



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GRAVES HASTALARINDA MicroRNA EKSPRESYONU VE İRİSİN DÜZEYİ

(UZMANLIK TEZİ)

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜZİN FİDAN YAYLALI

DR. AYŞEGÜL MERÇ ÇETİNKAYA

DENİZLİ-2018



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GRAVES HASTALARINDA MicroRNA EKSPRESYONU VE İRİSİN DÜZEYİ

(UZMANLIK TEZİ)

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜZİN FİDAN YAYLALI

DR. AYŞEGÜL MERÇ ÇETİNKAYA

DENİZLİ-2018

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 09.12.2016 tarih ve 2016TIPF027 nolu kararı ile desteklenmiştir.

ONAY SAYFASI

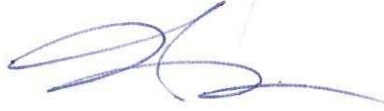
Prof. Dr. Güzin FİDAN YAYLALI danışmanlığında Dr. Ayşegül MERCİ ÇETİNKAYA tarafından yapılan 'GRAVES HASTALARINDA MicroRNA EKSPRESYONU VE İRİSİN DÜZEYİ' başlıklı tez çalışması 29.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

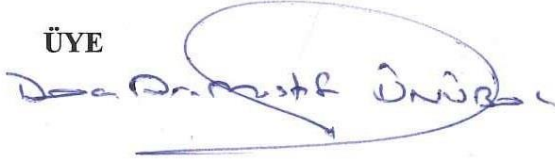
Prof. Dr. Güzin Fidan Yaylalı



ÜYE Dr. S. Üyesi Seray Topaloğlu



ÜYE



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

.../.../...

Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ
Dekan

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve her daim deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Güzin FİDAN YAYLALI' ya ve uzmanlık eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Gebelik ve doğum sonrası dönemimde tezimin aksamamasında büyük payı olan, çalışmadaki yokluğumu büyük bir özveriyle kapatan Tıbbi Biyoloji AD' dan Doç. Dr. Yavuz DODURGA ve Arş. Gör. Dr. Levent ELMAS' a,

Asistanlık eğitimimde birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli asistan arkadaşlarıma ve kliniğimizin tüm çalışanlarına,

Beni bugünlere sevgiyle, emekle getiren, her zaman desteğini sorgusuz sualsiz benimle bulduğum, biricik fedakar annem Tekgül Merç ve babam Hamdi Kudret Merç'e,

Gerek tıp fakültesi, gerekse asistanlık eğitimim süresince hiçbir desteği benden esirgemeyen sevgili kardeşlerim Pınar ve Şafak Merç'e,

13 yıllık yol arkadaşım, en yakın dostum, varlığıyla bana güç veren, destek ve anlayışını benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Yılmaz Çetinkaya'ya,

En önemlisi, geceleri mışıl mışıl uyuyarak tezimi yazmama en büyük desteği gösteren, gelişiyile hayatıma anlam katan, her an varlığına şükrettiğim, bu hayattaki en değerlim, canım kızım Yağmur Çetinkaya'ya,

Sonsuz teşekkürlerimle...

Dr. Ayşegül MERÇ ÇETİNKAYA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	3
TEŞEKKÜR	4
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	5
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	7
TABLolar DİZİNİ	9
ÖZET	11
SUMMARY	13
1.GİRİŞ VE AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. Graves hastalığı	16
2.1.1. Tanı	21
2.1.2. Tedavi	21
2.1.2.1. Medikal tedavi	22
2.1.2.2. Radyoaktif iyot tedavisi	23
2.1.2.3. Cerrahi tedavi	23
2.2. İrisin	24
2.2.1. İrisin ve tiroid ilişkisi	25
2.3. miRNA	26
2.3.1. miRNA ve tiroid ilişkisi	26

3.MATERYAL VE METOD	28
3.1 Kontrol ve Hasta Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu	29
3.2 Kontrol ve Hasta Örneklerinden RNA İzolasyonu	30
3.3 Kontrol ve Hasta RNA örneklerinden miRNA komplementer DNA (cDNA) sentezi	31
3.4 miRNA-22, -154, -375, -376b ve -451 gen ekspresyonunun gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile tespiti	32
3.5 Enzim-bağlı İmmünosorbent Analizi (ELIZA) Yöntemi ile İrisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	33
3.6 İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ	65
7. KAYNAKLAR	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GH : Graves Hastalığı

TSH: Tiroid Stimulan Hormon

TFT: Tiroid Fonksiyon Testleri

sT3/FT3: Serbest T3 hormonu

sT4/FT4: Serbest T4 hormonu

TRAb: TSH Reseptör Antikoru

OITH: Otoimmün Tiroid Hastalığı

TPO: Tiroid peroksidaz

Tg: Tiroglobulin

RNA: Ribonükleik asit

miRNA: MicroRNA

DNA: Deoksiribonükleik asit

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

NK: Natural killer

ATI: Antitiroid ilaç

MMI: Metimazol

PTU: Propiltiourasil

DTK: Diferansiye tiroid karsinomu

MTK: Medüller tiroid kanseri

LT4: Levotiroksin

FNDC5: Fibronektin tip III domain 5

PKMH: Periferal kan mononükleer hücreleri

ERa: Östrojen reseptör alfa

TSLP: Timik stromal lenfopoetini

Hb: Hemoglobin

AKŞ: Açlık kan şekeri

ALT: Alanin amino transferaz

LDL: Düşük yoğunluklu (low dansity) lipoprotein

HDL: Yüksek yoğunluklu (high dansity) lipoprotein

BMI: Vücut kitle oranı (Body Mass Index)

CK: Kreatin kinaz

FDNC: Fibronectin type III domain-containing protein (Tip 3 fibronektin içeren protein)

GREAT: Graves' Recurrent Events After Therapy (Tedavi sonrası olan Graves nöksleri)

TBII: Thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins (Tirotropin bağlantı inhibitör immunglobulini)

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

CAS: Klinik Aktivite Skoru

INDIGO: Investigation of Novel biomarkers and Definition of the role of the microbiome In Graves' Orbitopathy (Graves orbitopatisi'ni öngörebilecek yeni biyobelirteçlerin araştırması)

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (Trombosit ilişkili büyüme faktörü)

PDCD: Programmed Cell Death (Programlanmış hücre ölümü)

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. GREAT ve GREAT+ skOrlama sistemleri

Tablo 2. PREDIGO skOrlama sistemi

Tablo 3. cDNA sentezi için reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarlar

Tablo 4. Gerçek-zamanlı PCR çalışması için reaksiyon karışımı

Tablo 5. İrisin Eliza kiti içerisinde bulunan ekipmanlar

Tablo 6. İrisin Eliza kiti için standart konsantrasyonu ve standart çalışma konsantrasyonları

Tablo 7. Örnekleme grubumuzun cinsiyet ve yaş durumu

Tablo 8. Çalışma için kan alındığı sıradaki laboratuvar bulguları.

Tablo 9. Hasta ve kontrol grubu serum irisin düzeyleri

Tablo 10. Hastaların tiroid hormon durumlarına göre serum irisin düzeyleri

Tablo 11. Graves hastalarının oftalmopati durumuna göre serum irisin düzeyleri

Tablo 12. Relaps yaşamış ve yaşamamış Graves hastalarının irisin düzeyleri

Tablo 13. Graves hastalarının tiroid bezi boyutlarına göre serum irisin düzeyleri

Tablo 14. Graves hastalarının tiroide nodül varlığına göre serum irisin düzeyleri

Tablo 15. Graves hastalarının aldıkları tedavi modellerine göre serum irisin düzeyleri

Tablo 16. Graves hastalarının TRAb pozitif/negatif oluşlarına göre irisin düzeyleri

Tablo 17. Hasta ve kontrollerin miRNA düzeyleri

Tablo 18. Çalışmadaki tüm bireylerin cinsiyetlerine göre miRNA düzeyleri

Tablo 19. Hastaların tiroid hormon durumlarına göre miRNA düzeyleri

Tablo 20. Graves hastalarında oftalmopati varlığına göre miRNA düzeyleri

Tablo 21. Graves hastalarında relaps durumuna göre miRNA düzeyleri

Tablo 22. Hastaların tiroid boyutuna göre miRNA düzeyleri

Tablo 23. Hastaların nodül varlığına göre miRNA düzeyleri

Tablo 24. Hastaların tedavi şekillerine göre miRNA düzeyleri

Tablo 25. Hastaların TRAb düzeylerine göre miRNA düzeyleri

ÖZET

Graves hastalarında microRNA ekspresyonu ve İrisin düzeylerinin araştırılması

Dr. Ayşegül Merç Çetinkaya

Tiroid fonksiyon bozukluğu halinde serum irisın düzeyleri ve mikroRNA(miRNA) ekspresyonlarında değişmeler olduğu saptanmıştır. İrisin, yeni keşfedilen egzersiz kaynaklı PGC – 1 alfa mevcudiyetinde saptanan hormon benzeri bir adipo-myokin regülatördür. PGC – 1 alfa vücuttaki her bir organın enerji metabolizmasında ve metabolik hastalıkların düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir maddedir. Bu sebeple PGC – 1 alfa ve dolayısıyla irisinin hipo/hipertiroidi gibi metabolizma ilişkili hastalıklarda serum seviyelerinde anlamlı değişiklikler olabileceği düşünölmüştür. Ayrıca son zamanlarda posttranskripsiyonel aşamada genlerin ekspresyonlarının regölasyonunda görev alan miRNA'lar çok dikkat çekmektedir. Birçok otoimmün hastalık için ön tanıda anlamlı bir belirteç olarak kabul edilmektedirler. Bunun üzerine Graves Hastalığı(GH) gibi otoimmün tiroid hastalığı(OITH) olan kişilerde yapılan çalışmalarda da, miRNA ekspresyonu yönünden anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada GH tanısını yeni alan ya da mevcut tanıli hastalardaki irisın düzeyleri ile miRNA ekspresyonlarına bakılarak klinikte faydalı olabilecek yeni bir tanısal ve takipsel belirteç elde edebilmeyi amaçladık. Çalışmaya GH tanıli 30 hasta dahil edildi. Tüm hastalar ve sağlıklı kontrollerde irisın düzeyi ile belirlenen miRNA ekspresyonlarına bakıldı ve aralarındaki farklılık incelendi. Hasta ve kontrol grubu arasında ne irisın düzeyi ne de seçili miRNA ekspresyonları açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi. Ultrasonografi ile ölçölen tiroid hacimlerine göre serum irisın seviyeleri karşılaştırıldığında, normal boyutta tiroid bezi olanlar ile büyümüş tiroid bezi olanlar arasında anlamlı farklılık izlendi (p 0,014). Oftalmopatisi olan hastalar ile tanı sonrası relaps yaşamış hastaların serum irisın seviyeleri oftalmopatisi olmayan ve relaps yaşamayanlara göre daha yüksek saptandı,

ama istatistiksel açıdan sınırda p değerine sahipti (p değerleri sırasıyla 0,069 ve 0,07). Relaps yaşamış hastalar ile hiç relaps yaşamamış hastalar arasında miR-154 ekspresyonunda anlamlı ölçüde farklılık saptandı (p 0,035). miR-22 kadın hastalarda erkeklere göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptandı (p 0,035). Tüm bu sonuçlara göre irisin, miR-22 ve miR-154' ün Graves hastalığı için yeni prognostik belirteçler olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu düşüncenin anlamlı ölçüde kanıtlanabilmesi için hasta popülasyonunun daha geniş tutulması ve sadece yeni tanı olan, henüz tedavi almamış hastalar ile çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Graves hastalığı(GH), Otoimmün tiroid hastalığı(OITH), İrisin, mikro RNA(miRNA)

SUMMARY

Investigation of microRNA expression and

Irisin levels in Graves' patients

Dr. Ayşegül Merç Çetinkaya

In the case of thyroid dysfunction, serum miRNA and Irisin levels were found to vary. Irisin is a hormone-like adipo-myokine regulator identified in the presence of newly discovered exercise-induced PGC-1 alpha. PGC-1 alpha is a substance that plays an important role in energy metabolism of each organ in the body and regulation of metabolic diseases. Therefore, it was thought that PGC-1 alpha and Irisin levels may vary in metabolism related diseases such as hypo / hyperthyroidism. In addition, recently microRNAs are noticed as involving in the regulation of expression of genes in the posttranscriptional stage. For many autoimmune diseases, they are accepted as a diagnostic marker. On the other hand, there are recent researchs showing miRNA expression in autoimmune thyroid diseases, such as Graves' Disease. In this study, we aimed to obtain a new diagnostic and follow-up marker that could be helpful in clinical practice by looking at miRNA expression and Irisin levels in Graves' disease. A total of 30 patients of GH who is newly diagnosed or who had been diagnosed previously and actively treated or previously treated were included to study. Irisin and determined miRNA levels were measured in all patients. The same markers were also observed in the 30 control group individuals selected with the previously specified exclusion criteria. Irisin and miRNA levels were compared between these two groups. There was no significant difference between these groups' irisin and selected miRNAs levels. There was a significant difference between irisin levels of patients' whose thyroid volume was measured normal and enlarged ($p: 0.014$). Patients with ophthalmopathy or relapse had a higher serum irisin levels than patients who had no ophthalmopathy or relapse, but this wasn't a significant difference (respectively $p: 0.069$, $p: 0.07$). There was a significant difference between the miR-154 expression of the patients with relapse and without relapse ($p: 0.035$).

According to these results, miR-22, miR-154 and irisin may be new prognostic markers for Graves' disease. However, in order to prove this hypothesis, studies with larger population including newly diagnosed patients are needed.

Key words: Graves' disease(GD), Autoimmune thyroid disease(AITD), Irisin, microRNA(miRNA)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otoimmün tiroid hastalığının iki ana grubundan birini oluşturan Graves hastalığının etyolojisinde genetik ve çevresel faktörler önemli yer tutmaktadır. Bu hastalığın şiddeti ve semptomları birçok faktöre bağlı değişebilmektedir. Klinikte hipertiroidi ile görülmektedir. Bilindiği üzere tiroid hormonları vücutta metabolizmayı düzenleyen en önemli faktörlerden birisidir. Bu sebeple de, metabolizmayı etkileyen diğer faktörler ile olabilecek ilişkisi önem taşımaktadır. Son dönemde artmış oranda irisin ve tiroid fonksiyonlarının ilişkisinin araştırılması da işte bu sebeptir. İrisin, yeni keşfedilen egzersiz kaynaklı PGC-1 alfa mevcudiyetinde saptanan hormon benzeri bir adipo-myokin regülatördür. PGC-1 alfa vücuttaki organların enerji metabolizmasında ve metabolik hastalıkların düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir maddedir (1). Bu sebeple PGC-1 alfa ve dolayısıyla irisinin metabolizma ilişkili hastalıklarda serum seviyelerinde anlamlı değişiklikler olabileceği düşünülmüştür. İrisin, myositler tarafından salgılanır ve miyositlerden diğer vücut dokularına bazı sinyaller iletir. Bu iletilen sinyallerle metabolizma ve termogenez düzenlenir (2). İrisin ve tiroid hormonlarının metabolizma üzerinde benzer etkileri olduğu bilindiğinden dolayı aralarında potansiyel karşılıklı(mutual) ilişkinin olup olmadığının araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Son zamanlarda GH gibi sebebi tam anlaşılamayan hastalıkların mekanizmasında epigenetik faktörlerin önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Epigenetik faktörler, posttranskripsiyonel aşamada genlerin ekspresyonlarının regülasyonunda görev alırlar. miRNA'ların da bu regülasyonda önemli rolleri vardır (3). Bu sebeple, OITH'nın şiddeti ve seyri ile miRNA ekspresyonları arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmaya başlanmıştır.

İrisinin tiroid fonksiyonları ile bir ilişkisi olduğu varsayımının güçlenmesi; miRNA ilişkili çalışma sonuçlarında miRNA'ların OITH tedavisinde hedef olabileceği, hastalığın aktivite ya da progresyonunu gösterebileceğinin anlaşılması üzerine biz de çalışmamızda Graves hastalarının irisin ve miRNA düzeylerine bakarak GH'nın tedavi, survey ve progresyonu açısından yeni belirteçler elde edebilmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Graves Hastalığı

GH, hipertiroidi ve diffüz guatr ile karakterize antikor aracılı otoimmün bir hastalıktır, oftalmopati ve dermatopati eşlik edebilir (4,5). Endokrin hastalıklar içinde diabetes mellitustan sonra ikinci sıklıkta görülür (6). Tiroid stimulan hormon(TSH) reseptör antikor(TRAAb) %90'ında pozitif saptanır. Ayrıca diğer OITH belirteçleri de pozitif olabilir (Anti-TPO veya anti-Tg). Patogenezinde otoimmünite önemli bir faktör olarak görülmektedir.

Periferik kan mononükleer hücreleri(PKMH) T hücreleri, B hücreleri, monositler ve daha küçük miktarlarda NK hücrelerinden oluşur. GH'ın patogenezinde bu immün hücreler tiroidlere karşı tiroid dokusu içine infiltrat olup otoantikorlar üretirler. Sonrasında tiroid bezi bu otoantikorlar ile anormal uyarılarak aşırı tiroid hormonu üretir ve hipertiroidiye sebep olur. Hipertiroidin; tiroid bezinin büyümesi ve genel olarak immün cevabın uyarılması gibi birçok açıdan önemli fizyolojik etkileri vardır. Tüm bu patogeneze sonucunda da, GH gelişimi ve alevlenmesi görülür (3,7).

GH en sık orta yaş (20-40 yaş) kadınlarda görülür. Yetişkinlerde yıllık insidans, bölgenin iyot durumuna göre değişmekle birlikte ortalama 1-10/100.000 olarak bildirilmektedir. GH'nın etyolojisinde genetik ve çevresel multifaktöriyel etkenler vardır (4). Genetik kökeni olan GH'nda, aileden bir bireyde OITH varsa, diğer bireylerde de olma olasılığı artmıştır. Özellikle kadınlar risk altındadır. Hastalıktan tek bir genetik bozukluk sorumlu değildir, poligenik veya kompleks bir genetik bozukluk olduğu varsayılır. GH'nın birçok çalışmada sıklıkla emosyonel stres sonrası ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu durum, stres anında immüsupresyon olması ve stres sonrası immün bir alevlenmenin olması ile ilişkilendirilmiştir. Hamilelikte ortaya çıkan immüsupresyon da sıklıkla hastalık seyrini olumlu etkilemektedir (8).

Oftalmopati hastaların çoğunda tanı anında veya hipertiroidi tedavisi başlandıktan sonraki ilk 6 ay içerisinde görülür. Çoğunda göze kum kaçma hissi, fotofobi, aşırı göz yaşarması gibi hafif göz semptomları, %70' inde bulgu

olarak görünümde değişiklik mevcuttur. Hastaların %3-5' inde görmeyi tehdit edebilecek ciddi tutulum mevcuttur. En sık bulgu üst göz kapağı retraksiyonudur (%90-98). Orbitopatinin değerlendirilmesinde 'aktivite' ve 'şiddet' ibareleri kullanılır. Aktivitenin hesaplanmasında inflamasyon bulguları puanlanarak yapılan 'Klinik Aktivite Skoru' (CAS) kullanılır. Fonksiyonel ya da kozmetik değişikliklerin derecesi ise hastalık şiddeti ile tanımlanır (18).

GH'nın %90'ında tiroperoksidaza karşı antikorlar bulunur (anti-TPO) (9,10). Tiroglobuline karşı antikorlar ise daha düşük oranlarda, yaklaşık olarak hastaların %50'sinde saptanır (11). GH'nda tiroid stimulanların IgG yapısında oldukları ve TSH'dan farklı olarak TSH reseptörünü uzun süreli hedef aldıkları fark edilmiştir (12). Geliştirilen ölçüm sistemleri, tedavi edilmemiş Graves hastalarının %95'inden fazlasında TSH reseptör antikorunun saptanmasını sağlamıştır (13). Bu immünoglobulinlerin GH'nın patogenezindeki önemini gösteren en güçlü kanıtlar şunlardır: 1) Etkilenen hastaların IgG'lerinin invitro tiroid hücresel aktivitesini stimüle etmesi, 2) Gebe kadınlarda fetusa otoantikör geçişi sonucu hipertiroidizm oluşması (14). Bu antikorlar tiroid hücre membranındaki antijenik bölgelere bağlanarak adenilat siklazı aktive ederler ve böylece tiroidde büyüme, vaskülarite artışı ve hormon hipersekresyonu ile sonuçlanan bir dizi olayı başlatırlar.

GH'nın tirotoksik kliniğinin gidişi de oldukça değişkendir. Bazı hastalarda tirotoksikoz farklı ciddiyetlerde devam ederken, bazılarında değişen sıklık, ciddiyet ve sürede sıklık remisyonlar görülebilmektedir. Bu sıklık özellik de tedavideki zorluklardan biridir. Remisyon olasılığını değerlendirmede ötiroidi sağlamak için gerekli antitiroid ilaç dozu, başlangıç tiroid fonksiyon testleri, tiroid bezinin volümü, TRAb düzeyi, başlangıçta oftalmopati varlığı değerlendirilen faktörler olmakla birlikte yeterli değildir. Bu nedenle klinik gidişin veya tedaviye cevabın öngörülmesini sağlayacak her belirleyici, tedavi kararı ve hastalık takibine önemli bir katkı sağlayacaktır (15). Bu konuda 2016 yılında bir çalışma yayınlanmış ve Graves hastalığının nüks riskini öngördüren ve dolayısıyla terapötik yaklaşıma yardımcı olacak tedavi öncesi bulgular ile ilgili bir skorlama sisteminden bahsedilmiştir (16). GREAT ismi verilen ve 4 basit klinik parametre ile yapılan skorlamada hastalar

0 ile 6 arasında puanlamaya tabi tutularak nüks riski açısından 3 sınıfa ayrılmıştır; class I' de %16, class II' de %44, class III' te ise %68 oranında nüks riski olduğu saptanmıştır (Tablo 1). Skorlamada nüks riski açısından tedavi öncesinde bakılması önerilen parametreler yaş, WHO' ya göre guatr boyutu, TBII ve fT4 düzeyidir. Skorlamaya 5.değişken olarak genetik testlerin (PTPN22, HLA vs.) de eklenmesi halinde skorlama GREAT+ olarak isimlendirilmektedir ve bu skorlamada hastalar 0 ile 10 arasında puanlanarak nüks oranı açısından 4 ayrı sınıfa ayrılmaktadır. Class I' e düşen hastalara tedavi sonrası öngörülen nüks riskinin düşük oranda olması sebebiyle ATİ tedavisi önerilmektedir. Bu sınıfa genetik testler eklendiğinde remisyon/nüks açısından çok az faydası olmaktadır. Halbuki class II'de genetik testler eklendiğinde terapötik yaklaşım için destekleyici bilgiler elde edilebilmektedir. Bu hastaların genotipleme sonrasında %33'ü yeniden sınıflandırılarak düşük risk grubuna (GREAT+ class I+ ve II+) düşmekte ve ATİ tedavisi önerilebilmektedir. %5' lik çok az bir kısım hasta yeniden sınıflandırma sonucu %84 nüks oranına sahip olan çok yüksek risk grubuna (GREAT+ classIV+) düşmekte ve ATİ tedavisine alternatif olarak ablatif tedavi önerilebilmektedir. Yine de bu hastalarda nihai tedavi kararı, hasta tercihi ve komorbid hastalık durumuna göre alınabilir. GREAT skorlamasının en yüksek riskli grubu olan class III' e tedavi şekli olarak öncelikle RAI ve cerrahi, yani ablatif tedaviler önerilmektedir. Görünüşe göre, GREAT+ skorlamasının en büyük faydası GREAT class II' de görülmüştür; genotipleme sonrası 98 hastanın 37'sinin tedavi yönetiminde değişime gitmek gerekmiştir (16). Tedavi yönetiminde genotipleme kaynaklı yapılan değişiklikler, nüks riski yaklaşık %25 civarı olanlarda ATİ tedavisinin makul bir tedavi olabileceği ancak bu riskin %75 ve daha fazla olması halinde kesinlikle tiroid ablasyonu yapılması gerektiği varsayımına dayanmaktadır.

Tablo 1: GREAT ve GREAT+ skorum sistemleri

Parametre	GREAT sistemi	GREAT+ sistemi
Yaş		
≥ 40	0	0
< 40	1	1
Serum fT4 düzeyi, pmol/l		
< 40	0	0
≥ 40	1	1
Serum TBII düzeyi, IU/L		
< 6	0	0
6 – 19,9	1	1
≥ 20	2	2
Guatr boyutu *		
0 – I	0	0
II - III	2	2
HLA polimorfizmi **		
0		0
1 – 2		2
3 (LD)		3
PTPN22		
Wild tip		0
C/D		1
Maksimum skor	6	10
Risk sınıflandırması	Class I: 0 - 1 Class II: 2 - 3 Class III: 4 - 6	Class I+: 0 - 2 Class II+: 3 - 4 Class III+: 5 – 6 Class IV+: 7 - 10

* WHO- Grade I: Palpabl veya görünen guatr yok, II: boyun normal pozilyonda iken palpabl, ancak görülemeyen guatr (nodüler durum eşlik edebilir), III. Boyun normal pozilyonda iken hem görülebilen hem de palpe edilebilen guatr.

** HLA subtipleri DQB1-02, DQA1-05, and DRB1-03.

Ayrıca Graves orbitaopatisini öngörmek adına da çalışmalar yürütülmektedir. Henüz 2018’de, Wiersinga ve arkadaşları tarafından, PREDIGO adı verilen ve yeni GH tanısı konmuş hastalarda Graves orbitopatisi açısından risk değerlendirmesi yapmayı sağlayan bir skorum sistemi tanımlanmıştır (17). Bu skorumda hastalar klinik aktivite skoru, TBII (tirotropin bloke inhibitör Ig) düzeyi, tedavi öncesi semptomatik geçen hipertiroidik süre ve sigara kullanımı açısından değerlendirilerek puanlandırılmaktadır (Tablo 2). Maksimum skor 15 puan olup, sistemin pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla 0.28 ile 0.91’dir. PREDIGO’ ya göre, tanı anında Graves orbitopatisi olmayan hastalarda ATİ başlandıktan sonraki 18 aylık dönemde orbitopati gelişme ihtimali %15’tir. Bu sonuca göre, PREDIGO ile Graves orbitopatisi gelişmesi değil de gelişmemesi ihtimalinin tahmin edilmesinin daha doğru olacağı düşünülmektedir (17).

Tablo 2: PREDIGO skorum sistemi

	Sınır değerler	Skor
CAS	0	0
	≥1	5
TBII	< 2 U/L	0
	2-10 U/L	2
	>10 U/L	5
Hipertiroidi semptomlarının süresi	< 1 ay	0
	1-4 ay	1
	> 4 ay	3
Sigara kullanımı	Yok	0
	Var	2
Maksimum skor = 15		

2.1.1 Tanı

Graves hastalığında otoimmün uyarıya bağlı artmış bir üretim, yani hipertiroidi söz konusudur.

Hipertiroidizm tanısı anamnez ve fizik muayene ile başlar. Tanıyı kesinleştirmek için ilk yapılacak laboratuvar testi TSH ve sT4 olmalıdır. sT4 normal bulunduğu sT3 bakılmalıdır. Laboratuvar olarak hipertiroidi tanısının doğrulanması sonrasında, etyolojiye yönelik ayırıcı tanı testlerinin başında 99mTc tutulum veya RAI tutulumu gelmelidir. Böylece, düşük tutulumlu tirotoksikozu (tiroiditler, egzojen tiroid hormon kullanımı) normal-yüksek tutulumlu hipertiroididen (Graves hastalığı, Toksik multinodüler guatr, Toksik adenom) ayırmak mümkün olabilir (18).

Tipik laboratuvar ve klinik bulguların varlığında, sonografik bulgular da destekliyorsa (tiroid inferno paterni ve heterojen parankim), özellikle göz bulguları da varsa Graves tanısı sintigrafi veya tutulum bakılmadan da konulabilir.

TRAb, GH tanısının kesin olmadığı durumlarda, özellikle sessiz tiroidit - GH ayırıcı tanısında yararlı olabilir.

Tiroid sintigrafisi, TMNG tanısında hiperaktif nodülleri göstermede yararlı olabilir. Bezde üretimin artmış olduğu durumlarda T3 daha belirgin olarak artar iken, tiroiditlerde genelde T4 artışı daha belirgindir (18).

2.1.2. Tedavi

Graves hastalığına bağlı hipertiroidi tedavisinde 3 seçenek mevcuttur: Medikal (antitiroid ilaç) tedavi, radyoaktif iyot tedavisi, cerrahi tedavi. Bu yöntemler hasta bazında ve hastanın yaşı ile ailenin olası gebelik planlarıyla birlikte düşünülmeli, tedavi şekline hasta ile beraber karar verilmelidir. Tedavilerin her birinin iyi ve kötü yanları olduğu hastalara ayrıntılı şekilde anlatılmalıdır.

2.1.2.1 Medikal tedavi (Antitiroid ilaç)

Antitiroid ilaç tedavisi GH'da primer tedavidir. Hasta ötiroid olduktan sonra uzun süre (12-24 ay) kullanılmalıdır. Ülkemizde antitiroid ilaç olarak 2 ajan kullanılmaktadır: Metimazol(MMI) ve propiltiourasil(PTU). Etkisini metimazole metabolize olarak gösteren karbimazol ise ülkemizde bulunmamaktadır.

PTU sadece gebelik ya da gebelik planlayıp tedavinin bitmesi beklenemeyecek olan durumlar ve tirotoksik kriz gibi özel durumlarda kullanılmalıdır. MMI'nın majör yan etki olasılığının PTU'ya göre daha az olması ve günde tek doz kullanılabilmesi PTU'ya üstünlük sağlamasında rol almaktadır. Hem MMI hem PTU'nun immün sistem üzerine direkt etkisi uzun süreli remisyon ihtimaline destekte bulunur. Bu sayede hastalar 18-24 ay ATİ alıp ötiroid tutulduktan sonra otoimmün olayın remisyonu beklenir. ATİ, ablatif tedaviye hazırlık olarak geçici olarak da kullanılabilir. Uzun süreli ATİ tedavisi verilmesi planlanan hastalar başlangıçta 3-6 hafta aralıklarla kontrol edilerek doz azaltılması yapılır ve etkin en az doz bulunmaya çalışılır. Sonrasında da hasta 1.5-2 aylık aralıklarla takip edilir.

ATİ tedavisinde bazı yan etkileri görülebilir. PTU'nun majör yan etkisi olarak agranülositoz ve toksik hepatit görülebileceği gibi MMI'nın majör yan etkisi olarak da kolestatik sarılık görülebilir. Hastalar bu yan etkiler açısından mutlaka uyarılmalı, tedaviyi alırken boğaz ağrısı, ateş, sarılık, karın ağrısı, mide bulantısı ve idrar renginde koyulaşma şikayetleri olması halinde ilacını keserek hemen doktoruna başvurması söylenmelidir. Bunlar haricinde en sık görülebilecek minör yan etkilerse şunlardır: Kaşıntı, deri döküntüsü, artralji. Tüm bu olası yan etkiler sebebiyle ATİ tedavisi başlanmadan önce hastaların mutlaka bazal hemogram ve transaminaz düzeylerine bakılmalıdır ve hastanın değerleri tedavi için uygunsa tedaviye başlanmalıdır.

Uzun süreli ATİ tedavisi kararı alınan hastalarda ortalama tedavi süresi 18-24 aydır. Aktif oftalmopatisi olan, ablatif tedaviyi kabul etmeyen hastalar gibi özel durumlarda bu süre uzatılabilir. TRAb negatifleşmeden ATİ tedavisi kesilmemelidir. ATİ tedavisinin en büyük dezavantajı yüksek nüks

oranıdır(%30-70). Yeterli süre ve dozda ATİ tedavisi sonrası nüks olması ya da ATİ ile ciddi yan etki görülmesi halinde vakit kaybetmeden hastaya ablatif tedavi yöntemleri önerilmelidir (18).

2.1.2.2 Radyoaktif İyot Tedavisi

Ablatif tedavi kararı verilen hastalarda RAI veya cerrahi tercihi, hasta görüşü ve onayı alınarak, hastaların diğer özellikleri gözden geçirilerek bireysel düzeyde yapılmalıdır. RAI için gebelik ve emzirme mutlak kontrendikasyonlardır. Görece kontrendikasyonlar ise; oftalmopati, büyük guatr, intratorasik guatr ve malignite kuşkusu varlığıdır.

RAI tedavisi, ileri yaş ve kardiyovasküler hastalık varlığı haricinde genellikle ayaktan yapılmaktadır. Bayan hastalarda tedaviden 48 saat önce test yapılarak mutlaka gebelik ekarte edilmelidir. Genç ve hafif hipertiroidik hastalar ATİ ile hazırlık yapılmadan RAI tedavisine verilebilir. ATİ ile hazırlık yapılan hastalardaysa, RAI öncesinde ilacı kesilmelidir. MMI 48 saat önce, PTU 7 gün önce kesilir. RAI sonrasında genellikle ATİ tedavisine devam edilir.

RAI tedavisinin etkisi 6-8 hafta içinde görülmeye başlar. Bu sebeple tedavi etkinliğinin belirlenmesi için 2 ay sonra kontrol tiroid fonksiyon testleri ile hastalar değerlendirmelidir. Kalıcı hipotiroidi gelişen hastalara levotiroksin replasmanı başlanır. Sonrasında ilk 6 ayda 6-8 haftalık aralıklarla tiroid fonksiyon testlerinin kontrolü görülerek doz titrasyonu yapılır. RAI tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesi için ilk 6 ay beklenmesi gerekir. 6.ayın sonunda hasta halen toksikse 2. doz RAI planlanmalıdır. RAI tedavisi alan hastaların ilk 6 ayda gebe kalmaması gerekmektedir (18).

2.1.2.3 Cerrahi tedavi

Hipertiroidi tedavisinde ablasyona karar verildikten sonra cerrahi veya RAI arasında karar verilmesi gerekir. Cerrahi öncesi ATİ tedavisi ile mümkünse ötiroid hal sağlanmalı ve tedaviye beta bloker eklenmelidir. Burada yapılacak olan cerrahi total tiroidektomidir. Eşlik eden diferansiye tiroid karsinomu(DTK) veya kuvvetli şüphe halinde sentinel lenf nodu diseksiyonu(SLND) da eklenebilir (18).

Cerrahi endikasyonu olan durumlar şunlardır:

- Büyük ve/veya intratorasik guatr, bası belirtisi, kanser kuşkusu
- ATİ yan etkisi
- Eşlik eden DTK veya MTK
- RAI tedavisini reddetme
- Erken dönemde gebelik beklentisi
- Ciddi Graves oftalmopatisi

Cerrahi tedavinin akut dönemde kanama, geçici ya da kalıcı hipoparatiroidi, nervus recurrens hasarlanması, anesteziye bağlı bazı yan etkiler gibi bazı olası komplikasyonları mevcuttur. Bu komplikasyonların sıklığı daha çok cerrahi tekniğine bağlıdır. Kalıcı hipotiroidi ise cerrahinin beklenen ve istenen sonucudur. ATİ tedavisi post operatif dönemde hemen, beta bloker tedavisi de kademeli olarak azaltılarak kesilmeli ve hastaya LT4 başlanmalıdır. Post operatif dönemde 6-8.haftada kontrol tiroid fonksiyon testlerine bakılarak doz ayarlaması yapılır (18).

2.2 İrisin

İrisin beyaz yağ dokusunu kahverengi yağ dokusuna çevirerek enerji harcanmasını sağlayan termojenik bir proteindir. İlk olarak 2012 yılında yapılan bir çalışmada (19) egzersiz ile iskelet kasından kişiyi metabolik hastalıklardan koruyan bir protein salınımı olduğunun keşfedilmesiyle tanınmıştır. Bu membran proteinine FNDC5 ismi verilmiş ve bu proteinin dolaşıma proteoliz sonrası karıştığı anlaşılmıştır, proteolitik ürününe de İrisin ismi verilmiştir. Bu isim bir mitolojik kahraman olan İris'ten gelmektedir. Egzersiz kaynaklı PGC-1 alfa mevcudiyetinde saptanan bu hormon benzeri madde bir adipo-myokin regülatördür. PGC-1 alfa vücuttaki organların enerji metabolizmasında ve metabolik hastalıkların düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir maddedir (1). PGC-1 alfa ve dolayısıyla irisinin metabolizma ilişkili pek çok hastalıkta serum seviyelerinde anlamlı değişiklikler olabileceği düşünülmüş ve bu sebeple irisin ile metabolik hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Yeni tanı tip 2 diabetes mellitus tanılı hastalar ile normal glukoz toleranslı kontroller arasında yapılan karşılaştırmada

tip 2 diabetes mellituslu hastaların irisin seviyeleri anlamlı olarak azalmış saptanmıştır. Ayrıca obez hastalar ile normal vücut kitle indeksli hastalarda yapılan kıyaslamada ise, irisin seviyeleri vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksi ile pozitif korele saptanmıştır. Polikistik over sendromlu hastalarda yapılan bir çalışmada ise, metabolik sendrom açısından risk faktörü bulunmayan normal vücut ağırlıklı hastalarda irisin seviyeleri kontrollere oranla artmış saptanmıştır (20).

2.2.1 İrisin ve tiroid ilişkisi

İrisin, myositler tarafından salgılanır ve miyositlerden diğer vücut dokularına bazı sinyaller iletir. Bu iletilen sinyallerle de metabolizma ve termogenez düzenlenir (2). Bilindiği üzere iskelet kası tiroid hormonlarının temel hedeflerinden birisidir. Metabolizmayı etkilediği bilinen birçok faktör vardır. İrisin ve tiroid hormonları vücutta birçok benzer etki yaptıkları için aralarında olabilecek potansiyel karşılıklı(mutual) ilişkinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu sebeple de tiroid disfonksiyonu olan hastalarda serum irisin konsantrasyonlarının bakıldığı bir çalışma yapılmıştır (2). Çalışma sonucunda ortalama serum irisin seviyeleri hipotiroidili hastalarda hipertiroidilere göre daha düşük saptanmıştır. İrisin ile TSH seviyeleri arasında negatif korelasyon, ft4 ile irisin arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu çalışma serum irisin konsantrasyonunun tirometabolik durum ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (2).

Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, hem hipo hem de hipertiroidideki erkek farelerin serum irisin düzeylerinde artış trendi olduğu saptanmıştır (21).

Aşık hipertiroidi halinde olan 41 Graves hastasında irisin ve myostatin düzeylerine bakılan başka bir çalışmada (22) ise, serum irisin düzeyleri kontrol gruba nazaran yüksek saptanmıştır. Myostatin seviyelerinde ise istatistiksel farklılık saptanmamıştır. İrisin düzeyleri ile serbest T3 - T4 (fT3, fT4) ve TRAb arasında pozitif, TSH arasında ise negatif korelasyon saptanmıştır. Bu sonuçlar, artmış irisin düzeylerinin hipertiroidideki artmış enerji metabolizmasında katkısı olduğunu düşündürmüştür (22).

Tüm bu sebeplerle obezite, diabetes mellitus, hipo-hipertiroidi gibi pek çok metabolik hastalık için yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde irisinin önemli bir hedef olabileceği öngörülmektedir (1).

2.3 miRNA

Mikro RNA'lar geniş ve küçük, 19-25 nükleotidden oluşan, protein kodlamayan (non-coding), yüksek derecede korunmuş, regülatuar RNA'lardır ve posttranskripsiyonel aşamada gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli rolleri vardır. Bu ekspresyonlar immün fonksiyonlar, hücre ölümü, farklılaşması, gelişimi, proliferasyonu ve metabolizmasını da içeren geniş biyolojik olaylar dizisinde yer alır (19,23). Bu sebeple birçok hastalık için ön tanıda önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedirler. miRNA'lar posttranskripsiyonel aşamada mRNA'lara bağlanarak mRNA'nın inhibe ya da degrade olmasını sağlamakta ve oluşan mRNA'nın proteine dönüşmesini engellemektedirler. Yakın geçmişte spesifik dokularda tanımlanmış miRNA'ların serumu da içeren farklı vücut sıvılarında da tespit edildiği olmuştur. İlginç olarak, serumda dolaşan bu miRNA'lar hormon benzeri etkilere sahip olup salındıkları hücrelerden daha uzaklarda da cevaplara sebep olabilmektedir (25). Ekstrasellüler miRNA'lar hücre-hücre haberleşmesindeki mediatörlerden olabilir. Farklı otoimmün hastalıklar ile miRNA'lar arasındaki ilişkilere bakılan çalışmalarda, miR-16 sistemik lupus eritematozis ve romatoid artrit (26,27), miR-22 ise multipl sklerozda artmış olarak saptanmıştır (28). İşte tüm bu verilere göre, miRNA'ların rollerinin anlaşılması, hastalık patogenezi ve klinik seyri açısından önemlidir ve bize bu konularda yeni bilgiler sağlayabilir.

2.3.1 miRNA ve tiroid ilişkisi

Son zamanlarda Graves hastalığı gibi sebebi tam anlaşılamayan hastalıkların mekanizmasında epigenetik faktörlerin önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Epigenetik faktörler, posttranskripsiyonel aşamada genlerin ekspresyonlarının regülasyonunda görev alırlar. miRNA'ların da bu regülasyonda önemli rolleri vardır. Buna dayanarak son dönemde artan miRNA'lar ile ilgili yapılan araştırmalarda miRNA'ların otoimmün

hastalıklarda önemli rol oynadıkları raporlanmıştır. Serum miRNA düzeylerinin sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit, crohn hastalığı ve multipl skleroz gibi otoimmün hastalıklarda ayırt ettirici profil gösterdikleri birçok çalışmada gösterilmiştir (26,27,28). Otoimmün tiroid hastalığı olan hastaların tiroid bezi dokularında ve GH olanların PKMH’de bazı miRNA’lar regüle olmaktadır (23,29). Ayrıca tiroid bezi tümörleri ve normal dokudaki farklı miRNA ekspresyonları da gösterilmiştir (27).

Liu ve arkadaşları PKMH’nde farklı miRNA ekspresyonunun GH ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu da GH tedavisini yönlendirmedeki hedeflerden biri olabilir (24). Bu çalışmada sağlıklı kişiler, aktif GH olan kişiler ve remisyonda GH olan kişilerde sistemik olarak farklı eksprese olan 3 PKMH miRNA taranarak doğrulanmıştır. miR-154, miR-376b ve miR-431 normal kontrollere göre GH’da suprese olarak tespit edilmiştir. Bu arada, primer PKMH kültürlerinde bu 3 miRNA T3 tedavisi ile de suprese olabilir (24). T3 ve T4 tedavisi, doğuştan ya da kazanılmış immün cevapları genomik ve non-genomik yollarla regüle edebilir (30). Bu çalışmada T3’ün immün sistem regülasyonunu miRNA yoluyla modüle edebileceği yeni bir olasılık olarak ortaya çıkmıştır. Bu miRNA’ların down regülasyonu, proinflamatuvar ve immünolojik cevapları tetikleyip GH gelişimini alevlendirebilir.

Yamada ve arkadaşları, OITH’da farklı miRNA’ları tanımlayan ilk çalışmayı yapmışlardır (31). Bu çalışmada, kontroller ve OITH olanların serumlarında immün aracılı 4 miRNA’nın (miR-16, miR-22, miR-375 ve miR-451) farklı ekspresyonları araştırılmıştır. miR- 22, miR-375 ve miR-451 seviyelerinin Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığı olanlarda kontrollerle karşılaştırıldığında artmış olduğu gözlenmiştir. İşte bu sonuçlardan dolayı, miRNA’ların OITH tedavisinde hedef, aktivite ve progresyonunu göstermede belirteç olabileceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma polikliniğine başvuran ve GH tanısı olan ya da bu tanıyı yeni alan 30 hasta dahil edildi. Hastalar hormonal durumları, otoantikör düzeyleri, klinik özellikleri (oftalmopati varlığı, relaps-remisyon durumu), tiroid hacimleri ve aldıkları tedavi şekillerine göre gruplandırılarak ayrı ayrı incelendi.

Aktif viral hepatiti olan(HBV-HCV), aktif HIV enfeksiyonu olan, DM tanısı olan, aktif KOAH veya astım tanısı olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan sabah 8.30-10.30 saatleri arasında, 8-12 saatlik açlık sonrası jelli vakumlu tüpe venöz kan örnekleri alındı. Kanlar alındıktan hemen sonra laboratuvara ulaştırıldı. Vakumlu jelli tüpe alınan kan pıhtılaşması için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekletilen kanlar 2000 g'de 7 dakika santrifüj edildi. Hastalardan elde edilen serum örneğinden aynı gün ALT (alanin amino transferaz), kreatinin, glukoz, HDL (yüksek dansiteli lipoprotein), LDL (düşük dansiteli lipoprotein), total kolesterol, trigliserid, insülin, TSH, ft3, ft4 ve tiroid otoantikör (anti-Tg, anti-TPO, TRAb) düzeylerine bakıldı. Serum ft3, ft4, TSH ve insülin düzeyleri otoanalizörde (Roche, Cobas 8000 e602 Modüler Analizör, Mannheim Almanya) elektrokemilüminans immünölçüm (ECLIA) yöntemi ile çalışıldı. Anti-TPO ve anti-Tg düzeyleri otoanalizörde (Abbott Architect i2000 İmmün-Analizör, Amerika Birleşik Devletleri) kemilüminans immünölçüm (CLIA) yöntemi ile çalışıldı. TRAb düzeyi otoanalizörde (Gamma Sayıcı, PC-RIA MASS Stratec ,Belçika) Radyoİmmünölçüm (RIA) yöntemi ile çalışıldı (Normal aralık: 0-14 U/L). Total kolesterol, HDL, LDL ve trigliserit düzeyleri otoanalizörde (Roche Cobas 8000 c702 Modüler Analizör, Mannheim Almanya) enzimatik, kolorimetrik yöntem ile çalışıldı. CBC tüpüne alınan venöz tam kan örneğinden hemogram ölçümü yapıldı.

Çalışmaya katılan tüm bireylerden belirlenen miRNA' lar ve irisin çalışılmak üzere de kan alındı ve alınan serum örnekleri santrifüj edildikten sonra -20 derecede saklandı. Çalışma sonunda bu serum örneklerinden

belirlenen miRNA ve irisin düzeyleri çalışıldı. Çalışılacak miRNA' lar literatür taranarak OITH ve spesifik olarak Graves hastaları ile yapılan çalışmalardan anlamlı sonuç elde edilen miRNA' lar arasından seçildi. Sonuçta miR-22, miR-376, miR-154, miR-375 ve miR-451 isimli beş adet miRNA' nın çalışılmasına karar verildi.

Ayrıca hasta grubun tiroid bezi volüm durumu da ultrasonografi ile ölçüm yapılarak değerlendirildi. Ultrasonografi ile bezin 3 farklı boyutu ölçüldü ve Brunn formülü* kullanılarak tiroid volümü hesaplandı (*: En x Boy x Derinlik x $\pi/6$). Hesaplanan bu sonuçlar ile de hastalar, ortalama bez volümüne göre değerlendirilerek, normal ve büyümüş tiroid bezi olanlar olarak 2 gruba ayrıldı.

3.1 Kontrol ve Hasta Kan Örneklerinden Lökosit İzolasyonu

Kontrol ve Hasta kan örnekleri 2 adet 2 ml'lik hemogram tüpüne alınmış ve aynı gün lökosit izolasyonu için Tıbbi Biyoloji anabilim dalında işleme tabi tutulmuştur. 2 adet hemogram tüpündeki toplam 4 ml kan örneği 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak son hacim 10 ml'ye RBC lizis tamponu (89,9 gr NH₄Cl; 10 gr KHCO₃; 2 ml 0,5 M EDTA) eklenerek tamamlanmıştır. Santrifüj tüpleri santrifüj cihazına yerleştirilerek 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüp içerisindeki supernatan kısım uzaklaştırılmış ve kalan pelet üzerine 10 ml RBC lizis tamponu eklenmiştir. Tüpler tekrar santrifüj cihazına yerleştirilerek 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüj işleminden sonra da tüplerin içerisindeki supernatan kısım uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 10 ml RBC lizis tamponu eklenmiştir. Tüpler tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemler temiz bir pelet elde edilene dek 3 ya da 4 kez tekrarlanmıştır. En son aşamada, tüplerin içerisinde kalan temiz pelet üzerine 500 µl Trizol kimyasalı eklenmiş ve örnekler 1,7 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine mikropipet yardımı ile aktarılmıştır. Örnekler RNA izolasyonu işlemine dek -20°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2 Kontrol ve Hasta Örneklerinden RNA İzolasyonu

Kontrol ve hasta örneklerinden RNA izolasyonu “Trizol ile RNA izolasyonu” protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Trizol ile RNA izolasyonu protokolü aşağıda belirtilen sıra ile uygulanmıştır.

Bir önceki metotta -20°C 'de Trizol içerisinde saklanan örnekler derin dondurucudan çıkartılarak çözülmesi sağlanmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

1,7 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içerisindeki homojenat üzerine 100 μl kloroform eklenmiş ve mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işleminden sonra tüpler içerisinde oluşan en üstteki renksiz/şeffaf faz mikropipet yardımı ile alınarak temiz ve steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Renksiz ve şeffaf bu faz RNA'nın bulunduğu fazdır.

Toplanan bu fazın üzerine 500 μl izopropanol yavaş eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ardından örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işleminden sonra tüpler içerisindeki süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 500 μl %70'lik soğuk etanol eklenmiştir.

Tüpler tekrar $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj işleminden sonra tüplerin içerisindeki süpernatant atılmıştır. Tüplerin kapakları açılarak ortamda kalan fazla alkolün buharlaşması sağlanmıştır.

Son olarak pelet üzerine 40 μl RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek RNA'lar homojenize edilmiştir.

RNA örnekleri diğer bir deney aşamasına kadar saklanmadan önce, RNA'ların kalitesi ve konsantrasyonu nanodrop cihazı ile tespit edilmiştir. Nanodrop cihazında öncelikle 1 µl RNaz-DNaz içermeyen su cihazın kaidesi üzerine damlatılmış ve körlleme yapılmıştır. Ardından kontrol ve hasta RNA örneklerinden de sırasıyla 1 µl alınarak nanodrop cihazına aktarılmış ve örneklerin hem konsantrasyon hem de saflık değerleri ölçülmüştür.

3.3 Kontrol ve Hasta RNA örneklerinden miRNA komplementer DNA (cDNA) sentezi

Kontrol ve hasta örneklerinden cDNA sentezi “Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit”inin (Applied Biosystems, ABD) protokolüne bağlı kalınarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- RNA örnekleri -20 °C’den çıkartılıp buz üzerine alınmış ve erimeleri sağlanmıştır.
- Kontrol ve hasta örnekleri için hazırlanan steril 0,25 ml’lik PCR tüplerine, kit içerisinde çıkan malzemeler aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde kullanılarak 7 µl’lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3: cDNA sentezi için reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarlar

Malzeme	15 µl’lik reaksiyon karışımı için alınması gereken miktar
dNTP karışımı	0,15 µl
Revers transkriptaz enzimi	1 µl
10X RT Tamponu	1,5 µl
RNaz inhibitörü	0,19 µl
Nükleaz içermeyen su	4,16 µl
TOPLAM HACİM	7 µl

- 7 µl’lik reaksiyon karışımı içerisine her bir miRNA’nın ilgili primerinden 3 µl ilave edilmiştir.

- Kontrol ve hasta grubu için oluşturulan mikrosantrifüj tüpleri içerisinde ilgili RNA örneklerinden 5 µl eklenerek toplamda 15 µl'lik hacim elde edilmiştir.

- Hazırlanan PCR tüpleri, PCR cihazına (Techne, İNGİLTERE) yerleştirilerek 16°C 30 dk, 42°C 30 dk ve 85°C 5 dk olacak şekilde cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

- cDNA sentez işlemi bittikten sonra tüpler -20°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4 miRNA-22, -154, -375, -376b ve -451 gen ekspresyonunun gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile tespiti

Her bir örnek için elde edilen cDNA'lar kullanılarak miRNA-22, -154, 375, -376b ve -451 miRNA'larının ekspresyonları StepOne Plus gerçek-zamanlı PCR cihazı (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir.

- Öncelikle aşağıdaki tabloda belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanıp, 96 kuyucuklu plakadaki kuyucuklara 20 µl olacak şekilde dağıtılmıştır.

Tablo 4: Gerçek-zamanlı PCR çalışması için reaksiyon karışımı

Komponent	Reaksiyon karışımı için gerekli miktar
Taqman Small RNA Assay (20X)	1 µl
cDNA örneği	1,33 µl
Taqman® Universal PCR Master Mix II (2X), no UNG‡	10 µl
Nükleaz içermeyen su	7,67 µl
TOPLAM HACİM	20 µl

• Hazırlanan 96 kuyucuklu plaka gerçek-zamanlı PCR cihazına yerleştirilip, 95°C’de 10 dk ve 40 döngü boyunca 95°C 15 sn ve 60°C 60 sn olacak şekilde işleme tabi tutulmuştur.

3.5 Enzim-bağlı İmmünosorbent Analizi (ELIZA) Yöntemi ile İrisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda kontrol ve hasta kan örnekleri içerisinde jel bulunan kırmızı kapaklı biyokimya tüpüne aktarılmış ve 2500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında meydana gelen serumlar 1,7 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne mikropipet yardımı ile aktarılmış ve Eliza deneyi gerçekleşene dek -20°C’deki derin dondurucuda saklanmıştır.

Kontrol ve hasta serum örneklerinden irisin miktarı belirlemek için gerekli Eliza kit ticari olarak elde edilmiştir (YL Biont, ÇİN). Kitin içerisinde bulunan ekipmanlar aşağıdaki tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5: İrisin Eliza kiti içerisinde bulunan ekipmanlar

Kit ile sağlanan ekipmanlar	96 reaksiyon	Saklama Koşulu
Mikroeliza stripleri	1 Adet	2-8°C
Standart solüsyonu (32 ng/ml)	0,5 ml x 1 şişe	2-8°C
Standart dilüent	3 ml x 1 şişe	2-8°C
Streptavidin-HRP reaktifi	6 ml x 1 şişe	2-8°C
Kromojen solüsyon A	6 ml x 1 şişe	2-8°C
Kromojen solüsyon B	6 ml x 1 şişe	2-8°C
Stop solüsyonu	6 ml x 1 şişe	2-8°C
Yıkama solüsyonu	20 ml (30X) x 1 şişe	2-8°C
Biotin ile işaretlenmiş anti-İrisin antikoru	1 ml x 1 şişe	2-8°C

İrisin ELIZA kiti içerisindeki stok standart konsantrasyonu aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 6). Stok standarttan, standart dilüent ile aşağıdaki tabloda bulunan standart çalışma konsantrasyonu hazırlanmıştır.

Tablo 6: İrisin Eliza kiti için standart konsantrasyonu ve standart çalışma konsantrasyonları

Kit adı	Stok standart konsantrasyonu	Standart çalışma konsantrasyonları			
		16 ng/ml	8 ng/ml	4 ng/ml	2 ng/ml
İrisin	32 ng/ml	16 ng/ml	8 ng/ml	4 ng/ml	2 ng/ml

İrisin Eliza kiti için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

Standart, kör ve örnek sayısı kadar mikroeliza strip çıkartılmıştır.

Kontrol ve hastalara ait serum örnekleri -20°C 'den çıkartılıp oda sıcaklığında çözülmüştür.

Tablo 6'de hazırlanan standart çalışma konsantrasyonlarından 50 µl kuyucuklara aktarılmış ve üzerine 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir.

Kontrol ve hasta serum örneklerinden 40 µl ilgili kuyucuklara eklenmiş ve üzerine 10 µl anti-İrisin antikoruna aktarılmıştır. Daha sonra ilgili kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir.

Kör için bırakılan kuyucuklara ilk etapta herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

Mikroeliza stripleri, kitin içerisinden çıkan şeffaf etiket ile kapatılarak 37°C 'de 60 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon esnasında, 30X konsantrasyonda bulunan "yıkama tamponu" distile su ile 1X konsantrasyona dilüe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, striplerin üzerindeki şeffaf etiket çıkarılarak, kuyucuklardaki sıvı dökülmüş ve 1X konsantrasyondaki yıkama tamponundan yaklaşık 300 µl kuyucuklara ilave edilerek 30 sn oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından yıkama tamponu tekrar dökülmüştür. Bu işlem, kuyucukların iyi şekilde yıkanması için 5 kez tekrar edilmiştir.

Kör, örnekler ve standart için ayrılan kuyucukların içerisine 50 µl kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B eklenmiştir. Mikroeliza stripleri, orbital çalkalayıcıda nazikçe, kısa bir süre için çalkalanmıştır ve 37°C 'de 30 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Etkili bir renk değişiminin olması için bu aşama karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50 µl “Stop Solüsyonu” eklenerek reaksiyonun sonlanması sağlanmıştır. Stop solüsyonu eklendikten sonra kuyucukların içerisinde oluşan mavi renk, sarı renge dönüşmüştür.

Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra 10 dakika içerisinde mikroeliza striplerinin 450 nanometrede ELIZA okuyucu cihazında okutulma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen absorbans değerleri excel dosyasına aktarılmıştır. İlk olarak standart ve örneklerden elde edilen absorbans değerlerinden körlerin bulunduğu absorbans değerleri çıkartılarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra standartlardan elde edilen absorbans değerleriyle, “Standart Eğim Grafiği” çizilmiştir. Bu grafikten elde edilen “ $y = ax + b$ ” eğim denkleminde örneklere ait absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda 23.02.2016 tarihli ve 60116787-020/14502 numaralı etik kurul onayı ile kesitsel olarak yürütülmüştür.

3.6 İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Pearson ve Spearman korelasyon analizleri kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki kare analizi ile incelenmiştir. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma polikliniğine Graves Hastalığı ön tanısı / tanısı ile başvuran ve sonrasında medikal, cerrahi ya da radyoaktif iyot tedavileri uygulanan 30 hasta dahil edildi. Hastaların 21'i kadın (%70) ve 9'u erkek(%30) olup yaş ortalaması $38,8 \pm 10,0$ (yıl) idi (Tablo 7).

Tablo 7: Örnekleme grubumuzun cinsiyet ve yaş durumu

	Hasta grubu (n=30)	Kontrol grubu (n=30)	Toplam (n=60)	P değeri
Kadın	21	18	39	
Erkek	9	12	21	0,417
BMI (kg/m²)	$26,5 \pm 3,8$	$26,5 \pm 5,5$		0,634
Yaş ortalaması	$38,8 \pm 10,0$	$36,0 \pm 12,0$		0,124

Çalışmamızdaki hastalar klinik özellikleri ile tanımlandığında, 7 hastanın(%23,3) oftalmopatisi mevcut olup, kalan 23 hastanın(%76,6) oftalmopatisi yoktu. 16 hasta(%53,3) tanı aldıktan sonra hiç relaps yaşamamış iken, 14 hasta(%46,6) tedavisi sırasında en az 1 kez relaps yaşamış idi. Hastaların 17'si(%56,6) medikal tedavi almaktayken, 5'i(%16,6) RAI, 8'i(%26,6) ise cerrahi tedavi almış idi.

Çalışmamızdaki hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal ve hormonal değerleri tablo 8'de sunulmuştur. Buna göre Graves hastalarında tespit edilen ortalama TSH, hemoglobin ve LDL değerleri kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.005, 0.003, 0.03). Graves hastalarının ortalama fT4 ve anti-Tg değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. (p değerleri sırasıyla 0.043 ve 0.002)

Çalışmamızda hasta grubu ve kontrol grubu arasında trombosit, lökosit, trigliserid, insülin, FT3 ve anti-TPO değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 8).

Tablo 8: Çalışma için kan alındığı sıradaki laboratuvar bulguları

	GH Grubu (n=30) Ort±SD	Kontrol Grubu (n=30) Ort±SD	P değeri
Hemoglobin (g/dL)	12,6±2,2	13,8±2,0	0,003*
Lökosit (x10⁹/L)	6,4±1,6	7,4±1,8	0,033
Trombosit (x10⁹/L)	252,8±72,0	273,0±439,6	0,195
Kreatinin (mg/dl)	0,6±0,1	0,8±0,1	0,01*
Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	98,2 ± 11,5	92,0 ± 8,4	0,026*
İnsülin (mU/L)	14,1 ± 17,6	11,3 ± 6,4	0,551
Trigliserid (mg/dl)	118,5 ± 79,7	134,5 ± 71,6	0,246
LDL (mg/dl)	95,7 ± 33,3	115,0 ± 33,3	0,030*
TSH (mU/L)	1,5 ± 2,2	1,9 ± 0,9	0,005*
FT4 (ng/dl)	2,2±1,7	1,3 ± 0,1	0,043*
FT3 (ng/dl)	7,0 ± 7,5	3,3 ± 0,4	0,623
Anti TPO (IU/dl)	179,4 ± 217,1	32,9 ± 44,3	0,201
Anti Tg (IU/dl)	230,2 ± 298,0	32,9 ± 56,0	0,002*
TRAb (U/L)	21,4±31,3		

*=P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı.

Hormonal durumlarına göre hastaların 5'i(16,6) hipotiroidik, 12'si(%40) ötiroidik, 13'ü(%43,3) hipertiroidik idi. Graves hastalığı için spesifik bir otoantikör olan TRAb seviyelerine göre hastalar sınıflandırıldığında ise, hastaların 5'i(%16,6) TRAb(+), 25'i(%83,3) ise TRAb(-) idi. Ultrasonografi bulgularına bakıldığında, hastalarımızın 19'unun(%63,3) tiroid bezi normal büyüklükte iken, 11'inin(%36,6) tiroid bezi büyümüş idi. 10 hastanın(%33,3) tiroid bezi yapısında nodül ya da nodüller mevcut iken, 20 hastanın(%66,6) bez yapısında nodül yoktu. Nodülü olan hastalar nodül özelliklerine göre değerlendirilerek gerekli görülenlerde ince iğne aspirasyon biyopsisi ile değerlendirildi, hiçbirinde malignite saptanmadı.

Çalışmamızda Graves hastaları ile kontrol grubu arasındaki irisin düzeyleri karşılaştırıldı. Hasta grubun irisin seviyesi ortalaması $5,9 \pm 2,9$ ng/ml iken, kontrol grubunun irisin seviyesi ortalaması $6,8 \pm 3,1$ ng/ml olarak saptandı ve bu 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 9).

Tablo 9: Hasta ve kontrol grubu serum irisin düzeyleri

	Hasta (n=30)	Kontrol (n=30)	P değeri
İrisin(ng/ml)	$5,9 \pm 2,9$	$6,8 \pm 3,1$	0,634

Hasta ve kontrol grupları, kendi içerisinde, irisin ve diğer parametre düzeyleri arasında olası bir ilişki açısından da değerlendirildi. Hasta grubunun irisin düzeyleri ile serumda bakılan hemogram, glukoz, insülin, lipid profili, AST, ALT, kreatinin, TSH, fT4, fT3, anti-Tg, anti-TPO, TRAb düzeyleri ve diğer kayıt altına alınan veriler (yaş, BMI, boy, bel çevresi, vücut ağırlığı) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. Kontrol grubunda ise, irisin düzeyleri ile iki parametre arasında anlamlı ilişki saptandı: Anti-Tg ile pozitif yönde kuvvetli (p: 0.034, r: 0.845), trombosit düzeyi ile de pozitif yönde orta kuvvetli ilişki (p: 0.019, r: 0.424) saptandı.

Graves hastaları kendi içerisinde hipotiroidik, ötiroidik ve hipertiroidik olanlar olarak 3 gruba ayrılıp irisin düzeyleri ile tiroid hormonlarının ilişkisi incelendiğinde hipotiroidik hastaların irisin seviyeleri hipertiroidik ve ötiroidiklere göre biraz yüksek bulundu ancak üç grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 10).

Tablo 10: Hastaların tiroid hormon durumlarına göre serum irisin düzeyleri

	Hipotiroidik GH (n=5)	Ötiroidik GH (n=12)	Hipertiroidik GH (n=13)	P değeri
İrisin(ng/ml)	8,5 ± 1,8	5,6 ± 0,8	5,3 ± 0,6	0,166

Hastalar klinik özelliklerine göre gruplandırılarak da değerlendirildi. Oftalmopatisi olan hastalarda oftalmopatisiz gruba göre irisin düzeyleri daha yüksek saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 11). Ayrıca relaps yaşamış hastaların irisin seviyeleri, tanı aldıktan belli bir süre sonra remisyona girmiş ve remisyonda seyretmeye devam eden hastalara göre daha yüksek saptandı, ancak yine istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 12).

Tablo 11: Graves hastalarının oftalmopati durumuna göre serum irisin düzeyleri

	Oftalmopatisi olan GH (n=7)	Oftalmopatisi olmayan GH (n=21)	P değeri
İrisin(ng/ml)	8,1 ± 4,3	5,3 ± 2,1	0,069

Tablo 12: Relaps yaşamış ve yaşamamış Graves hastalarının irisin düzeyleri

	Relaps yaşamış GH (n=14)	Relaps yaşamamış GH (n=16)	P değeri
İrisin(ng/ml)	7,0 ± 3,7	5,0 ± 1,7	0,07

Hastaların ultrasonografi ile tiroid boyutları değerlendirilerek bez boyutu ile irisin düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildi: Tiroid boyutu büyük olanlarda normal boyutlu olanlara nazaran irisin düzeyleri daha düşük saptandı (p: 0,014) (Tablo 13). Ultrasonografi ile değerlendirme sırasında bez yapısında nodül saptanan hastalar da oldu. Bu hastalarda olası bir nodül varlığı - irisin ilişkisi araştırıldı ancak anlamlı bir fark elde edilmedi (p: 0,502) (Tablo 14).

Tablo 13: Graves hastalarının tiroid bezi boyutlarına göre serum irisin düzeyleri

	Normal boyutlu tiroid bezi olan GH (n=19)	Büyümüş tiroid bezi olan GH (n=11)	P değeri
İrisin(ng/ml)	6,9 ± 3,3	4,3 ± 0,7	0,014*

*=P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 14: Graves hastalarının tiroide nodül varlığına göre serum irisin düzeyleri

	Nodülü olan GH (n=10)	Nodülü olmayan GH (n=20)	P değeri
İrisin(ng/ml)	6,1 ± 3,4	5,9 ± 2,7	0,502

Hastalar aldıkları tedavilere göre medikal, radyoaktif ve cerrahi tedavi alanlar olarak üç gruba ayrıldı. Tedavi şekli ile irisin arasında olabilecek bir ilişki araştırıldı, ancak anlamlı bir sonuç elde edilmedi (p: 0,384) (Tablo 15).

Tablo 15: Graves hastalarının aldıkları tedaviye göre serum irisin düzeyleri

	Medikal tedavi (n=17)	RAI tedavisi (n=5)	Cerrahi tedavi (n=8)	P değeri
İrisin(ng/ml)	5,5 ± 2,4	4,6 ± 0,5	7,6 ± 4,2	0,384

Çalışmamızdaki Graves hastalarının 5'i(%16,6) TRAb pozitif, 25'i(%83,6) TRAb negatif idi. Bu hastaların irisin düzeyleri ile TRAb arasında anlamlı fark saptanmadı (p: 0,829) (Tablo 16).

Tablo 16: Graves hastalarının TRAb pozitif/negatif oluşlarına göre irisin düzeyleri

	TRAb (+) GH (n=5)	TRAb (-) GH (n=25)	P değeri
İrisin(ng/ml)	6,2 ± 4,0	5,9 ± 2,8	0,829

Graves Hastalığı ön tanısı ya da tanısı olan ve sonrasında medikal, cerrahi veya radyoaktif iyot tedavileri uygulanan yine aynı 30 hastanın miRNA düzeylerine de bakıldı. Hastaların 21'i kadın (%70) ve 9'u erkek(%30) olup yaş ortalaması 38,8 ± 10,0 (yıl) idi (Tablo 7). Hasta ve kontrol grubunda önceki çalışmalardan yapılan derlemelere göre seçilen 5 farklı miRNA düzeyi değerlendirildi. Gruplar arasında miRNA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo 17). Ancak çalışmaya katılan bireyler cinsiyetlerine göre gruplara ayrıldığında, bazı miRNA düzeylerinde bu 2 grup arasında anlamlı fark olduğu görüldü. Kadın bireylerde saptanan miR-22 ve miR-375 düzeyleri erkek bireylere göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptandı. (Tablo 18).

Tablo 17: Hasta ve kontrollerin miRNA düzeyleri

	Hasta (n=30)	Kontrol (n=30)	P değeri
hsa-miR-376b	34,1 ± 1,5	33,8 ± 1,3	0,401
hsa-miR-154	33,0 ± 1,4	32,7 ± 1,3	0,400
miR-451	19,0 ± 2,0	19,1 ± 1,9	0,872
miR-375	34,0 ± 1,1	34,0 ± 1,0	0,900
miR-22	22,9 ± 1,2	22,5 ± 1,0	0,226

Tablo 18: Çalışmadaki tüm bireylerin cinsiyetlerine göre miRNA düzeyleri

	Kadın (n=39)	Erkek (n=21)	P değeri
hsa-miR-376b	33,7 ± 1,4	34,4 ± 1,5	0,075
hsa-miR-154	32,9 ± 1,4	32,7 ± 1,1	0,628
miR-451	19,4 ± 2,0	18,4 ± 1,6	0,073
miR-375	34,2 ± 1,2	33,7 ± 0,7	0,016*
miR-22	22,9 ± 1,1	22,3 ± 1,0	0,035*

*=P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı.

Hastaların miRNA düzeyleri ile çalışmamızda baktığımız diğer parametreler de karşılaştırıldı: miR-376b, miR-154, miR-451 ve miR22 düzeyleri ile anti-Tg düzeyleri arasında negatif yönde orta kuvvetli ilişki saptandı (sırasıyla p: 0.041, r: -0.375, p: 0.019, r: -0.425, p: 0.014, r: -0.442, p: 0.001, r: -0.563). miR-376b ve miR-154 düzeyleri ile Hb düzeyleri arasında pozitif yönde orta kuvvetli ilişki saptandı (sırasıyla p: 0.002, r: 0.550, p: 0.02, r: 0.549). miR-376b ile HDL düzeyi arasında negatif yönde orta kuvvetli (p:

0.016, r: -0.445), miR-451 ile HDL düzeyi arasında ise pozitif yönde orta kuvvetli (p:0.044, r: 0.376) ilişki saptandı. miR-451 ile AKŞ arasında negatif yönde orta kuvvetli ilişki (p: 0.021, r: -0.427) saptandı. miR-22 ile fT3 düzeyleri arasında da, negatif yönde orta kuvvetli ilişki saptandı (p: 0.046, r: -0.367). Hastaların miRNA düzeyleri ile geri kalan diğer parametreler ile aralarında anlamlı fark saptanmadı.

Kontrollerin miRNA düzeyleri de çalışmamızda bakılan diğer parametreler ile karşılaştırıldı: miR-451, miR-375 ve miR-22 düzeyleri ile yaş arasında pozitif yönde orta kuvvetli bir ilişki saptandı (sırasıyla p: 0.026, r: 0.405, p: 0.004, r: 0.511, p: 0.02, r: 0.423). miR-451 düzeyleri ile anti-TPO düzeyleri arasında ise, pozitif yönde kuvvetli bir ilişki saptandı (p: 0.05, r: 0.812).

Çalışmamızdaki Graves hastaları tiroid fonksiyonlarına göre üç gruba ayrıldı: Hipotiroidik, ötiroid ve hipertiroidik olanlar. Bu üç grup arasındaki miRNA'ların düzeyleri kıyaslandığında hipertiroidik hastaların miR-22 seviyelerinin diğer iki grup hastaya göre daha düşük olduğu saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değildi (Tablo 19).

Tablo 19: Hastaların tiroid hormon durumlarına göre miRNA düzeyleri

	Hipotiroidik GH (n=5)	Ötiroidik GH (n=12)	Hipertiroidik GH (n=13)	P değeri
hsa-miR-376b	34,2 ± 1,4	34,1 ± 1,3	34,0 ± 1,9	0,989
hsa-miR-154	33,0 ± 0,8	33,2 ± 0,9	32,7 ± 1,8	0,250
miR-451	18,6 ± 1,6	20,0 ± 1,9	18,3 ± 1,9	0,127
miR-375	34,2 ± 0,8	34,1 ± 0,8	33,9 ± 1,4	0,880
miR-22	23,0 ± 0,6	23,6 ± 1,0	22,2 ± 1,2	0,064

Hastalar kliniklerine göre de sınıflandırılarak değerlendirildi: Oftalmopati olanlar ile olmayanların miRNA seviyelerine bakıldığında, iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 20). Tedavi sonrası remisyona girip sonra relaps yaşamış hastalar ile halen remisyonda olan hastaların miRNA düzeyleri de karşılaştırıldı. Bu iki grup arasında miR-154 düzeyinde anlamlı fark elde edildi. Relaps yaşamış olan hastaların miR-154 düzeyleri halen remisyonda olanlara göre anlamlı olarak yüksek saptandı (p: 0.035) (Tablo 21).

Tablo 20: Graves hastalarında oftalmopati varlığına göre miRNA düzeyleri

	Oftalmopati olan GH+ (n=7)	Oftalmopati olmayan GH+ (n=23)	P değeri
hsa-miR-376b	34,1 ± 1,4	34,1 ± 1,6	1,000
hsa-miR-154	33,1 ± 0,9	33,0 ± 1,5	0,598
miR-451	18,9 ± 2,3	19,1 ± 1,9	0,811
miR-375	33,6 ± 1,0	34,2 ± 1,1	0,288
miR-22	23,4 ± 0,8	22,8 ± 1,3	0,207

Tablo 21: Graves hastalarında relaps durumuna göre miRNA düzeyleri

	Relaps yaşamış hastalar (n=14)	Relaps yaşamamış hastalar (n=16)	P değeri
hsa-miR-376b	34,5 ± 1,4	33,7 ± 1,7	0,214
hsa-miR-154	33,5 ± 1,5	32,5 ± 1,0	0,035*
miR-451	18,9 ± 1,8	19,1 ± 2,2	0,802
miR-375	34,0 ± 1,2	34,1 ± 1,0	0,869
miR-22	23,1 ± 1,1	22,7 ± 1,3	0,208

*=P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı.

Graves hastaları, tiroid boyutları ve bezdeki nodül varlığı ile miRNA düzeyleri arasında ilişki açısından da değerlendirildi. Ne bez boyutu ne de tiroide nodül varlığı ile miRNA düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptandı (Tablo 22-23).

Tablo 22: Hastaların tiroid boyutuna göre miRNA düzeyleri

	Tiroid bezi normal boyutlu hastalar (n=19)	Tiroid bezi büyümüş hastalar (n=11)	P değeri
hsa-miR-376b	33,9 ± 1,3	34,5 ± 1,9	0,299
hsa-miR-154	33,1 ± 1,5	32,8 ± 1,1	0,589
miR-451	19,2 ± 1,8	18,8 ± 2,4	0,639
miR-375	34,2 ± 1,0	33,7 ± 1,2	0,206
miR-22	23,1 ± 1,2	22,6 ± 1,1	0,361

Tablo 23: Hastaların nodül varlığına göre miRNA düzeyleri

	Nodülü olan hastalar (n=10)	Nodülü olmayan hastalar (n=20)	P değeri
hsa-miR-376b	34,1 ± 2,0	34,1 ± 1,3	0,931
hsa-miR-154	33,0 ± 1,7	33,0 ± 1,2	0,935
miR-451	19,6 ± 1,7	18,7 ± 2,1	0,262
miR-375	34,3 ± 1,3	33,9 ± 1,0	0,439
miR-22	23,0 ± 0,9	22,9 ± 1,3	0,875

Hastalar medikal, radyoaktif ve cerrahi tedavi alanlar olarak üç gruba ayrılarak karşılaştırıldığında, miRNA düzeyleri ile tedavi şekilleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 24).

Tablo 24: Hastaların tedavi şekillerine göre miRNA düzeyleri

	Medikal tedavi (n=17)	RAI tedavisi (n=5)	Cerrahi tedavi (n=8)	P değeri
hsa-miR-376b	34,1 ± 1,8	34,1 ± 1,4	34,2 ± 1,4	0,946
hsa-miR-154	32,9 ± 1,6	32,9 ± 1,4	33,1 ± 0,8	0,777
miR-451	18,7 ± 1,8	19,4 ± 2,0	19,4 ± 2,5	0,673
miR-375	34,2 ± 1,1	33,8 ± 0,9	33,9 ± 1,2	0,572
miR-22	22,8 ± 1,2	22,5 ± 1,5	23,4 ± 0,7	0,230

Çalışmamızda bulunan 5 (%16,6) TRAb pozitif, 25 (%83,6) TRAb negatif hastada TRAb ile miRNA düzeyleri arası ilişki de değerlendirildi, ancak anlamlı sonuç elde edilmedi (Tablo 25).

Tablo 25: Hastaların TRAb düzeylerine göre miRNA düzeyleri

	TRAb (+) GH (n=5)	TRAb (-) GH (n=25)	P değeri
hsa-miR-376b	34,2 ± 1,4	34,1 ± 1,6	0,957
hsa-miR-154	32,6 ± 0,6	33,1 ± 1,5	0,552
miR-451	17,9 ± 2,0	19,2 ± 1,9	0,229
miR-375	33,3 ± 1,0	34,2 ± 1,1	0,096
miR-22	22,5 ± 1,1	23,0 ± 1,2	0,416

5. TARTIŞMA

Bilindiği üzere Graves hastalığı etyolojisi, kliniği, prognozu ve şiddeti farklı birçok faktöre bağlı olabilen otoimmün bir tiroid hastalığıdır. Klinikte sıklıkla hipertiroidi şeklinde görülür (4,5). Şiddetli olgularda remisyonu sağlamak oldukça zor olabildiği gibi, remisyondan sonra tekrarlayan relapslar, bu relapslar sırasında da ani görme kaybına kadar farklı kliniklere sebep olabilecek şiddette oftalmopatiler görülebilmektedir (15). GH'nın tanı ve prognoz tayininde değerlendirilebilen belirteç ve bulgular hem kısıtlı hem de yetersizdir. Bu sebeple halen bu hastalığın tanısı, prognozu, tedavisi açısından yeni bir keşif saptayabilmek adına pek çok çalışma yapılmaktadır. Biz de bu çalışmada, benzer amaçlarla daha önceden yapılmış çalışmalarını referans alarak yeni biyobelirteçler bulabilmeyi amaçladık. Referans aldığımız çalışmalardan anlamlı sonuçlar elde edilmesine göre seçtiğimiz irisin ve 5 adet miRNA düzeyini inceledik.

GH relapsının tedavi öncesi öngörülebilirliğini araştıran bazı çalışmalar yapılmıştır. Struja ve arkadaşları GH' da tedavi öncesi varolan ve ATİ tedavisi kesildikten sonraki nüksü öngören faktörler ile ilgili Temmuz 2015'te Cochrane, EMBASE ve PubMed' de yayınlanmış 54 çalışmayı derleyerek yeni bir çalışma yapmışlardır (32). Bu çalışmada toplam 7595 katılımcı mevcut olup, 3696'sında relaps görülmüştür (%48,7). Bu hastalarda orbitopati varlığı, sigara kullanımı, ultrasonografi ile ölçülen tiroid hacmi, WHO' ya göre guatr boyutu, fT3, tT3, TRAb ve TBII seviyeleri ile relaps arasında anlamlı ölçüde ilişki saptanırken, cinsiyet, yaş, başlangıç tT4 seviyesi ile arada önemli bir ilişki saptanmamıştır (32). Genç yaş, büyük guatr, sigara kullanımı, erkek cinsiyet, yüksek antikör seviyeleri ve ciddi biyokimyasal hastalık varlığı (fT4/tT4/fT3/tT3/TRAb/TBII yüksekliği) GH'da ATİ kesildikten sonra yaşanan nüksleri öngördürücü risk faktörleri olarak daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Burada bahsedilen ATİ tedavisinde ilaç doz ya da tip kısıtlaması yoktur) (33). Yine Struja ve arkadaşlarının az önceki çalışmadan sadece 3 ay sonra yayınladığı retrospektif başka bir çalışmada ise, yakın dönemde açıklanmış ve GH' nın tedavi sonrası nüksünü öngördüğü iddia edilen GREAT skorlama sisteminin doğruluğu incelenmiştir (34) (GREAT: Graves' Recurrent

Events After Therapy). GREAT skorlamasında yaş, FT4 düzeyi, TBII düzeyi ve WHO kriterlerine göre guatr derecesi ile değerlendirme yapılmaktadır. Bu skorlamaya 5.değişken olarak genetik testler (PTPN 22, HLA) eklendiğinde skorlama GREAT+ olarak adlandırılmaktadır (16). Buna göre hastalar risk durumu açısından 3 sınıfa ayrılır; 0-1 puan alanlar class I, 2-3 puan alanlar class II, 4-6 puan alanlarsa class III olarak sınıflandırılmıştır. Skorlamaya göre class I'de %16, class II'de %44, class III'te %68 nüks riski mevcut iken, GREAT+ skorlamasına göre class I'de %4, class II'de %21, class III'te %49, HLA polimorfizmi ya da PTPN22 pozitifliği olan class IV+'te ise %84 nüks riski mevcuttur (16). Struja ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, 371'i (%50,1) relaps yaşamış 741 Graves hastası mevcuttur. Bu hastalar ortalama olarak $25,6 \pm 33,5$ ay takip edilmiş ve ATİ tedavisi başlangıcı ya da ATİ tedavisinin kademeli olarak kesilmesinin ortalama 14 ± 22 ay sonrasında nüks yaşamışlardır. Çalışma sonucunda GREAT skorlamasına göre class I, II ve III'te olan hastaların sırasıyla % 33.8, % 59.4 ve % 73.6' sında relaps izlenmiş ve relaps ile artmış GREAT skoru arasında anlamlı ölçüde güçlü bir ilişki olduğu doğrulanmıştır (34). Dolayısıyla bu çalışma da göstermiştir ki, GREAT skorlamasının GH nüks riskini öngörmede ve başlangıç tedavisinin seçiminde yüksek oranda geçerliliği mevcuttur.

Oftalmopati, Graves hastalığı için sadece relaps anında görülen bir bulgu değil, tanı anında da saptanabilen bir bulgudur. Yeni GH tanısı konmuş hastalarda Graves orbitopatisi gelişme ihtimalini öngören bir skorlama sistemi tanımlanmıştır. PREDIGO olarak isimlendirilen bu skorlamada CAS, TBII düzeyi, semptomatik geçen hipertiroidik süre ve sigara kullanımı temel değişkenlerdir. Maksimum skor 15 puandır. Bu skorlama sisteminin pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla 0.28 ile 0.91'dir. PREDIGO' ya göre, tanı anında Graves orbitopatisi olmayan hastalarda ATİ başlandıktan sonraki 18 aylık dönemde orbitopati gelişme ihtimali %15'tir. Bu sonuca göre, PREDIGO ile Graves orbitopatisi gelişmesi değil de gelişmemesi ihtimalinin tahmin edilmesinin daha doğru olacağı düşünülmektedir (17). Günümüzde Graves hastalığının tanısı, prognozu ve şiddet tayininde aşikar hipertiroidi varlığı, TRAb pozitifliği, oftalmopati varlığı gibi ölçeklerden faydalanılmaktadır. GH

tanı, şiddet, prognoz ve nüks tayininde elimizdeki tetkiklerin kısıtlı kalması ve bu konuda halen pek çok araştırma yapıyor oluşu, ayrıca yeni yapılan çalışmalarda Graves hastalığının etyolojisinde metabolik ve epigenetik faktörlerin etkili olabildiğinin saptanması üzerine, biz de Graves hastaları ile sağlıklı kontrollerde serum irisin ve miRNA düzeylerini değerlendirdik. Bu değerlendirmedeki amacımız, irisin ve miRNA' ların Graves hastalığının tanı, şiddet, prognoz ya da nüksü için faydalı birer belirteç olarak kullanılabileceklerini göstermektir. Değerlendirmemiz sonucunda, hasta ve kontrol grubu arasındaki irisin ile seçili miRNA seviyelerinde farklılık izlenmedi. Hastaların kendi içerisindeki hormonal durum, otoantikor pozitifliği, klinik durum ve tedavi şekline göre karşılaştırılmalarında da anlamlı bir fark izlenmedi ancak oftalmopatisi olan grup ile relaps yaşamış gruplarda irisin seviyeleri daha yüksek idi (sırasıyla p: 0.069, p: 0.07). Yine relaps yaşamış hastalarda miR-22 ve miR-154 ekspresyonu yüksek saptandı (sırasıyla p: 0.208, p: 0.035).

İrisin ve tiroid hormonlarının metabolizma üzerine bilinen etkilerinden dolayı, aralarında olabilecek bir ilişki açısından araştırmalar yapılmaktadır. 2014 yılında Polonya'da M.Ruchala ve arkadaşları tiroid disfonksiyonu olan hastalarda serum irisin konsantrasyonlarına bakmıştır ve hipotiroidik hastalarda hipertiroidiklere göre serum irisin düzeylerini daha düşük saptamışlardır, ancak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değildir (p: 0,0726) (2). Aynı çalışmada, irisin miyosit kaynaklı olduğundan dolayı, irisin ile kreatin kinaz(CK) seviyeleri arasında korelasyon olup olmadığına da bakılmıştır. Hipotiroidi ya da hipertiroidisi olan 20 hasta ile yapılan bu çalışmada (10 hipotiroidik, 10 hipertiroidik) hasta serumlarında TSH, ft3, ft4, anti-TPO, TRAb, CK ve irisin düzeylerine bakılmıştır (Bu çalışmaya dahil edilen hipotiroidik hastalar içerisinde OITH olanlar olduğu gibi yetersiz medikal tedavi alan, tiroidektomi olmuş ya da radyoaktif iyot tedavisi almış olanlar da mevcuttur). Çalışma sonucunda ortalama serum irisin seviyeleri hipotiroidili hastalarda hipertiroidililere göre daha düşük iken, ortalama serum CK seviyeleri hipotiroidi grubunda hipertiroidi grubuna göre anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (p: 0.004). İrisin ile TSH seviyeleri arasındaysa orta kuvvette

negatif korelasyon saptanmıştır (p: 0.023, r: -0.49). Dolayısıyla hipotiroidide TSH artarken irisinde azalma, hipertroidide de TSH azalırken irisinde artma görülmüştür. Ayrıca ft4 ile irisin arasında orta kuvvette bir pozitif korelasyon (p: 0.036, r:0.48) saptanmıştır ki, bu bir önceki sonucu desteklemektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda da, serum CK seviyesi ile ft3 - ft4 arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Bu çalışma göstermiştir ki, serum irisin konsantrasyonu tirometabolik durum ile yakından ilişkilidir (2). Tiroid fonksiyonları ötiroid hale döndürüldükten sonra halen serum irisin seviyesinde anormallikler devam ediyor mu yoksa düzeliyor mu anlayabilmek içinse daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, tiroid disfonksiyonu ile irisin seviyeleri arasındaki ilişkiye bakılırken, eş zamanlı olarak egzersizin de irisin seviyesine etkisi araştırılmıştır (21). Sedanter yaşayan farelerin hem hipotiroidik hem de hipertroidik olanlarında serum irisin seviyelerinin ötiroidiklere göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca akut egzersiz sonrası da serum irisin seviyesinde artış izlenmiştir. Kronik egzersiz sonrasında ise, ne hipotiroidik ne de hipertroidik farelerde anlamlı serum irisin değişikliği olmamıştır. Serum irisin seviyelerinde hem hipotiroidi hem de hipertroidide izlenen bu up regülasyonun muhtemelen oksidatif stres ve/veya miyopatiye cevap olarak ortaya çıktığı, akut egzersizin de irisin seviyesini yine oksidatif stres ile ilişkisi sebebiyle artırdığı düşünülmüştür. Çalışma sonucunda, tiroid hormon disfonksiyonu ile serum irisin seviyesi arasında belirgin bir ilişki saptanmamıştır (21).

Önceden yapılan başka bir çalışmada T3' ün kas üzerine etkili olduğu, kasta bulunan ve FDNC5' i indükleyen PGC-1 adlı bir proteini uyardığı raporlanmıştır (35) (FDNC: Fibronectin type III domain-containing protein) . Bu değerlendirmeler sonucunda, bu çalışmada dolaşımdaki irisin seviyelerini belirleyen ana faktörün Graves hastalığı olduğu düşünülmüştür. Tüm bu sonuçlar, artmış irisin düzeylerinin hipertroidideki artmış enerji metabolizmasında katkısı olduğunu düşündürmüştür (22).

2016 yılında ise, Panagiotou ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, tiroid hormonlarının serum irisin seviyeleri üzerine etkisi

incelenmiştir (36). Bu çalışma 2 koldan sürdürülmüştür: Bir koldan kesitsel olarak subklinik hipertiroidik bireyler ile ötiroidik bireyler arasında karşılaştırma yapılmış, diğer koldan ise prospektif olarak tiroidektomi olup levotiroksin tedavisi altında olan ve 5 haftalığına tedavisi kesilen hastalar (Grup A) ile rekombinan insan TSH ile stimülasyon yapılan hastalar (Grup B) karşılaştırılmıştır. Ne subklinik hipertiroidili hastalar ile ötiroid hastalar arasında ne de levotiroksin tedavisi kesilerek hipotiroidiye sokulan hastalar ile rekombinan TSH stimülasyonu yapılarak hipotiroidiye sokulan hastalar arasında irisin açısından farklılık tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, fizyolojik ve suprafizyolojik aralıktaki tiroid hormon düzey değişimlerinin serum irisin seviyelerini etkilemediği izlenmiştir. Bu nedenle, tiroid hormonları ile irisinin metabolik etkilerinin büyük ihtimalle birbirinden bağımsız olduğu düşünülmüştür (36). Bizim çalışmamızda da, ne hasta ve kontrol grubu arasında ne de hastaların kendi aralarında hormonal durumları ile yapılan karşılaştırmalarında anlamlı farklılık izlenmemiştir (sırasıyla p: 0.297, p: 0.166).

Yine 2016 yılında bu kez Türkiye’de (Ankara, Gazi Üniversitesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı) yapılan başka bir çalışmada, aşikar hipertiroidi halinde olan 41 Graves hastasında irisin ve myostatin düzeylerine bakılmış ve serum irisin düzeyleri kontrol gruba göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır (p değeri 0,003) (22). Myostatin seviyelerinde ise, istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p değeri 0,21). İrisin düzeyleri ile FT3, FT4 ve TRAb arasında pozitif, TSH arasında ise negatif korelasyon saptanmıştır (sırasıyla p: 0.03, p: 0.02, p: 0.02, p: 0.006). Bizim çalışmamızda irisin seviyelerinde anlamlı farklılık tespit edilememesinin, çalışmalar arası farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. 2 çalışma bu sebeple kıyaslandığında, hastaların yaş ve BMI ortalamaları oldukça yakınken; yukarıdaki çalışmada sadece hipertiroidik hastalar bulunmakta, bizim çalışmamızda ise 5 hipotiroidik, 12 ötiroidik, 13 hipertiroidik hasta bulunmaktadır. Hastalarımızın tiroid hormon durumlarına göre irisin seviyeleri incelendiğinde, hipertiroidik hastalarda ötiroidik ve hipotiroidik olanlara kıyasla daha düşük irisin seviyeleri ($5,3 \pm 0,6$ ng/dl) saptanmıştır, ancak sonuç

istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde değildir (p: 0,166). Yukarıdaki çalışmada 26 kadın (%63,4), 15 erkek (%36,6) hasta bulunmaktayken bizim çalışmamızda 21 kadın (%70), 9 erkek (%30) mevcuttur. Yani iki çalışma arasında cinsiyet açısından da anlamlı bir fark yoktur. Çalışmamızın verilerine göre, hasta grupta cinsiyet ile irisin arasındaki ilişki incelendiğinde erkeklerde kadınlara göre daha düşük irisin seviyeleri saptanmıştır, ancak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değildir (p değeri 0,178). Elde ettiğimiz bu sonuca göre, bu çalışmadaki hasta popülasyonununun %63.4'ünü kadınların oluşturduğu düşünüldüğünde, irisin seviyelerinin hasta grupta kontrole nazaran yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur. Bizim çalışmamızda da kadın hastaların erkek hastalara oranı yüksektir ancak irisin seviyeleri bahsedilen çalışmada olduğu gibi, hastalarda kontrollere ya da hipertiroidik hastalarda diğer hastalara göre daha yüksek saptanmamıştır. Bu farkın nedeninin de, bu çalışmadaki kan örneklerinin anti tiroid tedavi başlamadan alınması olabileceği düşünülmüştür. Yani bu çalışmadaki hastaların tümü yeni tanı ve tedavi öncesi dönemdedir. Oysa bizim çalışmamızdaki 30 Graves hastasının 5'i (%16,6) radyoaktif iyot tedavisi almış, 8'i (%26,6) de cerrahiye gitmiş idi. Halihazırda 17'si (%56,6) de medikal tedavi almaktaydı. Bu sonuçlar üzerine irisinin dolaşımdaki tiroid hormon düzeylerinden mi yoksa uygulanan tedavi şekillerinden mi etkilenecek böyle farklı seviyeler gösterdiği merak konusu uyandırmaktadır. Belki de çalışmamızda cerrahi ya da RAI tedavi ile ablasyon yapılmış hastalar olduğu için ortalama irisin seviyesi önceki çalışmadaki gibi yüksek saptanamamış olabilir.

Kocik ve arkadaşları 2017' de farklı tiroid disfonksiyonlarında irisin ve kas metabolizması arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (37). 119 hasta ile 45 sağlıklı kontrolün dahil edildiği çalışmadaki hastaların 55' i hipertiroidik, 64' ü ise hipotiroidiktir. Hipotiroidik olan hastalar, hipotiroidide olma sürelerine göre uzun süreli hipotiroidisi olan OITH tanılı hastalar (n=32) ve kısa süreli hipotiroidisi olan ablatif tedavi (cerrahi veya RAI) almış hastalar (n=32) olarak 2 gruba ayrılmıştır. Hipertiroidik hastaların ise hepsini aktif Graves hastaları oluşturmaktadır. Bu 119 hastanın serumunda irisin seviyesi ile birlikte tiroid hormonları, CK, distrofin ve titin seviyeleri de incelenmiştir. Ayrıca içlerinden

toksik ve toksik olmayan multinoduler guatrı, GH ve tiroid papiller kanseri olan toplam 80 hastanın da doku örneklerinde FDNC5 ekspresyonları incelenmiştir. Uzun süreli hipotiroidisi olan hastaların serum irisin seviyesi geri kalan hasta grubuna göre anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır ($p < 0.001$). Gruplar arasında serum distrofin ve titin seviyeleri açısından da anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla p değerleri 0.020 ve 0.022). OITH olanlarda serum distrofin seviyeleri sağlıklı kontrollere göre daha düşük olup ($p: 0.071$), serum titin seviyeleri de OITH ve GH olanlarda daha düşük saptanmıştır (sırasıyla p değerleri 0.068, 0.057). Hipotiroididen ötiroidiye geçişte serum irisin seviyelerinde artış, kas kütlelerinde azalma izlenirken, hipertiroididen ötiroidiye geçişte serum irisin seviyelerinde anlamlı değişim olmayıp ($p: 0.213$) yağ kütlelerinde artış izlenmiştir. Çalışma sonucu, serum irisin seviye değişikliklerinin uzun süreli hipotiroidi ile ilişkili olup, bu durumun da öncelikle uzamış myopati sonucunda olabileceğini desteklemiştir. Nitekim bu varsayımı aynı yönlü olarak, bizim çalışmamızda da kısa süreli hipotiroidisi olan ablatif tedavi almış hastalar mevcuttur ve serum irisin seviyelerinde anlamlı farklılık izlenmemiştir. Yine yukarıda bahsedilen çalışma sonucunda tiroid bezindeki FDNC5 gen ekspresyonu ile serum irisin seviye değişikliklerinin büyük ihtimalle bir ilişkisi olmadığı, her ne kadar metabolik süreç üzerine önemli etkisi olsa da tiroid malignitesi gelişiminde FDNC5 gen ekspresyonunun etkisi olmadığı saptanmıştır (37).

Yukarıda bahsedilen son 2 çalışmadan sonra GH ve serum irisin seviyesi arasındaki ilişkiyi inceleyen literatürdeki 3. çalışma bizim çalışmamızdır. Diğer iki çalışmadan farklı olarak, Graves hastaları sadece tiroid hormonları ile serum irisin seviyeleri arasındaki ilişki açısından değil, hastalığın diğer klinik ve laboratuvar belirteçleri (oftalmopati varlığı, relaps varlığı, tiroid hacmi, tiroidde nodül varlığı, TRAb pozitifliği) ile uygulanan tedavi şekilleri (ATİ, RAI, cerrahi) açısından da olabilecek ilişkiler açısından incelenmiştir. Daha önce Struja ve arkadaşları, Graves hastalarını olası nüks belirteçleri açısından değerlendirmiş; fT3, tT3, TRAb, TBII seviyeleri, orbitopati varlığı, sigara kullanımı, ultrasonografi ile ölçülen tiroid hacmi ve WHO' ya göre guatr boyutu ile relaps arasında anlamlı ölçüde ilişki saptamıştı

(32). Biz de hastalarımızı hormonal durum (hipertiroidik, ötiroidik, hipotiroidik), TRAb pozitifliği, oftalmopati varlığı, relaps durumu, ultrasonografi ile ölçülen tirod hacmi ve alınan tedavi şekline (medikal, RAI, cerrahi) göre sınıflandırdık. Bu sınıfların irisin seviyelerini arasında olabilecek ilişkiler açısından değerlendirdik. Daha önce hiç yapılmamış olan bu değerlendirmeyi yaparak, irisinin Graves hastalığı için prognostik bir belirteç olabileceğini göstermeyi amaçladık. Bunun sonucunda yeni bir bulgu olarak, serum irisin düzeyi ve Graves hastalarının tiroid boyutları arasında anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Ultrasonografi ile tiroid boyutları incelenen hastaların irisin seviyeleri karşılaştırıldığında, büyük tiroid bezine sahip olanların normal boyutta tiroid bezi olanlar ile arasında anlamlı fark elde edilmiştir (p: 0.014). Tiroid bezi normal boyutta olanların serum irisin seviyeleri, büyümüş tiroid bezi olanlara göre istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır (Tablo 7). Başlangıçta bahsettiğimiz Graves hastalığı ile irisin seviyesi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği daha önce yapılmış olan çalışmalarda, hastaların tiroid boyutları ile irisin arasında herhangi bir inceleme yapılmamıştır. Dolayısıyla bizim çalışmamızda yapılan bu değerlendirme şu ana kadar tek ve ilktir.

Çalışmamızda oftalmopatisi olan hastaların irisin seviyeleri, oftalmopatisi olmayanlara göre daha yüksek saptanmıştır (p değeri 0,069). Yine aynı şekilde relaps yaşamış hastaların serum irisin düzeyleri, hiç relaps yaşamamış hastalara göre daha yüksek saptanmıştır (p değeri 0,07). Ancak her iki sonuç da, istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde değildir. Tedavi almamış ve kadın cinsiyetin ağırlıkta olduğu yeni çalışmalarda bu istatistiki fark daha anlamlı ölçülere ulaşabilir. Ayrıca elde ettiğimiz bir diğer sonuç ise, cerrahiye giden hastaların serum irisin seviyelerinin diğer tedavi yöntemlerini almış hastalara göre daha yüksek saptanmış olmasıdır. Ancak bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değildir (p değeri 0,384). Cerrahiye giden hastaların genellikle hastalık şiddeti fazla olan, medikal tedavi ile remisyona girememiş ya da relaps yaşamış hastalar olduğu düşünülür ise, irisinin Graves hastalığı için prognostik bir belirteç olabileceği olasılığı güçlenmektedir. Ve yine daha fazla sayıda, sadece cerrahi olmuş ya da sadece hipertiroidik hastalar ile yapılacak başka bir

çalışmada bu sonuçların anlamlı düzeylere ulaşabileceği düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar ışığında, serum irisin düzeyi ile Graves hastalığının prognozu arasında bir ilişki olduğu varsayılabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda otoimmün tiroid hastalığı olan hastaların tiroid bezi dokularında ve Graves hastalığı olan bireylerin kan mononükleer hücrelerinde geniş ve küçük, 19-25 nükleotidden oluşan, protein kodlamayan (non-coding), yüksek derecede korunmuş bazı regülatuar RNA' ların eksprese olduğu saptanmıştır (23,29). Bu regülatuar RNA' lar posttranskripsiyonel aşamadaki gen ekspresyonunun regülasyonunda görev almakta olup, bu ekspresyonlar immün fonksiyonlar ile hücrelerin ölümü, farklılaşması, gelişimi, proliferasyonu ve metabolizmasını da içeren geniş bir biyolojik olaylar dizisinde yer almaktadır (23,24). Bu sebeple birçok hastalık için ön tanıda belirleyici bir belirteç olarak kabul edilmektedirler. Çalışma sonucumuzda miR-376b, miR-154, miR-451 ve miR22 düzeylerinin anti-Tg düzeyleri ile negatif yönde orta kuvvette ilişkili saptanması da otoimmünite ile miRNA' ların öngörülen bu ilişkisini doğrular nitelikte olmuştur (sırasıyla p: 0.041, r: -0.375, p: 0.019, r: -0.425, p: 0.014, r: -0.442, p: 0.001, r: -0.563). Ancak çalışmamız sonucunda, bakılan diğer otoantikörler olan anti-TPO ve TRAb ile seçili miRNA' lar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış olup, bu da araştırılmaya açık başka bir konuyu oluşturmaktadır.

Liu ve arkadaşları periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) farklı miRNA ekspresyonlarının Graves hastalığı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (24). Bu durumda, miRNA' lar Graves hastalığının tedavisini yönlendirmedeki hedeflerden biri olabilir. İlginç olarak bu miRNA' lar farklı sitokin ve kemokin yollarında yer alıyor olabilir. Bu çalışmada PKMH'de farklı miRNA ekspresyonlarını göstermek için sağlıklı bireyler (n=35), yeni tanı (n=41) ve remisyonda (n=13) Graves hastalarında miRNA microarray, kantitatif RT-PCR ve hücre kültürü kullanılmıştır. Graves hastaları ve sağlıklı kişilerde sistemik olarak farklı eksprese olan 3 PKMH miRNA taranarak doğrulanmıştır. miR-154, miR-376b ve miR-431 sağlıklı kontrollere göre yeni tanı Graves hastalarında suprese olarak tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla 0.017, 0.001 ve 0.008). Ek olarak, bu miRNA ekspresyonları

remisyondaki Graves hastalarında yeni tanı olanlara göre daha yüksek düzeylerde saptanmıştır. Bu arada, sağlıklı bireylerin PKMH kültürlerinde bu 3 miRNA ekspresyonları akut (24 saat) ve kronik (7 gün) T3 tedavisi ile direkt olarak inhibe olmuştur (24). T3 ve T4 tedavisinin doğuştan ya da kazanılmış immün cevapları genomik ve non-genomik yollarla regüle edebildiği bilinmektedir (30). Dolayısıyla bu çalışmada T3'ün immün sistem regülasyonunu miRNA yoluyla modüle edebiliyor olabileceği ortaya çıkmıştır. Nitekim bizim çalışmamızda da fT3 ile miR-22 arasında negatif yönde orta kuvvetli ilişki saptanmıştır (p: 0.046, r: -0.367). Bu miRNA'ların çeşitli kemokin ve sitokin sinyal yollarında rol aldığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, Graves hastalığında bu miRNA'ların down regülasyonu proinflamatuvar ve immünolojik yanıtları şiddetlendirerek hastalık gelişimini şiddetlendirebilir. Ayrıca bu miRNA'lar tarafından hedeflenen genler klasik olarak immunolojik yollarda (kemokin ve sitokin sinyal yolları ya da G protein ve Wnt sinyal yolları gibi) yer almaktadır. Bu yolakların GH patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin; G protein Sgen T393C polimorfizminin Graves hastalığının klinik gidişi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (38). Ayrıca kronik Graves oftalmopatisinde Wnt yolu genlerinin upregüle olduğu da raporlanmıştır (39). Bu tahmin edilen yollar yukarıdaki çalışmada GH patogenezindeki moleküler mekanizmalar açısından daha fazla ipucu vermiş, Graves hastalığının yeni belirteçleri ve tedavi hedefleri olabilecek, GH ve T3 tedavisi ile etkilenebilen miRNA' lar olduğunu göstermiştir (24). Liu ve arkadaşlarının bu çalışmasından yola çıkarak, biz de hasta ve kontrol grubumuzda miR-154 ve miR-376b düzeylerine baktık. O çalışmada miR-154 ve miR-376b düzeylerini Graves hastalarında kontrollere göre anlamlı ölçüde azalmış saptamışlardı ancak bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında bu miRNA' lar açısından anlamlı bir fark elde edilmedi (p değerleri sırasıyla 0,400 ve 0,401). Fakat bizim çalışmamızda farklı olarak yeni bir bulgu saptanmıştır: Relaps yaşamış hasta popülasyonunda miR-154 seviyeleri anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır (p: 0.035). Bu çalışmadaki hasta popülasyonunda 41 aşikar hipertiroidili(%75,9), 13 remisyonda(%24,1) hasta bulunmaktadır. Bu aşikar hipertiroidideki hastalardan herhangi bir anti tiroid tedavi başlanmadan önce kan örnekleri alınmıştır. Remisyondaki hastaların

hepsinin tedavisi ise, metimazol kullanımınıdır. Bizim çalışmamızdaki hastaların ise, çoğu hipertiroidiktir (n=13)(%43,3). Remisyonda olan hastalarımızın da bir kısmı medikal tedavi (metimazol) ile diğer kısmı ise ablatif tedaviler (RAI veya cerrahi) ile remisyona girmişlerdir. Bu çalışmadaki 41 aşikar hipertiroidik Graves hastası da TRAb pozitifdir, ancak bizim çalışmamızda, yeni tanı / tedavisiz hastamızın az olması sebebiyle TRAb negatif hasta oranı daha fazladır (n=25, %83,3). Bu çalışmada ayrıca şöyle bir çıkarımda da bulunulmuştur; miR-154 ekspresyonu hastalar remisyona girdiğinde normale geri dönmüş, yani artmıştır. Bizim çalışmamızdaki hasta popülasyonu bu çalışmaya göre daha küçük bir grup olup, oran olarak remisyondaki hasta bizim grubumuzda daha fazladır. İşte bu sebeple çalışmamızda saptadığımız anlamlı ölçüde yüksek miR-154 ekspresyonunun, yani iki çalışma arasındaki bu olası çelişkinin, aradaki hormonal durum, TRAb durumu ve tedavi şekli farkından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Yine, yeni tanı hasta oranımızın düşük olmasının da bu farklılıkta payı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bizim çalışmamızdaki hastaların tedavi çeşitliliği ve elde edilen sonuçlar, uygulanan tedavi şekillerinin de miRNA'lar üzerine etkisinin araştırılması gerektiğini düşündürmüştür. Yine uygulanan tedavi şekline göre remisyona kadar geçen süre, yani hipertiroidi döneminin de miRNA ekspresyonu üzerine etkisi olabilir ki daha önce de bahsettiğimiz PREDIGO' da tedavi öncesi hipertiroidik ve semptomatik olunan sürenin Graves orbitopatisi gelişme riski ile orantılı olduğu belirtilmiştir (17). Yukarıda bahsettiğimiz Liu ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmadakinden farklı olarak bizim çalışmamızda hastalar sadece remiyon durumu ile değil, diğer prognostik faktörler ile miRNA düzeyleri arasında olabilecek ilişkiler açısından da değerlendirildi. Bu değerlendirme yapılırken yukarıda bahsettiğimiz Struja ve arkadaşlarının çalışması (32) referans alınarak hastalar oftalmopatisi olup olmaması, relaps yaşayıp yaşamaması, aldığı tedavi şekli, hormonal durumu ve ultrasonografi ile ölçülen tiroid hacmine göre karşılaştırıldı. miR-154 düzeylerinde relaps yaşamış hastalarda anlamlı ölçüde yükseklik saptanırken diğer hiçbir prognostik belirteç ile bakılan miRNA' lar arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Yamada ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, OITH olan hastalarda mikroarray ve kantitatif PCR analizi ile tanı ve tedavide potansiyel hedef olarak miRNA düzeyleri tanımlanmıştır. Bu OITH' da dolaşan farklı miRNA' ları tanımlayan ilk çalışmadır (31). Bu çalışmada, sağlıklı kontroller (n=20) ve OITH olanların (27 hasta Hashimoto tiroiditi, 17 hasta GH) serumlarında birçok miRNA' nın farklı ekspresyonları araştırılmıştır. İmmün aracılı 4 miRNA (miR-16, miR-22, miR-375 ve miR-451) seçilmiş ve real-time PCR ile valide edilmiştir. miR- 22, miR-375 ve miR-451 seviyelerinin Hashimoto tiroiditi hastalarında istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde artmış olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, miR-16, miR-22, miR- 375 ve miR-451 düzeyleri de kontroller ile karşılaştırıldığında Graves hastalarında anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. Bu çalışmada raporlanan bir kısım miRNA' lar daha önce başka otoimmün hastalıklarda da raporlanmıştır (31). Örneğin; miR-16 sistemik lupus eritematozis ve romatoid artrit (26,27), miR-22 multipl sklerozda artmıştır (28). miR-16 nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolağını regüle eder ki, bu da inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretiminden sorumludur (40). Ancak yine de miR-16' nın immün cevaptaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. miR-22, östrojen reseptör alfa (ER α) mRNA' sını hedef alarak T hücre farklılaşmasında gerekli olan östrojen sinyalinin bastırılmasını sağlar (41,42). Yani ER α aracılı östrojen sinyali, otoantijen spesifik yardımcı T hücre (Th1 ve Th17'yi içeren) cevabı ile karakterize immün regülatuar etki ile ilişkilidir. Th17 hücreleri, OITH' nın da yer aldığı otoimmün hastalıkların patogenezi ve şiddeti ile ilişkilidir (27,43,44). Dolayısıyla, serum miR-22 ekspresyonu OITH' da immün sistemin aktivasyonunun arttırılmasında rol oynuyor olabilir. Ayrıca bu çalışmada serum miR-375 ekspresyonunun OITH olanlarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde arttığı ve timik stromal lenfopoetini (TSLP) regüle ettiği de gösterilmiştir. TSLP doğuştan ve edinilmiş Th2 immün fonksiyonunu bağlayan önemli bir sitokindir (45,46). Anti-miR-375, TSLP mRNA' yı azaltırken, mimic-miR-375 TSLP mRNA' yı arttırır. TSLP' nin uyardığı dendritik hücreler Th2 fenotipindeki T hücreleri indükleyebilir. Graves hastalığı olanlarda TSLP ekspresyon seviyeleri artmıştır ve bu da TH17 farklılaşmasını arttırır. miR-451 ile immünregülasyon arasındaki ilişki genel anlamda bilinmemektedir. Ancak

ilginç olarak miR-451 seviyeleri sistemik lupus eritematozis ve romatoid artrit gibi hastalıklarda artmıştır (26,27,28). Bu çalışmalarla paralel olarak mevcut çalışmada da miR-451 seviyelerinin OITH olanlarda sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile, miR-451'in otoimmün reaksiyon ile uyumlu olabileceği düşünülebilir. Th1/Th2 ve Th17'nin OITH patogenezinde rol oynayabileceği öngörüsü, OITH' da bu miRNA düzeylerinin artması ile desteklenmiştir. Bu miRNA' ların OITH tedavisinde hedef ya da OITH aktivite ve progresyonunu göstermede bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar üzerine biz de çalışmamızdaki hasta ve kontrol grubunun miR-22, miR-375 ve miR-451 ekspresyonlarını değerlendirdik. Bizim çalışmamızda da, bu çalışmada olduğu gibi miR-22 ve miR-375 düzeyleri hastalarda kontrollere göre daha yüksek saptandı, ancak istatistiksel açıdan anlamlı değildi (sırasıyla p : 0.226 ve 0.900) (Tablo 11). Elde ettiğimiz sonucun istatistiksel olarak anlamsız olmasının, bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki bazı farklılıklardan kaynaklanabiliyor olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada sadece kadın bireylerden kan alınmış ve hasta popülasyonunun hepsi yeni tanı, yani hipertiroidik bireylerden oluşturulmuştu. Halbuki bizim çalışmamızdaki hastaların sadece 13'ü hipertiroidik (%43.3), diğerleri ise hipotiroidik ve ötiroidik idi. Yine bizim çalışmamızda sadece kadın bireyler değil, her iki cinsiyetten de hasta ve kontrol kabul edilmişti; hastaların çoğu kadın olmakla beraber az da olsa erkek hastalarımız da vardı (21 kadın, 9 erkek hasta). Toplamda 39 kadın (%65) 21 erkek (%35) mevcuttur ki, yine bizim çalışmamızda miRNA'ların cinsiyet ile ilişkisi araştırıldığında mir-22 ve miR-451 kadınlarda daha yüksek, miR-376b ise daha düşük saptanmıştır (sırasıyla p: 0.035, p: 0.073, p: 0.075). Bu çalışmadaki tüm hastalar yeni tanı, yani henüz tedavi almamış iken, bizim hastalarımızın bir kısmı yeni tanı almakla birlikte çoğu tedavi almış ya da almakta olan hastalardı (17'si medikal tedavi, 5'i RAI, 8'i cerrahi). Ayrıca yine bu çalışmadaki hastaların hepsi TRAb pozitif iken, bizim çalışmamızdaki hastaların sadece 5'i (%16,6) TRAb pozitifdir. Çalışmamızda TRAb pozitif hasta oranınının düşük olmasının sebepleri ise, yeni tanı hastamızın az olması, hastalarımızın neredeyse yarısının ablatif tedavi almış olması (5'i RAI, 8'i cerrahi) (18) ve hastalarımızın sadece 13'ünün aşikar hipertiroidide, 17'sinin ise remisyonda

olmasıdır (12'si ötiroid, 5'i hipotiroid). Dolayısıyla, bu çalışma ile kendi çalışmamız arasındaki farklılıklar, hastaların hem tiroid hormon durumlarında hem de cinsiyet durumlarında farklılık olmasından kaynaklanabiliyor olabilir. Kadın cinsiyette Graves hastalığının daha sık görüldüğü ve daha şiddetli seyredildiği zaten bilinmektedir (18). Yine bir önceki çalışma ile yapılan kıyaslamada da söylediğimiz gibi, bizim çalışmamızda farklı tedaviler almış olan hastaların olması ve iki çalışma arasında farklı sonuçlar görülmesi, tedavi şekli ile miRNA ekspresyonları arasında olabilecek ilişkilerin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Tedavi ile remisyona kadar geçen hipertiroidik sürenin de, antitiroid tedaviye başlanana kadar geçen hipertiroidik dönemin nüksü etkilediği gibi bu miRNA' lar üzerinde etkili olabileceği ve dolayısıyla da GH prognozunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda miR-22 düzeyleri ile ilgili elde edilen sonuçlar, her ne kadar istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde olmasa da, miR-22 düzeyinin Graves hastalığının prognozu açısından yol gösterici olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü çalışmamızda miR-22 düzeyleri, hem relaps yaşamış hem de oftalmopatisi olan hastalarda diğer hastalara göre daha yüksek saptanmıştır, ancak istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde değildir (p değerleri sırasıyla 0,208 – 0,207). Yine miR-22 düzeyleri tedavi şekline göre kıyaslandığında cerrahiye giden hastalarda medikal tedavi ve RAI tedavisi alanlara göre daha yüksek saptanmıştır (p değeri 0,230). Çalışmamızın hasta ve kontrol sayısının azlığı düşünüldüğünde, daha fazla sayıda hasta ile yapılacak yeni bir çalışmada, refere aldığımız çalışmadaki gibi sadece kadın ve hipertiroidik hastaların kanları kabul edilecek olursa, istatistiksel olarak da anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

miRNA'lar ile Graves hastalığı ilişkisi ile ilgili yapılan daha yeni çalışmalara bakıldığında ise, bizim çalışmamızın bitiminden yakın bir süre sonra Biscarini ve arkadaşlarının INDIGO' yu referans alarak yaptıkları bir çalışma yayınlanmıştır (INDIGO: Investigation of Novel biomarkers and Definition of the role of the microbiome In Graves' Orbitopathy). Toplam 33 Graves hastası ve 13 sağlıklı kontrol ile yaptıkları bu çalışmada, GH ve Graves orbitopatisi gelişimini öngördürebilecek miRNA ve proteinler bulmayı

amaçlamışlardır (47). Dahil edilen 33 Graves hastasının 19' unun orbitopatisi mevcuttur. Toplamda 3025 miRNA ile 1886 protein saptanmış ve içlerinden 5 miRNA ile 20 protein potansiyel biyobelirteç olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu potansiyel biyobelirteçler miR-19_15038, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-6748-3p isimli miRNA' lar ile Zonulin, Alfa-2 makroglobulin, Beta-2 glikoprotein 1 ve Fibronektin isimli proteinlerdir (47). Bu potansiyel biyobelirteçlerin GH'nın erken tanı ve prognozu için faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda miR-22 düzeylerine bakılmış iken, bu çalışmada miR-22-3p düzeyleri incelenmiştir. Her 2 çalışmada da sonuçların orbitopatisi olanlarda farklılık göstermesi, bu mi-RNA' nın Graves orbitopatisini öngördürebilecek potansiyel bir biyobelirteç olabileceği fikrini kuvvetle desteklemektedir.

Graves hastalığının tanısı ve prognozu hakkında yapılan diğer araştırmalarda çalışmamıza dahil etmediğimiz başka pek çok miRNA'dan bahsedilmiştir. 2016 yılında Jianhui Li ve arkadaşları ATİ kesiminden sonraki ilk 1 yılda görülen Graves hastalığı nüksünün TRAb ve miR-346 ekspresyonu ile öngörülebilirliğini araştırmışlardır (48). Önceden yapılan çalışmalarda Graves hastalarında miR-346 ekspresyonu sağlıklı kontrollere göre artmış seviyede saptanmışken, bu çalışma miR-346 ile GH nüksü arasındaki ilişkiye bakan ilk çalışmadır. Toplam 103 yeni tanı Graves hastası ile yapılan bu çalışmada, ATİ kesildikten sonraki ilk 1 yıl içerisinde 67 hasta remisyonda seyrederken, 36 hastada (%35) relaps yaşanmıştır. Çalışma sonucunda, tanı ve tedavi kesiminde mediana göre daha yüksek miR-346 ekspresyonu gösteren hastalarda relapssız sağkalım daha fazla izlenmiştir (p değerleri sırasıyla 0.034 ile 0.001). Tedavi kesiminde TRAb seviyeleri mediana göre düşük olan hastalarda da aynı şekilde yine relapssız sağkalım daha fazla izlenmiştir (p< 0.001) . Sonuç olarak, tanı anındaki TRAb ve miR-346 seviyeleri ile, tedavi kesimindeki TRAb seviyesi relaps ile anlamlı ölçüde ilişkili saptanmıştır (48). miR-346 ile GH arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma daha önce de yapılmış ve serum miR-346 seviyesi GH' da anlamlı ölçüde down regüle saptanmıştır (49). Graves hastalığının tanı ya da relapsında sık görülen bir klinik durum olan orbitopati üzerine de pek çok çalışma yapılmıştır. Daha önceleri yapılan

çalışmalarda miR-146 ile tiroid ilişkili orbitopatiye sebep olan CD4+ T lenfositler arasında bir ilişki olabileceğinden bahsedilmesi sebebiyle, J. Hu ve arkadaşları aktif tiroid orbitopatisi olan 60 hasta ile sağlıklı kontroller arasında miR-146a ekspresyonu farkını incelemiştir (50). Çalışma sonucunda görülmüştür ki, aktif tiroid orbitopatisi olan hastaların CD4+ T hücrelerinde miR-146a ekspresyonu downregule haldedir. Aynı çalışmada hücre membranına tutunan, tirozin bağlanan bir kısmı olan ve hücre kaderinde belirleyici bir rolü olan Numb isimli bir proteinin, miR-146a'nın hedefi olabileceği de saptanmıştır. Daha nceki çalışmalarda hem bu proteinin hem de miR-146a'nın apoptoziste etkili olduğu ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu çalışmada da miR-146a'nın Numb protein ekspresyon seviyesini etkilediğinin doğrulanması üzerine, tiroid orbitopatisindeki etkisini bu yolla gösteriyor olabileceği düşünülmüş ve bu yeni saptanan bilgi sayesinde tiroid orbitopatisi tedavisinde yeni hedefler geliştirilebileceği savunulmuştur (50). Daha önce yapılan başka bir çalışmada ise, Graves orbitopatisi olan hastaların miR-146a ekspresyonları orbitopatisi olmayanlara göre anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır (p: 0.032) (51). In vitro ortamda orbital yağ dokusunda saptanan bu artmış ekspresyon, daha önce aynı miRNA'nın hastalıklı dokularda da artmış olarak saptanmış olması nedeniyle, sebep değil sonuç olarak değerlendirilmiş ve miR-146a'nın inflamatuvar stres halinde upregüle olan anti-inflamatuvar etkili bir miRNA olduğuna kanaat getirilmiştir (51). Literatürde miR-146a ile GH ve orbitopatisi arasındaki ilişkiyi inceleyen daha pek çok çalışma mevcuttur (52, 53, 54, 55, 56, 57). Yine tiroid ilişkili orbitopati ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, tiroid ilişkili orbitopatisi olan 26 hasta, orbitopatisi olmayan 10 hasta ile kıyaslanmış ve aralarında miR-21 ekspresyonu farkı olup olmadığına bakılmıştır (Orbitopatisi olmayan bireylerin tiroid hastası mı yoksa sağlıklı birey mi olduğundan çalışmada bahsedilmemiştir) (58). Çalışma sonucunda, tiroid ilişkili orbitopatisi olan hastalarda diğerlerine göre daha yüksek miR-21 ekspresyonu saptanmıştır. Orbital dokulardan alınan örnekler in vitro ortamda ekilerek, miR-21'in bu dokulardaki fibroblastların proliferasyon, diferansiasyon ve apoptozisinde etkisi izlenmiş ve sonucunda miR-21'in orbital dokudan elde edilen bu fibroblastların tüm kaderini etkilediği görülmüştür. Eş zamanlı olarak TGF-β1'

in miR-21 ekspresyonu üzerine etkisi de incelenmiş ve TGF- β 1 ile indüklenen kollajen sentezini miR-21'in regüle ettiği saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar, miR-21 ile orbital kas fibrozu arasında bir ilişki olduğunu öngörmektedir ve bu öngörü tiroid ilişkili orbitopati için yeni bir terapötik hedef olabilir (58). Başka bir tiroid orbitopati çalışmasında ise, PDGF-BB' nin hücre çoğalması ve orbital fibroblastlar üzerine pozitif etkisi araştırılmıştır (PDGF: Platelet Derived Growth Factor, trombosit ilişkili büyüme faktörü) (59). PDGF, myofibroblastların proliferasyon ve surveyini sağlayarak, doku onarımı ve fibrotik hastalıklarda önemli rol oynayan bir dimerik proteindir. PDGF-BB ise, bu proteinin aktif orbital fibroblastların proliferasyonunda ve IL-6 ile hyaluronan üretmesinde etkili olan en potent izoformudur. İn vitro ortamda orbital yağ dokusundan elde edilen fibroblastlar üzerinde yapılan bu çalışmada, eş zamanlı olarak PDCD4 ve miR-21 ekspresyonlarına da bakılmıştır (PDCD: Programmed Cell Death, programlanmış hücre ölümü). Sonuç olarak PDGF-BB' nin orbital fibroblastlar üzerindeki etkisini miR-21 ilişkili PDCD4 ekspresyonunu down-regüle ederek gösterdiği saptanmıştır (59).

Hiratsuka ve arkadaşları 2016 yılında GH'nın klinik aktivitesi ile dolaşımda bulunan miRNA' ların ilişkisini araştırarak ilk çalışmayı yapmışlardır (60). Bu çalışmada miRNA' ların yanı sıra, eksozomların da GH patogenezi ve kliniğindeki olası fonksiyonları da incelenmiştir. Bilindiği üzere eksozomlar, hücre zarından koparak ayrılan, hücrenin fonksiyonuna göre farklı maddeler taşıyabilen ve böylece hücreler arası transport sağlayabilen, 30-100 nm büyüklüğünde keseciklerdir (61,62). Bu çalışmaya intraktabl ve remisyonda olan 7'şer Graves hastası ile 7 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. İntraktabl hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla 29, remisyondaki hastalarda yine sağlıklı kontrollere kıyasla 35, intraktabl hastalarda remisyondakilere kıyasla ise 14 farklı miRNA ayrıştırılmıştır. Tüm bu miRNA' lar içerisinde ancak birkaç tanesinde anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Remisyondaki hastalar intraktabl gruba göre kıyaslandıklarında, miR-23b-5p ve miR-92a-39 seviyelerinde anlamlı ölçüde yükseklik, let-7g-3p ve miR-339-5p seviyelerindeyse anlamlı ölçüde düşüklük izlenmiştir (p değerleri <0.05). Çalışmanın bir diğer kolunda değerlendirilen eksozomlar ile ilgili ise, intraktabl hastalar ile remisyondaki

hastalar ve sağlıklı kontroller kıyaslanmışlardır. Sonuç olarak ise, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ekspresyonunu sağlayan miRNA'ları en fazla uyararak bu sitokinlerin ciddi artışını sağlayan eksozomlar intraktabl Graves hastalarınıninkiler olmuştur. Çalışmanın nihai sonucunda, dolaşımda bulunan farklı miRNA seviyelerinin intraktabl GH ile ilişkili olduğu ve intraktabl hastaların eksozomlarının GH patogenezinde önemli rol oynayan immun hücreleri aktifleştiriyor olabileceği gösterilmiştir (60).

Ne yazık ki bizim çalışmamızda maliyet sebebiyle bahsettiğimiz tüm bu miRNA ile Graves hastalığı ilişkisini araştıran çalışmalardaki gibi fazla sayıda miRNA alışılamamıştır. Bu kısıtlama sebebiyle çalışmamızda bakılmak üzere miRNA' lar belirlenirken ilgili çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde edilen miRNA' lardan derleme yapılmıştır.

6. SONUÇ

❖ Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun serum irisin seviyeleri arasında anlamlı farklılık izlenmedi.

❖ Oftalmopatisi olan hastalar ile relaps yaşamış hastaların serum irisin seviyeleri oftalmopatisiz hastalar ve relapssız hastalara göre daha yüksek saptandı ancak istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde değildi (sırasıyla p: 0.069, p: 0.07).

❖ Hipotiroidik hastaların serum irisin seviyeleri hipertroidik ve ötiroidiklere göre biraz daha yüksek saptandı ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık değildi (p: 0.166).

❖ Tiroid hacmi artmış olan hastaların serum irisin seviyeleri normal hacimde tiroidi olan hastalara göre daha düşük saptandı (p: 0.014).

❖ Tedavi şekli, tiroide nodül varlığı, otoantikör pozitifliği ile serum irisin seviyeleri arasında anlamlı ilişki izlenmedi.

❖ Hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında seçili miRNA ekspresyonları açısından anlamlı farklılık izlenmedi.

❖ Çalışmaya katılan tüm bireyler arasından kadın cinsiyette olanların miR-22 ve miR-375 ekspresyonları erkeklere göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptandı (sırasıyla p: 0.035, p: 0.016).

❖ Hastaların miR-376b, miR-154, miR-451 ve miR22 düzeyleri ile anti-Tg düzeyleri arasında negatif yönde orta kuvvetli ilişki saptandı (sırasıyla p: 0.041, r: -0.375, p: 0.019, r: -0.425, p: 0.014, r: -0.442, p: 0.001, r: -0.563).

❖ Hastalarda miR-22 ekspresyonu ile serum ft3 düzeyleri arasında negatif yönde orta kuvvetli ilişki saptandı (p: 0.046, r: -0.367).

❖ Hipertiroidik hastaların miR-22 ekspresyonu ötiroidik ve hipotiroidik hastalara göre daha düşük saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değildi (p: 0.064).

❖ Relaps yaşamış hastaların miR-154 ekspresyonu relaps yaşamamış olanlara göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptandı (p: 0.035).

❖ Oftalmopati varlığı, tedavi şekli, tiroid hacmi, tiroide nodül varlığı, otoantikör pozitifliği ile miRNA ekspresyonları arasında anlamlı ilişki izlenmedi.

7. KAYNAKLAR

1. Ning Chen, Qingxue Li, Jun Liu, Shaohui Jia. Irisin, an exercise induced myokine as a metabolic regulator: an updated narrative review. *Diabetes metabolism research and reviews* 2016; 32(1): 51-59.
2. Marek Ruchala, Ariadna Zybek, Ewelina Szczepanek-Parulska. Serum irisin levels and thyroid function-Newly discovered association. *Peptides in international journal* 2014; 60: 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.021>. 17 Haziran 2015'te ulaşılmıştır.
3. Bartel DP. MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281–297.
4. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* 2003; 24: 802–835.
5. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest* 2001; 108: 1253–1259.
6. D.L.Jacobson, S.J.Gange, N.R.Rose, N.M.H.Graham, et al. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in United States 1997; 84,3: 223-243. <https://doi.org/10.1006/clin.1997.4412>. 2015'te ulaşılmıştır.
7. Zhou H, Huang X, Cui H, Luo X, Tang Y, Chen S, Wu L, Shen N. miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2010; 116: 5885–5894.
8. Gursoy A, Erdogan MF. Tirotoksikoz tanı ve tedavi. Adan Z ye klinik tiroidoloji. Gursoy A, Erdogan MF, eds. İstanbul Ömür Matbaacılık 2012.
9. MORI T, Kriss J.P. Measurements by competitive binding radioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in

Graves' disease and other thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 688-698.

10. KASAGI K, Kousaka T, Higuchi K, Iida Y, Misaki T, Alam M.S, Miyamoto S, Yamabe H, Konishi J. Clinical significance of measurements of antithyroid antibodies in the diagnosis of Hashimoto's thyroiditis: comparison with histological findings. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 1996; 6,5: 445-450.

11. MORRIS J.C, Bergert E.R, Bryant W.P. Binding of immunoglobulin G from patients with autoimmune thyroid disease to rat sodium-iodide symporter peptides: evidence for the iodide transporter as an autoantigen. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 1997; 7, 4: 527-534.

12. FURRMANIAK J, Smith B.R. The structure of thyroid autoantigens. *Autoimmunity* 1990; 7,1: 63-80.

13. OCHI Y, DeGroot L.J. Vitiligo in Graves' disease. *Ann Intern Med* 1969; 71, 5: 935-940.

14. MESTMAN J.H. Hyperthyroidism in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40,1: 45-64.

15. Salvatore D, Davies TF, Schlumberger MJ, Hay JD, Larsen PR. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. *Williams textbook of Endocrinology* 12th edition 2011; 3(11): 341-382.

16. Vos XG, Endert E, Zwinderman AH, Tijssen JGP & Wiersinga WM. Predicting the risk of recurrence before the start of antithyroid drug therapy in patients with Graves' hyperthyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2016; 101: 1381–1389.

17. Wiersinga W, Žarković M, Bartalena L, Donati S, Perros P, Okosieme O, et al. Predictive score for the development or progression of

Graves' orbitopathy in patients with newly diagnosed Graves' hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol* 2018; 178(6): 635-643.

18. TEMD Tiroid hastalıkları tanı ve tedavi kılavuzu 2017; 8: 54-79.

19. Boström P et al. PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature international journal of science* 2012; 481: 463-468.

20. Jia-qi Chen, Yue-ye Huang, Aaron M Gusdon, Shen Qu. Irisin: a new molecular marker and target in metabolic disorder. *Lipids in Health and Disease* 2015; 14: 2.

21. Doaa M. Samy, Cherine A. Ismail, Rasha A. Nassra. Circulating Irisin Concentrations in Rat Models of Thyroid Dysfunction - Effect of Exercise. *Metabolism clinical and experimental* 2015; 64: 804-813.

22. Yalçın M.M, Aktürk M, Tohma Y, Cerit E.T, Altinova A.E, Arslan E, Yetkin I, Toruner F.B. Irisin and Myostatin Levels in Patients with Graves' Disease. *Archives of medical research* 2016; 47: 471-475.

23. O'Connell R.M, Rao D.S, Chaudhuri A.A, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10: 111-122.

24. Liu R, Ma X, Xu L, et al. Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97: 968- 972.

25. Cortez M.A, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011; 8: 467-477.

26. Wang H, Peng W, Ouyang X, et al. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Translational Research* 2012; 160: 198-206.

27. Zahm A.M, Thayu M, Hand N.J, et al. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2011; 53: 26–33.

28. Siegel S.R, Mackenzie, J, Chaplin G, et al. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Molecular Biology Reports* 2012; 39: 6219–6225.

29. Bernecker C, Lenz L, Ostapczuk M.S, et al. MicroRNAs miR-146a1, miR-155_2 and miR-200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 2012; 22: 1294–1295.

30. De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 2011; 21: 879–890.

31. Yamada H, Itoh M, Hiratsuka I, Hashimoto S. Circulating microRNAs in autoimmune thyroid diseases. *Clinical Endocrinology* 2014; 81: 276-281.

32. Tristan Struja, Hannah Fehlberg, Alexander Kutz, Larissa Guebelin, Christian Degen, Beat Mueller and Philipp Schuetz. Can we predict relapse in Graves' disease? Results from a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2017; 176(1): 87-97.

33. Franklyn JA & Boelaert K. Thyrotoxicosis. *Lancet* 2012; 379: 1155–1166.

34. Tristan Struja, Marina Kaeslin, Fabienne Boesiger, Rebecca Jutzi, Noemi Imahorn, Alexander Kutz, et al. External validation of the GREAT score to predict relapse risk in Graves' disease: results from a multicenter, retrospective study with 741 patients. *Eur J Endocrinol* 2017; 176(4): 413-419.

35. Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, et al. PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 1669-1677.

36. Grigorios Panagiotou, Kalliopi Pazaitou-Panayiotou, Stavroula A , Paschou, Despina Komninou, Nikolaos Kalogeris, Andromachi Vryonidou, Christos S. Mantzoros. Changes in Thyroid Hormone Levels Within the Normal and/or Subclinical Hyper- or Hypothyroid Range Do Not Affect Circulating Irisin Levels in Humans. *Thyroid* 2016; 26(8): 1039-1045.

37. Ariadna Zybek-Kocik, Nadia Sawicka-Gutaj, Ewelina Szczepanek-Parulska, Mirosław Andrusiewicz, Joanna Waligórska-Stachura, Piotr Białas, Tomasz Krauze, Przemysław Guzik, Jerzy Skrobisz, Marek Ruchała. The association between irisin and muscle metabolism in different thyroid disorders. *Clinical endocrinology* 2018; 88(3): 460-467.

38. Glowacka D, Loesch C, Johnson KT, Mann K, Esser J, Morgenthaler NG, Siffert W, Schmid KW, Eckstein AK. The T393C polymorphism of the G_s gene (GNAS1) is associated with the course of Graves' disease. *Horm Metab Res* 2009; 41: 430–435.

39. Planck T, Parikh H, Brorson H, Mårtensson T, Åsman P, Groop L, Hallengren B, Lantz M. Gene expression in Graves' ophthalmopathy and arm lymphedema: similarities and differences. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 2011; 21: 663–674.

40. Li T, Morgan M.J, Choksi S. et al. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nature Immunology* 2010; 11: 799–805.

41. Pandey D.P. & Picard D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. *Molecular & Cellular Biology* 2009; 29: 3783–3790.

42. Lelu K, Laffont S, Delpy L, et al. Estrogen receptor signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17

cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 2011; 187: 2386–2393.

43. Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95: 953–962.

44. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 2009; 19: 495–501.

45. Bleck B, Grunig G, Chiu A, et al. MicroRNA-375 Regulation of thymic stromal lymphopoietin by diesel exhaust particles and ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology* 2013; 190: 3757–3763.

46. Zhang Y. & Zhou B. Functions of thymic stromal lymphopoietin in immunity and disease. *Immunologic Research* 2012; 52: 211–223.

47. Filippo Biscarini, Lei Zhang, Giulia Masetti, Danila Covelli, Giuseppe Colucci, Anja Eckstein, et al. Combining Micro-RNA and Protein Sequencing to Detect Robust Biomarkers for Graves' Disease and Orbitopathy. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 8386.

48. Jianhui Li, Yawei Cai, Xiaohua Sun, Danzhen Yao, Jinying Xia. MiR-346 and TRAb as Predictive Factors for Relapse in Graves' Disease Within One Year. *Horm Metab Res* 2017; 49(3): 180-184.

49. Chen J, Tian J, Tang X, Rui K, Ma J, Mao C, Liu Y, Lu L, Xu H, Wang S. MiR-346 regulates CD4⁺ CXCR5⁺ T cells in the pathogenesis of Graves' disease. *Endocrine* 2015; 49(3): 752-60.

50. Z.-J. HU, J.-F. HE, K.-J. LI, J. CHEN, X.-R. XIE. Decreased microRNA-146a in CD4⁺T cells promote ocular inflammation in thyroid-

associated ophthalmopathy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2017; 21: 1803-1809.

51. Sun Young Jang, Min Kyung Chae, Joon H. Lee, Eun Jig Lee, Jin Sook Yoon. Role of miR-146a in the Regulation of Inflammation in an In Vitro Model of Graves' Orbitopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: 4027–4034.

52. Bernecker C, Lenz L, Ostapczuk MS, Schinner S, Willenberg H, Ehlers M, Vordenbäumen S, Feldkamp J, Schott M. MicroRNAs miR-146a1, miR-155_2, and miR-200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 2012; 22(12): 1294-5.

53. Alemán-Ávila I, Jiménez-Morales M, Beltrán-Ramírez O, Barbosa-Cobos RE, Jiménez-Morales S, Sánchez-Muñoz F, Valencia-Pacheco G, et al. Functional polymorphisms in pre-miR146a and pre-miR499 are associated with systemic lupus erythematosus but not with rheumatoid arthritis or Graves' disease in Mexican patients. *Oncotarget* 2017; 8(54): 91876-91886.

54 Wang N, Chen FE, Long ZW. *Cell Physiol Biochem. Mechanism of MicroRNA-146a/Notch2 Signaling Regulating IL-6 in Graves Ophthalmopathy.* 2017; 41(4): 1285-1297.

55. Li K, Du Y, Jiang BL, He JF. Increased microRNA-155 and decreased microRNA-146a may promote ocular inflammation and proliferation in Graves' ophthalmopathy. *Med Sci Monit.* 2014; 20: 639-643.

56. Wei H, Guan M, Qin Y, Xie C, Fu X, Gao F, Xue Y. Circulating levels of miR-146a and IL-17 are significantly correlated with the clinical activity of Graves' ophthalmopathy. *Endocr J* 2014; 61(11): 1087-1092.

57. Bernecker C, Lenz L, Ostapczuk MS, Schinner S, Willenberg H, Ehlers M, Vordenbäumen S, Feldkamp J, Schott M. MicroRNAs miR-146a1, miR-155_2, and miR-200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 2012; 22(12): 1294-1295.

58. Tong Bo-ding, Xiao Man-Yi, Zeng Jie-Xi, Xiong Wei. MiRNA-21

promotes fibrosis in orbital fibroblasts from thyroid-associated ophthalmopathy. *Molecular Vision* 2015; 21: 324-334.

59. Ji-Young Lee, Mihee Yun, Ji-Sun Paik, Seong-Beom Lee, Suk-Woo Yang. PDGF-BB Enhances the Proliferation of Cells in Human Orbital Fibroblasts by Suppressing PDCD4 Expression Via Up-Regulation of microRNA-21. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: 908–913.

60. Izumi Hiratsuka, Hiroya Yamada, Eiji Munetsuna, Shuji Hashimoto, Mitsuyasu Itoh. Circulating MicroRNAs in Graves' Disease in Relation to Clinical Activity. *Thyroid* 2016; 26(10): 1431-1440.

61. Manyak CL, Tse H, Fischer P, Coker L, Sigal NH, Koo GC. Regulation of class II MHC molecules on human endothelial cells. Effects of IFN and dexamethasone. *J Immunol* 1988; 140: 3817-3821.

62. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 195-208.