgeyi çoğaltmak için kullanılan floresan işaretli primerlerdir. Bunlar ise TaqMan prob, Molecular beacon, "Light-

up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problardır (132).

Son zamanlarda geliştirilmiş bir prob çeşidi olan hidroliz probunda problemlerin 5' ucunda rapörtör boya (6-karboksifloresin, 6-FAM) ve 3' ucunda baskılayıcı boya (6-karboksitetrametil-rodamin, TAMRA) bulunmaktadır. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası, 5' uçtaki rapörtör boyanın sinyal oluşturmalarını engeller. Bu sebeple UPL (Universal Probe Library) prob hedef DNA'ya bağlı iken düşük floresan sinyal ölçümü alınır. Çoğaltılma sürecinde yeni zincir oluşmaya başlar, probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM floresan sinyal oluşturur. Her çoğaltma evresinde ürün miktarı arttıkça eş zamanlı olarak floresan sinyal düzeyi de artar. Sonuçta bu yöntem kullanılarak miRNA profillemesi yapılabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın protokolü KTÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2015/46). Çalışmaya alınan bütün hastalar ve sağlıklı gönüllü bireyler araştırma öncesinde ayrıntılı olarak bilgilendirilip yazılı olarak onamları alınmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Grubu

Endokrinoloji polikliniğine gelen, serumda otoantikör pozitifliği varlığı doğrulanıp Hashimoto Tiroiditi teşhisi alan (133) ve yüksek TSH düzeyleri olan 34 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan tanı anında ve 3 ay sonra ötroid oldukları dönemde kan örnekleri alınmıştır.

3.1.2. Kontrol Grubu

Endokrinoloji polikliniğinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu herhangi bir sağlık problemi tespit edilmeyen cinsiyet ve yaşı hasta grubu ile uyumlu 33 gönüllü birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.3. Örneklerin Toplanması

Hashimoto Tiroiditi tanısı konulan hastalardan ve kontrol grubu bireylerden EDTA'lı tüpe 3 ml kan örneği alındı.

3.1.4. Kullanılan Aletler

- Rotor-Gene Q Real time PCR
- Spektrofotometre (NanoDrop 2000 UV-Vis Thermo Scientific)
- PZR Cihazı (Applied Biosystems Veriti)
- 4 °C'lik buzdolabı (Vestel)
- -20 °C'lik derin dondurucu (Vestel)
- -80°C'lik derin dondurucu (Thermo Scientific)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5810 R)
- Mikrosantrifüj (Hettich Mikro 200)
- Flash spindown (My Fuge by Benchmark)
- Vorteks (Boeco)
- Soğuk blok (Corbett Research)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf)

3.1.5. Kimyasal Malzemeler

- miRNA izolasyon kiti (Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit)
- QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen)
- Ethanol (EMSURE®)
- Kloroform (MERCK)
- cDNA sentez kiti (miScript II RT Kit 50)
- miScript® SYBR® Green PCR Kit
- MiR-22 Primer (Qiagen miScript Primer Assays)
- MiR-141 Primer (Qiagen miScript Primer Assays)
- MiR-155 Primer (Qiagen miScript Primer Assays)
- MiR-375 Primer (Qiagen miScript Primer Assays)
- MiR-451 Primer (Qiagen miScript Primer Assays)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

EDTA'lı tüplere 3 ml periferik kan örnekleri alındığı gün miRNA izolasyonu yapılarak -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2. miRNA İzolasyonu

miRNA izolasyonu için Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanıldı. Başlamadan önce;

- 50 ml'lik 3 adet falkon tüpe kullanacağımız kadar %100'lük, %80'lik etanol ve kloroform porsiyonlanır.
- Kitten çıkan konsantre haldeki Buffer RPE içerisine 44 ml; Buffer RWT içerisine 30 ml etanol eklenerek sulandırılır.

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kanlar;

- EDTA'lı tüpe alınmış hasta veya sağlıklı gönüllü kanları 1.900 Rcf'de +4°C'de 10 dk santifüj edilir.
- Santifüj sonrası süpernatant kısmı olan plazma dikkatlice 2 ml'lik ependorf tüplere porsiyonlanır ve bu kez ccc 16.000 Rcf'de 10 dk santifüjlenir. Süpernatant kısmından 200 µl alınır ve farklı bir ependorf tüpe alınır ve 5 katı kadar QIAzol eklenir, pipetaj yapılır ve vortekslenir sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.
- Daha sonra üzerine 200 µl kloroform eklenir, altüst edip vortekslenir, 2-3 dk oda ısısında bekletilir, sonra 13000 Rcf'de 20 dk. +4°C'de santifüj edilir.
- Santifüj sonrası 3 faz görülür, üstte kalan berrak faz yeni bir 2 ml'lik bir ependorf tüpe alınır, üzerine 900 µl %100 etanol eklenir ve pipetaj yapılır. (Bu sırada kitten çıkan ve +4°C'de bekletilen kolonlar çıkarılır ve hazırlanır.)

- Örnekten 700 µl alınır ve kolonun ortasına damla damla eklenir. Kolon 8.000 Rcf’de oda sıcaklığında 30 sn. santifüj edilir, santifüj sonrasında kolonun altındaki tüpe akan sıvı atılır. (bu işlem iki kez tekrarlanır)
- İkinci kez sıvı atıldıktan sonra kolona 700 µl buffer RWT eklenir, oda sıcaklığında 8.000 Rcf’de 30 sn santifüj edilir, kolonun altındaki tüpe akan sıvı uzaklaştırılır.
- Bu kez 500 µl buffer RPE eklenir kolona ve oda sıcaklığında 8.000 Rcf’de 30 sn santifüj edilir, kolonun altındaki tüpe akan sıvı uzaklaştırılır.
- 500 µl %80’lik etanol kolona yüklenir ve oda sıcaklığında 8.000 Rcf’de 2 dk. santifüj edilir, kolonun altındaki tüpe akan sıvı bu kez tüp ile birlikte uzaklaştırılır.
- Kitten çıkan 2 ml’lik “collection tube” kolonun altına yerleştirilir. Kolon ve tüp birleşik şekilde kapakları açık olarak oda sıcaklığındaki santifüje konur ve en yüksek devirde santifüj edilir. Santifüj sonunda altta kalan tüp ve sıvı atılır. Bu kez 1,5 ml’lik “collection tube”lardan alınır ve kolon bunun üzerine yerleştirilir.
- Bu kez kolona 14 µl RNase-free water eklenir ve 2 dk oda sıcaklığında bekletilir sonra oda sıcaklığında tam hızda 2 dk. Santifüj edilir. (Bu işlem iki kez tekrarlanır.)
- Sonuç olarak 12-14 µl elüsyon elde edilir ve -80°C’de saklanır.

3.2.3. cDNA Sentezi

Elde ettiğimiz miRNA’dan cDNA elde etmek için miScript II RT Kit 50 kullanıldı. İlk aşamada 12 µl miRNA, kitten çıkan 2 µl miScript reverse transcriptase 2 µl 10x miScript nucleics, 4 µl Hispec buffer toplam 20 µl ürün pcr tüplerine konur. Her hasta için bir tüp hazırlanır. RNA konsantrasyonuna göre RNA miktarı azaltılıp yerine su konabilir.

- Hazırlanan pcr tüpleri Applied Biosystems Veriti cihazında aşağıdaki pcr programına koyulur;
 - 37°C'de 60 dk 1 döngü
 - 95°C'de 5 dk 1 döngü
 - 4°C'de ∞ dk 1 döngü
- PCR programı bittiğinde elimizde 20 µl cDNA ürünü olur, her bir hasta için oluşan ürüne 35 µl RNase free su eklenir ve böylece elimizde 55 µl ürün olmuş olur.
- Elde edilen cDNA'lar Qiagene miScript® PreAMP PCR Kit ile kitten çıkan prosedüre uygun şekilde zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.4. Ekspresyon Analizi

Mir-22, mir-141, mir-155, mir-375, mir-451 genleri için ekspresyon ilgili primerler kullanılarak cDNA'dan çoğaltılarak yapıldı. Kantitatif Real time PZR (Rotor-Gene Q Real time PCR) ile gen ekspresyonu tayinleri yapıldı. Mir-22, mir-141, mir-155, mir-375, mir-451 primerleri için Qiagen miScript Primer Assays, real time PZR master miksi için miScript® SYBR® Green PCR Kit kullanıldı.

- miScript® SYBR® Green PCR Kit içindeki; 2x Quantitec SYBR Green PCR mastermix'den 10 µl, RNase free sudan 1 µl, 10x miScript primer universal'den 2 µl konularak örnek+No Template Control (NTC) sayısı kadar miks hazırlanır.
- Qiagen miScript Primer Assays kitindeki çalışmamıza ait primerlerden de her örnek başına 2 µl konulur.
- Hazırlanan miks 0,1 ml'lik strip tüplere çalıştığımız sayı kadar dağıtılır.
- Dağıtılan kuyucukların üzerine önceki aşamada elde ettiğimiz cDNA'dan 5 µl konulur.

- Tüplerin kapakları kapatılarak aşağıdaki pcr programı hazırlanıp Rotor-Gene Q Real time PCR'a koyulur:
 - 95°C'de 15 dk (Başlangıç Taq polimeraz aktivasyon adımı)
 - 94°C'de 15 sn (Denatürasyon)
 - 55°C'de 30 sn (Annealing)
 - 70 °C'de 30 sn (Extension)
 - 40 cycles (Melting)

3.3. İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol grupları arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla RT-PCR verileri Qiagen Gene Globe Veri Analizi Merkezi portalı $\Delta\Delta C_t$ modülü kullanılarak analiz edilmiştir (<http://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). Veri normalleştirmek için yine aynı analiz merkezinde bulunan “Global CT Mean Of expressed miRNAs” kullanıldı. Gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri ilişkisi yine sistem tarafından Student T testi ile belirlendi ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Niteliksel veriler sayı ve yüzde; ölçümsel veriler ortalama standart sapma ve minimum maksimum değerleriyle sunulmuştur. Hasta grubun ilk tanı anı ve üç ay sonraki kontrol dönemi arasındaki TSH ve miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile hesaplanmıştır. Veriler IBM SPSS Statistics for Windows 23.0 istatistik paket programında analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Elimizde bulunan 3 gruptan sağlıklı olanlar S (Sağlıklı) grubu, ilk tanı anındaki TSH seviyesi yüksek olan hastalar H (High: Yüksek) grubu ve aynı hastaların 3 ay sonra ötroid oldukları dönem ise N (Normal) grubu olarak adlandırıldı.

Yaş ortalaması 35,79 ($\pm 12,93$) olan 4 erkek ve 30 kadın toplamda 34 hasta ve yaş ortalaması 35,88 ($\pm 14,17$) olan 4 erkek ve 29 kadın toplamda 33 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edildi (Tablo 4).

S Grubu: Sağlıklı gönüllüler, Kontrol Grubu.

H Grubu: İlk tanı anındaki hastalar.

N Grubu: H grubundaki hastaların 3 ay sonra ötroid oldukları dönemdeki örnekleri.

Tablo 4. Gruplardaki Cinsiyet, Yaş Dağılımı.

	<u>Cinsiyet</u>		Yaş ($\pm$ SD)	Min.-Max.
	Kadın (n)	Erkek (n)		
S Grubu	29	4	35,88 ($\pm 14,17$)	19-70
H Grubu	30	4	35,79 ($\pm 12,93$)	19-68
N Grubu	30	4	35,79 ($\pm 12,93$)	19-68

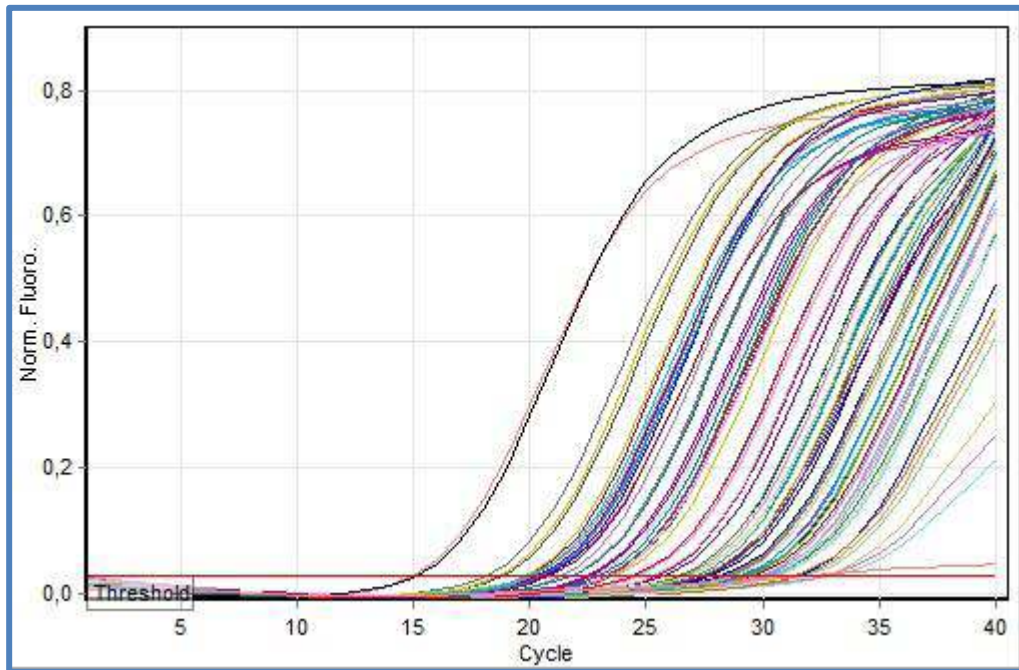
34 hastanın tanı anındaki TSH değerleri ortalaması 18,52 ($\pm 22,99$), Anti-TPO değerleri ortalaması 399,80 ($\pm 356,1$) ve Anti-TG değerleri ortalaması ise 131,17 ($\pm 429,1$) olarak hesaplandı. Üç ay sonraki kontrol döneminde bakılan TSH değerleri ortalaması ise 3,15 ($\pm 1,61$) olarak hesaplandı. Kontrol grubunun TSH değeri ortalaması ise 2,69 ($\pm 0,71$) olarak hesaplandı (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta grubu TSH, Anti-TPO, Anti-TG değerleri ile sağlıklı grup TSH Dağılımı.

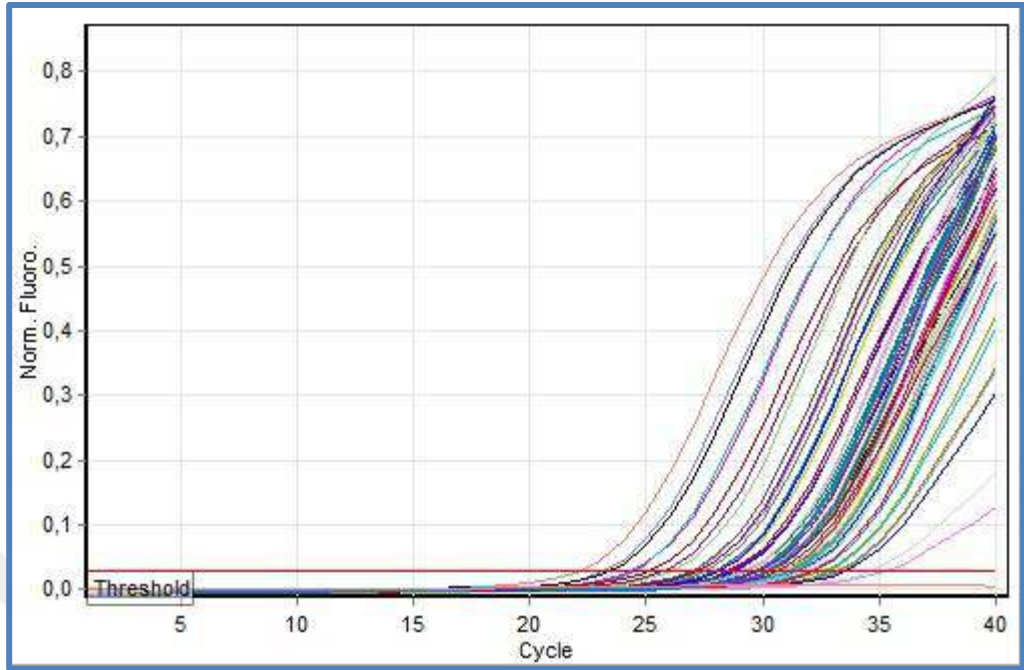
	TSH			ANTI-TPO	ANTI-TG
	S Grubu	H Grubu	N Grubu	H Grubu	H Grubu
Ortalama	2,69	18,52	3,15	399,80	131,17
($\pm$SD)	($\pm$ 0,71)	($\pm$ 22,99)	($\pm$ 1,61)	($\pm$ 356,1)	($\pm$ 429,1)
Min.-Max.	1,45-4,1	5,60-100,0	0,41-5,41	1,3-1025,0	0,89-2381,0

Hedef gen bölgesi olarak seçtiğimiz miR-22, miR-141, miR-155, miR-375, miR-451 için Rotor-Gene Q Real time PCR ile elde ettiğimiz amplifikasyon eğrileri sırası ile Şekil 10,11,12,13,14’de gösterilmiştir.

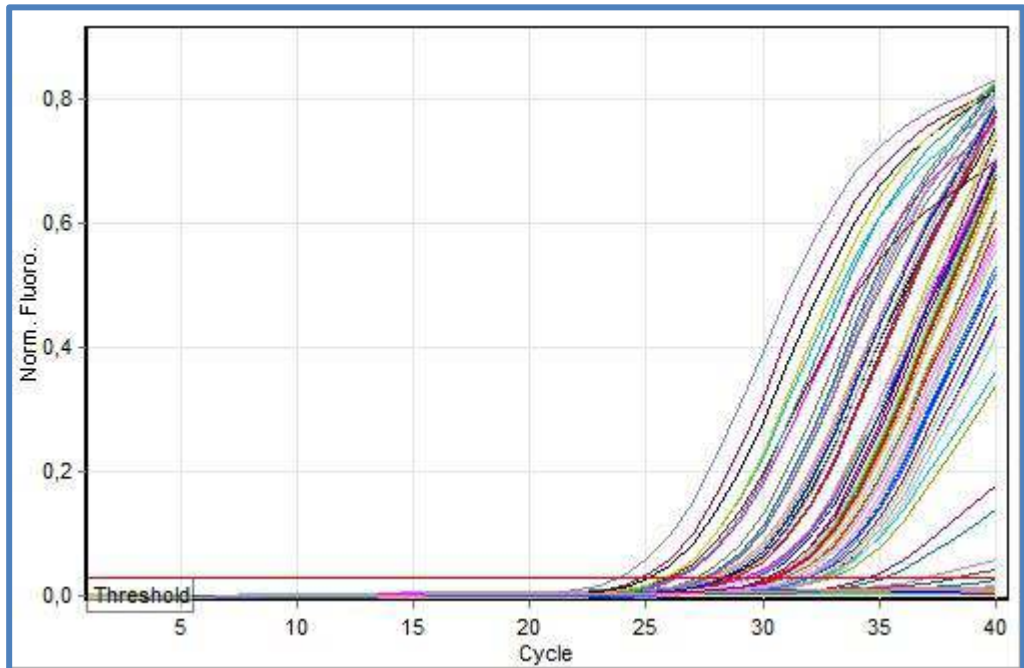
Çalışma sonucunda hedef gen bölgesi olarak seçtiğimiz miR-22, miR-141, miR-155, miR-375, miR-451 için cycle treshold (CT) değerlerini Rotor-Gene Q Software (version: 2.3.1) sisteminde otomatik kantitasyon analizi yaparak elde etmiş olduk (tüm miRNA’lar için treshold değeri 0,03 olarak belirlenmiştir). Elde ettiğimiz CT değerleri Tablo 6, 7 ve 8’de verilmiştir.



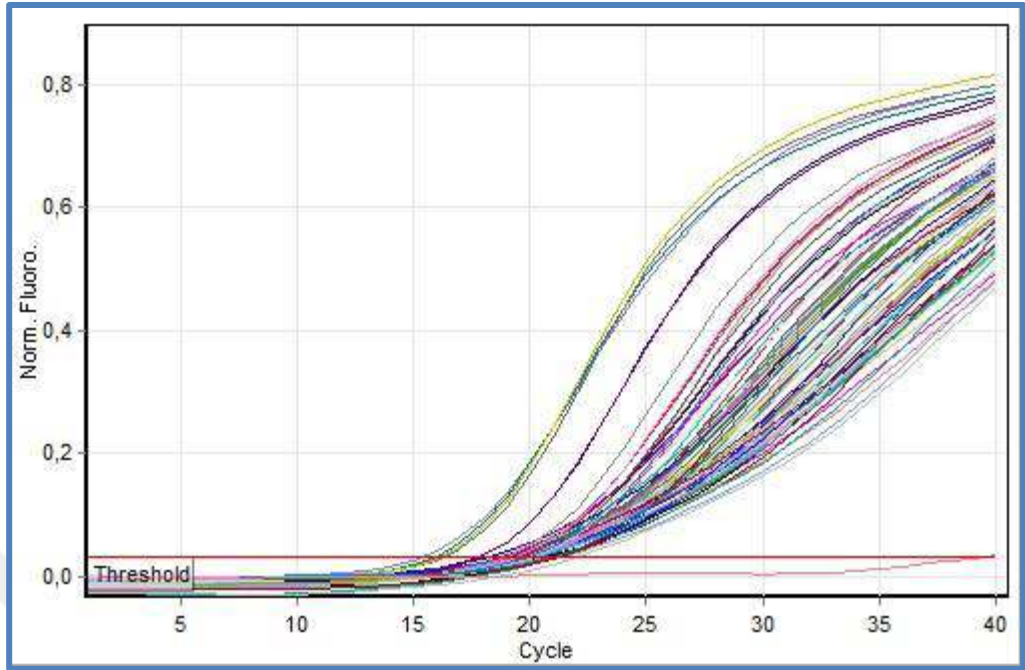
Şekil 10. MiR-22 Amplifikasyon Eğrileri.



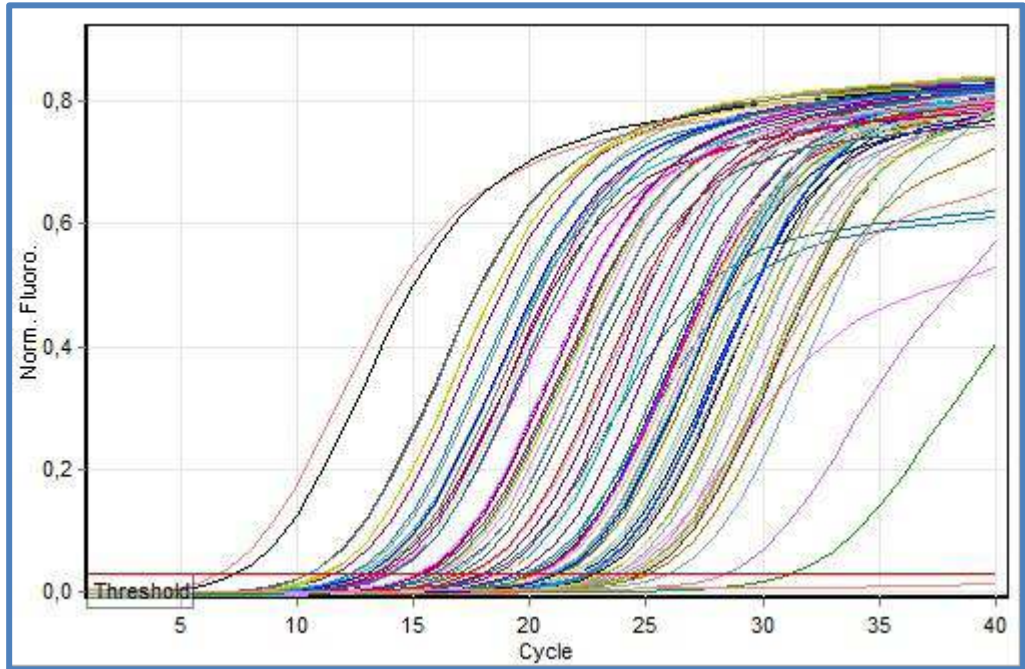
Şekil 11. MiR-141 Amplifikasyon Eğrileri.



Şekil 12. MiR-155 Amplifikasyon Eğrileri.



Şekil 13. MiR-375 Amplifikasyon Eğrileri.



Şekil 14. MiR-451 Amplifikasyon Eğrileri.

Tablo 6. Kontrol grubu CT değerleri.

S Grubu	miR-22	miR-141	miR-155	miR-375	miR-451
1	31.59	31.68	31.85	20.88	22.41
2	29,12	32.93	32.47	19.80	21,05
3	32.74	30.92	31.0	18.78	20.48
4	31.93	30.84	32.39	20.24	21.17
5	30.71	31.45	30.49	19,12	21.21
6	15,09	22.23	27.94	20.15	6,71
7	27.62	30.36	32.09	19.68	19.34
8	19.86	30.43	30.59	19.84	11,27
9	28.79	30.27	29.80	19,06	21.30
10	24.72	29.40	31.93	20.0	16,1
11	26.58	29.91	30.51	19.69	20,08
12	20.92	24.43	26.43	20.27	14,01
13	15.25	23.52	25.18	19.53	7,45
14	20.15	24.55	25.92	20.18	12,7
15	23.38	28,03	28.47	15.85	16.44
16	27.59	31.33	32.96	19.70	23.32
17	21.87	29.88	27.22	19,04	13.32
18	18,87	26.98	28.92	20,06	10,54
19	26,94	31,05	30,41	19,38	23.25
20	29.18	29.76	31.67	20.19	22.37
21	21.86	28,09	27.49	19.88	14,12
22	27.94	29.83	27.99	19.96	22,11
23	23.42	30.96	28.96	19.96	15.53
24	28.45	27.56	30.49	18.21	21.74
25	33.18	31.78	32.85	19.39	24.60
26	32.91	30.63	32.68	19.40	24,09
27	20.95	25.21	26,09	21.15	13.45
28	30.44	31.38	29.89	20,1	25.94
29	31.52	33.22	31,06	19,08	25.16
30	29.51	32.64	27.93	18.98	24.40
31	21.43	27.30	27.49	19.74	13,08
32	27.27	31.56	29.76	20,2	21.29
33	29.38	31,12	30.18	21,01	22.53

Tablo 7. HT Hastaları İlk geliş CT Değerleri

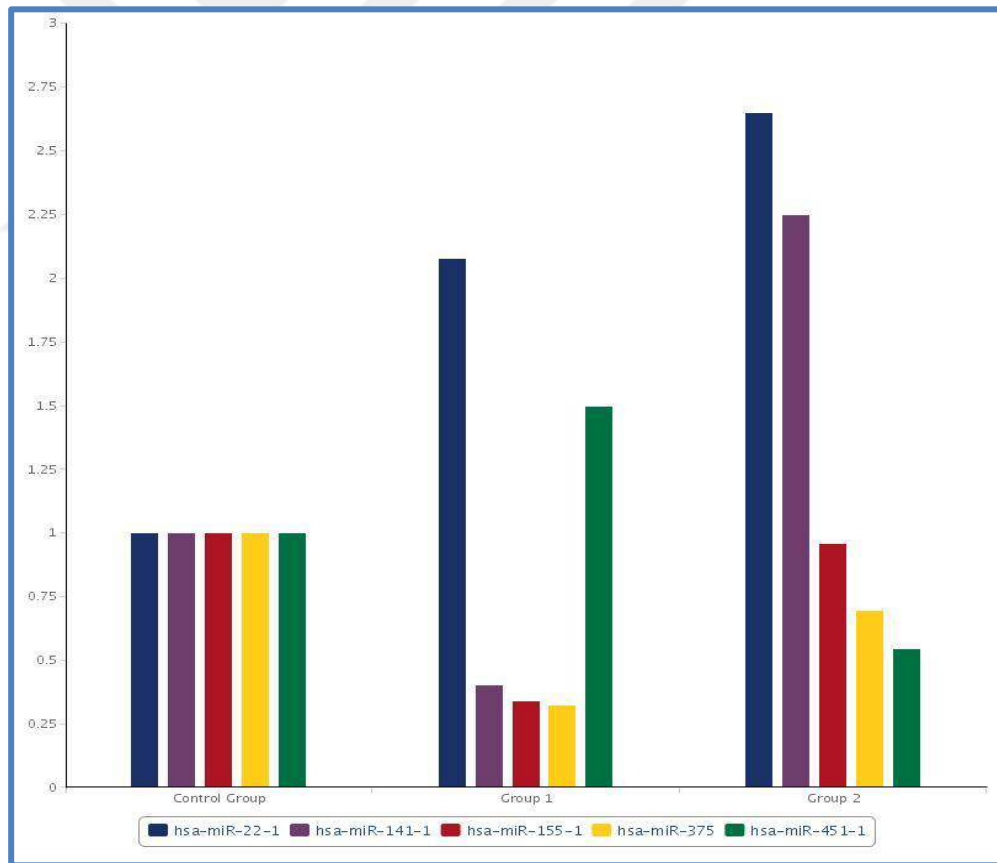
H Grubu	miR-22	miR-141	miR-155	miR-375	miR-451
1	25.75	31.40	27.58	22.13	17.49
2	25.92	21.60	32.97	22.47	17.92
3	27.48	30.33	31.06	19.38	20.27
4	23.71	28.23	29.70	18.45	15.98
5	26.54	28.89	32.57	18.58	20.30
6	27.22	31.24	26.25	18.39	18.83
7	23.68	32.8	31.68	19.23	23.75
8	25.78	30.37	30.29	19.63	18,02
9	23,04	27.98	27.59	19.0	15.83
10	28.36	33.62	29.76	18,06	21.14
11	22.76	29.91	30.66	18.56	15.36
12	23.31	25.25	29.93	19.61	19,09
13	25.43	29.30	31.75	20,06	17.55
14	28.52	30.25	28.17	18.89	16.64
15	18.17	27.61	27.77	16.29	10,62
16	22.58	28.73	28.82	18.87	13.71
17	20,04	25.81	24.87	18.47	11,62
18	22.83	28,1	27.97	19.27	13.84
19	23.59	30.35	38.39	19.68	16.94
20	24.60	32.24	30.58	19.50	17.48
21	18.73	27.36	25.86	16,11	11,31
22	20.76	28.16	28.43	17.81	12,98
23	20,5	27.31	30.30	17.78	15.44
24	23.54	35.36	31.38	19.37	15.20
25	20.67	30.24	32.06	19.80	12,37
26	21.87	29.73	35.30	21.0	14,05
27	25.72	32.03	27.80	23.55	22.21
28	17.94	28.94	28.21	20.20	11,48
29	20.57	25.59	26.53	18.51	13.73
30	19.41	25.99	27.22	19.51	12,83
31	20.63	25.76	26.89	19.97	14.54
32	18,04	25.93	26.52	19.58	12,13
33	29.53	27.85	31.46	24.79	23.27
34	24.64	31.86	31.72	21.70	17.92

Tablo 8. HT Hastaları ikinci Geliş CT Değerleri

N Grubu	miR-22	miR-141	miR-155	miR-375	miR-451
1	30.24	33.39	30.20	21.34	23.64
2	20.23	23.29	23.88	15.39	22.63
3	27.72	32.18	31.09	19.65	19.80
4	24.64	29.29	27.93	19.29	18.21
5	31.77	31.20	32.29	20,09	24.35
6	22.35	26.19	31.14	20.19	20,11
7	29.14	30.26	29.31	19.36	20.33
8	30.52	30.35	26.99	19.91	27.36
9	25.54	30.68	34.67	18.72	18.54
10	30.76	34.73	29.78	18.37	18.83
11	23.0	25.72	29.92	19.29	22.17
12	22.38	26.56	30.89	18.91	19.56
13	18.69	25.32	26.40	17.89	11,83
14	17.48	24.55	23.80	16.52	10,69
15	22.50	26.27	27.80	20,01	16,06
16	28.82	30,06	30.72	21.95	21.93
17	20.56	27,08	28.71	19.91	12,47
18	26,2	30.15	30.17	21.95	20.18
19	23.13	26.15	30.96	20,5	18.76
20	23,05	26.49	28.18	19.29	17.84
21	21,09	26.56	27,9	19.76	15.42
22	24.15	26.99	29.31	20.94	17.22
23	22.23	26.43	29.82	21.66	19.88
24	21.48	26.37	28.49	20.62	16.54
25	23.15	26.51	30.79	20.55	20.89
26	22,05	26.28	29.98	20.66	17.85
27	29.67	28.63	29.88	20.96	24.81
28	23,8	26.56	30.62	19.42	19.36
29	23.28	26,08	30.23	20.43	19.25
30	21,11	26.29	28.87	20,5	14,05
31	17,06	24.87	26.36	19,07	10,26
32	23.44	26.54	29.68	20.79	19,08
33	26.62	30,01	37,1	19,9	20,9
34	30,02	31.27	29.61	20.72	28.42

Yeni tanı alıp TSH değeri normalin üzerinde gelen HT hasta grubu, aynı hastaların kontrollerindeki ötroid halleri ve kontrol grupları arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla RT-PCR verileri Qiagen Gene Globe Veri Analizi Merkezi portalı $\Delta\Delta C_t$ modülü kullanılarak analiz edilmiştir (<http://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). Veri normalleştirmek için yine aynı analiz merkezinde bulunan Global CT Mean Of expressed miRNAs kullanıldı.

Grupların kontrol grubuna göre miRNA ekspresyon düzeyi ilişkisi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 'ye göre değerlendirilmiş ve “fold change (katlı değişim)” değerleri hesaplanmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. S, H, N gruplarının miRNA değerleri (x eksen) ve fold change (y eksen) değişimi grafiği.

Elde ettiğimiz verilere göre H grubundaki hastaların S grubuna göre miR-22 ekspresyon düzeyleri 2,077 kat artmış olarak tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,201$). N grubunun S grubuna göre miR-22 ekspresyon düzeyleri de 2,646 kat artmış olarak bulundu ve istatistiksel olarak da anlamlı olarak saptandı ($p=0,002$). Hasta grubu kendi arasında karşılaştırıldığında; H grubundaki hastaların N grubuna göre miR-22 ekspresyon düzeylerinde 0,784 kat azalma saptanmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,087$) (Tablo 9, Şekil 16 ve 17).

Tablo 9. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-22 Ekspresyon Oranları.

	MiR-22 Ort. CT	Ort. Δ CT	Ort. $2^{-\Delta\Delta CT}$	Grupların Karşılaştırılması	Ekspresyondaki Değişiklik (Fold change)	CI (%95)	P değeri (*= $p<0,05$)
S Grubu	26,1	4,65	0,039				
H Grubu	23,29	3,60	0,082	S ve H Grupları	2,077 kat artış	(0,97-3,18)	0,201
N Grubu	24,35	3,25	0,104	S ve N Grupları	2,646 kat artış	(1,09-4,20)	0,002*
				H ve N Grupları	0,784 kat azalma	(0,40-1,17)	0,087

(CI: Confidence interval)

miR-141 için H grubundaki hastaların ekspresyon düzeyleri ise S grubuna göre 0,402 kat azalmış olarak bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,302$). N grubunun miR-141 düzeyleri ise S grubuna göre 2,247 kat artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,007$). H grubundaki hastaların N grubuna göre miR-141 ekspresyon düzeylerinde ise 0,180 kat azalma saptanmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,427$) (Tablo 10, Şekil 17 ve 18).

Tablo 10. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-141 Ekspresyon Oranları.

	MiR-141 Ort. CT	Ort. Δ CT	Ort. $2^{-\Delta\Delta CT}$	Grubların Karşılaştırılması	Ekspresyondaki Değişiklik (Fold change)	CI (%95)	P değeri (*= $p<0,05$)
S Grubu	29,43	7,99	0,0392				
H Grubu	28,99	9,30	0,0015	S ve H Grupları	0,402 kat azalma	(0,07-0,74)	0,302
N Grubu	27,92	6,82	0,0088	S ve N Grupları	2,247 kat artış	(0,76-3,73)	0,007*
				H ve N Grupları	0,180 kat azalma	(0,04-0,32)	0,427

miR-155 için H grubundaki hastaların ekspresyon düzeyleri ise S grubuna göre 0,339 kat azalmış olarak bulunmuştur. N grubunun miR-155 düzeyleri de S grubuna göre 0,956 kat azalma göstermiştir. H grubundaki hastaların N grubuna göre miR-155 ekspresyon düzeylerinde 0,356 kat azalma saptanmıştır. Her bir karşılaştırma sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,276$, $p=0,353$, $p=0,223$) (Tablo 11, Şekil 17 ve 18).

Tablo 11. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-155 Ekspresyon Oranları.

	MiR-155 Ort. CT	Ort. Δ CT	Ort. $2^{-\Delta\Delta CT}$	Grubların Karşılaştırılması	Ekspresyondaki Değişiklik (Fold change)	CI (%95)	P değeri (*= $p<0,05$)
S Grubu	29,73	8,29	0,0031				
H Grubu	29,54	9,85	0,0010	S ve H Grupları	0,339 kat azalma	(0,05-0,63)	0,276
N Grubu	29,45	8,35	0,0030	S ve N Grupları	0,956 kat azalma	(0,17-1,75)	0,353
				H ve N Grupları	0,356 kat azalma	(0,07-0,64)	0,223

miR-375 için H grubundaki hastaların ekspresyon düzeyleri S grubuna göre 0,322 kat azalmış olarak bulunmuş istatistiksel olarak da anlamlı tespit edilmiştir ($p=0,0006$). N grubunun miR-375 düzeyleri de S grubuna göre 0,692 kat azalma göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,086$). Hasta grubunun kendi içindeki karşılaştırmasında H grubundaki hastaların N grubuna göre miR-375 ekspresyon düzeylerinde 0,464 kat azalma saptanmış ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0,034$) (Tablo 12, Şekil 17 ve 18).

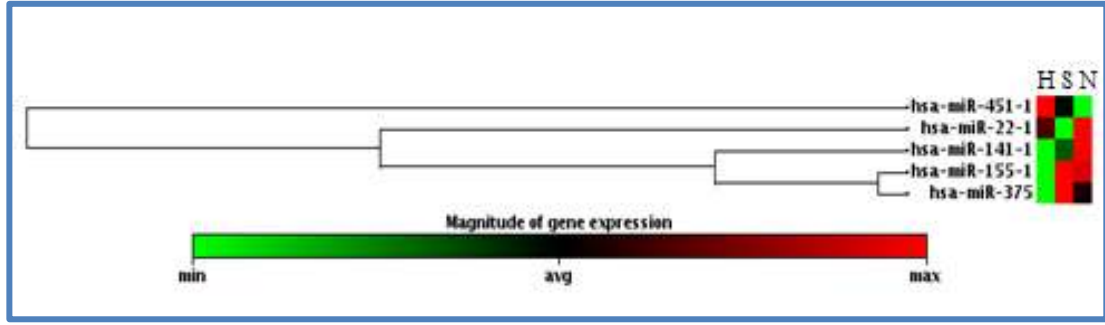
Tablo 12. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-375 Ekspresyon Oranları.

	MiR-375 Ort. CT	Ort. Δ CT	Ort. $2^{-\Delta\Delta CT}$	Grupların Karşılaştırılması	Ekspresyondaki Değişiklik (Fold change)	CI (%95)	P değeri (*= $p<0,05$)
S Grubu	19,65	-1,78	3,446				
H Grubu	19,54	-0,15	1,109	S ve H Grupları	0,322 kat azalma	(0,02-0,63)	0,0006*
N Grubu	19,84	-1,25	2,38	S ve N Grupları	0,692 kat azalma	(0,00001-1,39)	0,086
				H ve N Grupları	0,464 kat azalma	(0,13-0,80)	0,034*

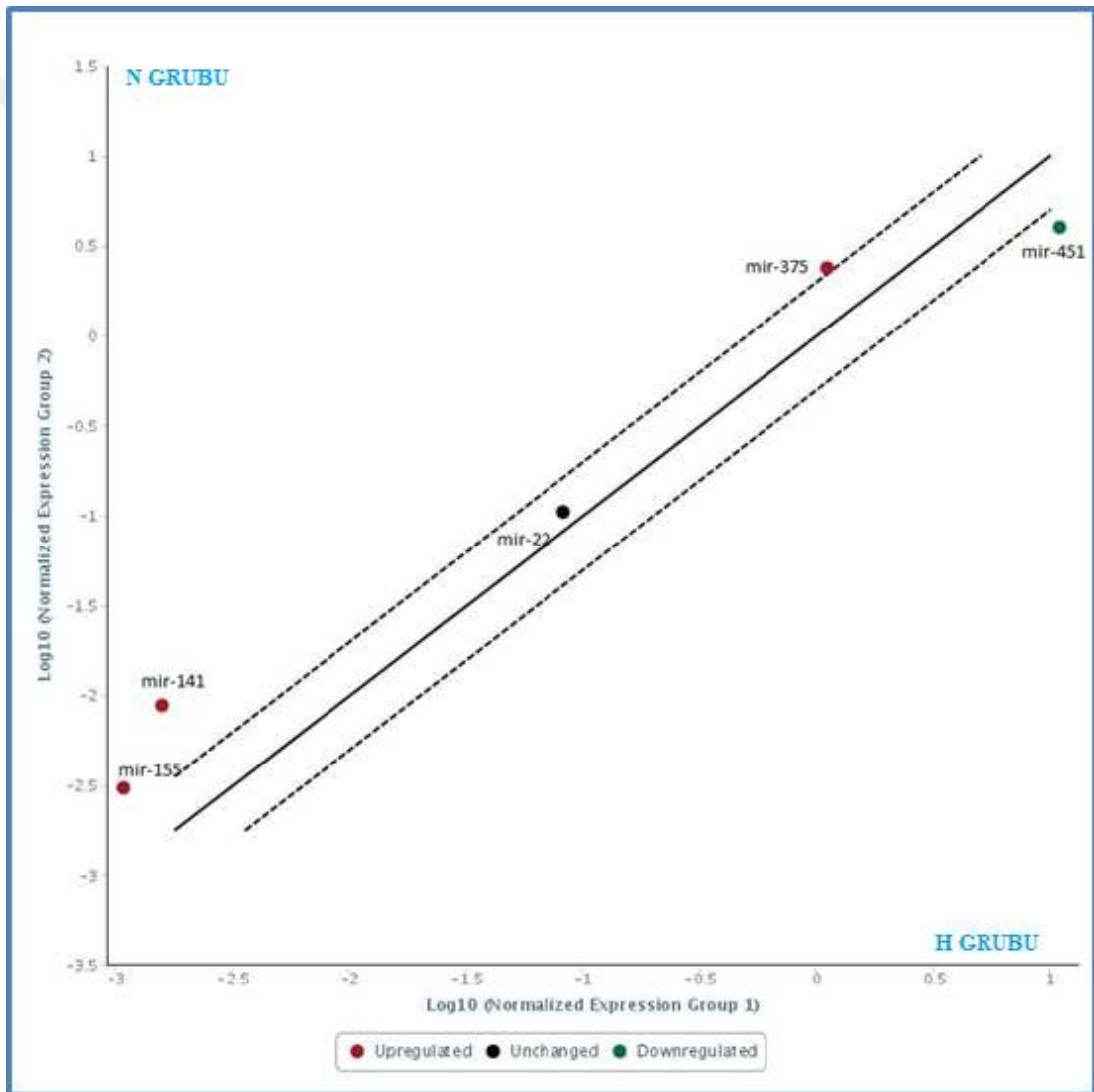
miR-451 için H grubundaki hastaların ekspresyon düzeyleri S grubuna göre 1,495 kat artmış olarak bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,434$). N grubunun miR-451 düzeyleri ise S grubuna göre 0,545 kat azalma göstermiştir ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0,042$). Hasta grubu kendi arasında karşılaştırıldığında H grubundaki hastaların N grubuna göre miR-451 ekspresyon düzeylerinde 2,74 kat artış saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0026$) (Tablo 13, Şekil 17 ve 18).

Tablo 13. S, H ve N Grupları Arasındaki miR-451 Ekspresyon Oranları.

	MiR-451 Ort. CT	Ort. Δ CT	Ort. $2^{-\Delta\Delta CT}$	Grupların Karşılaştırılması	Ekspresyondaki Değişiklik (Fold change)	CI (%95)	P değeri (*= $p<0,05$)
S Grubu	18,56	-2,87	7,331				
H Grubu	16,23	-3,45	10,964	S ve H Grupları	1,495 kat artış	(0,61-2,38)	0,434
N Grubu	19,09	-1,99	3,998	S ve N Grupları	0,545 kat azalma	(0,18-0,91)	0,042*
				H ve N Grupları	2,74 kat artış	(1,22-4,26)	0,0026*



Şekil 16. S, H, N gruplarının her bir miRNA için ekspresyon dağılım grafiği.



Şekil 17. N grubunun H grubuna göre miRNA ekspresyon değişimleri grafiği.

Hasta grubunun ilk tanı anı (H Grubu) ve tedavi sonrası kontrol dönemi (N Grubu) ayrı ayrı olmak üzere TSH değerleri her bir grubun kendi içindeki $2^{-\Delta\Delta ct}$ değerleri Spearman korelasyon analizine tabi tutuldu. H grubu için TSH değerleri ile sadece miR-22 ekspresyon düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif yönde bir korelasyon tespit edilmiştir. Bu da bize TSH düzeyi ile miR-22 arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu göstermektedir (Tablo 14). N grubu için yapılan aynı korelasyon analizi sonucu TSH düzeyi ile miRNA ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon tespit edilememiştir (Tablo 15).

Tablo 14. H Grubunda TSH ve miRNA Ekspresyon Korelasyonu.

	TSH	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P değeri (*: p<0,05)
MiR-22	0,464	0,006*
MiR-141	0,165	0,350
MiR-155	-0,135	0,447
MiR-375	-0,210	0,233
MiR-451	-0,069	0,697

Tablo 15. N Grubunda TSH ve miRNA Ekspresyon Korelasyonu.

	TSH	
	Korelasyon Katsayısı (r)	P değeri (*: p<0,05)
MiR-22	0,100	0,573
MiR-141	0,047	0,794
MiR-155	0,034	0,847
MiR-375	-0,214	0,223
MiR-451	0,027	0,878

5. TARTIŞMA

HT dünyada iyot eksikliği olmayan bölgelerde hipotiroidinin en sık nedenidir. İnsidansı % 6-7 kadardır. En sık görülen otoimmün tiroidittir. (28, 29) Otoimmün hastalığı olanların birinci derece akrabalarında da benzer otoimmün hastalıkların sık görülmesi, genetik faktörlerin otoimmünite üzerinde etkisinin olduğunu düşündürmektedir (14). HT otoimmün bir hastalık olmakla birlikte patogenezi tam olarak ortaya konamamıştır. Hastalığın başlangıcı ve gelişimi basamaklı bir yol izlemektedir. Bu basamaklamada immunogenetik, epigenetik ve çevresel faktörler rol almaktadır (31). Tiroid disfonksiyonunun, tiroid dokusuna infiltrate olmuş T lenfositlerin sitokin aracılı apoptozisi nedeniyle olduğu düşünülmektedir (35).

Ortaya konmuş immün mekanizmasında CD4+ T lenfositler ana rolü üstlenmektedir. T lenfositler HT patogenezinde iki fonksiyon gösterirler. Th2 hücreleri tiroidite yol açan tiroid antijenlerine karşı antikor üreten B hücrelerinin aşırı uyarımı ile artan otoantikor üretilmesine yol açarak IL-4, 5, 13 salgılamasına neden olur (134, 135). Th1 hücreleri ise sitotoksik lenfositleri ve makrofajları aktive eder. IFN- γ salgılamasına neden olurlar. Sonuçta tiroid folliküler hücrelerini yok ederek doğrudan tiroid dokusunu etkiler (136). Ayrıca son araştırmalar, otoimmün bozuklukların indüksiyonunda yeni bulunan Th17 (CD4+ IL-17+) ve Treg lenfositlerin (CD4+ CD25+ highFoxP3+) önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (38). Th17 hücreleri, kan serumunda CD4+ lenfositlerinin yaklaşık %1'ini oluşturur. Hücreler arası antijenlere karşı bağışıklık tepkisine katkı sağlarlar. CCR6 (CD196), IL-23R, IL-12R-beta2, CD49 ve CD161 gibi ekspresyon belirteçleri ile karakterize edilip başlıca IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-9, IL-22 ve TNF- α gibi proenflamatuar sitokinler üretmektedirler. Th'lardan TGFB, IL-6, IL-21 ve IL-23 gibi çeşitli faktörlerin ve STAT3, RORgammat ve RORalpha gibi transkripsiyon faktörlerinin etkisi altında gelişirler (39, 137, 138). Yapılan bir çalışmada HT hastalarının IL-6 ve IL-23 serum

konsantrasyonlarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin olarak artmış olduğu gösterilmiştir (139, 140).

MikroRNAlar son yıllarda ortaya çıkan, 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük proteine çevrilemeyen (noncoding) RNA molekülleridir. miRNA'ların hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolik süreçler, apoptoz, inflamasyon ve immünolojik mekanizmaların düzenlenmesi gibi süreçlerde posttranskripsiyonel olarak düzenleyici oldukları ortaya konmuştur (123).

Şimdiye kadarki çalışmalarda, miRNA'ların plazma dahil çeşitli vücut doku ve sıvılarında tesbit edilebildiği gösterilmiştir. Sirkülatuvar miRNA'ların sekrete edildiği hücrelerden uzak noktalarda hormon benzeri etkiler yapabildiği bulunmuştur. Bu sebeple sirkülatuvar miRNA'lar hastalık patogenezi ve klinik durumların aydınlatılmasında önemli ve yeni bilgiler sağlayabileceği ön plana çıkmıştır (127).

miRNA'lar hücresel gelişim ve farklılaşmada önemli rollere sahiptir (141). Bazı miRNA'lar dokularda geniş kapsamlı olarak eksprese olurken; bazıları gelişimin belirli aşamasında, belirli dokularda veya belirli hücre hattında kısıtlı bir şekilde eksprese olmaktadır (142).

miRNA'ların dolaşımında stabl olmaları RNase'lar tarafından sindirilememeleri, pH vb. fiziksel koşullardan etkilenmemeleri hastalık patogenezinde kullanışlı biyomarkerlar olabileceği fikrini ortaya koymaktadır. Kandaki miRNA ekspresyon miktarındaki değişiklikler hastalıkların patogeneziyi ortaya koymak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır (143-145).

Çalışmamızda HT patogenezi ile ilgili olduğunu düşündüğümüz miR-22, miR-141, miR-155, miR-375, miR-451'in hasta grubunda TSH'ın yüksek olduğu tanı anında ve 3 aylık tedavi sonrası ötroid oldukları dönemde plazmadaki miRNA ekspresyon seviyelerini sağlıklı kontroller ile karşılaştırmayı planladık.

Yapmış olduğumuz çalışmada, özellikle miR-451'in gen ekspresyonunda tanı anındaki TSH'ı normal sınırın üzerinde olan hasta grubunda (H grubu), sağlıklı kontrol grubuna (S grubu) göre 1,495 kat artış ($p=0,434$) saptanması; bununla

birlikte hastaların tedavi sonrası ötroid olduğu kontrol döneminde (N grubu) sağlıklı kontrollere göre aynı genlerin ekspresyonunda 0,545 kat azalma ($p=0,042$) görülmüştür. Hasta grubunun kendi arasındaki karşılaştırmasında da TSH'ın yüksek olduğu dönemde normal olduğu döneme göre miR-451 gen ekspresyonları arasında 2,74 katlık artış ($p= 0,00262$) tespit edilmesi miR-451'in hastalık aktivitesi ile yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bu bulguların sonucu olarak çalışmamız, sirkülatuar miRNA ekspresyon düzey farklılıklarının, HT'de hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

miR-451'in immünite regülasyon mekanizması tam olarak netlik kazanmamış olsa da SLE (Sistemik Lupus Eritematozus), RA (Romatid Artrit), Primer biliyer siroz gibi diğer otoimmün hastalıklarda da HT hastalarında elde edilen miR-451 ekspresyonlarındaki artışa benzer sonuçlar bulunmuştur (94, 146, 147).

Hiroya Yamada ve arkadaşlarının 2014 yılında HT hasta gruplarını sağlıklı kontroller ile karşılaştırarak yapmış olduğu bir çalışmada serumdaki bazı miRNA ekspresyon profilleri analiz edilmiştir. Sonuçları bizim çalışmamız ile benzer bir şekilde miR-451'in ekspresyonunun HT hastalarında sağlıklı kontrollere göre artmış olduğu tespit edilmiştir (148).

Yine aktif tüberküloz latent tüberküloz ve sağlıklı kontroller arasında, kandaki miR-451 ekspresyon analizinin bakıldığı Wang ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada, miR-451'in aktif tüberkülozlu hastalarda ve latent hastalığı olanlarda sağlıklı kontrollere göre ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Aktif tüberkülozda ise latente göre artmış bir ekspresyon düzeyi tespit edilmiştir (149). Tüberküloz enfektif bir hastalık olmakla birlikte aktif ve latent olduğu dönemdeki vücudun verdiği immun yanıt farklılık arzedeceğinden immünite ile ilgili olduğu düşünülen genlerin ve miRNA'ların ekspresyonunda farklılık beklemek yanıtıcı olmayacaktır. Çalışmamızda da bu çalışmaya benzer şekilde hastalığın aktif olduğu dönemdeki miR-451 ekspresyon düzeyini, tedavi sonrası döneme ve sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olarak tespit ettik. Bu bulgular bize miR-451'in HT hastalarında hastalık relaps ve remisyon dönemlerini belirlemede kullanılabileceği fikrini düşündürmektedir.

2015 yılında Churov ve arkadaşlarının otoimmün bir hastalık olan RA hastalarının aktif hastalık dönemi ve TNF α ve Metotreksat ile tedavi sonrası döneminin karşılaştırılmasını yaptıkları bir başka çalışmada, bizim çalışmamız ile uyumlu olarak aktif hastalık döneminde miR-451'in ekspresyonunda artışın olduğunu tedavi sonrası dönemde ise ekspresyonun azaldığını göstermiştir (150).

Çalışmamızda miR-155 ekspresyon düzeyi H grubunda S grubuna göre 0,339 kat azalmış ($p= 0,276$) olarak tespit edilmiştir; N grubu ekspresyon düzeyi S grubuna göre 0,956 kat düşük ($p= 0,353$) tespit edilmiştir. H grubu N grubu ile karşılaştırıldığında H grubunun miR-155 ekspresyon düzeyi N grubuna göre 0,356 kat düşük ($p= 0,223$) olduğu tespit edildi.

Bernecker ve arkadaşlarının 2012 yılında Hashimoto hasta grubunda ince iğne aspirasyon biyopsisi dokusundan izole edilerek miR-155'in ekspresyonuna baktıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde hasta grubu kontrol grubuna göre miR-155 ekspresyon düzeyinin belirgin olarak azaldığı bulunmuştur ($p= 0.001$) (151). Hasta sayısının 10 kişi ile sınırlı olması güvenilirliği düşürmekle birlikte, miR-155'in HT'de dokuda ekspresyonunun azaldığını gösteren ilk çalışma olması açısından önemlidir.

2001 yılında Moore ve arkadaşlarının IL-10 genin knockout ve IL-10 gen açısından transgenik fareler kullanarak yapmış oldukları çalışmada, akut ve kronik hastalıklarda pro-inflamatuar sinyaller tarafından başlatılan ve devam eden inflamasyonun kontrolünde IL-10'un kesin önemini ortaya koymuştur (152). Yine yapılan bir in vitro çalışmada IFN- γ ve transkripsiyon faktör T-bet sentezleyen CD4+ ve CD8+ hücrelerde IL-10 gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. IL-10 upregülasyonunun kinetiği, T hücrelerin immün aktivasyonu gerçekleştikten sonra etkili olduğunu ortaya koymuştur. Böylece IL-10 üretiminin artması, Th1 aktivitesi için izin verilen bir ortamda aşırı immün yanıtın baskılanmasına yardımcı olur (153, 154). An H. ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, miR-155 ekspresyonunun IL-10 tarafından inhibe edildiği ve buna bağlı olarak miR-155'in hedef genlerinden biri olan SHIP-1 geninin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular mir-155 ekspresyonunun immün sistem üzerinde beklenenin ötesinde farklı yollar üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür. Bu sonuçlar mir-155

ekspresyonunun birnevi kontrol mekanizması olarak da görev yaptığını göstermektedir (155, 156). Yukarıdaki elde edilen bulgulara paralel olarak, çalışmamızda otoimmün aktivitesinin en üst seviyede olduğu HT hastalarının (TSH'ın yüksek olduğu) ilk tanı anında, sağlıklı kontrollere göre ve tedavi sonrası TSH'ın normale döndüğü kontrol dönemine göre, miR-155 ekspresyon düzeyinin düşük çıkması, artan immün yanıtın sonucu miR-155 ekspresyon düzeyinin supresse edildiğini düşündürmektedir.

Dai ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada otoimmünite ile ilişkisinin olduğu düşünülen miRNA'ların profillemesi sonucu, çalışmamızdan farklı olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında hasta gruptaki miR-155 ekspresyon düzeyinin artmış olduğu tespit edilmiştir (107). HT ve Graves hasta grubunda yapılan başka bir çalışmada, mikroveziküller içerisinde serum ve plazmada taşınan miR-155 ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak HT hasta grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın ($p = .047$) olduğu bulunmuştur (157). Beslenme ve çevresel faktörlerin sirkülatuvar miRNA düzeylerinde farklılıklara yol açabileceğinin daha önceki çalışmalar ile ortaya konması hasta seçimi, hasta sayısı, coğrafik dağılım gibi faktörlerin bu farklılıkta rolü olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızda miR-141 ekspresyon düzeyi, H grubunda S grubuna göre 0,402 kat azalma ($p = 0,302$) göstermiştir. N grubunun S grubuna göre miR-141 ekspresyon düzeyi ise 2,247 kat arttığı bulunmuştur ($p = 0,00720$). H ve N grubu kendi arasında karşılaştırıldığında ise H grubu N grubuna göre 0,180 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p = 0,427$).

Emma R. Dorris ve arkadaşlarının 2012 yılında, HT ve Papiller Tirod karsinomlu (PTC) hastaların tiroid dokusunda miR-141 ekspresyon düzeylerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda HT hastalarında PTC ve sağlıklı kontrollere göre miR-141 ekspresyon düzeyinin önemli ölçüde azalmış olduğu tespit edilmiştir (158). Yine aynı çalışmada HT hastalarında miR-141 ekspresyonu ve hedef geni olan TGF β R1 ekspresyonunun birlikte azaldığının gösterilmesi ile daha önce ortaya konulmuş olan miR-141 ve TGF β R1 ilişkisi desteklenmiştir (105). Başka bir otoimmün hastalık olan Crohn Hastalığını baz alarak Huang ve arkadaşlarının 2014

yılında yapmış oldukları çalışmada Crohn hastalığı olan insanlardan inflame ve sağlıklı dokudan alınan kolonoskopik punch biyopsi örneklerini, IL-10'u knockout (KO) olup Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile indüklenip deneysel kolit oluşturulmuş fareleri kontrol fareler ile karşılaştırılmıştır. Kolon epitel dokusundaki miR-141 ekspresyon düzeyleri bakılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde sağlıklı kolon dokusuna ve sağlıklı farelere göre inflamatuvar kolit grubunda miR-141 ekspresyon düzeyi düşük bulunmuştur. Bu sonuç bize proinflamatuvar sitokin stimülasyonunun inflamasyon süreci boyunca miR-141 ekspresyonunun downregülasyonuna katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Aynı çalışmada pre-miR-141 (sentetik miRNA taklitleri) tedavisi uygulanan deneysel kolitli farelerde pre-miR-141 tedavisinden sonra, mukozal nötrofil infiltrasyonu ile korelasyon gösteren kolonik miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Doğrulama çalışması için anti-miR-141 (miRNA inhibitörü) verilen deneysel kolitli fare grubunun MPO aktivitesi, kolon resimleri, vücut ağırlığı değişiklikleri, kolonların histolojik incelemeleri, daha şiddetli kolit geliştirdiğini ortaya koymuştur (159). HT gibi organa spesifik, Th17 aracılı bir otoimmün hastalık olan ITP (Immune Thrombocytopenic Purpura) hastaların kanından bakılan miR-141 ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı ITP hasta grubunda miR-141 ekspresyon düzeyleri azalmış olarak tespit edilmiştir (160). Yukarıda ifade edildiği üzere otoimmün zeminden geliştiği kabul edilen HT, Chron hastalığı, ITP, deneysel kolitli fareler üzerinde yapılan miR-141 ekspresyon düzeylerindeki azalma, yapmış olduğumuz çalışmamızda ki sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda miR-375 ekspresyon düzeyi, H grubunda S grubuna göre 0,322 kat azalma ($p=0,000607$) göstermiştir. N grubunun S grubuna göre miR-375 ekspresyon düzeyi ise 0,692 kat düşük bulunmuştur ($p=0,0862$). H ve N grubu kendi arasında karşılaştırıldığında ise H grubu N grubuna göre 0,464 kat azaldığı ($p=0,0344$) tespit edilmiştir.

2012 yılında Lu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, IL-13 ile 24 saat muamele edilmiş özefagus ve bronşial epitel hücrelerinde, IL-13 ile muamele edilmemiş epitel hücrelerine göre miR-375 ekspresyon düzeyinin azalmış olduğu

tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 4 hafta doksisisiklin verilerek IL-13 (Th2 fonksiyonuna aracılık eden bir sitokindir) ekspresyonu arttırılan farelerde kontrol farelere göre miR-375 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada Th2 aracılı bir hastalık olan Eozinofilik Özefajit (EÖ) hastalarının sağlıklı kontroller ile miR-375 ekspresyonu karşılaştırılmıştır. Hasta grubunda sağlıklı gruba göre miR-375 ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Daha sonra bu hastaların flutikazon propiyonat tedavisi sonrası remisyon dönemindeki miR-375 ekspresyon düzeylerine bakıldığında, sağlıklı kontrollere göre ekspresyon düzeylerinin normalleştiği tespit edilmiştir (161). Bu çalışmada, miR-375 ekspresyon düzeyindeki azalma ve tedavi ile miR-375 ekspresyon düzeyinin normal düzeylere gelmesi rapor edilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmamızda, HT tanı anında miR-375 ekspresyon düzeyindeki azalma ve HT tedavisi sonrası miR-375 ekspresyon düzeyinde normalleşme, Lu ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Hiroya Yamada ve arkadaşlarının 2014 yılında HT hasta gruplarını sağlıklı kontroller ile karşılaştırarak yapmış olduğu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak miR-375'in ekspresyon düzeyinin HT hastalarında sağlıklı kontrollere göre artmış olduğunu tespit etmiştir (148). Daha önceden vurgulandığı gibi beslenme ve çevresel faktörlerin sirkülatuvar miRNA düzeylerinde farklılıklara yol açabilmesi, bununla birlikte belki de çözümlenmeyi bekleyen ve miRNA ekspresyon düzeyini etkileyen farklı mekanizmalar nedeniyle miR-375'in ekspresyon düzeyi farklılık göstermiştir.

Çalışmamızda miR-22 ekspresyon düzeyi, H grubunda S grubuna göre 2,077 kat artma ($p=0,201$) göstermiştir. N grubunun S grubuna göre miR-22 ekspresyon düzeyi ise 2,646 kat artmış bulunmuştur ($p= 0,0082$). H ve N grubu kendi arasında karşılaştırıldığında ise H grubu N grubuna göre 0,784 kat azaldığı ($p=0,0874$) tespit edilmiştir.

Hiroya Yamada ve arkadaşlarının Graves (GD) ve HT hasta gruplarını sağlıklı kontroller ile karşılaştırarak yapmış olduğu çalışmada, serumdaki miRNA ekspresyon profillerine bakılmıştır. HT ve GD hastalarında sağlıklı kontrollere göre miR-22 ekspresyon düzeylerinin artmış oldukları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada hastaların TSH seviyeleri ve miRNA ekspresyon düzeyleri (miR-22, miR-375, miR-

451) karşılaştırılmış ancak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir (sırasıyla $P=0.74$, $P=0.91$, $P=0.79$) (148). Kendi çalışmamızda bu çalışma ile paralel olarak HT hasta grubumuzda sağlıklı gruba göre miR-22 ekspresyon düzeyinin artmış olduğunu tespit ettik. Ancak bu çalışmadan farklı olarak, HT hasta grubumuzun tanı anı ve tedavi sonrası kontrol dönemindeki TSH ve miRNA'ların ekspresyon düzeyi arasında yaptığımız korelasyon analizi sonucu H grubu için miR-22 ve TSH düzeyi arasında orta düzeyde pozitif yönde anlamlı bir korelasyon tespit ettik (Tablo 14). Bu analiz sonucu bize, TSH düzeyi arttıkça miR-22 ekspresyon düzeyinin arttığını ve hastalığın aktivitesi ile doğru orantılı olduğunu göstermiş oldu.

Multiple Sclerosis hastalarında yapılan başka bir çalışmada, yine miR-22'nin ekspresyon düzeyinin artmış olduğunun tespit edilmesi ($P=0.04$) otoimmunité tabanlı farklı hastalıklarda benzer bulguların miR-22'nin otoimmunité ile ilişkisini kuvvetlendirmektedir (147).

Pandey ve Picard'ın 2009 yılında yapmış olduğu çalışma, miR-22 ekspresyonunun Estrojen Reseptör Alfa ($ER\alpha$) geninin mRNA'sını hedefleyerek bu mRNA'nın degrade olmasına neden olduğunu göstermiştir. miR-22 ekspresyonu, $ER\alpha$ 'nın ekspresyonunu azaltarak otoimmunité dahil tüm yolaklardaki etkilerini azalttığını vurgulamıştır (162). $ER\alpha$ ekspresyonu Th1 ve Th17 kaynaklı otoantijen spesifik inflamasyonu baskılamaktadır (163). miRNA'ların otoimmunitéye katkılarını incelemek amacıyla yola çıkılan farklı bir çalışmada miR-22 ayrıntılı olarak incelendiğinde, APC aktivasyonunu ve Th17 cevaplarını $ER\alpha$ vasıtası ile kontrol ettiğini göstermiştir (164, 165). Çalışmamızda hem TSH'ın yüksek olduğu (P değeri anlamsız olsa da) hem de tedavi sonrası TSH'ın normale döndüğü dönemde kontrol grubuna göre miR-22 ekspresyon düzeyinde 2 kat artışın olması hastalık evresi ile ilişkisi olduğu düşüncesinden bizi uzaklaştırmasına rağmen, otoimmunité yolaklarının tedavi sonrası dönemde de devam ettiğini düşündürmektedir. Bu sebeple miR-22'nin HT'de tedavi takibinden çok otoimmunité tanısında yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

miRNA ekspresyonlarının mRNA ekspresyonu ve protein seviyesinde önemli rollerinin olduğu her geçen gün daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır. HT'nin en yaygın otoimmün endokrin hastalıklardan biri olması ve etiyolojik nedenlerin tam aydınlatılamamış olması nedeniyle, miRNA'ların HT patogeneziindeki olası rolünün ortaya çıkarılması üzerine çalışma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

miR-22, miR-141, miR-155, miR-375, miR-451 gibi birçok miRNA'nın farklı immün yolaklarda, otoimmün hastalıklarda ve çeşitli hastalık patogeneziinde etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonucu, plazmadaki değişik seviyelerdeki sirkülatuvar miRNA'ların otoimmün bir hastalık olan HT'de hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda yeni tanı almış, TSH değeri normal sınırın üzerinde olan HT hastaları ve aynı hastaların üç ay tedavi sonrası kontrollerinde (ötroid dönemde) kan örnekleri üzerinde miR-22, miR-141, miR-155, miR-375 ve miR-451 ekspresyon profillerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Hastaların yeni tanı aldıkları dönemdeki miR-22 ekspresyon düzeyi sağlıklı kontrollere göre 2,077 kat arttığı ($p=0,201$), sağlıklı kontrollere göre tedavi sonrası kontrol dönemindeki miR-22 ekspresyon düzeyi ise 2,646 kat artmış ($p=0,0082$) olduğu tespit edilmiştir. Hasta grupları kendi arasında karşılaştırıldığında, tedavi sonrasına göre tanı anındaki 0,784 kat düşük ($p= 0,0874$) olduğu görülmüştür. Hastaların tanı aldığı dönemdeki 2,077 katlık artış istatistiksel olarak anlamsız görülse de, tedavi sonrası dönemdeki 2,646 katlık anlamlı artışın olması ve hasta grupları arasındaki 0,784 katlık farkın sınırda anlamlı ($0,05 \leq p < 0,10$) çıkması hastalığın her iki döneminde de miR-22 ekspresyon düzeyinin sağlıklı kontrollere göre artmış olduğunu göstermiştir. Tedavi sonrası dönemde miR-22'nin ekspresyonunun daha yüksek tespit edilmesi vücudun otoimmunitiyi dengelemek için tedavi ile birlikte zaman içinde miR-22 ekspresyonunu arttırdığını

düşündürebilir. Farklı otoimmün hastalıklarda da miR-22 seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek çıktığını biliyoruz. Bu hastalıklarda da tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon analizleri yapılarak sonuçlar karşılaştırılabilir. İlerleyen çalışmalarda farklı hastalıklarda da miR-22 ekspresyon düzeyi bakılarak hastalık patogenezi hakkında bilgi edinilebilir.

Yine tanı anındaki hasta grubu TSH değerleri ile mir-22 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon analizinde doğru orantı tespit etmemiz, oluşan immün cevabın derecesine göre vücudun bunu dengelemek için miR-22'nin ekspresyonunu arttırdığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın bir başka sonucu olarak, miR-141, miR-155, miR-375'in sağlıklı kontrollere göre TSH değerinin yüksek olduğu tanı dönemdeki hastalarda ekspresyon düzeylerinin azaldığını gördük (miR-141 için 0,402 kat; miR-155 için 0,339 kat; miR-375 için 0,322 kat). Tedavi sonrası kontrol dönemindeki miRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise azalan miRNA ekspresyon düzeylerinin normale yakın bir patern izlediğini tespit ettik. Yukarıda bahsettiğimiz benzer çalışmalarda olduğu gibi hastalığın aktif olduğu dönemde miRNA ekspresyon düzeylerinin azalmış olması ve remisyon döneminde ise miRNA ekspresyonlarının sağlıklı insan popülasyonuna yaklaşması bu miRNA'ların otoimmunitiyi baskılamak ile görevli olduklarını düşündürmektedir.

Yine çalışmamızın bir başka sonucu olarak, sağlıklı kontrol grubuna göre TSH'ı normal sınırın üzerinde olan tanı anı hasta grubundaki miR-451 ekspresyonunda, 1,495 kat artış ($p=0,434$) saptanmıştır. Bununla birlikte sağlıklı kontrollere göre hastaların tedavi sonrası TSH değerlerinin normale döndüğü kontrol döneminde miR-451 ekspresyon düzeyinde 0,545 kat azalma ($p=0,042$) bulunmuştur. Hasta grubunun kendi arasındaki karşılaştırmasında ise TSH'ın yüksek olduğu dönemde normal olduğu döneme göre miR-451 ekspresyon düzeyleri arasında 2,74 katlık artış ($p= 0,00262$) tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında miR-451 ekspresyon düzeyindeki değişikliğin, HT olgularında hastalık aktivitesi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda miR-451 ekspresyon düzeyindeki değişikliğin, HT hastalığı için aktivite değerlendirmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız HT hastalarında miR-155 ve miR-141 düzeylerinin bakılması açısından ve ayrıca HT hastalarının TSH'ın yüksek olduğu tanı anında ve ilaç tedavisi aldıktan sonraki ötroid oldukları dönemdeki miR-22, miR-375 ve miR-451 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması açısından ilk örnektir. Bununla birlikte çalışmamızı kısıtlayıcı durumlar da vardır. Örneğin beslenme ve çevresel faktörlerin sirkülatuvar miRNA düzeylerinde farklılıklara yol açabileceği daha önceki çalışmalar ile ortaya konmuştur (166).

Dış etkenleri en aza indirmek için çalışmamızda alınan kanlar en kısa sürede izole edilip saklanmakla birlikte, sadece bulunduğumuz coğrafyadaki HT hastaları çalışmaya dahil edilmiş olup, farklı coğrafyadaki HT hastalarının miRNA profillendirmesi farklı olabilir. Bu hastalık grubunda daha geniş hasta grupları ile yapılabilecek çalışmalar sonucu daha kapsamlı bilgiler edinilebilir. Hatta otoimmünite tedavisinde miRNA'lar üzerinden “miR-mimics (sentetik miRNA taklitleri)” ve “anti-miR (miRNA inhibitörü)” tedavileri dahi gündeme gelebilir.

7. ÖZET

MİKRORNA'LARIN HASHİMOTO TİROİDİTİ'NDEKİ ROLÜ

MikroRNA (miRNA) 'lar son yıllarda ortaya çıkan, 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlama yapmayan (noncoding) ve büyük bir çoğunluğu hücre içinde bulunmakla birlikte ekstrasellüler alanda, vücut sıvılarında ve kanda bulunabilen RNA molekülleridir. miRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolik süreçler, apoptoz, inflamasyon ve immünolojik süreçlerin düzenlenmesi gibi yollarda düzenleyicidirler. Çeşitli çalışmalarda yapılan gözlemler, insan plazmasında bulunan miRNA'ların yüksek bir stabiliteye sahip olduğunu ve bu örneklerde yapılan miRNA ekspresyon kalıbı analizinin çeşitli hastalıkların durumları hakkında yararlı bilgiler sunabileceğini ortaya koymuştur. miRNA'ların solid dokulardan elde edilen örneklerle ek olarak hasta serum/plazmasında da belirlenebilmesi, tanısında mutlaka girişimsel tekniklerin kullanılmasını gerektiren hastalıklarda oldukça kolay bir örnek eldesini sağlar. Potansiyonel olarak gen veya protein sentez bozukluğu aracılı her hastalık, hücre tipi veya doku tipi miRNA tabanlı hedefleri oluşturabilirler. miRNA'lar gelişimsel açıdan mesajcı RNA'ların protein üretmesini düzenleyici rol üstlendiğinden, terapötik açıdan önemli olmalarını sağlamaktadır.

Hashimoto Tiroiditi (HT), T ve B lenfositlerin tiroid dokusunu istila ederek parçalaması sonucu Anti-TPO ve Anti-TG antikörlerinin üretimi ile karakterize bir hastalıktır. En yaygın görülen otoimmün ve endokrin hastalıklardan birisidir.

miRNA'ların immün sistemi kontrol etmede önemli bir yeri olduğunu son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar açıkça göstermektedir. HT'de bunu tiroid dokusuna infiltre olan lenfositleri aktive ederek yaptıkları düşünülmektedir. Bu sebeple sirkülatuar miRNA'nın tanımlanması hastalığın kliniği ve patogenezinde önemli ve yeni bilgiler sağlayabilir.

Hashimoto Tiroiditi'nde yeni tanı anında ve aynı hastaların ötroid dönemdeki miRNA profili bu güne kadar henüz çalışılmamış bir konudur. Biz de bunu göz

önünde bulundurarak TSH'ın yüksek olduğu tanı anında ve aynı hastaların ötroid oldukları kontrol dönemindeki miRNA ekspresyon düzeylerini belirleyip sağlıklı kontrol grubu ile aralarında ekspresyon düzeyi açısından bir fark olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık. Çalışmamız ile HT'nin şimdiye dek tam olarak aydınlığa kavuşmamış olan patogeneze yeni bir bakış açısı sunarak hem literatüre katkı yapmayı planlıyoruz; hem de bu yeni bakış açısının HT güncel tedavisine yeni ufuklar açmasını bekliyoruz.

Çalışmamızda Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Endokrinoloji Polikliniği'ne gelen ve yeni tanı Hashimoto Tiroiditi olup TSH değerleri yüksek olan 34 hastadan tanı anında ve 3 ay sonra ötroid oldukları dönemdeki halleri ile endokrinoloji polikliniği'nde yapılan muayene ve tetkikler sonucu herhangi bir sağlık problemi tespit edilmeyen, hasta grubu cinsiyet ve yaşı ile uyumlu 33 gönüllü birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı bireylerden EDTA'lı kan örnekleri alınmıştır. Plazmada eksprese olduğu bilinen ve otoimmunité ile ilişkisi daha önceki çalışmalar ile ortaya konmuş 5 farklı miRNA'nın (mir-22, miR-141, miR-155, miR-375, miR-451) ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol grubunda çalışılmıştır.

Hasta ve kontrol grupları arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla RT-PCR verileri Qiagen Gene Globe Veri Analizi Merkezi portalı $\Delta\Delta C_t$ modülü kullanılarak analiz edilmiştir. (<http://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). Veri normalleştirmek için yine aynı analiz merkezinde bulunan "Global CT Mean Of expressed miRNAs" kullanıldı. Gruplar arasındaki miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkisi Student T testi ile analiz edildi ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi). Hasta grubun ilk tanı anı ve üç ay sonraki kontrol dönemi arasındaki TSH ve miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile hesaplanmıştır. Veriler IBM SPSS Statistics for Windows 23.0 istatistik paket programında analiz edilmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışma plazmadaki sirkülatuar miRNA'ların otoimmun bir hastalık olan HT'de hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle miR-451'in gen ekspresyonunda yeni tanı anındaki TSH'ı normal sınırın üzerinde olan hasta grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre 1,495 kat artış ($p=0,434$) saptanması; bununla birlikte hastaların tedavi sonrası TSH

değerlerinin normale döndüğü kontrol döneminde sağlıklı kontrollere göre aynı genlerin ekspresyonunda 0,545 kat azalma ($p=0,042$) gözlenmesi ve hasta grubunun kendi arasındaki karşılaştırmasında da TSH'ın yüksek olduğu dönemde normal olduğu döneme göre miR-451 gen ekspresyonları arasında 2,74 katlık artış ($p=0,00262$) tespit edilmesi miR-451'in hastalık aktivitesi ile yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Otoimmün bir hastalık olan HT, patogenezi hala aydınlatılamamış bir hastalıktır. miRNA'ların son yıllardaki hastalık patogenezlerindeki önemli etkilerinin ortaya konması ile birçok hastalık patogenezi aydınlatılmış, tedavi alternatifleri sunulmuştur. Bizim çalışmamız ile ortaya konulan sonuçlar ışığında HT patogenezini aydınlatmada ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde öncülük edecektir.

Anahtar kelimeler : Hashimoto Tiroiditi, miRNA, Otoimmünite

8. SUMMARY

THE ROLE OF MICRORNAS IN HASHIMOTO THYROIDITIS

microRNAs (miRNAs) are small noncoding 18 to 24 nucleotides long RNA molecules, that have emerged in recent years. Most of miRNAs are found in the cells but they can be found extracellular area, body fluids and blood. miRNAs are regulatory in processes such as cell proliferation, differentiation, metabolic processes, apoptosis, inflammation and regulation of immunological processes. Observations made in various studies have shown that miRNAs found in human plasma have high stability and miRNA expression pattern analysis performed in these samples may provide useful information on the status of various diseases. In addition to the samples which are obtained from solid tissues, miRNAs can also be determined in patient serum / plasma, providing a fairly easy sampling of diseases that require the use of invasive techniques. Any disease, cell type or tissue type mediated by gene or protein synthesis deficiency may constitute miRNA-based targets. miRNAs are developmentally important because they have a regulatory role in the production of protein by messenger RNAs, which is therapeutically important.

HT is one of the most common autoimmune and endocrine disease which characterized by the production of Anti-TPO and Anti-TG antibodies, which result in the breakdown of T and B lymphocytes by invading thyroid tissue. Scientific studies in recent years show that miRNAs have an important role in controlling the immune system. It is thought that HT activates lymphocytes that infiltrate the thyroid tissue. Thus, identification of the circulatory miRNA may provide important and novel information in clinical situations and disease pathogenesis.

At the time of new diagnosis in Hashimoto thyroiditis and euthyroid period of the same patients' miRNA profile has not been studied yet. We therefore aimed to

determine the miRNA expression levels at the time of new diagnosis and control period when the same patients were euthyroidized and to determine whether there is a difference in expression level between healthy control group and the patients' expression level. We are planning to make a contribution to the literature by presenting a new perspective on the pathogenesis of HT that has not yet fully attained enlightenment; And we expect that this new perspective will open new horizons to current HT treatment.

We took blood from 34 patient who were diagnosed as Hashimoto thyroiditis newly who came to the Endocrinology Polyclinic in Karadeniz Technical University Medicine Faculty, and were taken blood again 3 months after when they were euthyroid. And blood samples were taken in tube with EDTA from 33 voluntary individuals who were in agreement with the gender and age group of the patients who did not have any health problems after the examinations performed at the endocrinology polyclinic. Expression levels of 5 different miRNAs (mir-22, miR-141, miR-155, miR-375, miR-451) which were known to be connected autoimmunity were revealed by previous publications were studied in the patient and control group.

To quantitatively determine miRNA expression levels between patient and control groups, RT-PCR data were analyzed using the Qiagen Gene Globe Data Analysis Center portal $\Delta\Delta C_t$ module (<http://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). In order to normalize the data, "Global CT Mean of expressed miRNAs" was used in the same analysis center. Relation of expression levels between groups was also determined by the system by the Student T test and $p < 0.05$ was considered significant. Qualitative data are number and percentage; Measured data are presented with mean standard deviation and minimum maximum values. The relationship between TSH and miRNA expression level between the first diagnostic moment of the patient group and the control period after 3 months was calculated by Spearman correlation analysis. The data were analyzed in IBM SPSS Statistics for Windows 23.0 statistical package program.

The conclusion of our study is that circulating miRNAs in different levels of plasma may be associated with disease activity in HT. Specifically, the gene expression of miR-451 was found to be 1,495 fold increase ($p = 0.423$) in group H

compared to group S; In the N group, there was a 0.545 fold decrease ($p=0,042$) in the expression of the same genes according to the S group and we found 2,74 fold increase ($p= 0,00262$) between expression levels of mir-451 in H group compared to N group. These findings suggest that miR-451 is closely related to disease activity.

HT is an autoimmune disease and its pathogenesis is still unknown. Many of the pathogenesis of the disease has been clarified and treatment alternatives are presented by introducing the important effects of miRNAs on the disease pathogenesis in recent years. The results of our study will lead to clarify HT pathogenesis in light and to develop new therapeutic approaches.

Key words: Hashimoto Thyroiditis, miRNA, Autoimmunity.

9. KAYNAKLAR

1. Arıncı K ve Elhan A: A.Anotomi. Güneş Kitabevi. 2001, s.349-51
2. Kabalak T: Tiroid El Kitabı. Birinci baskı. Güven Kitapevi, İzmir, 2009.
3. Jameson JL and Weetman AP: Harrison Endokrinoloji (Türkçe çeviri 2006). Tiroid Bez Hastalıkları, Anatomi ve Gelişim. 2006, s.71.
4. Masters PA and Simons RJ: Clinical Use of Sensitive Assays For Thyroid-stimulating hormone. Journal Of General Internal Medicine. 11(2):115-27, 1996.
5. Jameson JL and Weetman AP: Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. 15. Edisyon. Tiroid Bezi Hastalıkları. Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2004, s.2060-75.
6. Kandi S, Pinnelli VB, Rao P, Ramana K: Effect Of Anti-Thyropoxidase On Thyroid Gland and Breast Tissue: A Comprehensive Review. American Journal of Medicine Studies, 2(2):34-7, 2014.
7. İlçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S: İç Hastalıkları. Güneş Tıp Kitabevi, Sıhhiye-Ankara, 2012, s. 2019-21.
8. Falk SA: Thyroid Disease Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine and Radiotherapy. Raven Press, New York, 1990, s. 644.
9. Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B: Effects Of Thyroid Hormone On The Cardiovascular System. Recent Progress In Hormone Research, 59(1):31-50, 2004.
10. Antonijević N, Nesović M, Trbojević B, Milosević R: Anemia In Hypothyroidism. Medicinski Pregled, 52(3-5):136-40, 1998.
11. Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, Kuroda Y: Development Of The Trainstem: Assessment By MR Imaging. Neuropediatrics, 22(03):139-46, 1991.

12. Venzani ES, Benoist C, Mathis D: Good Riddance: Thymocyte Clonal Deletion Prevents Autoimmunity. *Current Opinion In Immunology*, 16(2):197-202, 2004.
13. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF: Mapping The Major Susceptibility Loci For Familial Graves' and Hashimoto's Diseases: Evidence for Genetic Heterogeneity and Gene Interactions 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(12):4656-64, 1999.
14. Roitt I, Doniach D, Campbell P, Hudson RV: Auto-antibodies in Hashimoto's Disease (Lymphadenoid Goitre). *The Lancet*, 268(6947):820-1, 1956.
15. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM: Epidemiology And Estimated Population Burden Of Selected Autoimmune Diseases In The United States. *Clinical immunology and immunopathology*, 84(3):223-43, 1997.
16. Jameson JL and Weetman AP: *Harrison Endocrinology*. 2006.
17. Eguchi K. MN and Nagataki S: Cellular Immunity In Autoimmune Thyroid Cell. *Baillieres ClinEndocrinol and Metab*, 9-1:71, 1995.
18. Jones DEJ DA: The Basis Autoimmunity: An Overview. *Baillieres Clin. Endocrinology And Metab*, 9-11, 1995.
19. Mayer G, Nyland J: Major Histocompatibility Complex (MHC) And T-cell Receptors Role In Immune Responses. *Microbiology And immunology Online University of South Carolina School of Medicine, Columbia* <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm>, 2010.
20. Shimojo N, Saito K, Kohno Y, Sasaki N, Tarutani O, Nakajima H: Antigenic Determinants On Thyroglobulin: Comparison Of The Reactivities Of Different Thyroglobulin Preparations With Serum Antibodies And T Cells Of Patients With Chronic Thyroiditis*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 66(4):689-95, 1988.
21. Latrofa F, Ricci D, Grasso L, Vitti P, Masserini L, Basolo F, et al.: Characterization Of Thyroglobulin Epitopes In Patients With Autoimmune And Non-autoimmune Thyroid Diseases Using Recombinant Human Monoclonal Thyroglobulin Autoantibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(2):591-6, 2008.

22. Yoshida H, Amino N, Yagawa K, Uemura K, Satoh M, Miyai K, et al.: Association of Serum Antithyroid Antibodies with Lymphocytic Infiltration of the Thyroid Gland: Studies of Seventy Autopsied Cases*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 46(6):859-62, 1978.
23. Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M, Perret J, Ludgate M, et al.: Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochemical and biophysical research communications*, 165(3):1250-5, 1989.
24. Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B: Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 165(3):1184-90, 1989.
25. Ajjan R and Weetman A: Techniques to quantify TSH receptor antibodies. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 4(8):461-8, 2008.
26. McLachlan SM and Rapoport B: The Molecular Biology of Thyroid Peroxidase: Cloning, Expression and Role as Autoantigen in Autoimmune Thyroid Disease*. *Endocrine reviews*, 13(2):192-206, 1992.
27. Rebuffat SA, Nguyen B, Robert B, Castex F, Peraldi-Roux S: Antithyroperoxidase antibody-dependent cytotoxicity in autoimmune thyroid disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(3):929-34, 2008.
28. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al.: 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*, 87(2):489-99, 2002.
29. Barbesino G and Chiovato L: The genetics of Hashimoto's disease. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 29(2):357-74, 2000.
30. Pinchera CLMA: Thyroiditis. *Endocrinology and Metabolism*, 189,2001.
31. Balázs C: Hashimoto's thyroiditis, the model of organ-specific autoimmune disorders. *Orvosi hetilap*, 148(Supplement 1):31-3, 2007.

32. Tendon N, Zhang L, Weetman A: HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clinical endocrinology*, 34(5):383-6, 1991.
33. Weetman A: New aspects of thyroid immunity. *Hormone Research in Paediatrics*, 48(Suppl. 4):51-4, 1997.
34. Weetman AP , J.Larry Jameson: *Werner and Ingbar's The Thyroid*. 9th ed. Philadelphia, 2005.
35. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al.: Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science*, 275(5302):960-3, 1997.
36. Kawashima A, Tanigawa K, Akama T, Yoshihara A, Ishii N, Suzuki K: Innate immune activation and thyroid autoimmunity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(12):3661-71, 2011.
37. Fiducia M, Lauretta R, Lunghi R, Kyanvash S, Pallotti S: Hashimoto's thyroiditis and autoimmunity parameters: descriptive study. *Minerva medica*, 98(2):95-9, 2007.
38. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK: IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27:485-517,2009.
39. Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W: Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in immunology*, 32(12):603-11, 2011.
40. Pop VJ, Maartens LH, Leusink G, van Son MJ, Knottnerus AA, Ward AM, et al: Are Autoimmune Thyroid Dysfunction and Depression Related ? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(9):3194-7, 1998.
41. Jacobs A, Root J, Van Gorp W: Isolated global amnesia associated with autoimmune thyroid disease. *Neurology*, 66(4):605-, 2006.
42. Saravanan P and Dayan CM: Thyroid autoantibodies. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(2):315-37, 2001.

43. Meier DA and Kaplan MM: Radioiodine uptake and thyroid scintiscanning. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 30(2):291-313, 2001.
44. Aksoy DY, Kerimoğlu U, Okur H, Canpınar H, Karaağaoğlu E, Yetgin S, et al.: Effects of prophylactic thyroid hormone replacement in euthyroid Hashimoto's thyroiditis. *Endocrine journal*, 52(3):337-43, 2005.
45. Aksoy D, Gurlek A, Ringkananont U, Weiss R, Refetoff S: Resistance to thyroid hormone associated with autoimmune thyroid disease in a Turkish family. *Journal of endocrinological investigation*, 28(6):379-83, 2005.
46. Papapetrou P, MacSween R, Lazarus J, Harden RM: Long-term treatment of Hashimoto's thyroiditis with thyroxine. *The Lancet*, 300(7786):1045-8, 1972.
47. Okamura K, Sato K, Yoshinari M, Ikenoue H, Kuroda T, Nakagawa M, et al.: Recovery of the thyroid function in patients with atrophic hypothyroidism and blocking type TSH binding inhibitor immunoglobulin. *Acta endocrinologica*, 122(1):107-14, 1990.
48. Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS: The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29(3):288-99, 2007.
49. Zhou H, Hu H, Lai M: Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biology of the Cell*, 102(12):645-55, 2010.
50. Mattick JS: Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports*, 2(11):986-91, 2001.
51. Mattick JS: Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays*, 25(10):930-9, 2003.
52. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J: A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 7(4):147-54, 2009.
53. Hammond SM: MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends in molecular medicine*, 12(3):99-101, 2006.

54. Ruvkun G: Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 294(5543):797-9, 2001.
55. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843-54, 1993.
56. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH: Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development*, 15(20):2654-9, 2001.
57. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al.: Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808):86-9, 2000.
58. Griffiths-Jones S: The microRNA registry. *Nucleic acids research*, 32(suppl 1):D109-D11, 2004;.
59. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y: The microRNA pathway and cancer. *Cancer science*, 101(11):2309-15, 2010.
60. Sontheimer EJ: Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2):127-38, 2005.
61. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209-16, 2003.
62. Ouellet DL, Perron MP, Gobeil L-A, Plante P, Provost P: MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *BioMed Research International*, 2006.
63. Hutvagner G and Zamore PD: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297(5589):2056-60, 2002.
64. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(2):126-39, 2009.
65. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17):4663-70, 2002.

66. Kim DH, Sætrom P, Snøve O, Rossi JJ: MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42):16230-5, 2008.
67. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858):1931-4, 2007.
68. Iorio MV and Croce CM: microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 33(6):1126-33, 2012.
69. Wong T-S, Ho W-K, Chan J, Ng R, Wei WI: Mature miR-184 and squamous cell carcinoma of the tongue. *ScientificWorldJournal*, 9:130-2, 2009.
70. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 101(9):2999-3004, 2004.
71. Cogen PH and McDonald JD: Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 29(1):103-12, 1996.
72. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, et al: Allelic loss in colorectal carcinoma. *Jama*, 261(21):3099-103, 1989.
73. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853-8, 2001.
74. Neely LA, Patel S, Garver J, Gallo M, Hackett M, McLaughlin S, et al: A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. *Nature Methods*, 3(1):41-6, 2006.
75. Xie X, Lu J, Kulbokas E, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al: Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031):338-45, 2005.
76. Xiong J: Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. *Current molecular medicine*, 12(3):247-58, 2012.

77. Ma X, Zhou J, Zhong Y, Jiang L, Mu P, Li Y, et al: Expression, regulation and function of microRNAs in multiple sclerosis. *Int J Med Sci*, 11(8):810-8, 2014.
78. Brusselle GG and Bracke KR: MicroRNA miR-22 drives TH17 responses in emphysema. *Nature immunology*, 16(11):1109-10, 2015.
79. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al: A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432(7014):226-30, 2004.
80. Zhang N, Lin J-k, Chen J, Liu X-f, Liu J-l, Luo H-s, et al: MicroRNA 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF) regulating pro-opiomelanocortin (POMC) expression by targeting mitogen-activated protein kinase 8. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15):10361-73, 2013.
81. Bleck B, Grunig G, Chiu A, Liu M, Gordon T, Kazeros A, et al: MicroRNA-375 regulation of thymic stromal lymphopoietin by diesel exhaust particles and ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 190(7):3757-63, 2013.
82. Lu TX and Rothenberg ME: Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 132(1):3-13, 2013.
83. Kapsimali M, Kloosterman WP, De Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW: MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome biology*. 2007;8(8):R173.
84. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, Van Obberghen E: miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic β -cells. *Diabetes*. 57(10):2708-17, 2008.
85. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E: miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1792(6):497-505, 2009.
86. Tam W: Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*. 274(1):157-67, 2001.

87. Sharma AR, Sharma G, Lee SS, Chakraborty C: miRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Medicinal research reviews*. 2016.
88. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL: Micro-RNA-155 inhibits IFN- γ signaling in CD4+ T cells. *European journal of immunology*. 40(1):225-31, 2010.
89. Kidd P: Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review*. 8(3):223-46, 2003.
90. Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, Zhang Z, Gai X, Tobias JW, et al: A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(9):3333-8, 2008.
91. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N, et al: Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PloS one*. 6(9):e24145, 2011.
92. Rosenberger CM, Podymnagin RL, Navarro G, Zhao G-W, Askovich PS, Weiss MJ, et al: miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *The Journal of Immunology*. 189(12):5965-75, 2012.
93. Murata K, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, et al: MicroRNA-451 Down-Regulates Neutrophil Chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis & rheumatology*. 66(3):549-59, 2014.
94. Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y: Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Translational Research*. 160(3):198-206, 2012.
95. Pan X, Wang R, Wang Z-X: The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Molecular cancer therapeutics*. 12(7):1153-62, 2013.
96. Liu H, Brannon AR, Reddy AR, Alexe G, Seiler MW, Arreola A, et al: Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma. *BMC systems biology*. 4(1):1, 2010.

97. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio C-WJ, et al: Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity*. 28(1):112-21, 2008.
98. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-j, Li L, Marinos N, et al: Conversion of peripheral CD4+ CD25– naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*. 198(12):1875-86, 2003.
99. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*. 178(7):4022-6, 2007.
100. Waite JC and Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International journal of inflammation*. vol.2012, 2011.
101. Honardoost MA, Naghavian R, Ahmadinejad F, Hosseini A, Ghaedi K: Integrative computational mRNA–miRNA interaction analyses of the autoimmune deregulated miRNAs and wellknown Th17 differentiation regulators: An attempt to discover new potential miRNAs involved in Th17 differentiation. *Gene*. 572(2):153-62, 2015.
102. Pekow JR and Kwon JH: MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 18(1):187-93, 2012.
103. Wang G, Tam L, Li E, Kwan B, Chow K, Luk C, et al: Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 20(5):493-500, 2011.
104. Zibert JR, Løvendorf MB, Litman T, Olsen J, Kaczkowski B, Skov L: MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *Journal of dermatological science*. 58(3):177-85, 2010.
105. Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, Hüttelmaier S: Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene*. 29(29):4237-44, 2010.

106. Weijl N, Van der Harst D, Brand A, Kooy Y, Van Luxemburg S, Schroder J, et al: Hypothyroidism during immunotherapy with interleukin-2 is associated with antithyroid antibodies and response to treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 11(7):1376-83, 1993.
107. Dai R and Ahmed SA: MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational Research*. 157(4):163-79, 2011.
108. Gurol T, Zhou W, Deng Q: MicroRNAs in neutrophils: potential next generation therapeutics for inflammatory ailments. *Immunological Reviews*. 273(1):29-47, 2016.
109. Lu LF and Liston A: MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*. 127(3):291-8, 2009.
110. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, et al: Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*. 205(9):1983-91, 2008.
111. Persengiev SP: miRNAs at the crossroad between hematopoietic malignancies and autoimmune pathogenesis. *Discovery medicine*, 13(70):211-21, 2012.
112. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *science*. 303(5654):83-6, 2004.
113. Xiao C and Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 136(1):26-36, 2009.
114. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, et al: Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*. 19(4):489-501, 2005.
115. Liston A, Lu L-F, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Rudensky AY. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *The Journal of experimental medicine*. 205(9):1993-2004, 2008.

116. Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C, et al: Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*. 132(5):860-74, 2008.
117. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al: Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 316(5824):608-11, 2007.
118. Thai T-H, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al: Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 316(5824):604-8, 2007.
119. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN: Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 316(5824):575-9, 2007.
120. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al: Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 129(2):303-17, 2007.
121. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP: The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 455(7209):64-71, 2008.
122. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 455(7209):58-63, 2008.
123. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-97, 2004.
124. Santarosa M and Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 1654(2):105-22, 2004.
125. Seidman J and Seidman C: Transcription factor haploinsufficiency: when half a loaf is not enough. *The Journal of clinical investigation*. 109(4):451-5, 2002.
126. Smilenov LB: Tumor development: haploinsufficiency and local network assembly. *Cancer letters*. 240(1):17-28, 2006.

127. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA: MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 8(8):467-77, 2011.
128. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M: MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*. 13(5):358-69, 2012.
129. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al: Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*. 33(20):e179-e, 2005.
130. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>. 2016
131. de Quervain DJ, Henke K, Aerni A, Coluccia D, Wollmer MA, Hock C, et al: A functional genetic variation of the 5-HT_{2a} receptor affects human memory. *Nature neuroscience*. 6(11):1141-2, 2003.
132. GÜNEL T: Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 27(5):763-7, 2007.
133. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM : *Williams text book of endocrinology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders Publ. 2011.
134. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y: Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid*. 19(5):495-501, 2009.
135. Weetman AP and McGregor A: Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrine reviews*. 15(6):788-830, 1994.
136. Ben-Skowronek I, Szewczyk L, Kulik-Rechberger B, Korobowicz E: The differences in T and B cell subsets in thyroid of children with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *World Journal of Pediatrics*. 9(3):245-50, 2013.
137. Miossec P and Kolls JK: Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews Drug discovery*. 11(10):763-76, 2012.

138. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar MdJ, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N: Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *International journal of inflammation*. 2014;12, 2014.
139. Liu Y, Tang X, Tian J, Zhu C, Peng H, Rui K, et al: Th17/Treg cells imbalance and GITRL profile in patients with Hashimoto's thyroiditis. *International journal of molecular sciences*. 15(12):21674-86, 2014.
140. Qin Q, Liu P, Liu L, Wang R, Yan N, Yang J, et al: The increased but non-predominant expression of Th17-and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 45(12):1202-8, 2012.
141. Ambros V: The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431(7006):350-5, 2004.
142. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J: MicroRNAs: a developing story. *Current opinion in genetics & development*. 15(2):200-5, 2005.
143. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K: Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 717(1):85-90, 2011.
144. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al: Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*. 15(17):5473-7, 2009.
145. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE: The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecologic oncology*. 112(1):55-9, 2009.
146. Qian C, Yao D, Jiang T, Chen S, Wu C, Zhou Y, et al: MicroRNA profile in peripheral blood T cells of patients with primary biliary cirrhosis. *Clinical Science*. CS20080002, 2008.
147. Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L: Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Molecular biology reports*. 39(5):6219-25, 2012.

148. Yamada H, Itoh M, Hiratsuka I, Hashimoto S: Circulating microRNAs in autoimmune thyroid diseases. *Clinical endocrinology*. 81(2):276-81, 2014.
149. Wang C, Yang S, Sun G, Tang X, Lu S, Neyrolles O, et al: Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PloS one*. 6(10):e25832, 2011.
150. Churov AV, Oleinik EK, Knip M: MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential. *Autoimmunity reviews*. 14(11):1029-37, 2015.
151. Bernecker C, Lenz L, Ostapczuk MS, Schinner S, Willenberg H, Ehlers M, et al: MicroRNAs miR-146a1, miR-155_2, and miR-200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid*. 22(12):1294-5, 2012.
152. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 19(1):683-765, 2001.
153. Fitzgerald DC, Zhang G-X, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al: Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27–stimulated T cells. *Nature immunology*. 8(12):1372-9, 2007.
154. Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, et al: The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*. 19(5):645-55, 2003.
155. An H, Xu H, Zhang M, Zhou J, Feng T, Qian C, et al: Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity-and PI-3K-independent mechanism. *Blood*. 105(12):4685-92, 2005.
156. McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, et al: IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 285(27):20492-8, 2010.
157. Rodríguez-Muñoz A, Martínez-Hernández R, Ramos-Leví AM, Serrano-Somavilla A, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F, et al: Circulating microvesicles regulate Treg and Th17 differentiation in human autoimmune thyroid disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 100(12):E1531-E9, 2015.

158. Dorris ER, Smyth P, O'Leary JJ, Sheils O: MIR141 expression differentiates Hashimoto thyroiditis from PTC and benign thyrocytes in Irish archival thyroid tissues. *Frontiers in endocrinology*. 3:102, 2012.
159. Huang Z, Shi T, Zhou Q, Shi S, Zhao R, Shi H, et al: miR-141 Regulates colonic leukocytic trafficking by targeting CXCL12 β during murine colitis and human Crohn's disease. *Gut*. 63(8):1247-57, 2014.
160. Dai Y, Huang Y-S, Tang M, Lv T-Y, Hu C-X, Tan Y-H, et al: Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 16(12):939-46, 2007.
161. Lu TX, Lim E-J, Wen T, Plassard AJ, Hogan S, Martin L, et al: MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome. *Mucosal immunology*. 5(4):388-96, 2012.
162. Pandey DP and Picard D: miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor α mRNA. *Molecular and cellular biology*. 29(13):3783-90, 2009.
163. Liu H-b, Loo KK, Palaszynski K, Ashouri J, Lubahn DB, Voskuhl RR: Estrogen receptor α mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *The Journal of Immunology*. 171(12):6936-40, 2003.
164. L  lu K, Laffont S, Delpy L, Paulet P-E, P  rinat T, Tschanz SA, et al: Estrogen receptor α signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. 187(5):2386-93, 2011.
165. Lu W, You R, Yuan X, Yang T, Samuel EL, Marcano DC, et al: The microRNA miR-22 inhibits the histone deacetylase HDAC4 to promote T(H)17 cell-dependent emphysema. *Nat Immunol*. 16(11):1185-94, 2015.
166. Liu R, Ma X, Xu L, Wang D, Jiang X, Zhu W, et al: Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 97(6):E968-E72, 2012.