

T.C.  
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ



**TİROİD NODÜLÜ VE FARKLI TİPTE TİROİD KARSİNOMU OLAN  
HASTALARDA VE CUSHİNG'S SENDROMU OLAN HASTALARDA  
MİKRONUKLEUS SIKLIĞI VE 8-OHdG DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Proje No: TSA-10-3285**

**Araştırma Projesi**

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Prof.Dr. Hamiyet Altuntaş  
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Araştırmacılar**

Prof Dr. Fahri Bayram  
Tıp Fakültesi/Endokrinoloji Bilim Dalı  
Prof. Dr. Gülden Başkol  
Tıp Fakültesi/Biyokimya Anabilim Dalı  
Yrd. Doç. Dr. Zuhale Hamurcu  
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Uzm.Dr. İlkay Çakır  
Tıp Fakültesi/Endokrinoloji Bilim Dalı  
Arş. Gör. Dr. Nazmiye Bitgen  
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**EKİM 2013  
KAYSERİ**

**II**

### III

## TEŞEKKÜR

“Tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastalarda ve Cushing’s sendromu olan hastalarda mikronukleus sıklığı ve 8-OHdG düzeylerinin araştırılması” isimli araştırma projesinin yürütülmesi süresince değerli yardımlarıyla ve katkılarıyla destek olan Prof. Dr. Fahri BAYRAM’ a, Prof. Dr. Gülden Başkol’e, Yrd. Doç. Dr. Zuhâl Hamurcu’ya, Uzm.Dr. İlkey Çakır’a, Arş. Gör. Dr. Nazmiye Bitgen’e ve Doktora öğrencisi Fatma Şahin’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sürekli olarak maddi ve manevi yönden desteklerini esirgemeyen aileme saygı ve şükranlarımı sunarım.

## IV İÇİNDEKİLER

KAPAK .....	I
BOŞ SAYFA .....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ÖZET .....	V
ABSTRACT .....	VI
KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ.....	VIII

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM .....	9
2. GENEL BİLGİLER.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1.GEREÇLER.....	15
3.2. YÖNTEM .....	16
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	24
6. KAYNAKLAR.....	27
7. EK 1. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (BGOF) .....	31

## V

**Tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastalarda ve Cushing's sendromu olan hastalarda mikronukleus sıklığı ve 8-OHdG düzeylerinin araştırılması****ÖZET**

Tiroid kanserleri, tüm kanserlerin %1-2'sini oluşturmasına rağmen, son yıllarda insidansı hızla artan en sık endokrin kanserlerinden biridir. Bu çalışmanın amacı, tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastalarda ve Cushing's sendromu olan hastalarda, salgılanan farklı hormonların DNA hasarı üzerine etkisini Sitokinez-bloke mikronükleus (Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome; CBMN) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) yöntemlerini kullanarak araştırmaktır.

Çalışmada, yeni teşhis konulmuş ve herhangi bir tedavi almamış 20 nodüler guatr, 12 tiroid kanserli ve 10 Cushing's sendromlu hasta ile hastalarla benzer yaş ve cinsiyette toplam 20 sağlıklı bireyin kan örnekleri analiz edilmiştir.

Tiroid kanserli, nodüler guatrlı ve Cushing's sendromlu hastaların MN sıklığı ve 8-OHdG seviyeleri kontrol kişilerin MN sıklığı ve 8-OHdG seviyeleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.05$   $p<0.05$ ). Ayrıca, tiroid kanserli hastalarda, I-131 tedavisinden sonra MN frekansı ve 8-OHdG seviyelerinin arttığı ve tedaviden bir yıl sonra da azaldığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, nodüler guatr ve Cushing's sendromlu hastalarda artan kromozomal ve oksidatif DNA hasar parametreleri, bu hastalarda ileride gelişebilecek olası kanser riski ile ilişkili olabilir. Bu nedenle, nodüler guatr ve Cushing's sendromlu hastaların kanser riski açısından uzun süreli olarak takip edilmesi önemli olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Tiroid kanserleri, Tiroid nodülü, Cushing's Sendromu, Mikronukleus, 8-OHdG, I-131 tedavisi.

## VI

**The investigation of the micronucleus frequency and the levels of 8-OHdG in patients with different types of thyroid cancer and thyroid nodules and in patients with Cushing's syndrome****ABSTRACT**

Thyroid cancers represent a 1 to 2 % of all human cancers; however, it is the most frequent endocrine neoplasia with incidence is rising rapidly in recent years. The aim of this study was to investigate such effects in patients with different types of thyroid cancer and thyroid nodules and in patients with Cushing's syndrome by using the Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) assay methods.

The study was carried out using blood samples of untreated 20 with nodular goiter, 12 with thyroid cancer and 10 with Cushing's syndrome in addition to total 20 age- and sex-matched healthy controls.

When compared with control subjects, statistically significant differences in micronucleus (MN) frequency and 8-OHdG levels were observed in patients with thyroid cancer, nodular goiter and Cushing's syndrome (respectively,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$   $p < 0.05$ ). In addition, MN frequency and 8-OHdG levels were significantly increased after I-131 therapy and decreased after one year of therapy in patients with thyroid cancer.

In conclusion, the increase in chromosomal and oxidative DNA damage may predict an increased risk of malignancy in patients with nodular goiter and Cushing's syndrome. Thus, long-term follow-up of patients with nodular goiter and Cushing's syndrome will be necessary to establish the cancer risk in these patients.

**Key words:** Thyroid cancers; thyroid nodules; Cushing's syndrome; Micronucleus; 8-OHdG; I-131 therapy.

**VII****KISALTMALAR**

<b>CBMN</b>	: Cytokinesis-Block Micronucleus; Sitokinez Blok Mikronükleus
<b>Cyt-B</b>	: Sitokalazin B
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>8-OHdG</b>	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>FTC</b>	: Folikular tiroid karsinoma
<b>MN</b>	: Mikronükleus
<b>KA</b>	: Kromozom aberasyon
<b>KKD</b>	: Kardeş kromatid değişimleri
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Testi
<b>PHA</b>	: Phytohemagglutinin; Fitohemagglutinin
<b>PTC</b>	: Papillar tiroid karsinoma
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türevleri
<b>I-131</b>	: Radyoaktif iyot

## VIII

## ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ

<u>Tablo ve Şekil Listesi</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Standart Kalibrasyon Eğrisi .....	21
Resim 4.1. a. İki çekirdekli binükleer hücre; b. Bir MN'lu binükleer hücre .....	22
Tablo 4.1. Tiroit kanserli 8 hastaya ait MN frekansı ve 8-OHdG seviyeleri .....	23
Tablo 4.2. Kontrollere, tiroid kanserli, nodüler guatrı ve Cushing's sendromlu hastalara ait MN frekansı ve 8-OHdG seviyeleri .....	23



## 1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM:

Tiroid kanserleri, tüm kanserlerin %1-2'sini oluşturmalarına rağmen, son yıllarda insidansı hızla artan en sık endokrin kanserlerinden biridir (1-3). İyot eksikliği, radyasyona maruz kalma, endemik ve sporadik guatr, benign tiroid nodülleri, ailesel geçmiş, Graves gibi bazı tiroid hastalıkları ve çeşitli onkogenler (ras, braf, trk, met ve RET gibi) tiroid kanserlerinin gelişmesi için önemli faktörlerdir (1, 4, 5). Tiroid hormonlarının biyosentezi için reaktif oksijen türevlerinden (ROT) olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e gereksinim vardır. Tiroid nodülleri, guatr, Graves gibi endokrin hastalıklarında ve tiroid kanserlerinde, tiroid hormon sentezinin oksidatif doğasından kaynaklanan ve buna ilave olarak iyot eksikliğinden de kaynaklanan oksidatif stresin etkili olduğu belirtilmektedir (6, 7).

Oksidatif stres, farklı mekanizmalar ile DNA'da hasarlanmalara yol açmakta ve DNA'nın instabilitesini (kararlılığını) etkilemektedir (8). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olup oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılan en yaygın yöntemdir (8-10). Sitokinez-blok mikronukleus (CBMN) testi de DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmekte ve kromozom hasarlarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (11, 12).

Yapılan çalışmalarda, artmış DNA hasarı ile kanser gelişimi arasında bir korelasyon olduğu belirtilmektedir. Fakat tiroid kanserleri ve DNA hasarı ile ilgili çalışmaların sonuçları birbiri ile çelişkili olup bazı çalışmalarda DNA hasarının arttığı, bazı çalışmalarda ise herhangi bir değişiklik olmadığı bulunmuştur (2). Bununla birlikte DNA hasarı ve tiroid kanserleri arasındaki ilişkiyi kesin olarak gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastaların periferik kan lenfositlerinde mikronukleus (MN) sıklığı (CBMN testi ile) ve plazmalarında oksidatif DNA hasarı (8-OHdG ölçümü ile) değerlendirilerek, hem tiroid nodül oluşumu ile hem de farklı

tipte tiroid karsinomları ile DNA hasarı arasında bir ilişkinin olup olmadığı tespit edilmeye çalışılacaktır.

Radyoaktif iyot (I-131) tedavisi 1942'lerden beri hipertroidizm ve tiroid kanserleri gibi birçok tiroid hastalıklarının tedavisinde etkili ve güvenilir bir tedavi şekli olarak kullanılmaktadır (13, 14). Radyoaktif I-131 tedavisinin hastalar üzerinde olumlu etkisinin olması yanı sıra, bazı olumsuz yan etkileri de bulunmaktadır. Çünkü tedavi sırasında normal dokular da radyasyona maruz kalmakta ve bu durum çeşitli komplikasyonlara yol açmaktadır. İyonize radyasyon olan, I-131'in terapötik kullanımının, DNA'da hasarlanmalara hatta hücre ölümlerine bile yol açtığı ileri sürülmektedir (2, 13). Ancak, I-131 tedavisi ve DNA hasarı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışma sonuçlarının da birbiri ile çelişkili olduğu görülmektedir (15, 16).

Ayrıca, çalışmamızda I-131 tedavisi alan hastalarda, tedaviden sonra hastaların periferik kan lenfositlerinde MN sıklığı (MN testi ile) ve plazmalarında oksidatif DNA hasarı (8-OHdG ölçümü ile) değerlendirilerek, I-131 tedavisinin DNA üzerine etkileri araştırılacaktır.

Cushing's Sendromu devamlı patolojik hiperkortizolemi sonucunda ortaya çıkan bir hastalık tablosudur. Bu stresin DNA onarımı ve/veya apoptozda değişikliklere yol açarak karsinogeneze zemin yarattığı öne sürülmektedir (17, 18). Ayrıca, stres hormonlarından özellikle kortizol ve noradrenalinin DNA hasarını artırabileceği de bildirilmektedir (19). Fakat Cushing's Sendromu'nda DNA hasarı ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Endojen ya da inatrogenik olarak kortizol salınımının arttığı ve sirkadiyen ritminin bozulduğu Cushing's Sendromunda da, hem periferik kan lenfositlerinde MN sıklığı incelenerek, hem de plazmalarında 8-OHdG düzeyleri ölçülerek DNA hasarının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Tiroid kanserleri, tüm kanserlerin %1-2'sini oluşturmasına rağmen, son yıllarda insidansı hızla artan en sık endokrin kanserlerinden biridir (1-3). Tiroid kanserlerin görülme sıklığı erkek: kadın için 1:3 oranındadır. Tiroid kanserlerinin çoğu tiroid foliküler hücrelerden kaynaklanır (3). Tiroid kanserleri, papiller, folikular, medullar ve anaplastik olmak üzere 4 farklı formda oluşmaktadır (1, 3). Bunlar arasında en sık rastlanılan formu papiller tiroid karsinomudur (PTC) ve yaklaşık tüm tiroid kanserlerinin %80'nini oluştururlar (1, 3). Folikular tiroid karsinomu (FTC) en yaygın ikinci tiroid kanser tipidir ve tüm tiroid kanserlerinin %15'ini oluşturur. PTC tiroid foliküler hücrelerden köken alırken, FTC ya doğrudan tiroid epitel (foliküler) hücrelerden ya da daha önceden var olan benign foliküler adenomdan oluşur. Hem PTC hem de FTC iyi farklılaşmış (diferansiye) kanserlerdir. Anaplastik tiroid karsinomları az farklılaşmış epitelyal kökenlidir ve tüm tiroid kanserlerinin %1-2'sini oluştururlar. Medullar karsinoma tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %3'nü oluştururlar ve parafoliküler C hücrelerinden orjinlenirler (3). İyot eksikliği, radyasyona maruz kalma, endemik ve sporadik guatr, benign tiroid nodülleri, ailesel geçmiş, Graves gibi bazı tiroid hastalıkları ve çeşitli onkogenler (ras, braf, trk, met ve RET gibi) tiroid kanserlerinin gelişmesi için önemli faktörlerdir (1, 4, 5).

Endokrin hastalıklarının genel nedeni tiroid fonksiyonundaki değişikliklerdir (20). Normal bir tiroid fonksiyonu tiroid hormonlarının sentezi için gerekli bir iz element olan iyotun varlığına bağlıdır. Çünkü iyot tiroit hormonu triksinin (T4) sentezi için major bir substrattır (5, 21). İyot eksikliğinde en sık görülen klinik belirtilerden biri endemik (bölgesel) guatr olarak bilinen tiroid büyümesidir. Tiroid büyümesi daha sonra tiroidin nodular transformasyonuna yol açabilir (21).

Tiroid hormonlarının biyosentezi için reaktif oksijen türevlerinden (ROT) olan  $H_2O_2$ 'e gereksinim vardır. Çünkü tiroid hormonu olan trioksin (T4)'nin sentezinde triglobine iyot atomunun bağlanması  $H_2O_2$ 'i gerektirir (6, 21, 22). Tiroid nodülleri, guatr, Graves gibi endokrin hastalıklarında ve tiroid kanserlerinde, tiroid hormon sentezinin oksidatif doğasından kaynaklanan ve buna ilave olarak iyot eksikliğinden de kaynaklanan oksidatif stresin etkili olduğu belirtilmektedir (6, 7).

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA'da baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları (kromozom kırıkları), DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (8).

ROT'lar DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (23). Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarının göstergesidir (8-10). Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, DNA'da guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalinin bağlanması sonucu oluşur. DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (8-10) ve bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması da yeni hatalara sebep olur (24). Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olup oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılan en yaygın yöntemdir (8-10).

Sitokinez-blok mikronukleus (CBMN) testi, insan periferik kan lenfositlerinde mikronukleus (MN) frekansını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (12, 25, 26). MN, kromozom parçalarını ya da bölünen hücrelerde anafazda geri kalma sonucu oluşan tam kromozomları içerebilir. Bölünen hücrelerde MN, tamir edilemeyen ya da yanlış tamir edilen DNA lezyonlarından, mitoz bölünme sırasındaki kusurlardan kaynaklanan hatalı kromozom ayrılmalarından oluşur. Bu olaylara ise oksidatif stres, çeşitli mutajenik ajanlara maruz kalma, hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki genetik hatalar, DNA tamir genlerindeki kusurlar ve beslenme bozuklukları neden olmaktadır (27).

DNA hasarı ile kanser gelişimi arasında bir ilişkinin olduğu rapor edilmiştir (2). Tiroid kanserlerinde DNA hasarını araştıran çok az çalışma bulunmaktadır ve sonuçları da birbiri ile çelişkilidir (28, 29). Bunlardan, MN sıklığını araştıran iki çalışmada tiroid kanserli hastalarla (hangi tipi olduğu belirtilmemiş) kontrol grubu arasında MN frekansı açısından bir fark olmadığı (30, 31), bir çalışmada ise tiroid kanserli hastalarda MN sıklığının kontrollere göre önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (2). Tiroid kanserli hastalarda oksidatif DNA hasarını (8-OHdG içeriğini) araştıran herhangi bir çalışmaya da rastlanılamamıştır.

Radyoaktif iyot (I-131), tiroid kanserli hastaların tedavisinde kullanılan en yaygın tedavi yöntemlerinden biri olup oldukça etkili ve güvenilir bir tedavi şeklidir (13, 14, 15, 32). I-131'le tedavinin avantajları olmasına rağmen, dezavantajları da bulunmaktadır. Çünkü radyoaktif iyot, bir iyonize radyasyondur. Hastalara verilen I-131 tirod hücreleri tarafından alınır ve iyot-tironin olarak depo edilir (14). Dolayısıyla I-131 tedavisi sırasında normal sağlıklı hücrelerde radyasyona maruz kalmaktadır ve bu alan da doku yıkımı görülmektedir (14, 15). İyonize radyasyon, tek ve çift zincir kırıklarını içeren, kromozom kırıklarına neden olan ve nükleotid değişimlerine yol açan çeşitli DNA hasarlarına sebep olur. Ayrıca, iyonize radyasyon, serbest radikallerin oluşumuna, mitozun gecikmesine ve önlenmesine apoptozun indüklenmesine yol açar. İyonize radyasyonun bu etkilerinden dolayı, I-131 tedavisi alan tiroid kanserli hastalarda, I-131'in DNA hasarı üzerine etkileri farklı yöntemler (kardeş kromatid değişimi, comet assay, kromozom aberasyonları) kullanılarak araştırılmıştır. Ancak, bu çalışmalar sınırlı sayıda olup çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir (14, 15, 33). I-131 tedavisinin MN sıklığı üzerine etkisi ile ilgili birkaç çalışma bulunmakta ve bu çalışma sonuçları da birbiriyle çelişmektedir. Monteiro ve ark (13) tiroid kanserli 19 hastanın I-131'le tedavi edilmeden önce ve tedaviden 1 ay ve 6 ay sonra periferik kan lenfositlerinde MN sıklığını incelediklerinde, 1 ay ve 6 ay sonra MN sıklığının arttığını bulmuşlardır. Gutierrez ve ark (16), tiroid kanserli hastaların terapiden (I-131) önce ve terapiden 1 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonra ki MN sıklığını araştırdıklarında, terapiden sonra MN sıklığının arttığını, terapiden 1 hafta sonra bu artışın maksimuma ulaştığını zaman geçtikçe MN sıklığının azaldığını bulmuşlardır. Oysa, Federico ve ark (34) I-131 tedavisi alan tiroid kanser hastalarında, tedavi almadan önceki MN frekansı ile tedavi aldıktan 24 ve 48 saat sonraki MN frekansı arasında fark olmadığını göstermişlerdir. Joseph ve ark. (2) I-131 tedavisi alan tiroid kanserli hastalarda tedaviden önce ve tedaviden 1ay ile 126 ay değişen sürelerde alınan kan örneklerinde MN sıklığını araştırmışlardır. Hastalardan farklı aralıklarla alınan kan örneklerinde MN frekansının değişmediğini ve radyoaktif iyot tedavisinin DNA hasarını artırmadığını ileri sürmüşlerdir. Radyoaktif iyot tedavisinin oksidatif DNA hasarına yol açıp açmadığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Glukokortikoidler organizmanın homeostazisinin devamını sağlamak ve fiziksel ya da emosyonel strese karşı organizmayı hazırlamakla görevlidirler. İnsanlarda ana glukokortikoid hormon olan kortizol, adrenal bezlerden salgınır ve salgınının sirkadiyen ve pulsatil özelliği vardır (35). Cushing's Sendromu devamlı patolojik hiperkortizolemi sonucunda ortaya çıkan bir hastalık tablosudur. Bu stresin DNA onarımı ve/veya apoptozda değişikliklere yol açarak

karsinogeneze zemin yarattığı öne sürülmektedir (17, 18). Stres hormonlarından özellikle kortizol ve noradrenalinin DNA hasarını artırabileceği de bildirilmektedir (19). Endojen ya da inatrogenik olarak kortizol salınımının arttığı ve sirkadiyen ritminin bozulduğu Cushing's Sendromunda da, literatür incelemesine göre hem kromozomal DNA hasarını hem de oksidatif DNA hasarını araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. GEREÇLER**

##### **Demirbaş Malzemeler**

1. Etüv (Heto/ Cell Hause 200)
2. Su banyosu (Thermal)
3. Vorteks (Janke & Kunkel VF2)
4. Mikroskop (Nikon Labophot 2 ve Zeiss Primo Star model)
5. Santrifüj ( ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
6. Hassas terazi (Kern S 2000 ve Ohaus Pioneer)
7. Derin dondurucu
8. Buzdolabı
9. Dengeleme terazisi
10. Otomatik pipet
11. Fotomikroskop (Leica DM 2500 )
12. Elisa Cihazı (Biotek-Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System)

##### **Sarf Malzemeler**

1. Hazır Medyum, (Biological Industries, B-01-198-1B) Peripheral Blood Karyotyping Medium (Complete culture medium w/o phytohemagglutinin),
2. Fitohemagglutinin (Biological Industries, B1-12-006-1H)
3. Sitokalazin-B (Sigma, C-6762)
4. Dimetil sülfoksit, DMSO (Merck)

5. Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi)
6. Giemsa (Merck, 5400512)
7.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, 9021622)
8.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, K1690176)
9. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
10. Metanol (Merck, 502K05275408)
11. Ksilol (Merck, 207K037553)
12. Entellan® (Merck, 640171987)
13. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
14. KCL (Merck, 340TA611835)
15. Alkol (%96'lık Tekel)
16. Distile su
17. Tüplük
18. Çeşitli cam malzemeler
19. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
20. Enjektör
21. Çeşitli ebatlarda puarlar
22. Pastör pipeti
23. Filtre Kağıdı (Whatman Filter Papers 125 mm)
24. Lam (İsolab, 76x26 mm)
25. Lamel (İsolab, 24x32 mm)
26. 8-OHdG Eliza Kiti (NWK- 8OHdG02, Northwest Life Science Specialties, LLC, WA, USA)

### **3.2. YÖNTEM**

#### **Çalışma Grubu**

Bu çalışma Ekim 2010 ve Ekim 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Polikliniğine başvuran hastalar üzerinde yapıldı. Çalışma öncesi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı (Etik kurul karar no: 2010/46). Çalışmada,



cerrahi dışında herhangi bir tedavi almamış (foliküler ve papiller) tiroid kanser şüpheli 36 hastadan ameliyat öncesi ve sonrası kan örnekleri toplandı. Ancak bu şüpheli hastalardan patoloji sonucu karsinoma (foliküler ve papiller karsinom) çıkan 16 hastadan ameliyat öncesi ve sonrası ve I-131 tedavisi aldıktan 1 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonrası, ayrıca nodüler guatrı olan 30 hastadan, ekzojen ve endojen Cushing's tanısı alıp herhangi bir tedavi almamış Cushing's sendromlu 20 hastadan ve benzer özelliklere sahip 30 sağlıklı kişiden kan örnekleri alındı. Hasta ve kontrol kişilerin yaşları, 18-65 yaş aralığı arasındaydı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların isim, soy isim, dosya numarası, yaş, cinsiyet, yaşadığı yer, telefon numaraları ve operasyon sonrası patoloji raporları kaydedildi.

Ayrıca hasta ve kontrol kişilerin, az miktarda (3 fincan) çay içen, son altı ayda şiddetli enfeksiyon yada viral hastalık geçirmeyen, herhangi bir ilaç kullanmayan, bilinen genotoksik kimyasal bir ajana maruz kalmamış olan, farklı bir beslenme alışkanlığı olmayan, hipertansiyon, diyetle regüle diyabet, kalp, kanser gibi herhangi bir hastalığı olmayan ve ailede de kanser öyküsü olmayan kişiler olmasına dikkat edildi. Çalışmaya katılan kişilere çalışmanın amacı anlatılarak, yazılı onayları alındı (Ek 1).

## **CBMN Yöntemi**

CBMN yöntemine göre özetle, hastalardan alınan kan örnekleri hücre kültür medyumuna içeren kültür tüplerine eklendi ve 72 saatlik tam kan kültürü yapıldı. Kültürün 44. saatinde sitokalazin-B (cyt-B) ilave edilerek binükleer hücrelerin oluşması sağlandı. 72 saatlik kültür sonrası kültür sonlandırılarak preparatlar hazırlandı (12, 36, 37).

### **1. Kültür Ortamının (Besiyerinin) Hazırlanması**

Kullanılan malzemeler ve miktarları;

<b><u>Malzeme</u></b>	<b><u>Miktarı</u></b>
Hazır Medyum	100 cc ( complete culture medium)
Fitohemaglutinin	2.5 cc

Besiyeri, steril ortamda 100 cc'lik hazır medyum içine fitohemaglutinin eklenip, elle yavaş bir şekilde bir kaç kez karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan medyum yine steril ortamda 5'er cc olmak üzere steril vidalı kapaklı konik tabanlı kültür tüplerine bölünüp, 10-15 dakika laboratuarda bekletildikten sonra -20 °C'ye kaldırıldı.

## 2. Kan Örneklerinin Alınması

Hasta ve sağlıklı kişilerin yazılı onayları alındıktan sonra, heparinle yıkanmış enjektörlere 5 ml periferik kan örnekleri alındı. Ayrıca, I-131 tedavisi alacak olan foliküler ve papiller tiroid kanserli hastalardan (n=36), tedaviden 1 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonra da heparinle yıkanmış enjektörlere 5 ml periferik kan örnekleri alındı.

## 3. Kültür Tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin ilk 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 12 damla (~0.4 ml) kan ilave edildi. Tüplerin üzerine kişi adı yazıldı ve her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 44. saatte binükleer hücre elde etmek için cyt-B (final konsantrasyonu: 3µg/ml) eklenmek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

## 4. Çıkarım İşlemleri

MN elde etmek için kullanılan Fenech (12) metoduna göre ve bazı modifikasyonlarla (37, 38) çıkarım işlemleri yapıldı.

1. 72 saat inkübasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.
2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
3. Daha sonra tüplere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1 M hipotonik solüsyonundan 6 ml eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glacial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
6. Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
7. Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

## 5. Preparat Hazırlama

Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzlukunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1- 2 cm yukarıdan) 9-10 damla damlatıldı. Lamlara hafifçe üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her bir kişi için, bir kültür tüpünden 2 tane olmak üzere toplam 4 preparat hazırlandı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

## 6. Preparatların Boyanması ve Saklanması

Sorenson boya tamponu (pH=7.0):

Sorenson boya tamponu 5.26 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 8.65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

94 ml Sorenson boya tamponu üzerine 6 ml giemsa boyası eklenerek giemsa boyası hazırlandı. Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan % 6'lık giemsa 8 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

## 7. Lamların İncelenmesi

Hazırlanan preparatlarda ışık mikroskopunda X40 büyütmede;

DNA hasarı için; 1000 binükleer hücre sayıldı ve bulunan MN sayıları kaydedildi.

Sitokinezi bloke edilmiş binükleer hücreler, MN frekansını değerlendirebilmek için aşağıdaki kriterleri içermek zorundadırlar (12) :

- Hücreler iki çekirdekli olmalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdek, nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü, çekirdek çapının  $\frac{1}{4}$ 'ünden büyük olmamalıdır.

- BN hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
- BN hücrenin sitoplazmik sınırı ya da zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.

### **MN sayma kriterleri:**

MN'lar morfolojik olarak çekirdek ile aynı ancak çekirdekten daha küçüktür. MN özellikleri aşağıda belirtilmiştir (12) :

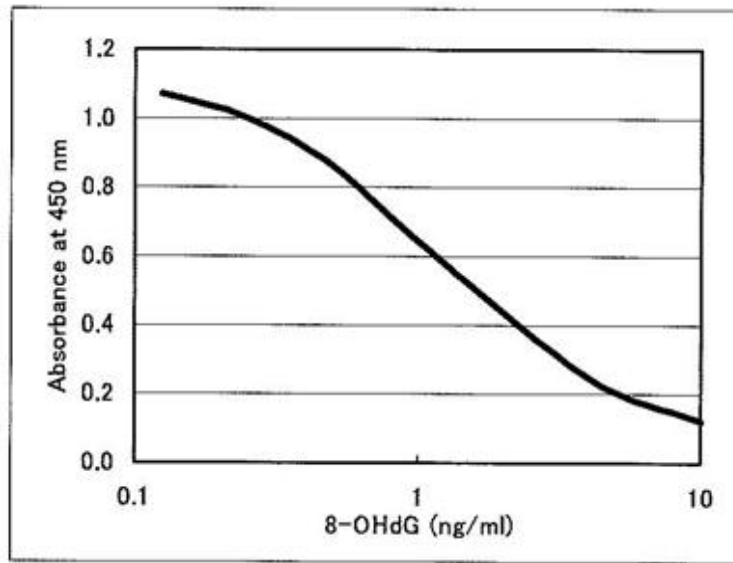
- a) İnsan lenfositlerindeki MN'ların çapı, genellikle ana çekirdeğin ortalama çapının 1/16 ve 1/3'ü arasında değişebilir.
- b) MN'lar kırılğan olmamalıdır ve böylece boyanan partiküller gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilir olmalıdır.
- c) MN'lar ana çekirdekle birleşmiş veya bağlantılı olmamalıdır.
- d) MN'lar ana çekirdeğe temas edilebilir ancak üstüne binmiş olmamalıdır ve mikronükleer sınır çekirdek sınırından ayırt edilebilir olmalıdır.
- e) MN'lar genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boyanmalıdır, ana çekirdek bazen daha yoğun (koyu) boyanabilir.
- f) Hücrelerin 6 tane MN'dan daha fazlasını içermemesi gerekir.

### **8. 8-OHdG seviyelerinin belirlenmesi**

Kan örnekleri alındıktan hemen sonra 1500 devirde 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayırt edildi ve çalışma yapılmıncaya kadar plazma örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı (38). Plazma 8-OHdG seviyesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan Biotek Marka ELISA cihazında, ticari kit (Northwest Life Science Specialties, LLC, WA, USA) kullanılarak belirlendi.

**İşlem:** Reaktiflerin tamamı oda ısısına getirildi. Plaka üzerinde standartların ve örneklerin konulacağı kuyucuklar belirlendi, 50  $\mu\text{L}$  standartlardan ve örneklerden kendileri için belirlenen kuyucuklara eklendi. Blank için ayrılan kuyucuğa da 50  $\mu\text{L}$  PBS eklendi. Sulandırılmış primer antikordan blank haricindeki bütün gözlere 50  $\mu\text{L}$  ilave edilip, içeriğin düzgün karışmasını sağlamak için plaka hafifçe çalkalandı. Ağız kısmına kapak yapıştırılan plaka bir gece boyunca  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. İçeriği boşaltılan kuyucukların her

birine 250  $\mu$ L yıkama tamponu ilave edilip, yıkamadan iyi sonuç almak için plaka yavaşça sallandıktan sonra içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından sulandırılmış sekonder antikordan her bir göze 100  $\mu$ L eklenip, içeriğin karıştığından emin olmak için yavaşça çalkalandı. Yapışkan bant ile ağzı kapatılan plaka oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaka içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç defa tekrarlandı. Plakanın her gözüne 100  $\mu$ L TMB substrat eklendikten sonra hafifçe karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Her bir göze 100  $\mu$ L stop solüsyonu eklenerek 450 nm'de absorbansı okundu. Standart eğri ELISA kiti içinde mevcut olan standardize edilmiş örneklerden elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Standart Kalibrasyon Eğrisi

## 9. İstatistiksel Değerlendirme

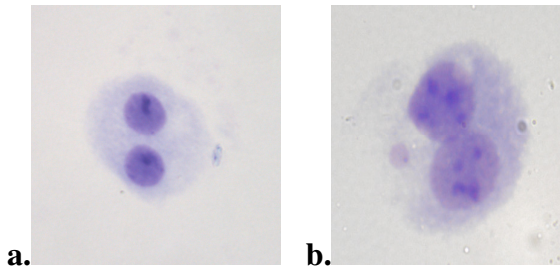
Hastalara ve kontrollere ait MN frekansları ve plazma 8-OHdG seviyeleri istatistiksel olarak nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi, Friedman test ve Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca hastalara ait MN frekansları ve plazma 8-OHdG seviyelerinin, yaş ile ilişkisi Spearman rho korelasyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama±standart sapma olarak verildi. P değeri < 0.05 olduğunda anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda tiroid kanserli 50 hasta toplanması planlanmasına rağmen, kanser şüpheli 36 hastadan kan örneği toplanabilmiş ve bu şüpheli hastalardan 16 hastanın patoloji sonucu karsinoma (foliküler ve papiller karsinom) çıkmıştır. Ancak bu tiroit karsinomalı hastalardan sadece 8 hastanın takibi (tedaviden önce ve I-131 tedavisi aldıktan 1 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonra) yapılabilmektedir.

16 tiroid kanserli, 30 nodüler guatrı olan ve 20 ekzojen ve endojen Cushing's sendromlu hastadan ve benzer özelliklere sahip 30 sağlıklı kişiden alınan kan örnekleri materyal ve metotta belirtilen yöntemlere göre kültüre edildi ve kültür sonunda preparatları hazırlandı. Ancak, bu hastalardan 12 tiroid kanserli, 20 nodüler guatrı olan ve 10 ekzojen ve endojen Cushing's sendromlu hastanın ve benzer özelliklere sahip 20 sağlıklı kişinin preparatları CBMN yöntemine göre MN frekansı için değerlendirilebilmiştir. Ayrıca, bu hasta ve kontrol kişilere ait plazma örneklerinde 8-OHdG seviyeleri de ölçülmüştür.

CBMN yöntemine göre, elde edilen preparatlar mikroskopta incelenerek, DNA hasarını belirlemek için, 1000 kadar binükleer hücreler sayıldı ve MN'lu binükleer hücreler kaydedildi (Resim 4.1.).



**Resim 4.1.** a. İki çekirdekli binükleer hücre; b. Bir MN'lu binükleer hücre.

Takibi yapılabilen tiroitd kanserli 8 hastanın MN frekansı ve 8-OHdG seviyelerinin sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Tiroit kanserli 8 hastaya ait MN frekansı ve 8-OHdG seviyeleri.

	Tedavi öncesi (Ameliyattan önce) (n=8)	Ameliyattan 10 gün sonra	İyottan 1 hafta sonra	İyottan 6 ay sonra	İyottan 1 yıl sonra
<b>MN frekansı (%)</b>	1.67 ± 0.72	1.53 ± 0.69	2.16± 0.71*	2.26± 0.67*	1.52± 0.75
<b>8-OHdG seviyesi (ng/mL)</b>	1.29 ± 0.58	1.31 ± 0.47	1.48 ± 0.39*	1.56 ± 0.51*	1.18 ± 0.62

Tedavi öncesi hastalarla ile karşılaştırıldığında, \*p <0.05.

Çalışmamızdaki kontrollere, tiroid kanserli, nodüler guatrılı ve Cushing’s sendromlu hastalara ait MN frekansı ve 8-OHdG seviyelerinin sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Kontrollere, tiroid kanserli, nodüler guatrılı ve Cushing’s sendromlu hastalara ait MN frekansı ve 8-OHdG seviyeleri.

	Kontrol (n=20)	Tiroid kanserli hasta (n=12) (Tedavi öncesi)	Nodüler guatrılı olan hasta (n=20)	Cushing’s sendromlu hasta (n=10)
<b>MN frekansı (%)</b>	0.87 ± 0.51	1.72 ± 0.57**	1.43±0.64*	1.54±0.59*
<b>8-OHdG seviyesi (ng/mL)</b>	0.62±0.32	1.24 ± 0.63**	1.09±0.37*	1.08±0.78*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, \*p <0.05 ve \*\*p<0.01.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Projede hedeflenen 50 tiroid kanserli hastadan sadece 36 hastanın (16 hastanın patoloji sonucu karsinomadır), nodüler guatrı olan 30 hastanın ve ekzojen ve endojen Cushing's tanısı alıp herhangi bir tedavi almamış 20 Cushing's sendromlu hastanın ve benzer özelliklere sahip 30 sağlıklı kişinin kan örnekleri toplanabilmiştir. Ancak proje süresince medullar tiroid kanserli hasta bulunamamıştır. Ayrıca, bu hastalardan 12 tiroid kanserli, 20 nodüler guatrı olan ve 10 ekzojen ve endojen Cushing's sendromlu hastanın ve benzer özelliklere sahip 20 sağlıklı kişinin preparatları incelenebilmiş ve plazma örneklerinde 8-OHdG seviyeleri de ölçülebilmştir. Proje süresinin sona ermiş olmasına rağmen tiroid kanserli hastaların ileri takibi (altı ay ve bir yıl sonra kan örnek alımı) ve incelenmeyen preparatların incelenmesine de devam edilmektedir.

Tiroid kanserleri, tüm kanserlerin %1-2'sini oluşturur ve son yıllarda insidansı hızla artmaktadır (1-3). Tirod kanserlerin görülme sıklığı erkek: kadın için 1:3 oranındadır. Tiroid kanserlerinin çoğu tiroid foliküler hücrelerden kaynaklanır (3). Tiroid kanserleri, papiller, folikular, medullar ve anaplastik olmak üzere 4 farklı formda oluşurlar. En sık rastlanılan formu ise papillar tiroid karsinomdur ve yaklaşık tüm tiroid kanserlerin %80'nini oluşturur (1, 3).

CBMN yöntemi, insan periferel kan lenfositlerde MN frekansını değerlendirmek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır (12, 25, 26). MN, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Ayrıca, bölünen hücrelerde MN, tamir edilemeyen ya da yanlış tamir edilen DNA lezyonlarından, mitoz bölünme sırasındaki kusurlardan kaynaklanan hatalı kromozom ayrılmalarından oluşabilir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak



değerlendirilmektedir. Diğer taraftan, kromozomal DNA hasarı ile kanser gelişimi arasında bir ilişkinin olduğu da rapor edilmiştir (11).

Çalışmamızda, tiroid kanserli, nodüler guatrli ve Cushing's sendromlu hastalara ait MN sıklığı ve 8-OHdG seviyeleri kontrol kişilerin MN sıklığı ve 8-OHdG seviyeleri ile karşılaştırıldığında, hastalarda bu değerlerin arttığı bulunmuştur.

Tiroid nodülleri toplumda çok sık görülen (~%7 oranında) hastalıklardan biridir. Tiroid nodüllerinin büyük çoğunluğu (%90) iyi huylu olmasına rağmen, tiroid nodüllerinin az bir kısmında (%10) tiroid kanseri görülebilmektedir. Bu olasılık nedeniyle, nodüler guatrli hastalarda DNA hasarının değerlendirilmesi tiroid kanser riski açısından önemlidir. Biz de çalışmamızda, nodüler guatrli hastalardaki MN sıklığı ve 8-OHdG seviyelerinin kontrollere göre arttığını gösterdik. Bundan dolayı, bu hastaların kanser riski açısından takip edilmesini önerebiliriz.

Glukokortikoidler organizmanın homeostazisinin devamını sağlamak ve fiziksel ya da emosyonel strese karşı organizmayı hazırlamakla görevlidirler. İnsanlarda ana glukokortikoid hormon olan kortizol, adrenal bezlerden salgınır, ve salgınının sirkadiyen ve pulsatil özelliği vardır (35). Cushing's Sendromu devamlı patolojik hiperkortizolemi sonucunda ortaya çıkan bir hastalık tablosudur. Bu stresin DNA onarımı ve/veya apoptozda değişikliklere yol açarak karsinogeneze zemin yarattığı öne sürülmektedir (17, 18). Stres hormonlarından özellikle kortizol ve noradrenalinin DNA hasarını artırabileceği de bildirilmektedir (19). Endojen ya da inatrogenik olarak kortizol salgınının arttığı ve sirkadiyen ritminin bozulduğu Cushing's sendromu ile ilgili olarak literatür incelemesine göre hem kromozomal DNA hasarını hem de oksidatif DNA hasarını araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu yönüyle Cushing's sendromu ile ilgili sonuçlarımız bir ilk olacak ve literatüre katkı getirecektir. Bu çalışmada, Cushing's sendromlu hastalara ait MN sıklığı ve 8-OHdG seviyelerinin kontrol kişilerin MN sıklığı ve 8-OHdG seviyelerine göre arttığı gösterilmiştir.

Radyoaktif iyot (I-131) tiroid kanserli hastaların tedavisinde kullanılan en yaygın tedavi yöntemlerinden biri olup oldukça etkili ve güvenilir bir tedavi şeklidir (15, 32). I-131'le tedavinin avantajları olmasına rağmen, dezavantajları da bulunmaktadır. Çünkü radyoaktif iyot, bir iyonize radyasyondur. Hastalara verilen I-131 tiroid hücreleri tarafından alınır ve iyot-tironin olarak depo edilir (14). Dolayısıyla I-131 tedavisi sırasında normal sağlıklı hücreler de radyasyona maruz kalmaktadır ve bu alanda doku yıkımı görülmektedir (14, 15). İyonize radyasyon, tek ve çift zincir kırıklarını içeren, kromozom kırıklarına neden olan ve nükleotid değişimlerine yol açan çeşitli DNA hasarlarına sebep olur. Ayrıca, iyonize radyasyon, serbest

radikallerin oluşumuna, mitozun gecikmesine ve önlenmesine apoptozun indüklenmesine yol açar.

Çalışmamızda, I-131 tedavisi alan tiroid kanserli hastaların tedavi öncesi, ameliyattan on gün sonrası, I-131 tedavisinden bir hafta, altı ay ve bir yıl sonrası MN sıklığı ve 8-OHdG seviyeleri karşılaştırıldığında tedaviden bir hafta ve altı ay sonrasında MN sıklığı ve 8-OHdG seviyelerinin arttığı, ancak tedaviden bir yıl sonra artan MN sıklığı ve 8-OHdG seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir.

Literatürde ise, I-131 tedavisinin MN sıklığı üzerine etkisi ile ilgili birkaç çalışma bulunmakta olup bu çalışma sonuçları da birbiriyle çelişkilidir. Monteiro ve ark. (13) tiroid kanserli 19 hastanın I-131'le tedavi edilmeden önce ve tedaviden 1 ay ve 6 ay sonra periferik kan lenfositlerinde MN sıklığını incelediklerinde, 1 ay ve 6 ay sonra MN sıklığının arttığını bulmuşlardır. Gutierrez ve ark (16), tiroid kanserli hastaların tedaviden (I-131) önce ve tedaviden 1 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonraki MN sıklığını araştırdıklarında, terapiden sonra MN sıklığının arttığını, terapiden 1 hafta sonra bu artışın maksimuma ulaştığını zaman geçtikçe MN sıklığının azaldığını bulmuşlardır. Federico ve ark. (34) ise I-131 tedavisi alan tiroid kanser hastalarında, tedavi almadan önceki MN frekansı ile tedavi aldıktan 24 ve 48 saat sonraki MN frekansı arasında fark olmadığını göstermişlerdir. Joseph ve ark. (2) da I-131 tedavisi alan tiroid kanserli hastalarda tedaviden önce ve tedaviden 1ay ile 126 ay değişen sürelerde alınan kan örneklerinde MN sıklığını araştırmışlardır. Hastalardan farklı aralıklarla alınan kan örneklerinde MN frekansının değişmediğini ve radyoaktif iyot tedavisinin DNA hasarını artırmadığını ileri sürmüşlerdir. Radyoaktif iyot tedavisinin oksidatif DNA hasarına yol açıp açmadığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya ise rastlanılamamıştır.

Yukarıda belirtilen çalışmaların ışığında ve bizim sonuçlarımıza göre, tiroid kanserli hastalardaki I-131 tedavisinin MN sıklığı üzerine etkileri için farklı (çelişkili) sonuçların bulunmasının nedeni, önceki çalışmalarda kan örneklerinin toplanma zamanlarının farklı olması ile açıklanabilir. Bu yönüyle, aynı zamanlarda alınan kan örneklerine ait kromozomal ve oksidatif DNA hasar sonuçlarını karşılaştırmak daha sağlıklı olacaktır.

Sonuç olarak, nodüler guatr ve Cushing's sendromlu hastalardaki artan kromozomal ve oksidatif DNA hasar parametreleri, bu hastalarda ileride gelişebilecek olası kanser riski ile ilişkili olabilir. Bu nedenle, nodüler guatr ve cushing's sendromlu hastaların kanser riski açısından uzun süreli olarak takip edilmesini önerebiliriz.

## KAYNAKLAR

1. Gatzidou E, Michailidi C, Tseleni-Balafouta S, Theocharis S. An epitome of DNA repair related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. *Cancer Lett.* 2010;290:139-47.
2. Joseph LJ, Bhartiya US, Raut YS, Kand P, Hawaldar RW, Nair N. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of thyroid cancer patients after radioiodine therapy and its relationship with metastasis. *Mutat Res.* 2009;675:35-40.
3. Greco A, Borrello MG, Miranda C, Degl'Innocenti D, Pierotti MA. Molecular pathology of differentiated thyroid cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2009;53:440-53.
4. Parameswaran R, Brooks S, Sadler GP. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers. *Int J Surg.* 2010 [Epub ahead of print].
5. Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, van Hasselt CA. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46:302 - 18.
6. Karbownik M, Lewinski A. The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003;24:293-303.
7. Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3:713-20.
8. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17:1195- 214.
9. Chen HI, Liou SH, Ho SF, Wu KY, Sun CW, Chen MF, Cheng LC, Shih TS, Loh CH. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxyguanosine (8-OHdG):

- Influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. *J Occup Health* 2007; 49: 389-98.
10. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1636-41.
  11. Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsière T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutation Research* 2008 ; 659: 274-283.
  12. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007;2: 1084-1104.
  13. Monteiro Gil O, Oliveira NG, Rodrigues AS, Laires A, Ferreira TC, Limbert E, Léonard A, Gerber G, Rueff J. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis* 2000;15: 69-75.
  14. Erselcan T, Sungu S, Ozdemir S, Turgut B, Dogan D, Ozdemir O. Iodine-131 treatment and chromosomal damage: in vivo dose-effect relationship. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004 ;3:676-84.
  15. Grzesiuk W, Nieminuszczy J, Kruszewski M, Iwanienko T, Plazinska M, Bogdanska M, Bar-Andziak E, Królicki L, Grzesiuk E. DNA damage and its repair in lymphocytes and thyroid nodule cells during radioiodine therapy in patients with hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol.* 2006;37:527-32.
  16. Gutiérrez S, Carbonell E, Galofré P, Creus A, Marcos R. Cytogenetic damage after 131-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test. *Eur J Nucl Med.* 1999;26 :1589–96.
  17. Kiecolt-Glaser JK, Stephens RE, Lipetz PD, Speicher CE, Glaser R. Distress and DNA repair in human lymphocytes. *J Behav Med.* 1985; 8: 311-20.
  18. Glaser R, Thorn BE, Tarr KL, Kiecolt-Glaser JK, D'Ambrosio SM Effects of stress on methyltransferase synthesis: an important DNA repair enzyme. *Health Psychol.* 1985, 4: 403-12.
  19. Flint MS, Baum A, Chambers WH, Jenkins FJ. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology.* 2007; 32: 470-9.
  20. Grzesiuk W, Nieminuszczy J, Kruszewski M, Iwanienko T, Plazinska M, Bogdanska M, Bar-Andziak E, Królicki L, Grzesiuk E. DNA damage and its repair in

- lymphocytes and thyroid nodule cells during radioiodine therapy in patients with hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol.* 2006; 37:527-32.
21. Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, Paschke R, Weiss RE, Krohn K. Iodine deficiency activates antioxidant genes and causes DNA damage in the thyroid gland of rats and mice. *Biochim Biophys Acta.* 2007 ;73:990-9.
  22. Gago-Dominguez M, Castelao J E. Role of lipid peroxidation and oxidative stress in the association between thyroid diseases and breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2008; 68: 107–114.
  23. Nakatani K, Komatsu M, Kato T, Yamanaka T, Takekura H, et al. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radical Res.* 2005; 39:905-911.
  24. Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res* 2007; 619: 113-23.
  25. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 2002; 181-182: 411-416.
  26. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research* 2008; 658: 215-233.
  27. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007;28:625-31.
  28. Violot D, M'Kacher R, Adjadj E, Dossou J, de Vathaire F, Parmentier C. Evidence of increased chromosomal abnormalities in French Polynesian thyroid cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005 ;32:174-9.
  29. Erselcan T, Sungu S, Ozdemir S, Turgut B, Dogan D, Ozdemir O. Iodine-131 treatment and chromosomal damage: in vivo dose-effect relationship. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31:676-84.

30. Gutiérrez S, Carbonell E, Galofré P, Creus A, Marcos R. Cytogenetic damage after <sup>131</sup>I-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test. *Eur J Nucl Med*. 1999;26:1589-96.
31. Gil OM, Oliveira NG, Rodrigues AS, Laires A, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J. No evidence of increased chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes from nonfamilial thyroid cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;123: 55-60.
32. Marx K, Moka D, Schomäcker K, Fischer T, Gabruk-Szostak B, Kobe C, Dietlein M, Schicha H. Cell death induced by <sup>131</sup>I in a differentiated thyroid carcinoma cell line in vitro: necrosis or apoptosis? *Nucl Med Commun*. 2006;27:353-8.
33. Lopes Rodrigues C, Corbo R, Proença Martins FP, Barbosa da Fonseca LM, Aranha IP, Gutfilen B. Low dosage of <sup>131</sup>I effects on chromosomes. *Yale J Biol Med*. 2003;76:109-14.
34. Federico G, Boni G, Fabiani B, Fiore L, Lazzeri P, Massart F, Traino C, Verola C, Saggese G, Mariani G, Scarpato R. No evidence of chromosome damage in children and adolescents with differentiated thyroid carcinoma after receiving <sup>131</sup>I radiometabolic therapy, as evaluated by micronucleus assay and microarray analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:2113-21.
35. Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16: 265-71.
36. Hamurcu Z, Bayram F, Kahrıman G, Dönmez-Altuntas H, Baskol G. Micronucleus frequency in lymphocytes and 8-hydroxydeoxyguanosine level in plasma of women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2010 Aug; 26(8): 590-5.
37. Dönmez-Altuntas H, Sut Z, Ferahbas A, Hamurcu Z, Demirtas H. Increased micronucleus frequency in phytohaemagglutinin-stimulated blood cells of patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22:162-7.
38. Hamurcu Z, Saritas N, Baskol G, Akpınar N. Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys. *Pediatr Exerc Sci*. 2010; 22: 60-8.

**Ek 1:****BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)** (radyoaktif iyot (I-131) tedavisi alan hastalar için)**BİLGİLENDİRME:**

**Araştırmanın Adı;** Tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastalarda ve Cushing's sendromu olan hastalarda mikronukleus sıklığı ve 8-OHdG düzeylerinin araştırılması.

**Araştırmanın Amacı;** Çalışmamızda, radyoaktif iyot (I-131) tedavisi alan hastalarda, I-131 tedavisinin DNA hasarı üzerine etkisi araştırılacaktır. I-131 tedavisinin olası DNA hasarına yol açması durumunda ikincil kanser gelişimine katkısının olup olmayacağı araştırılacaktır.

**Araştırmanın Süresi;** Yaklaşık 2 yıl

**Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı;** 155

**Araştırmada İzlenecek Yöntem;** DNA hasarını ölçmek için, tedaviden önce, tedaviden 1 hafta, 6 ay ve 1 yıl sonra heparinli enjektörlere 5 ml periferik kan örneği alınacaktır. Çalışma için ayrıca bir ilaç uygulaması ya da tıbbi müdahale yapılmayacaktır. Bu nedenle çalışmanın size herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır.

Çalışma ile ilgili olarak kan alma dışında özel bir girişimde bulunulmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmakta özgürsünüz. Başlangıçta kabul edip daha sonra fikir değiştirip, hiçbir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirsiniz. Bu durumda sizinle ilgili tıbbi özende bir değişiklik olmayacaktır.

Kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlarınız gizli tutulacaktır; kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde bile kimliğiniz gizli kalacaktır.

**Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:**

Uzm. Dr. İlkay Çakır

Tel: 0 352 437 49 01/20957

**GÖNÜLLÜ OLURU**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)** (hasta ve sağlıklı gönüllüler için)

**BİLGİLENDİRME:**

**Araştırmanın Adı;** Tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastalarda ve Cushing's sendromu olan hastalarda mikronukleus sıklığı ve 8-OHdG düzeylerinin araştırılması.

**Araştırmanın Amacı:** Çalışmamızda, Tiroid nodülü ve farklı tipte tiroid karsinomu olan hastalarda ve Cushing's sendromu olan hastalarda DNA hasarı ölçülerek, tiroid kanseri alt tipleri ve serum kortizol düzeylerinin yükselmesi ile ile genotoksisite arasında bir ilişkinin olup olmadığı tespit edilecektir.

**Araştırmanın Süresi;** Yaklaşık 2 yıl

**Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı;** 155

**Araştırmada İzlenecek Yöntem;** DNA hasarını ölçmek için, hastalardan ve hastalarla benzer yaş ve cinsiyete olan sağlıklı gönüllülerden bir kez heparinli enjektöre 5 ml periferik kan örneği alınacaktır. Çalışma için ayrıca bir ilaç uygulaması ya da tıbbi müdahale yapılmayacaktır. Bu nedenle çalışmanın size herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır.

Bu çalışmaya katılmakta özgürsünüz. Başlangıçta kabul edip daha sonra fikir değiştirip, hiçbir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirsiniz.

Kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlarınız gizli tutulacaktır; kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde bile kimliğiniz gizli kalacaktır.

**Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilir Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:**

Uzm. Dr. İlkay Çakır

Tel: 0 352 437 49 01/20957

**GÖNÜLLÜ OLURU**

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih