



**TÜRK TOPLUMUNDA BENİGN VE MALİGN TİROİT  
NODÜLLERİNDE MİTOKONDRİYAL DNA SIK DELESYON  
PREVALANSININ BELİRLENMESİ**

**Nazlı APAYDIN**

**Yüksek Lisans**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Rifat BİRCAN**

**2021**

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRK TOPLUMUNDA BENİGN VE MALİGN TİROİT  
NODÜLLERİNDE MİTOKONDRIYAL DNA SIK DELESYON  
PREVALANSININ BELİRLENMESİ**

**Nazlı APAYDIN**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Rifat BİRCAN**

**TEKİRDAĞ-2021**

**Her hakkı saklıdır.**

## ÖZET

Yüksek Lisans

### TÜRK TOPLUMUNDA BENİGN VE MALİGN TİROİT NODÜLLERİNDE MİTOKONDRİYAL DNA SIK DELESYON PREVALANSININ BELİRLENMESİ

**Nazlı APAYDIN**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rıfat BİRCAN

mtDNA mutasyonlarının veya varyasyonlarının birçok multifaktöryel hastalıkta ve yaşlanma süreçlerinde rol oynadığına dair bilgi literatürde yer almaktadır. Literatürde 4977 baz çiftlik bir mtDNA delesyonu olan sık delesyonun tiroit, kolorektal, karaciğer, meme, kanserlerinde rol oynadığına bilgiler yer almaktadır. Yapılan bu çalışmanın amacı, Türk toplumunda, fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan tiroit nodülleri ile papiller tiroit karsinomlarında (PTK) mitokondriyal DNA (mtDNA) sık delesyon prevalansının saptanması ve mitokondriyal DNA (mtDNA) sık delesyon varlığının PTK'lerinde ayırıcı tanıda kullanılabilme potansiyeli olup/olmadığının belirlenmesidir. Çalışmaya 105 benign ve 6 PTK hastasına ait toplam 285 dokudan daha önceki çalışmadan fenol-kloroform yöntemiyle elde edilen DNA örneği dahil edilmiştir mtDNA sık delesyon bölgesine ait 8470.-8484. nükleotidler ile 13459.- 13447. nükleotidler arasındaki mitokondriyal genom bölgesinin çoğaltılması Yuvalanmış PZR (Nested-PCR) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam 104 hastadan alınan sıcak ve soğuk nodül dokularının 151'inde (%66,23) sık delesyon tespit edilmiştir. PTK tanısı konulan 6 hastaya ait 11 tümör dokusunun 10'unda (%90,9) sık delesyon tespit edilmiştir. Soğuk nodüller ve sıcak nodüller arasındaki sık delesyon dağılımı incelendiğinde, 107 sıcak nodülün 80'inde (%74,8), 80 soğuk nodülün ise 69'unda (%86,3) sık delesyon saptanmıştır (p 0,053). Sonuç olarak, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber sık delesyon prevalansı kanserleşme potansiyeli yüksek olan soğuk nodüllerde sıcak nodüllere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Ancak soğuk tiroit nodüllerindeki sık delesyon prevalansının PTK tümör dokularıyla benzer olması nedeniyle PTK'lerinde ayırıcı tanıda kullanılabilme potansiyelinin olmadığı öngörülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Mitokondriyal DNA, Sık Delesyon, Tiroit

2021, 64 sayfa

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

### **DETERMINATION OF MITOCHONDRIAL DNA COMMON DELETION PREVALENCE IN BENIGN AND MALIGN THYROID NODULES IN THE TURKISH POPULATION**

**Nazlı APAYDIN**

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Rıfat BİRCAN

In literature is mentioned that mitochondrial DNA (mtDNA) mutations/ variations play a role in many multifactorial diseases and aging processes. According to these studies, the common deletion in mtDNA, which is 4977 bp long, play a role in thyroid, colorectal, liver, breast cancer and aging. The aim of this study is to determine the prevalence of mitochondrial DNA (mtDNA) common deletion in functional and non-functional thyroid nodules and papillary thyroid carcinomas in Turkish population and to determine the presence of (mtDNA) common deletion can be used in the differential diagnosis of papillary thyroid cancers (PTC) whether or not. A total of 285 nodular and surrounding tissues of 105 benign and 6 PTC patients were included in the study. Nested PCR methodology were performed to analyze the mitochondrial genome region between 8470.-8484 and 13459.- 13447. nucleotides for detection of the mtDNA common deletion. The DNA samples were obtained by using phenol-chloroform methodology in previous studies. Common deletion was detected in 151 (66.23%) of the hot and cold nodule tissues taken from a total of 104 patients. Common deletion was detected in 10 (90.9%) of 11 tumor tissues of 6 patients diagnosed with PTC. When the distribution of Common deletion was examined between cold nodules and hot nodules, Common deletion was found in 80 (74.8%) of 107 hot nodules and 69 (86.3%) of 80 cold nodules (p 0.053). As a result, although, the prevalence of Common deletions was found to be higher in cold nodules, which has a high cancer potential than the hot nodules, it is not statistically significant. However, since the prevalence of Common deletions in cold thyroid nodules is similar to PTC tumor tissues, it is predicted that it has no potential to be used in the differential diagnosis of PTCs.

**Key words:** Mitochondrial DNA, Common Deletion, Thyroid

**2021, 64 pages**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Genel Bilgiler.....</b>	<b>4</b>
2.1. Mitokondriyal Genom .....	4
2.1.1. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyonu .....	5
2.1.2. Mitokondriyal DNA'nın Transkripsiyonu.....	5
2.1.3. Mitokondriyal Protein Sentezi .....	7
2.2. Mitokondriyal DNA Mutasyonları .....	7
2.2.1. Mitokondriyal DNA Nokta Mutasyonları .....	8
2.2.2. 4977 bç Sık Delesyon .....	9
2.3. Tiroid Anatomisi.....	10
2.3.1. Epidemoloji.....	11
2.3.2. Etiyoloji .....	12
2.3.3. Tiroidin Fizyolojisi .....	13
2.3.4. Tiroit Bezinin Benign Hastalıkları.....	13
2.3.4.1. Guatr Tanımı ve Multinodüler Guatr .....	13
2.3.4.2. Soğuk ve Sıcak Nodüller .....	14
2.3.5. Tiroit Kanserleri.....	16
2.3.5.1. Foliküler adenomlar .....	17
2.3.5.2. Folliküler tiroit karsinom .....	17
2.3.5.3. Papiller karsinoma .....	17
2.3.5.4. Anaplastik tiroit kanseri .....	18
2.3.5.5. Medullar tiroit kanseri.....	18
<b>3. Materyal ve yöntem .....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	19

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	20
3.1.3. Kullanılan kitler.....	21
3.1.4. Kullanılan ticari çözeltiler ve tamponlar.....	21
3.1.5. Kullanılan çözeltiler.....	22
3.1.6. Primerler .....	23
3.1.7. Kullanılan bilgisayar programları.....	23
3.1.8. Hasta grubu.....	23
3.2. Yöntem .....	24
3.2.1. İzole DNA Örneklerinde Spektrofotometrik Safılık ve Miktar Tayini.....	24
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	24
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi .....	25
3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	25
3.2.5. DNA dizileme reaksiyonu .....	26
3.2.6. DNA dizi analizi örneklerinin çöktürülmesi (etanol çöktürmesi) .....	27
3.2.7. Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi.....	27
3.2.8. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi .....	27
3.2.9. İstatistiksel analizler .....	28
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>28</b>
4.1. Hasta Grubu .....	28
4.2. DNA Miktar Tayini .....	29
4.3. Mitokondriyal DNA Yuvalanmış (Nested) PZR Sonuçları.....	42
4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	43
4.5. Soğuk ve Sıcak Nodüllere Sahip Hastalarda Demografik ve Patolojik Tanı Verilerin İstatistiksel Karşılaştırılması.....	46
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>50</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Tiroit kanseri sınıflandırılması .....	16
Çizelge 3. 2. PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler.....	23
Çizelge 4. 1. Tez çalışma kapsamında incelenen Toksik MNG ve MNG hastalarına ait veriler .....	28
Çizelge 4. 2. Tez çalışma kapsamında incelenen PTK hastalarına ait veriler .....	29
Çizelge 4. 4. Sıcak nodüllere sahip hastalarda sigara kullanımı ve aile öyküsü ile sık delesyon sıklığının karşılaştırılması .....	46
Çizelge 4. 5. Soğuk nodüllere sahip hastalarda sigara kullanımı ve aile öyküsü verileri ile sık delesyon sıklığının karşılaştırılması .....	47
Çizelge 4. 6. Sıcak ve soğuk nodüllere sahip hastalarda sık delesyon sıklığının karşılaştırılması.....	47



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1. İnsan mitokondriyal DNA'sı ve üzerinde yer alan genler.....	10
Şekil 2. 2. Tiroit bezi anatomisi.....	11
Şekil 2. 3. Tiroit otonomisinin etiyojisi.....	15
Şekil 4. 2. 4977 bç'lik sık delesyona sahip nodülün DNA'sından elde edilen Dizi analizi sonuçlar (A) ve analiz sonucunun referans dizi ile karşılaştırılması (B).....	44
Şekil 4. 3. 4879 bç'lik delesyona sahip nodülün DNA'sından elde edilen Dizi analizi sonuçları (A) ve analiz sonucunun referans dizi ile karşılaştırılması (B).....	45





## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATP	: Adenozin-3-fosfat
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
CD	: Mitokondriyal DNA sık delesyon “common deletion”
cm	: Santimetre
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleikasit trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
G	: Guanin
GTP	: Guanozin trifosfat
HCl	: Hidrojen klorür
HSP	: Ağır zincir promotör bölge
ITH	: Ağır zincir transkripsiyon başlangıç yeri
ITL	: Hafif zincir transkripsiyon başlangıç yeri
KCl	: Potasyum klorür
LSP	: Hafif zincir promotör bölge
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre

mM	: Milimolar
MNG	: Multinodüler guatr
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mtIF	: Mitokondriyal translasyon başlangıç faktörü
mtRNAPol	: Mitokondriyal RNA polimeraz
NaAC	: Sodyum asetat
nDNA	: Nükleer DNA
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
O <sub>H</sub> , O <sub>L</sub>	: Ağır ve hafif zincir replikasyon orijinleri
PEG	: Polietilenglikol
pmol	: Pikomol
PTK	: Papiler Tiroit Karsinom
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAS	: Rat sarkoma
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
rRNA	: Ribozomal RNA
SLS	: Örnek yükleme tamponu
T	: Timin
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TBE	: Tris borik asit EDTA
tRNA	: Taşıyıcı RNA
TSH	: Tiroit stimulan hormon
U	: Ünite
USG	: Ultrasonografi
UV	: Ultraviyole

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, eğitimimin her aşamasında gösterdiği sabır ve değerli katkılarından dolayı sayın danışman hocam Prof. Dr. Rıfat BİRCAN'a;

Yüksek lisans süresince birçok konuda destek aldığım, engin tecrübeleri, büyük bilgi birikimi, yapıcı yaklaşımı ve yönlendirmeleriyle her zaman yanımda olan sayın hocalarım Prof. Dr. Cenk ARAL'a ve Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e;

Tezimin analiz bölümünde her türlü yardımı en ince detayına kadar büyük bir sabırla yapan ve destek olan sayın hocam Doç. Dr. Deniz ŞİRİN'e ve diğer tüm Biyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma;

Çalışma arkadaşım olarak her zaman yanımda olan her durumda enerjisiyle desteğini hissettiğim dostum Şeyma TEKİN'e;

Hayatımın her anında yanımda olan maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem Ferahnaz APAYDIN'a, babam Aslan APAYDIN'a ve kardeşim Bora APAYDIN'a en içten teşekkür ederim.

Haziran, 2021

Nazlı APAYDIN

Biyolog

## 1. GİRİŞ

Genel olarak kanser terimi kontrolsüz hücre proliferasyonu gösteren invazyon ve metastaz ile karakterize malign neoplazmlar için kullanılır (Schaaf, Zschocke ve Potocki, 2012). Tiroit kanserleri tüm malignitelerin %1'ini oluşturur. Tiroit kanserleri en sık görülen endokrin malignitelerden biridir ve insidansı diğer tümörlere göre daha hızlı artmaktadır. Tiroit kanserlerinin insidansının artışına neden olarak çocukluk çağında benign durumlar nedeniyle eksternal radyasyona maruz kalınması, atmosferde kalıntı halinde radyoaktif iyoda maruz kalınması (örneğin Çernobil nükleer reaktör kazası), mikropapiller karsinomda olduğu gibi ince iğne aspirasyon ile subklinik dönemde tanı konması ve ultrasonografi tekniğindeki gelişmeler sonucunda mikronodüllerin daha kolay belirlenebilmesi gösterilebilir. Günümüzde, tiroit kanseri insidansı artmasına rağmen mortalite oranının azaldığı gözlemlenmektedir. Bunun nedeni erken tanı ve cerrahi ve/veya I<sup>131</sup> ile efektif tedavi yapılmasıdır (Arslan, Delibaşı ve Şahin, 2011).

Nodüllerin fonksiyonel özellikleri göz önüne alındığında sintigrafik taramalarda iyot alımındaki azalış veya artışa bağlı olarak fonksiyonel (sıcak) ve non-fonksiyonel (soğuk) nodüller olarak sınıflandırılırlar (Gozu vd., 2005). Tiroit sintigrafisinde, geri kalan tiroit dokusundan daha düşük radyoizotop tutulumu gösteren nodüle, non-fonksiyonel (hipofonksiyonel) veya soğuk nodül denilir. Sıcak nodüllerin radyoizotop tutulumu normal tiroit dokusuna oranla daha yüksektir. Belirgin tiroit nodülü olan hastaların nodüllerinin %7-25'i sıcak karakterdedir. Sıcak nodüllerin büyük bir kısmı benign olmakla birlikte %<1'den az bir kısmı tiroit karsinomu karakteri gösterir (Özata, 2005).

Tiroit kanserleri, tiroit dokusunun epitelyal ve non-epitelyal kısımlarından gelişir. Tiroit foliküler epitelyal; papiller, foliküler ve anaplastik kanserler köken alır. Papiller tiroit kanseri en sık görülen tip olup, tiroit kanserlerinin yaklaşık %75-83'ünü oluşturur (Zimmermann, Camenisch, Rechsteiner, Bode-Lesniewska ve Rössle, 2014). Papiller tiroit kanseri varyantları, iyi prognozlu papiller kanser varyantları ve kötü prognozlu papiller kanser varyantları olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır. İyi prognozlu papiller kanser varyantları; mikrokarsinoma, enkapsüle varyant, solid varyant, foliküler varyanttır. Kötü prognozlu papiller kanser varyantları ise; uzun hücreli (tall hücreli) varyant, onkositik (oksifil) varyant, kolumnar hücreleri varyant, diffüz sklerozandır (Özata, 2005).

Bununla beraber, mitokondriler nükleer genomdan bağımsız olarak replike ve transkribe olabilen kendi genomlarına sahiptirler. İnsan mitokondriyal DNA'sı (mtDNA), solunum zincir komplekslerinin 13 alt birimini, iki ribozomal RNA'yı ve 22 transfer RNA'sını kodlayan 16569 baz çiftlik dairesel çift iplikli bir DNA molekülüdür (Aral vd., 2010).

Son yıllarda mitokondriyal DNA mutasyonları ve polimorfizmlerinin kanser oluşumunda ve gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bunlar arasında, en çok çalışılan kodlama yapmayan D-loop bölgesinde yer alan D310 uzunluk polimorfizmidir. MtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızının diğer kısımlarına göre %2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu denli yüksek oranda mutasyon görülmesi, histon proteinlerden yoksun olması ve tamir mekanizmasının nükleer genom kadar etkin olmamasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla mitokondriyal genomda genellikle görülen mutasyonlar/varyasyonlar nükleotit eksilmesi (delesyon), eklenmesi (insersiyon) veya değişimlerinden (tranzisyon ve transversiyon) kaynaklanmaktadır (Avisé, 1991).

mtDNA mutasyonlarının veya varyasyonlarının bir çok multifaktöryel hastalıkta ve yaşlanma süreçlerinde rol oynadığına dair bilgi literatürde yer almaktadır. En sık görülen mitokondriyal mutasyonlardan birisi, sık delesyon (common deletion) olarak adlandırılan 8470.-8484. ve 13447.-13459. nükleotidleri arasındaki 4977 baz çiftlik mtDNA dizisinin delesyonudur. Bu delesyon, 5 tRNA geni ile sitokrom c oksidaz kompleks 1 ve ATPaz alt üniteleri olmak üzere 7 geni içermektedir (Aral vd., 2010).

Literatürde tiroit kanserleri ile mtDNA sık delesyonu arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı oldukça azdır ve çelişkilidir. Literatürde yer alan tiroit kanseri ile ilgili bir çalışmada benign ve malign tiroit tümörlerinden oluşan ve 79 vakayı kapsayan bir araştırmada (Hürthle ve non-hürthle hücre neoplazmaları) 4977 bç (baz çifti) sık delesyon (CD) varlığı taranmış ve sonuç olarak mtDNA sık delesyonu Hurthle hücre tümörlerinin %100'ünde, adenomların %33,3'ünde ve Hurthle olmayan hücreli papiller karsinomların %18,8'inde tespit edilmiştir. ATPaz 6 geninin germline polimorfizmleri, Hurthle hücreli tümörlerin ayırt edici özelliği olarak görülen mtDNA sık delesyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Aral ve Özer, 2007; Carew ve Huang, 2002; Chatterjee, Mambo ve Sidransky, 2006; Máximo, Soares, Lima, Cameselle-Teijeiro ve Sobrinho-Simoes, 2002). Çernobil kazasından sonra radyoizotoplarla kontamine olan bölgelerde yapılan bir çalışmada, papiller tiroit karsinom ve foliküller adenom hastalarının mtDNA örneklerindeki mutasyonlar araştırılmıştır ve sık delesyonun (4977 bç)

papiller tiroid karsinom ve foliküller adenomda yaygın olduğunu bulmuşlardır (Aral ve Özer, 2007; Chatterjee vd., 2006; Rogounovitch vd., 2002).

Literatürde yer alan diğer bir çalışmada ise 50 tiroit tümöründen ve Türk hastalarının komşu sağlıklı dokulardan alınan dokularda sık delesyon varlığı araştırıldı ve sadece 6 tiroit örneğinde delesyon gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda mitokondriyal sık delesyonun kanserle ilişkisi olmadığı öne sürülmüştür (Aral vd., 2010).

Bu nedenle, yapılacak bu çalışma ile Türk Toplumunda fonksiyone ve nonfonksiyone tiroit nodülleri ile papiller tiroit karsinomlarında mitokondriyal DNA sık delesyon prevalansının belirlenmesi mutasyon insidansının saptanması ve literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mitokondriyal Genom

İnsan mitokondriyal DNA'sı (mtDNA), 16.569 baz çifti uzunluğunda, dairesel ve maternal olarak kalıtılan bir DNA molekülüdür. Mitokondriyal genom 13'ü oksidatif fosforilasyon sisteminin (OXPHOS) polipeptitlerini kodlayan, 22'si taşıyıcı RNA'ları (tRNA) ve 2'si 12S ve 16S olmak üzere ribozomal RNA'ları (rRNA) kodlayan toplam 37 gen içermektedir (Aral ve Özer, 2007; Brandon, Baldi ve Wallace, 2006). Son yıllarda literatürde yer alan bazı çalışmalar, mtDNA'nın kodladığı mevcut genlere ilaveten düzenleyici RNA'ları ve hatta ilave proteinleri kodlayan genlere de sahip olduklarını bildirmişlerdir. Her bir insan hücresi yaklaşık olarak 1000-10000 mitokondriyal genom kopyası içermektedir (Özçelik vd., 2019).

MtDNA'nın yapısı incelendiğinde; ağır zincir (H) ve hafif zincir (L) olmak üzere iki tamamlayıcı zincirden oluştuğu görülmektedir (Aral ve Özer, 2007; Brandon vd., 2006). Guanin bakımından zengin olan ağır zincirde; 2 rRNA, 14 tRNA ve 12 polipeptid kodlayan gen; sitozince zengin olan hafif zincirde ise; 8 tRNA ve 1 polipeptid kodlayan gen yer almaktadır (Aral ve Özer, 2007; Taanman, 1999).

Bununla beraber memeli mtDNA olağanüstü ekonomik bir organizasyon sergilemektedir. Memeli mtDNA'sı histon proteinleri içermemektedir. Ayrıca, mitokondriyal genler intron dizileri içermezler ve mtDNA kontrol bölgesi dışında genler arası diziler ya birkaç bazla sınırlanmıştır ya da bulunmamaktadır. Mitokondriyal genler yer alan hem tRNA hem de rRNA molekülleri alışılmadık derecede küçüktür. Protein kodlayan genlerin bazısı üst üste gelebilir ve birçok durumda sonlanma kodonlarının bir kısmı kodlanmaz. Ancak, posttranskripsiyonel olarak mesajcı RNA'nın (mRNA) poliadenilasyonu sonucu üretilirler (Taanman, 1999).

mtDNA üzerinde 16,024 ile 576 nükleotid pozisyonları arasında yer alan ve herhangi bir kodlama yapmayan kontrol bölgesi replikasyon ve transkripsiyonun regülasyonundan sorumludur. Bu bölge 3 korunmuş dizi bloğunu, 3 sarmallı bir D-loop bölgesini ve mitokondriyal transkripsiyon için gerekli enhancer ve promotör dizileri ile ağır zincir replikasyon orijinini içermektedir (Aral & Özer, 2007; Taanman, 1999). Mitokondri üzerinde yer alan protein bileşenlerin çoğu nDNA tarafından kodlanır (Carew ve Huang, 2002).

Nükleer genom; mtDNA polimeraz  $\gamma$ , mtRNA polimeraz, mitokondriyal ribozomal proteinler, mitokondriyal metabolizma enzimleri gibi birçok mitokondriyal polipeptidi kodlar. Bu proteinlere ait mRNA'lar sitozolik ribozomda translasyona uğrar ve mitokondriyal proteinler, özel sinyal dizileri ile mitokondriye yönlendirilirler Mitokondri membranındaki özel transport proteinleriyle de mitokondri membran ve kompartmanlarına aktarılırlar (Brandon vd., 2006)

### **2.1.1. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyonu**

Ökaryotik hücrelerde, mtDNA'nın replikasyonu işlev bakımından nDNA replikasyonundan farklıdır. MtDNA'nın replikasyonu hücre döngüsünün S fazıyla senkronize değildir ve yarı otonomdur (Carew ve Huang, 2002). Mitokondriyal ve nükleer genom arasında etkileşim olmasına rağmen, mtDNA replikasyonu nükleer genomdan ayrı gerçekleşir. mtDNA replikasyon başlangıç noktası olarak, D-loop içerisinde bulunan ve hafif zincir promotör (LSP) bölgesinin aşağıda yer alan bir ağır zincir replikasyon orijini (OH) ile ağır zincir replikasyon orijininden mtDNA'nın uzunluğunun 2/3 kadar uzaklıkta yer alan hafif zincir replikasyon orijini (OL) olmak üzere iki ayrı replikasyon orijine sahiptir. Mitokondriyal replikasyon mitokondriyal transkripsiyon ile yakından bağlantılı olup ağır zincir sentezi ile ağır zincir replikasyon orijininden başlar ve yeni sentezlenen ağır zincir hemen hemen OL'yi geçtikten sonra ters yönde OL üzerinde hafif zincir sentezi başlayarak halkasal şekilde gerçekleşmektedir (Aral ve Özer, 2007; Brandon vd., 2006; Taanman, 1999).

Mitokondriyal DNA replikasyonunda mitokondriyal DNA sentezini gerçekleştiren DNA polimeraz  $\gamma$  enzimidir. DNA polimeraz  $\gamma$  5'-3' polimeraz aktivitesine ek olarak 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine de sahiptir ve bu özellik sayesinde mtDNA'nın replikasyonun doğru gerçekleşmesini sağlar. Replikasyonda nükleer DNA polimerazlar gibi DNA polimeraz  $\gamma$ 'nın yanında; tek zincir bağlanma proteini (mtSSB), çift sarmalın açılmasını sağlayan helikaz, mtDNA süper dönümlerin açılmasını sağlayan topoizomerez I ve II, primaz, ligaz gibi yardımcı proteinlere de gereksinim vardır (Chinnery ve Hudson, 2013; Taanman, 1999; Ulu, 2015).

### **2.1.2. Mitokondriyal DNA'nın Transkripsiyonu**

Ökaryotlarda; nDNA'da transkripsiyon için her gen kendine ait özgün bir promotöre sahipken, mtDNA'da ikisi ağır zincirde (HSP1 ve HSP2) biri de hafif zincirde (LSP) olmak üzere 3 promotör bulunur (Chinnery ve Hudson, 2013).



Mitokondriyal genom üzerinde D-loop bölgesinde karşılıklı olarak yer alan 150 bp uzunluğundaki ağır zincir transkripsiyon başlangıç yeri (ITH1) ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç yeri (ITL) transkripsiyonun başlaması için önemlidir. Ağır zincir ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgeleri 15 bp'lik konsensus dizisinden (5P-CANACC(G)CC(A)AAAGAYA) oluşur ve ağır ve hafif zincir promotör bölgeleri içerisinde yer alır (Aral, 2007; Taanman, 1999). MtDNA Ağır zincirin transkripsiyonu ağır zincir promotör (HSP) içerisinde bulunan ve tRNA<sup>Phe</sup> genine bitişik 561. nükleotid pozisyonundan (ITH1); hafif zincirin transkripsiyonu ise hafif zincir promotör (LSP) bölgesi içerisinde bulunan 407. nükleotid pozisyonundan (ITL) başlar. Ağır zincir için varsayılan 2. transkripsiyon başlangıç yeri; 638. nükleotid pozisyonunda (ITH2) tRNA<sup>Phe</sup> geninin içerisinde 12S rRNA geninin hemen yanında yer alır. Bu bölgenin promotör dizisi 15 bp'lik konsensus dizisiyle daha sınırlı benzerlik gösterir ve bu yer ağır zincirin transkripsiyonu için ITH1'den daha az aktiftir (Aral ve Özer, 2007; Taanman, 1999).

Transkripsiyon; mitokondriyal RNA polimeraz (mtRNAPol) tarafından gerçekleştirilir. Ancak mtRNAPol'ın tek başına transkripsiyonu başlatma kabiliyetinden yoksundur. Bu nedenle, mtRNAPol'ın transkripsiyonu başlatabilmesi için mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (mtTFA), mitokondriyal transkripsiyon faktörü B1 ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü B2'ye (TFB1M ve TFB2M) ihtiyacı bulunmaktadır (Aral ve Özer, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013; Fernández-Silva, Enriquez ve Montoya, 2003; Ulu, 2015).

Transkripsiyon mtDNA üzerinde polisistronik bir mRNA oluşturur. ITH1'de başlayan transkripsiyon 16S rRNA geninin aşağısında 3'ucunda sonlandırılır. Böylece iki farklı transkripsiyon başlama bölgesi mRNA ve tRNA transkriptlerinin düzenlenmesinin birbirinden bağımsız olmasını sağlar. ITL'de başlayan transkripsiyon ise ITH2 gibi polisistronik mRNA oluşmasıyla sonuçlanır. ITH1 üzerinde gerçekleşen transkripsiyon 16S rRNA/tRNA<sup>leu</sup> sınırında tRNA'daki üç tekrar dizisi ile mitokondriyal sonlanma faktörünün (mTERF veya mtTERM) bu dizilere bağlanmasıyla gerçekleşir (Aral ve Özer, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013; Fernández-Silva vd., 2003; Taanman, 1999; Ulu, 2015) (Şekil 2.1.).

### 2.1.3. Mitokondriyal Protein Sentezi

Mitokondriyal protein sentezi sitoplazmik protein sentezinden bağımsız olarak mitokondriyal matrikste yer alan ribozomlarda veya mitoribozomlarda gerçekleşir (Aral ve Özer, 2007; Taanman, 1999). Mitoribozomlar ribozomal alt birimleri mtDNA tarafından kodlanan 16S ve 12S rRNA içeren olağandışı ölçüde düşük bir RNA içeriğine sahiptir. Memeli mitoribozomlarında 5S rRNA bulunmaz (Taanman, 1999). Mitokondriyal protein sentezinde görev alan tRNA'lar mtDNA tarafından kodlanırlar. Kodlanan tRNA'lar sitoplazmik tRNA'lara göre çok daha küçüktürler. Bununla birlikte kodon kullanımı da sitoplazmik genetik koddan farklılık gösterir (Aral ve Özer, 2007). UGA sitoplazmik genetik kodda sonlandırma kodunu iken mitokondriyal genetik kodda triptofan amino asidini kodlar. Aynı şekilde AGA, AGG arjinin amino asidi yerine STOP kodonunu, AUA ve AUU izolösin yerine metionin amino asidini kodlamaktadır (Aral ve Özer, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013).

Mitokondriyal mRNA'ların 5'ucunda 7-metilguanilat şapka yapısı yoktur. Bu sebepten sitozoldeki translasyonda görülen şapka yapısının translasyonda ünitelerince tanınma işlemi gerçekleşmez (Aral ve Özer, 2007; Taanman, 1999). Translasyon sırasında küçük ribozomal alt birim mRNA'ya bağlandıktan sonra yardımcı faktörler aracılığıyla mRNA'nın 5'ucuna doğru ilerlemektedir. Memeli mitokondriyelerinde tanımlanmış tek başlatma faktörü GTPaz ailesine ait olan mtIF-2'dir. GTP ile bir kalıp varlığında küçük ribozomal alt birime fmet-tRNA bağlanmasını teşvik eder ve mtIF-2 ile küçük alt birim arasındaki yakınlığı artırılarak fmet-tRNA'nın translasyon kompleksine katılmasını sağlar. mtIF-2, GTP'nin hidrolizi ile serbest kalır ve büyük ribozomal alt birimin eş zamanlı bağlanmasıyla ~55S başlatma kompleksi oluşur. Memelilerde mtEF-Tu, mtEF-Ts ve mtEF-G olmak üzere 3 mitokondriyal uzama faktörü tanımlanmıştır (Chinnery ve Hudson, 2013; Taanman, 1999). Translasyon sonlandırması ise sadece mitokondriyal serbest bırakma faktörü 1a (mtRF1a) tarafından gerçekleştirilir. Mitokondriyal serbest bırakma faktörü 1a (mtRF1a) stop kodonlarını (UAA ve UAG) tanır. Terminal tRNA ve yeni oluşan peptid dizisi arasındaki bağın hidrolizini gerçekleştirir (Chinnery ve Hudson, 2013)

### 2.2. Mitokondriyal DNA Mutasyonları

mtDNA'nın nükleer DNA'dan farklılıklarından biri de mtDNA'nın sinir hücreleri gibi farklılaşmış hücrelerde bile devamlı replike olabilmesidir. Bu nedenle mtDNA hasarları hücresel fonksiyonlar üzerinde somatik nDNA hasarından daha fazla olumsuz etki

yapabilmektedir. Nüklear genom hasarı onarılmayacak kadar büyük olduğunda, hücreyi programlı hücre ölümü olan apoptoza yönlendirirken, mtDNA'nın birden çok kopyası olduğu için oluşan mutasyonlar sonucu çıkabilecek hasarlı mtDNA, normal kopyaların varlığı ile tolere edilebilmektedir. Ayrıca mitokondrilerin sürekli fizyon ve füzyonu mitokondri başına düşen mutasyonların azalmasına katkı sağlamakta, yüksek mutasyon oranı ile ortaya çıkan defektif mitokondriler mitofaji mekanizmaları ile büyük ölçüde elimine edilebilmektedir (Lodish vd., 2003; Scheffler, 1999).

Mitokondrideki oksidatif fosforilasyon sisteminin (OXPHOS) eksikliği enerji kaynağını azaltırken mtDNA'ya oksidatif hasarı ve mutasyonu indükleyebilen ROS üretimini artırır. ROS konsantrasyonundaki artış mtDNA mutasyonlarının oluşumuna neden olur (Aral ve Özer, 2007). Nüklear genom ile kıyaslandığında, mtDNA'da yüksek oranda mutasyon görülmesinin nedeni histon proteinlerinin olmaması, mtDNA tamir mekanizmalarının yetersiz olması, ortamda yoğun oksijen radikallerin ve birçok metabolitin bulunması ile açıklanabilir (Carew ve Huang, 2002; Özgen, 2012). mtDNA'daki mutasyonlar, zararlı (patojenik), nötr veya yararlı (adaptif) olabilir (Brandon vd., 2006). mtDNA'nın introna sahip olmadığı göz önüne alındığında, çoğu mutasyon kodlama dizilerinde meydana gelmesiyle biyolojik sonuçlara yol açabilir (Carew ve Huang, 2002).

Tipik olarak bir bireyin tüm mtDNA kopyalarının aynı dizi özelliklerini gösterdiği duruma homoplazmi adı verilmektedir. Eğer mtDNA'nın farklı varyantları ya da mutasyon içeren tipleri ve yabancı tipler bir arada bulunuyorsa bu durum heteroplazmi olarak adlandırılmaktadır (Aral ve Özer, 2007). Mutasyonun fenotipe etkisi mutasyonun yeri, ait olduğu hücre tipi ve mutant DNA miktarının yabancı tip DNA'ya kıyasla ne kadar fazla olduğuyula ilişkilidir. Bu durum eşik etkisi olarak adlandırılır. Eşik değeri aşıldığında, mutasyondaki küçük artış oranlarına karşılık fenotipte giderek artan bir biçimde daha büyük değişikliklere neden olabilmektedir (Finnilä, Hassinen ve Majamaa, 1999).

### **2.2.1. Mitokondriyal DNA Nokta Mutasyonları**

Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları mitokondriyal genom üzerinde tRNA, rRNA, protein kodlayan genler veya kodlama yapmayan bölgelerde tanımlanmıştır. tRNA genlerindeki mutasyonlar hastalıklarla ilişkilendirilen nokta mutasyonlarının büyük kısmını oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar genellikle kas ve sinir hastalıkları veya kardiyak defektler ile ilişkilendirilmektedir (von Kleist-Retzow, Schauseil-Zipf, Michalk ve Kunz, 2003).

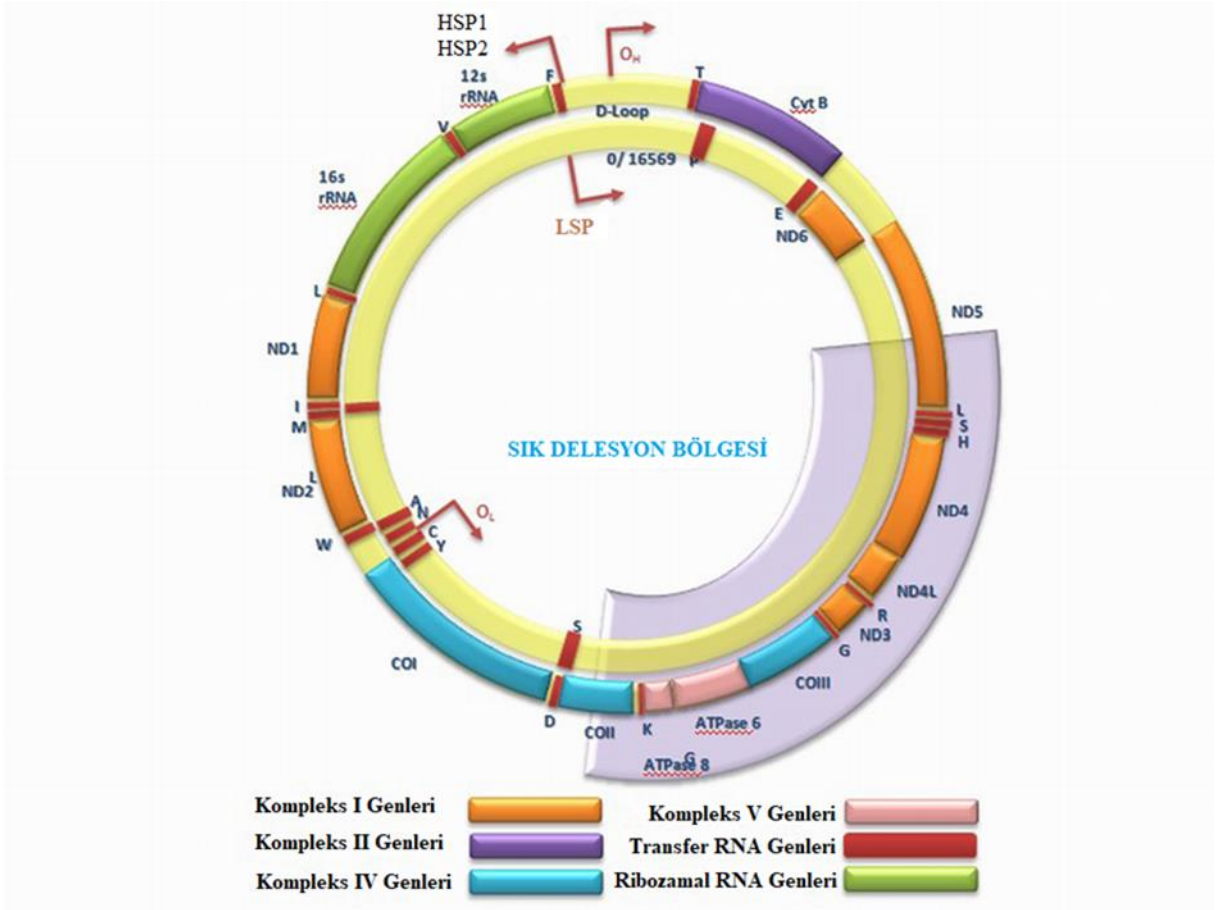
Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları aynı yolakta yer alan genlerde görülen aynı tip mutasyonlar olmasına rağmen çoğunun fenotipik yansıması son derece değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda fenotipik değişikliklerde nükleer genler ve diğer mtDNA mutasyon ve/veya polimorfizmlerinin rolü olabileceği ve çevresel faktörlerin etkisinin olduğu öne sürülmektedir (Schapira, 2006).

### **2.2.2. 4977 bç Sık Delesyon**

Son yıllarda mtDNA mutasyon ve polimorfizmlerinin kanser oluşumunda ve gelişiminde önemli rol oynayabileceği ifade edilmektedir. Söz konusu varyasyonlar arasında, en çok çalışılan kodlama yapmayan D-loop bölgesinde 303 ve 315 nükleotid arsında yer alan D310 uzunluk polimorfizmidir. MtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızının mitokondriyal genomun diğer kısımlarına göre %2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha fazla olduğu literatürde yer almaktadır. MtDNA üzerinde bu denli yüksek oranda mutasyon görülmesinin nedeni, histon proteinlerden yoksun olması ve tamir mekanizmasının nükleer genom kadar etkin olmamasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, mitokondriyal genomda genellikle görülen mutasyonlar/varyasyonlar nükleotit eksilmesi (delesyon), eklenmesi (insersiyon) veya değişimlerinden (tranzisyon ve transversiyon) kaynaklanmaktadır (Avisé, 1991).

mtDNA mutasyonlarının veya varyasyonlarının birçok multifaktöryel hastalıkta ve yaşlanma süreçlerinde rol oynadığına dair bilgi literatürde yer almaktadır. En sık görülen mitokondriyal mutasyonlardan birisi de sık delesyon (common deletion) olarak adlandırılan 8470-8484 ve 13447-13459 nükleotidleri arasındaki 4977 bç'lik mtDNA dizisinin delesyonudur. Bu delesyon, 5 tRNA geni ile sitokrom c oksidaz kompleks 1 ve ATPaz alt üniteleri olmak üzere 7 geni içermektedir (Aral vd., 2010) (Şekil 2.1.).

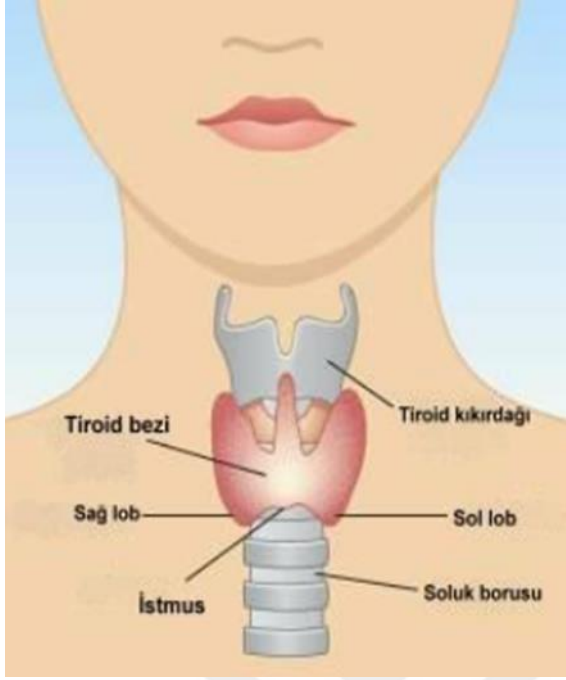
4977 bç'lik mtDNA delesyonu olan sık delesyon literatürde yer alan çalışmalara göre tiroit, kolorektal, meme kanseri ve yaşlanmada rol oynadığı gözlenmiştir (Berneburg vd., 2004; Chen vd., 2011; Dimberg vd., 2015; Gendron, Mallet, Bastien ve Rochette, 2012; Máximo vd., 2002).



Şekil 2.1. İnsan mitokondriyal DNA'sı ve üzerinde yer alan genler (Kim, Kenigsberg, Jurisicova ve Bentov, 2019). Kompleks I genleri: NADH dehidrojenaz (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6), Kompleks III genleri: sitokrom c Oksidoredüktaz (CYTB), Kompleks IV genleri: Sitokrom oksidaz (COI, COII, COIII), Kompleks V genleri: ATP sentaz (ATP6, ATP8), Ribozomal RNA genleri: 16S, 12S, Transfer RNA genleri taşıdıkları aminoasitin harf kodu ile gösterilmiştir. HSP1: Ağır zincir promotör bölge 1, HSP1/HSP2: Ağır zincir promotör bölgeleri, LSP: Hafif zincir promotör bölge, O<sub>H</sub>: Ağır zincir orijini, O<sub>L</sub>: Hafif zincir orijini

### 2.3. Tiroid Anatomisi

Tiroit bezi boynun ön bölümünde, larinksin yarı alt-ön ve trakeanın üst-ön bölümünde kelebek şeklinde bulunan bir organdır (Kabalak, 2009). Erişkin tiroit bezi ortalama 15-20 gram ağırlığında olmakla birlikte insan bedenindeki en büyük endokrin bezidir (Meller ve Becker, 2002). Tiroit bezi eni 2-3 cm, kalınlığı 2-4 cm, boyu 4-5 cm aralığında olan sağ lob, sol lob ve isthmus kısımlarından meydana gelmektedir (Skandalakis ve John, 1995) (Şekil 2.2.).



Şekil 2 1. Tiroit bezi anatomisi (Solmaz, 2013)

Embriyolojik olarak gelişmesini tamamlayan tiroit bezini bir tabaka kübik tiroit epiteli ile çevrili, lümeni kolloid ile dolu, foliküllerden oluşmaktadır (Erdoğan, 2005). Her lobülde ortalama 2-40 folikül bulunmaktadır. Folikül hücrelerine tiroisit adı da verilir. Bir tiroit folikülünde esas olarak üç tip hücre vardır. Bunlardan ilki hem foliküler lümen hem de bazal membranla ilişkide olan normal folikül hücresi bu hücrelere A hücresi de denmektedir. A hücresi, normal folikül hücresi olup TSH etkisi altında, hormonların yapım ve salınımından sorumludur (Henry, 1997). İkinci foliküler hücre tipi, oksifilik hücreler (Hürthle) olup bunlara B hücresi de denmektedir. B hücrelerin en önemli özelliği çok miktarda serotonin depolaması ve TSH reseptörü içerip tiroglobulin sentezi yapabilmesidir (Henry, 1997). Son hücre tipi olan lümenle ilişkide olmayan ancak bazal membranla ilişkide olan parafoliküler hücreler diğer adı ile C hücresi TSH kontrolünde olmayıp tirokalsitonin (TC) hormonunun yapım ve salınımından sorumludur (Papotti, 1994).

### 2.3.1. Epidemoloji

Dünyada en yaygın görülen endokrin hastalıklarından biri olan tiroit bezi hastalıkları, özellikle nodüllerine çok sık rastlanmaktadır (Özata, 2005). Tiroit nodülleri, radyolojik olarak

ayrılabilir, fizik muayene ya da yardımcı görüntüleme yöntemleri ile tespit edilir. Tiroit nodüllerinin palpe edilme sıklığı %3-7 iken, klinik taramalar sonucu çıkmayan ancak ultrasonografide (USG) tespit edilme sıklığı %20-76 arasında değişkenlik gösterir (Datta, Petrelli ve Ramzy, 2006; Faquin, 2008; Hegedus, Bonnema ve Bennedbaek, 2003; Serra ve Asa, 2008). Tiroit bezinin büyümesi olan guatr erkeklerde kadınlardan %20-25 daha az görülür. Türkiye’de coğrafik bölgelere göre değişiklik göstermekle beraber % 5-56 arasında görülür (Özata, 2005).

En sık görülen endokrin malignitelerinden biri olan tiroit kanseri tüm malignitelerin yaklaşık %2,9’unu oluşturmaktadır (Barbaro vd., 2014; Fayaz, Fard-Esfahani ve Torbati, 2014). Bu artışın sebep ince iğne aspirasyon biyopsisinin daha sık kullanılmaya başlanması veya diğer sebebi Çernobil kazasının Türkiye üzerindeki etkisi olabilir (Özata, 2003).

Tiroit nodüllerinin %5-15’inde malignite saptanması nedeniyle klinik tanısı önemlidir. Tiroit kanseri, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde kansere bağlı ölümlerin kadınlarda %0.17, erkeklerde ise %0.26’sından sorumludur. Sıklığı yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir. En sık 30-70 yaş arasında ve kadınlarda görülmektedir. Kadınlardaki malignitelerin %1,5’inden, erkeklerde ise %0,5’inden sorumludur. Tiroit kanseri insidansı artmasına rağmen mortalite azalmasının nedeni erken tanı ve cerrahi ve/veya I-131 ile efektif tedavi yapılmasıdır (Arslan vd., 2011).

### **2.3.2. Etiyoloji**

Tiroit nodüllerinde radyasyonun etiyolojide rol oynadığı belirlenmiştir. Tiroit kanser insidansı 200-700 rad radyasyon almış kişilerde 20-25 yıl sonra arttığı saptanırken 500 rad civarında radyasyon alan kişilerde insidansı %2’dir (Özata, 2003).

Besinler ile iyot alımının yetersiz olduğu durumlarda T3/T4 üretimindeki azalmaya bağlı olarak TSH’ da artışa sebep olarak tiroit hücre sayısında artma meydana gelir. TSH salgısının anormal artışı tiroit hücrelerinde sayıca kontrolsüz çoğalmalara ve genetik değişikliklere neden olmaktadır (Demir, 2015).

Kadınlarda başta olmak üzere endojen hormonal faktörler tüm tiroit nodül tiplerinde risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Ekzojen östrojen alımı, indüklenmiş menopoza, gebelik sayısı ve obezite bazı çalışmalarda tiroit nodülleri için risk faktörleri olarak görülmektedir.

(Nikiforova, Chioseva ve Nikiforov 2009). Birinci derece akrabalarda tiroit kanseri olma durumunun tiroit kanser riskini 4-10 kat artırdığı literatürde yer almaktadır (Özata, 2003).

### **2.3.3. Tiroidin Fizyolojisi**

Tiroit bezinin foliküler hücrelerinden tiroit hormonları olan tiroksin (T4), triiyodotironin (T3) hormonları hipotalamus ve pitüiter bezden gelen sinyallere cevap olarak hipotalamus-hipofiz ekseninde sentezlenmektedir. T3 metabolik aktif form iken, T4 tiroit depo ve taşınması için gereken formudur. Tiroit hormonunun salgılanması kontrollü hipotalamus, anterior pitüiter ve tiroit bezi tarafından feedback mekanizması ile gerçekleşmektedir. Hipotalamus tarafından salınan tirotropin salgılayıcı hormon (TRH), hipofiz bezinden tiroit uyarıcı hormonun (TSH) salınmasını ve sonrasında da tiroitten T4 ve T3'ün yapımı ve salınımını başlatır. Tiroit hormonunun hem pitüiter bez hem de hipotalamus üzerine feedback etkisi olmasında serbest T4 seviyesindeki az da olsa artış veya azalma, TSH seviyesinde azalma veya artışa neden olmaktadır (Aktümsek, 2010).

Tiroit hormonları kardiyovasküler sistem, sinir sistemi, immun sistem gelişiminde ve fonksiyonlarında görev yaparak metabolizma hızının artırılmasında ve mitokondrilerin büyümesinde görev almaktadırlar. TSH reseptörü rodopsin/B adrenerjik reseptör alt ailesinin bir üyesi olarak tiroit bezinin büyüme ve işlevlerinden sorumludur (Szkudlinski, Fremont, Ronin ve Weintraub, 2002).

TSH, TSH reseptörüne bağlanarak tiroit foliküler hücrelerinin büyüme ve işlevlerini uyarır, tiroit bezi hormonlarının sentezini ve tiroit bezinden salgılanmalarını düzenlemesini sağlamaktadır. Tiroit bezi hormonları ise (T3, T4) farklılaşma, büyüme ve metabolizma üzerinde çoklu etkiye sahiptirler. Bu hormonların birincil işlevleri nükleer reseptörler vasıtasıyla protein yapımını düzenlemek ve zar yapısında yer alan enzimleri aktive ederek mitokondrilerde oksitlenme hızını arttırmaktır (Yiğit, 2001; Kopp, 2001).

### **2.3.4. Tiroit Bezinin Benign Hastalıkları**

#### **2.3.4.1. Guatr Tanımı ve Multinodüler Guatr**

Guatr tiroit bezinin herhangi bir nedenle büyümesine denir. Ultrasonografi yöntemi ile bezin büyüklüğü, objektif bir şekilde hacim ya da boyutu belirlenebilir. Guatr endemik ya da nonendemik olmak üzere sınıflandırılabilir. Endemik guatr iyot eksikliği olan bölgelerde,



nüfusun %10'undan fazlasında guatr ortaya çıkıyorsa; nonendemik guatr iyot kaynakları yeterli olan ülkelerde ise, insanlara yiyecek ve ilaçlarla fazla miktarda iyot verildiğinde, tiroit hormon sentezi azalmasına bağlı olarak gelişen guatra denir (Hanks, 2001; İşgör, 2000; Sadler, Clark ve Van Herden, 1999).

Multinodüler guatr (MNG) ise; tiroit bezinin birçok yerinde nodüllerin büyümesiyle oluşan guatrdır. Tiroit nodülleri; toksik ya da nontoksik, diffüz ya da nodüler ve soliter nodül ya da multiple nodüler şeklinde sınıflandırılabilir (Day, Chu ve Hoang, 2003).

Soliter nodüler guatlarda, 1,5 cm' nin altındaki nodüllerin ince iğne aspirasyon biyopsisi ile değerlendirilip hem klinik hem de sitopatolojik malignite kriterleri yoksa medikal tedavi ile izlem yapılabilir (Karakan, 2008).

#### **2.3.4.2. Soğuk ve Sıcak Nodüller**

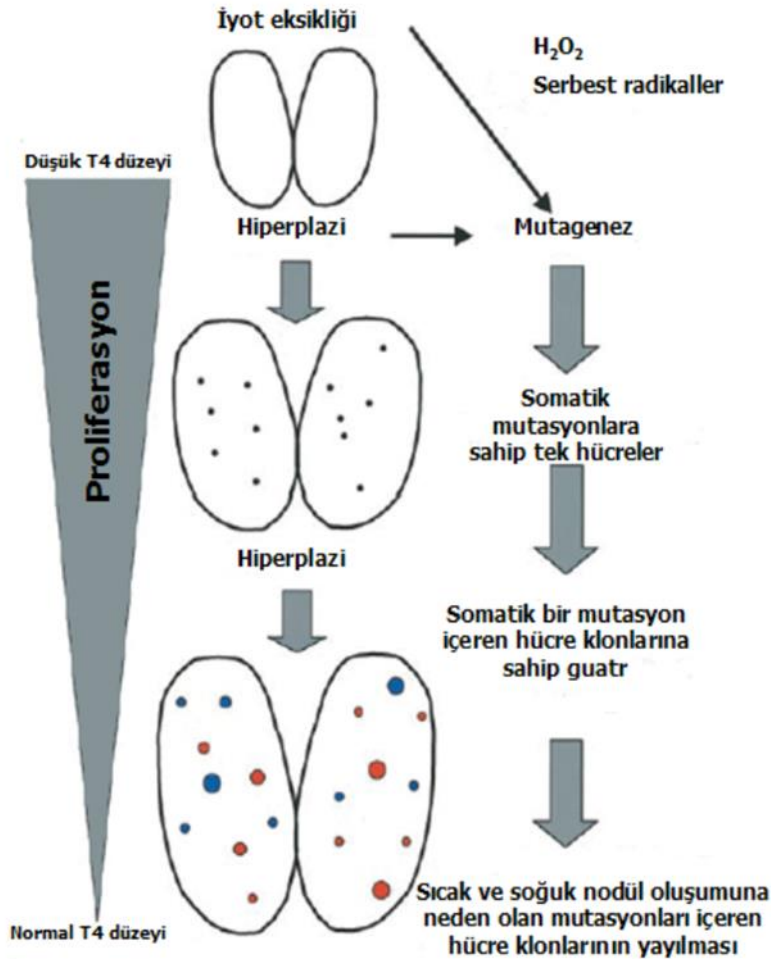
Sintigrafik taramalarda iyot alımındaki artış ve azalışına bağlı olarak nodüllerin %85'i soğuk, %10'u ılık ve %5'i sıcak nodüllerden oluşur (Belfiore vd., 1992; Gozu vd., 2005).

Soğuk nodül diğer adı ile hipofanksiyone nodül tiroit sintigrafisinde, geri kalan tiroit dokusundan daha düşük radyoizotop tutulumu göstermektedir. Soliter nodüllerin %85-90'ı soğuk nodüldür. Tiroit malign tümörleri normal tiroit dokusunun %1-10'u kadar radyoaktif ilaçları biriktirir ve sintigrafik olarak hipoaktif görüntü verirler. Soliter soğuk nodüllerin büyük kısmının nedeni kolloid kist veya adenomdur. %15-40'ı ise karsinoma riski taşır. Apse, kanama, paratiroit adenomu da soğuk nodül olarak görülür. Soğuk nodüllerinin karsinoma olasılığı hasta eğer genç kadın veya herhangi bir yaşta erkek ise artar (Özata, 2005).

Taramalarda iyot alımı normal tiroit dokusundan daha fazla olan nodüllere sıcak nodül diğer adıyla hiperfonksiyon denmektedir. Belirgin tiroit nodülü olan hastaların nodüllerinin %7-25'i hiperfonksiyondur. Sıcak nodüllerin büyük bir kısmı benign olmakla birlikte çok küçük bir kısmında tiroit karsinoma tanımlanmıştır (Özata, 2005).

Tiroit nodül gelişimi üç adımda değerlendirilir. İlk adımda; iyot eksikliği, besinsel guatrojenler veya otoimmünite yaygın tiroit hiperplazisine neden olur. Daha sonra, bu aşamada serbest radikallerin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi) etkisine bağlı oluşabilecek bir DNA hasarı ile tiroit hiperplazisi ile artan proliferasyon, bir mutasyon taşıyan daha fazla sayıda hücre ile daha yüksek mutasyon yüküne neden olur. Bu spontan mutasyonların bazıları (Örneğin; Tirotropin reseptörü (TSHR)

ve GS $\alpha$  mutasyonları) tiroitin büyümesini ve fonksiyonunu uyararak siklik adenozin monofosfat (cAMP) sinyal ileti yolağının aktivasyonunu sağlar. Son olarak, proliferatif bir tiroit büyüme faktörünün ifadesinde (IGF-I, TGF- $\beta$ 1 veya EGF (epidermal büyüme faktörü) artışına neden olur. Büyüme faktörlerinin uyarılmalarının bir sonucu olarak, tüm hücreler bölünür ve küçük klonlar oluşturur. Büyüme faktörü ekspresyonu sona erdiğinde, aktive edici mutasyonlara sahip klonlar, kendi kendini uyarılmayı başarabilirlerse daha da çoğalmaya devam eder. Böylece tiroit nodüllerine dönüşecek küçük odaklar oluşturabilirler. Sıcak tiroit nodüllerinde meydana gelen somatik mutasyonlar, tiroit hücrelerinde hem büyümeyi hem de hücre işlevlerinin başlamasını sağlarken soğuk tiroit nodüllerinde meydana gelen mutasyonlar (RAS mutasyonları ve RAS/RAF/MEK/ERK/MAP sinyal ileti yolağındaki diğer mutasyonlar) sadece hücre proliferasyonunun oluşmasını sağlar (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.2. Tiroit otonomisinin etiyolojisi (Bircan, 2007)

### 2.3.5. Tiroit Kanserleri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) malign tiroit tümörlerini 1988 yılında papiller, folliküler, medüller, anaplastik olmak üzere 4 başlıkta ele almıştır papiller ve foliküller kanserler folikül epitelyum hücrelerinden, medüller kanserler parafoliküler C hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Özata, 2003) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Tiroit kanseri sınıflandırılması (Özata, 2003)

I.PRİMER TÜMÖRLERİ
1.EPİTELYAL TÜMÖRLERİ
Foliküler Hücre Kaynaklı Tümörler a) Bening Olanlar Foliküler Adenomlar 1.Klasik 2.Varyantlar b) Malign Olanlar 1.Diferansiye Foliküler Karsinoma Papiller Karsinoma a.Klasik b.Varyantlar 2.Az Diferansiye Karsinomlar İnsüler Karsinoma Diğerleri 3.Anaplastik Karsinoma
2.C HÜCRE KAYNAKLI TÜMÖRLER Medüller Tiroit Karsinoma
3.MALİGN LENFOMA
4.ÇEŞİTLİ TÜMÖRLER Sarkom, Fibrosarkom, Epidermoid, Mukoepidermoid karsinoma
II. SEKONDER TÜMÖRLER (METASTATİK)
III. TÜMÖR-BENZERİ LEZYONLAR

### **2.3.5.1. Foliküler adenomlar**

Histolojik inceleme ile saptanan, spesifik olarak yeni ve selim doku hiperplazisidirler. Foliküler hücre klonlarının aşırı üretimi sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. İyi sınırlı tek lezyonlar şeklinde olup, genellikle adenomu normal tiroit dokusundan ayıran bir kapsül vardır. Hücresel özellik ve içerdikleri kolloid miktarına göre kolloid, Hürthel hücreli, Fetal, Embriyonel, papiller adenomlar olarak alt gruplara ayrılırlar (Özyeğin ve Yavuz, 2000).

### **2.3.5.2. Folliküler tiroit karsinom**

Tiroit kanser tiplerinde papiller kanserlerden sonra %15 görülmesiyle en sık görülendir. Folliküler karsinom ortalama 50 yaşlarındaki kadınlarda daha sık gözükmetedir. 10 yıllık mortalite papiller tiroit kanserine göre daha yüksek olup, %60-70 civarındadır. Radyasyon, iyottan fakir bölgeler, ailesel veya Cowden sendromu etiyolojisinde rol oynamaktadır. Onkogenezinde RAS onkogen aktivasyonu rol oynamaktadır (Oliveira ve de Oliveira, 2007). PAX8/PPAR gama yeniden düzenlenmesi olup 11 nolu kromozomun uzun kolundaki (11q13) multipl endokrin neoplazi tip 1 (MEN-1) geninin kaybı folliküler kanserlerde tümör hücrelerinin folliküler fenotipe yönelmesine neden olmaktadır (Özata, 2011). Folliküler karsinomlar; Hurtle hücreli, İnsüler Karsinoma, Clear hücreli olarak 3 varyant çeşitti vardır (Özata, 2003).

### **2.3.5.3. Papiller karsinoma**

Papiller karsinom, tiroitin folliküler hücrelerinden köken alıp karakteristik nükleer özellikleri olan iyi diferansiye malign tümördür. Tiroit kanserleri içinde % 80 ile en sık görülen kanser papiller kanserdir (Adaş, Adaş, Özülker ve Akçakaya, 2012). Kadınlarda sıklığı erkeklere göre 3 kat daha fazladır. Görülme sıklığı son dönemlerde artış göstermektedir. Çocukluk çağında iyonize radyasyona maruz kalma, iyottan zengin diyet, altta yatan benign tiroit lezyonları, hormonal ve herediter faktörler etiyolojisinde rol oynarken onkogenezinde ise V-Raf fare sarkomu viral onkogen homologu B1 (BRAF) gen mutasyonu, RAS geni nokta mutasyonları rol oynamaktadır. Hastalarda genelde ağırlı tiroit nodülü saptanmaktadır (Demir, 2015). Papiller karsinomlarında psammom cisimcikleri %40-50 oranında bulunur. Tümör hücrelerinin arasında veya lenfatik kanalda psammom cisimcikleri görünmektedir. Foliküler adenoma ve karsinomalarında foliküler lümeni içerisindeki kalsifikasyonlar ön planda izlenmektedir. Buna karşılık, tümör dışı parenkim içerisinde de psammom cisimcikleri izlenebilmektedir (Nikiforova vd., 2009).

Papiller tiroit kanserlerinin; papiller mikrokarsinom, enkapsüle, folliküler, diffüz sklerozan,onkositik, şeffaf hücreli foliküler, uzun ve kolumnar hücreli, kribriform morulu varyantları gibi alt tipleri bulunmaktadır (Demir, 2015; Akpolat, 2012)

#### **2.3.5.4. Anaplastik tiroit kanseri**

Tiroit kanserlerinin yaklaşık % 1'ini oluşturur ve aynı zamanda en agresif tiroit kanser tipi olarak kabul edilmektedir (Adaş vd., 2012). Genellikle 60 yaşından sonra görülür. Ortalama hayatta kalma 6 ay olup, genel kabul edilen görüş diferansiye tiroit kanserinin anaplastik tipe dönüşmesidir. Genellikle boyunda hızlı büyüyen sert bir kitle mevcuttur, sıklıkla servikal lenfadenopati görülmektedir (Neff, Farrar, Kloos ve Burman, 2008). Anaplastik tiroit kanserinde sıklıkla P53 onkogene bozukluk vardır (Adaş vd., 2012). Akciğere yaygın metastaz %86, hava yolu obstruksiyonu %16, hemoroji % 14, kalp yetmezliği %11 oranında görülür. Histolojik olarak nekroz, hemoroji ve yüksek mitoz oranı sıklıkla bulunur (Neff vd., 2008).

#### **2.3.5.5. Medullar tiroit kanseri**

Medullar tiroit kanser bir nöroendokrin tümör olup, tiroitin parafoliküler (C hücreleri) hücrelerinden çıkar. Yaklaşık tiroit kanserlerinin %2-5'ini oluşturur. Meduller tiroit kanserlerinin yaklaşık %25'i herediter olup RET proto onkogene patoloji vardır. Multipl endokrin neoplazi (MEN) olarak adlandırılan bu hastalığın 3 ayrı tipi bulunur, MEN2a (medullar tiroit kanseri, feokromositoma, hiperparotiroitizm) ve MEN2b'de (medullar tiroit kanseri, feokromositoma, ganglionöroma) görülür, bunların dışında tek ailevi tiroit kanseri bulunmaktadır. Erken dönemde C hücre hiperplazisi ve serum kalsitonin seviyesinde yükselme vardır. Kadın erkek oranı 1,5/ 1 olup, en sık görülme 50-60 yaşlarındadır. Medullar tiroit kanseri sıklıkla boyunda palpe edilen kitle ve servikal lenfadenopatiyle kendini gösterir. Tiroit kanserinde tanı İİAB yapılarak konulabilir, tanı değeri %50-80 arasındadır. Ender olarak boyunda radyoloji ile kalsifikasyon gösterilir (Adaş vd., 2012).

Yapılan bu çalışmanın amacı, Türk toplumunda, fonksiyone ve nonfonksiyone tiroit nodülleri ile papiller tiroit karsinomlarında mitokondriyal DNA (mtDNA) sık delesyon prevalansının saptanması ve mitokondriyal DNA (mtDNA) sık delesyon varlığının papiller tiroit kanserlerinde ayırıcı tanıda kullanılabilme potansiyeli olup/olmadığının belirlenmesidir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan cihazlar**

Buzdolabı +4° C, Bosch, Almanya

Derin Dondurucu -20°C, Vestel, Türkiye

Distile Su Cihazı, GFL, Almanya

Ultrasaf Su Cihazı, Millipore, ABD

Elektroforez Güç Kaynağı, Cleaver, ABD

Elektroforez Güç Kaynağı, Thermo, İngiltere

Hassas Terazı, Ohaus, ABD

Isı döngü cihazı, Techne TC Plus, İngiltere

Isı döngü cihazı, Applied Biosystem, ABD

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

Kar buz makinası, Bluewave BW, Çin

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Otoklav, Tek Bal, Türkiye

Otomatik dizi analizi cihazı, Genome lab GeXP genetic analysis system Beckman Coulter, ABD

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

pH metre, Hanna HI221, Romanya

Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye

Transillüminatör, Vilber Lourmat, Fransa

Vorteks, WiseMix, Kore

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere

### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

33 cm x 75 µm Kapiler dizi, Beckman Coulter, ABD

Agaroz, Sigma, ABD

Borik asit, Sigma, ABD

Dizi analizi seperasyon jeli, Beckman Coulter, ABD

Dizi analizi kapiller elektroforez tamponu, Beckman Coulter, ABD

Deoksiribonükleik asit trifosfat (dNTP) set, MBI Fermentas, Litvanya

DNA belirteç (100 bç'lik), Thermo, Almanya

EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit), Sigma, ABD

Etidyum bromür, Sigma, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Glikojen, Roche, Almanya

Magnezyum klorür, Sigma, ABD

Mineral yağ, Sigma, ABD

PEG (polietilenglikol) 4000, Merck, Almanya

SLS (örnek yükleme tamponu), Beckman Coulter, ABD

Sodyum asetat, Merck, Almanya

Taq DNA polimeraz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya

Tris, Sigma, ABD

Yükleme tamponu, MBI Fermentas, Litvanya

### **3.1.3. Kullanılan kitler**

#### **DNA Sekans Kiti**

DNA dizi analizinde kullanılmak üzere Beckman Coulter (ABD) firmasından GenomeLab DTCS – Quick Start DNA Sequencing Kiti satın alınmıştır. DNA dizi analizi kiti dizileme için gerekli olan quick start mix, kontrol kalıp, dizileme primeri, glikojen, mineral yağ, SLS içermektedir.

### **3.1.4. Kullanılan ticari çözelti ve tamponlar**

#### **Yükleme tamponu (Fermantas, Litvanya)**

Tris-HCl pH 7,6

%0,03 bromfenol mavisi

%0,03 ksilen siyanol FF

%60 gliserol

60 mM EDTA

#### **10X reaksiyon tamponu (Fermantas, Litvanya)**

Taq DNA polimeraz enzim seti içerisinde hazır olarak alındı.

100 mM Tris-HCl (pH 8,8)

500 mM KCl

%0,8 Nonidet P40

2 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermantas, Litvanya)**

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan 25 mM MgCl<sub>2</sub> Taq DNA polimeraz enzim kiti içerisinde hazır olarak alındı.



### **10 mM dNTP (Fermantas, Litvanya)**

Her biri 100 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP solüsyonlarından 10'ar µl ve steril dH<sub>2</sub>O'dan 60 µl alınarak 500 µl'lik steril eppendorf tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

### **3.1.5. Kullanılan çözeltiler**

#### **Etidyum bromür çözeltisi**

10 mg/ml etidyum bromür distile su içerisinde hazırlandı.

#### **5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu**

54 g Tris baz

27,5 g Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Çözelti 1 litre' ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

1X TBE hazırlamak için 5X TBE stokundan 200 ml alınarak son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

#### **%26 PEG solüsyonu**

13 g PEG 4000

67 mg Magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>)

25 ml 1.2 M Sodyum asetat (NaAC) (pH 5.2)

Hazırlanan çözelti 50 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

#### **DNA dizileme reaksiyonu durdurma solüsyonu**

Her bir örnek için son hacim 5 µl olacak şekilde 0,1 M EDTA (pH 8,0)'dan 2 µl, 3 M Sodyum Asetat (pH 5,2)'tan 2 µl, 20 mg/ml Glikojen'den 1 µl alınarak 0.2 ml'lik eppendorf tüpte kullanım öncesi taze olarak hazırlandı.

### 3.1.6. Primerler

Çalışmada PZR ve DNA dizi analizi esnasında kullanılan primerler Sentromer Ltd Şti, Türkiye'den temin edilmiştir. Kullanılan primerler çizelge 3.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 3. 1. PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler

Birinci PZR:	
MT-LF1	5'-CTACGGTCAATGCTCTGAAA-3'
MT-HR1	5'-ATAGCTTTTCTAGTCAGGTT-3'
İkinci PZR:	
MT-LF2	5'-GCCCGTATTTACCCTATAGC-3'
MT-HR2	5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'

Primerler liyofilize olarak temin edilerek ana stok 100 pmol olacak şekilde sulandırıldı. Ara stok 10 pmol olarak elde etmek için ana stoktan 10 µl alınıp üzerine 90 µl distile su ilave edildi. Hazırlanan ara stoklar -20°C'de saklandı.

### 3.1.7. Kullanılan bilgisayar programları

GenomeLab GeXP Genetic Analysis System, DNA sekanslama analiz programı versiyon 10.2, Beckman Coulter, ABD

Microsoft word, ABD

Microsoft excel, ABD

SPSS 16.0, ABD

### 3.1.8. Hasta grubu

Yapılan bu çalışma için Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır. Yerel etik kurulu tarafından onay alınan bu çalışmada; 107 sıcak nodül, 80 soğuk nodül ve 98 sağlıklı çevre dokusu olmak üzere 285 adet doku çalışmaya alınmıştır. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı ile Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde 2000-2013 yılları arasında MNG ve Toksik MNG tanısı alan hastalar arasından

seçilmiştir. Benign tiroit nodüllerinin tanısı ultrason ve sintigrafi teknikleri ile tespit edilmiş olup histopatolojik tanısı WHO kriterlerine göre yapılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. İzole DNA Örneklerinde Spektrofotometrik Safılık ve Miktar Tayini**

Yapılan bu çalışmada, bölümümüzde daha önce DNA izolasyonu yapılarak arşivlenen tiroit dokularına ait örnekler kullanılmıştır. Örnek DNA'ların 260 nm (A260) ve 280 nm (A280) dalga boyundaki absorbans değerleriyle spektrofotometrik ölçüm yapılarak miktarının ve saflığının belirlenmesi gerçekleştirildi.

### **3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu, özel bir DNA veya RNA dizisinin seçilip tanınması ve sayısal olarak artması esasına dayanan bir yöntemdir (Nagaraja ve Nagaraju, 1995). Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli kalıp DNA molekülünün 90-95 °C'de denatüre olarak DNA tek iplikçik hale geçmesi, 37-60 °C sıcaklıklar arasında primerlerin tek iplikçikli DNA molekülüne bağlanması ve son olarak DNA zinciri üzerine yapışan primerler ve DNA polimeraz enzimi aracılığı ile istenen DNA bölgesinin çoğaltılması olarak 3 ana basamaktan oluşmaktadır. DNA polimeraz enziminin en iyi performans gösterdiği sıcaklık 72 °C olduğundan genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Sevindik ve Abacı, 2013).

Yuvalanmış (Nested) PZR, PZR tekniğinin özgüllüğünü artırmak için geliştirilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemin amacı birçok amplifikasyon ürünü içerisinde çoğaltılmak istenilen DNA dizisinin bulunup çıkarılmasını sağlamaktır. Yuvalanmış PZR reaksiyonu birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonundan oluşmaktadır. Bu yöntemde ikinci PZR işleminin uygulanma amacı amplifiye DNA dizilerinin içerisinde istenilen PZR bölgesinin çoğaltılmasıdır. Yuvalanmış PZR tekniğinde DNA dizilerinin amplifikasyonu için iki primer çifti tasarlanmaktadır. Uygulanan ilk amplifikasyonda uzun bir bölge çoğaltılması için hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılmaktadır. Küçük alanın çoğaltılması için ikinci amplifikasyon mekanizmasında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak sağlanmaktadır (Karataş, 2014).

Yapılan bu çalışmada, bölümümüzde arşivlenen tiroit dokularına ait DNA örneklerinden mtDNA sık delesyon bölgesine ait 8470.-8484. nükleotidler ile 13459.- 13447. nükleotidler arasındaki mitokondriyal genom bölgesinin çoğaltılması amacıyla Yong Lou ve

arkadaşlarınca belirlenen kriterlere göre Yuvalanmış PZR reaksiyonları gerçekleştirildi (Luo vd., 2019).

Arşiv metaryallerinde mtDNA sık delesyonlarının saptanabilmesi için toplam 25 µl'lik reaksiyon karışımı; 200 mM dNTP, 12,5 pmol MT-LF1: 5'-CTACGGTCAATGCTCTGAAA-3' ve MT-HR1: 5'ATAGCTTTTCTAGTCAGGTT-3' primerleri, 10X PZR tamponu, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1 U Taq DNA polimeraz ve 100 ng kalıp DNA kullanılarak hazırlandı. PCR reaksiyonu ABI Profleks marka ısı döngü cihazı kullanılarak 95 °C'de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben 35 döngülü 94 °C 30 saniye denatürasyon, 58 °C'de 30 saniye bağlanma, 72 °C'de 30 saniye sentez ve sentezden sonra 72 °C'de 5 dakika son sentez olarak gerçekleştirildi.

İkinci PZR için ilk PZR ürününden reaksiyonunundan 5 µl alınarak ve MT-LF2: 5'GCCCGTATTTACCCTATAGC-3' ve MT-HR2: 5'- GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3' primerleri kullanılarak PZR karışımı tekrar hazırlandı ve aynı koşullarda PZR gerçekleştirildi. Bunu takiben PZR örnekleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

### **3.2.3. Agaroz jel elektroforezi**

Yapılan bu tez çalışmasında PZR ile amplifiye edilen ürünlerin doğruluğunu ve kalitesini saptamak için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Yapılan çalışmada bu amaçla 50 ml 1X TBE içerisinde 1 gr agaroz mikrodalga fırında çözündürüldü. Konsantrasyonu 10mg/ml olan etidyum bromürden 2,5µl ilave edilerek agaroz jel hazırlandı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve düzenek içerisinde 1X TBE bulunan tanka yerleştirildi. Kuyucuklara örnekler ve belirteç DNA yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. Yüklenen DNA örnekler birinci PZR için 15 dakika 130 volt sabit voltajda, ikinci PZR için 45 dakika 130 volt sabit voltajda koşturuldu ve oluşan DNA bantları UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi. Birinci PZR için bant oluşumunun olup olmadığı kontrol edilirken, ikinci PZR için 423 bç amplifikasyon ürünlerinin varlığı DNA belirteç ile kıyaslanarak kontrol edildi. Farklı büyüklükte tespit edilen PZR ürünlerinin sık delesyon içeren örnekler olup olmadığının tespiti için Sanger metodu ile dizi analizi gerçekleştirildi.

### **3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması**

Dizi analizi reaksiyonu öncesi PZR ürünlerini primer, dNTP gibi kimyasallardan uzaklaştırılması için, PEG ile çöktürme yöntemi kullanılarak saflaştırıldı (Rosenthal, Coutelle ve Craxton, 1993).

PZR ürünlerinin saflaştırılması amacı ile, PZR ürünlerinin üzerine 1:1 oranında %26'lık PEG çözeltisi ilave edilerek kuvvetli şekilde vortekslendi ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Bu işlemin ardından oda ısısında 20 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 90 µl %70'lik -20°'de bekletilen soğuk etil alkol ilave edildi ve 10 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Pellet 20 µl dH<sub>2</sub>O ile çözündürüldü ve oluşan hacimden 4 µl alınarak %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek yukarıda belirtildiği şekilde incelendi. Jel üzerinde her bir örneğin konsantrasyonu belirteç DNA yardımı ile kıyaslandı ve Bio1D programında fotodansitometrik olarak belirlendi.

### 3.2.5. DNA dizileme reaksiyonu

DNA dizi analizi ya da sekanslama, klonlanmış gen tarafından kodlanan aminoasit dizisinin tahmin edilmesinde, genin tam yapısının ortaya çıkarılmasında, promotör dizileri gibi düzenleyici öğelerin yerlerinin belirlenmesinde, gen uç-birleştirme yoluyla oluşturulan genlerdeki farklılıkların belirlenmesi ve genetik mutasyonların belirlenmesinde kullanılan yöntemdir (Tekeoğlu, 2013).

Günümüzde Sanger dizileme prensibine dayalı sistem enzimatik ve kimyasal yöntemler olarak bilinen klasik yöntemlerin dışında kullanılmaktadır. Sanger sekanslama prensibine dayalı sistemde dizi analizi reaksiyonunda fotokrom işaretli nükleotidler kullanılır. Bu yöntemde tüm dedioksi işaretli NTP'ler (ddNTP) tek bir reaksiyon tüpü içerisine koyulur ve reaksiyon karışımı amplifikasyon sonrası kapiller jelle yüklenir. İki farklı floresans dedektör aracılığı ile bazların saptanması gerçekleştirilir. Elde edilen veriler kullanılan bilgisayar programları aracılığı ile renkli kromotogram dosyalarına çevrilir ve her bir baz kendine özgül olan renk eğrisi ile gösterilir (Eberhard, 2000). Yapılan bu çalışmada da tiroit nodülleri ve sağlıklı örneklere ait mtDNA sık delesyon bölgesine ait 423 bç'den büyük DNA dizilerinin tespiti için Sanger metoduna dayanan otomatik dizi analizi yöntemi kullanıldı. Bu amaçla dizileme reaksiyon karışımı hazırlandı.

10 µl'lik reaksiyon karışımı:

- 35-50 ng saflaştırılmış PZR ürünü
- 1,5 µl dizileme reaksiyon karışımı (Sequencing mix)
- 5 pmol primer (ileri veya geri)
- dH<sub>2</sub>O içermektedir.

Bu işlem buz içerisinde 0,2 ml'lik eppendorf tüplerinde gerçekleştirildi ve tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen program uygulandı.

96°C'de 20 saniye..... denatürasyon	}	30 döngü
50 °C'de 20 saniye..... bağlanma		
60°C'de 4 dakika..... sentez		

### 3.2.6. DNA dizi analizi örneklerinin çöktürülmesi (etanol çöktürmesi)

Dizileme reaksiyonu sonrası çöktürme üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri polimeraz zincir reaksiyonu tüpleri içerisinde 0,5 ml'lik steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Her bir örneğin üstüne hazırlanan durdurma solüsyonundan 5 µl ve -20°C'de saklanan %95'lik soğuk etanolden 60 µl ilave edilip vortekslendi ve ardından +4 °C'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Pellet üzerine -20°C'de saklanan %70'lik soğuk etanolden 90 µl ilave edilip +4 °C'de 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst faz dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra örnekler karanlıkta 10 dakika kurumaya bırakıldı. Kurutulan örnekler, otomatik dizi analizi cihazına yüklenene kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.7. Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi

Çöken dizi analizi ürünleri üre ve formamid içeren 40 µl SLS tamponu içerisinde çözüldürüldü. Buharlaşmayı engellemek amacıyla üzerlerine bir damla mineral yağ eklendi ve cihaza yüklendi. Kapiller elektroforez üretici firma tarafından belirtilen koşullara göre Backman Coulter GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (ABD) marka otomatik dizi analizi cihazında gerçekleştirildi.

### 3.2.8. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Elde edilen dizi analizi sonuçları GenomeLab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2 DNA dizi analizi programı kullanılarak değerlendirildi. Hastalara ait sağlıklı dokular ve nodüllerden elde edilen diziler değerlendirilip, GENE BANK'ta bulunan Cambridgereferans dizisi (NC\_012920.1) ile karşılaştırıldı.

### 3.2.9. İstatistiksel analizler

Tez çalışması kapsamındaki Türk toplumunda fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan tiroit nodülleri ile papiller tiroit karsinomları arasında mitokondriyal DNA sık delesyon prevalanslarının karşılaştırılması ki kare testi yapılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel hesaplar için SPSS 16.0 bilgisayar programı kullanıldı ve “p” değerinin 0,05’ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Hasta Grubu

Çalışmaya, klinik ve patolojik tanısı konulmuş 111 hasta dahil edilmiş olup bu hastaların 105 tanesi Toksik MNG ve MNG tanısı almış, 6 tanesi ise PTK tanısı almıştır (Çizelge 4.1. ve 4.2.). Toksik MNG ve MNG tanısı almış 105 hastanın 89’ı kadın ve 16’ erkektir. Bu hastalara ait 107 sıcak nodül, 80 soğuk nodül ve 98 sağlıklı çevre dokusu olmak üzere 285 adet doku çalışmaya alınmıştır. 105 Toksik MNG ve MNG hastasının 60’ında sadece sıcak nodül, 27’sinde soğuk nodül, 18’inde ise hem sıcak hem soğuk nodül vardır. Hastalara ait demografik bilgiler çizelge 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4. 1. Tez çalışma kapsamında incelenen Toksik MNG ve MNG hastalarına ait veriler

Nodül Tipi	Hasta Sayısı	Toplam Doku Sayısı	Çevre Doku Sayısı	Nodül Sayısı	Cinsiyet	Sigara İçen	Aile Öyküsü Bulunan
Sıcak Nodül	60	149	59	90H	48K+12E	10	26
Soğuk Nodül	27	81	23	57C	25K+2E	4	7
Sıcak + Soğuk	18	61	16	17H+23C	16K+2E	3	5
Toplam	105	291	98	187	105	17	38

*H; sıcak nodül, C; soğuk nodül, H+C; Hem sıcak hem de soğuk nodülü bulunan hastalar, K; Kadın, E; Erkek*

Çizelge 4. 2. Tez çalışma kapsamında incelenen PTK hastalarına ait veriler

Hasta Kodu	Nodül Tipi	Cinsiyet	Yaş	Sigara	Aile Öyküsü	Sık Delesyon
TK1	Çevre	K	50	Yok	Yok	Yok
	Soğuk					Var
TK2	Çevre	K	53	Yok	Yok	Yok
	Soğuk					Var
TK3	Çevre	E	61	Yok	Yok	Var
	Soğuk					Var
	Soğuk					Var
TK4	Çevre	K	78	Yok	Yok	Yok
	Soğuk					Var
	Soğuk					Var
	Servikal lap					Var
TK5	Sıcak	K			Var	Var
	Soğuk (hiperplazi)					Var
TK6	Soğuk	K	35	Yok	Yok	Yok
	Soğuk					Var
	Kan					Yok

#### 4.2. DNA Miktar Tayini

Bölümümüzde daha önce DNA izolasyonu yapılarak arşivlenen tiroit dokularının DNA miktarı ve saflığı belirlendi. Elde edilen ölçüm sonuçları Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.



Çizelge 4.3. Tiroit hastalara ait kan dokularından elde edilen DNA miktarlarının kantitatif sonuçları

Örnek	A260(nm)	A280(nm)	A260/A280	DNA Miktarı (µg/ml)
P001	0,018	0,013	1,38	90
P002	0,023	0,016	1,44	115
P003	0,087	0,045	1,93	435
P004	0,038	0,016	2,38	190
P005	0,195	0,113	1,73	975
P006	0,125	0,061	2,05	625
P007	0,216	0,125	1,73	1080
P008	0,078	0,062	1,26	390
P009	0,097	0,051	1,90	485
P010	0,025	0,009	2,78	125
P011	0,111	0,071	1,56	555
P012	0,114	0,072	1,58	570
P013	0,09	0,05	1,80	450
P014	0,117	0,058	2,02	585
P015	0,035	0,017	2,06	175
P016	0,039	0,017	2,29	195
P017	0,1	0,059	1,69	500
P018	0,01	0,007	1,43	50
P019	0,009	0,004	2,25	45
P020	0,016	0,007	2,29	80
P021	0,028	0,012	2,33	140
P022	0,009	0,004	2,25	45
P023	0,01	0,004	2,50	50

P024	0,107	0,053	2,02	535
P025	0,142	0,08	1,78	710
P026	0,011			55
P027	0,052	0,025	2,08	260
P028	0,052	0,018	2,89	260
P029	0,04	0,028	1,43	200
P030	0,008			40
P031	0,016	0,006	2,67	80
P032	0,023	0,003	7,67	115
P033	0,024	0,012	2,00	120
P034	0,038	0,018	2,11	190
P035	0,024	0,013	1,85	120
P036	0,053	0,028	1,89	265
P037	0,018	0,016	1,13	90
P038	0,132	0,075	1,76	660
P039	0,131	0,076	1,72	655
P040	0,016	0,01	1,60	80
P041	0,074	0,044	1,68	370
P042	0,135	0,087	1,55	675
P043	0,048	0,027	1,78	240
P044	0,175	0,1	1,75	875
P045	0,129	0,081	1,59	645
P046	0,067	0,053	1,26	335
P047	0,03	0,026	1,15	150
P048	0,109	0,079	1,38	545
P049	0,088	0,059	1,49	440

P050	0,168	0,108	1,56	840
P051	0,062	0,041	1,51	310
P052	0,058	0,04	1,45	290
P053	0,061	0,04	1,53	305
P054	0,04	0,027	1,48	200
P055	0,032	0,020	1,60	160
P056	0,025	0,005	5,00	125
P057	0,045	0,018	2,50	225
P058	0,101	0,053	1,91	505
P059	0,075	0,030	2,50	375
P060	0,033	0,022	1,50	165
P061	0,065	0,040	1,63	325
P062	0,033	0,021	1,57	165
P063	0,044	0,030	1,47	220
P064	0,100	0,062	1,61	500
P065	0,089	0,059	1,51	445
P066	0,007	0,012	0,58	35
P067	0,059	0,041	1,44	295
P068	0,052	0,036	1,44	260
P069	0,067	0,048	1,40	335
P070	0,088	0,061	1,44	440
P071	0,045	0,033	1,36	225
P072	0,083	0,055	1,51	415
P073	0,115	0,078	1,47	575
P074	0,025	0,030	0,83	125
P075	0,124	0,081	1,53	620

P076	0,172	0,114	1,51	860
P077	0,009	0,014	0,64	45
P078	0,064	0,045	1,42	320
P079	0,027	0,03	0,90	135
P080	0,024	0,027	0,89	120
P081	0,01	0,01	1,00	50
P082	0,019	0,014	1,36	95
P083	0,053	0,032	1,66	265
P084	0,009	0,01	0,90	45
P085	0,033	0,021	1,57	165
P086	0,046	0,028	1,64	230
P087	0,288	0,16	1,80	1440
P088	0,037	0,026	1,42	185
P089	0,069	0,043	1,60	345
P090	0,051	0,032	1,59	255
P091	0,434	0,405	1,07	2170
P092	0,168	0,106	1,58	840
P093	0,061	0,038	1,61	305
P094	0,559	0,308	1,81	2795
P095	0,012	0,011	1,09	60
P096	0,036	0,029	1,24	180
P097	0,161	0,099	1,63	805
P098	0,114	0,07	1,63	570
P099	0,093	0,062	1,50	465
P100	0,161	0,09	1,79	805
P101	0,033	0,027	1,22	165

P102	0,072	0,05	1,44	360
P103	0,069	0,043	1,60	345
P104	0,048	0,029	1,66	240
P105	0,278	0,172	1,62	1390
P106	0,26	0,15	1,73	1300
P107	0,111	0,064	1,73	555
P108	0,177	0,093	1,90	885
P109	0,09	0,047	1,91	450
P110	0,242	0,149	1,62	1210
P111	0,016	0,019	0,84	80
P112	0,028	0,026	1,08	140
P113	0,044	0,032	1,38	220
P114	0,139	0,084	1,65	695
P115	0,084	0,064	1,31	420
P116	0,100	0,068	1,47	500
P117	0,033	0,027	1,22	165
P118	0,026	0,028	0,93	130
P119	0,051	0,035	1,46	255
P120	0,026	0,021	1,24	130
P121	0,030	0,027	1,11	150
P122	0,052	0,040	1,30	260
P123	0,112	0,069	1,62	560
P124	0,076	0,046	1,65	380
P125	0,032	0,023	1,39	160
P126	0,087	0,053	1,64	435
P127	0,016	0,013	1,23	80

P128	0,041	0,034	1,21	205
P129	0,021	0,016	1,31	105
P130	0,057	0,044	1,30	285
P131	0,010	0,013	0,77	50
P132	0,088	0,073	1,21	440
P133	0,058	0,048	1,21	290
P134	0,354	0,204	1,74	1770
P135	0,103	0,061	1,69	515
P136	0,049	0,035	1,40	245
P137	0,073	0,058	1,26	365
P138	0,031	0,025	1,24	155
P139	0,035	0,024	1,46	175
P140	0,062	0,040	1,55	310
P141	0,049	0,034	1,44	245
P142	0,175	0,104	1,68	875
P143	0,060	0,044	1,36	300
P144	0,031	0,026	1,19	155
P145	0,043	0,029	1,48	215
P146	0,123	0,073	1,68	615
P147	0,282	0,182	1,55	1410
P148	0,045	0,033	1,36	225
P149	0,202	0,126	1,60	1010
P150	0,075	0,046	1,63	375
P151	0,073	0,049	1,49	365
P152	0,028	0,024	1,17	140
P153	0,084	0,055	1,53	420

P154	0,071	0,045	1,58	355
P155	0,022	0,017	1,29	110
P156	0,015	0,018	0,83	75
P157	0,030	0,023	1,30	150
P158	0,028	0,023	1,22	140
P159	0,052	0,036	1,44	260
P160	0,015	0,015	1,00	75
P161	0,037	0,026	1,42	185
P162	0,015	0,014	1,07	75
P163	0,019	0,016	1,19	95
P164	0,064	0,042	1,52	320
P165	0,033	0,026	1,27	165
P166	0,022	0,018	1,22	110
P167	0,021	0,017	1,24	105
P168	0,020	0,015	1,33	100
P169	0,023	0,018	1,28	115
P170	0,030	0,023	1,30	150
P171	0,042	0,034	1,24	210
P172	0,038	0,26	0,15	190
P173	0,036	0,024	1,50	180
P174	0,038	0,032	1,19	190
P175	0,015	0,010	1,50	75
P176	0,020	0,013	1,54	100
P177	0,016	0,011	1,45	80
P178	0,033	0,027	1,22	165
P179	0,034	0,021	1,62	170

P180	0,022	0,017	1,29	110
P181	0,028	0,020	1,40	140
P182	0,080	0,059	1,36	400
P183	0,033	0,023	1,43	165
P184	0,049	0,031	1,58	245
P185	0,036	0,025	1,44	180
P186	0,053	0,036	1,47	265
P187	0,041	0,028	1,46	205
P188	0,089	0,062	1,44	445
P189	0,023	0,018	1,28	115
P190	0,045	0,030	1,50	225
P191	0,038	0,025	1,52	190
P192	0,021	0,015	1,40	105
P193	0,021	0,015	1,40	105
P194	0,045	0,027	1,67	225
P195	0,028	0,018	1,56	140
P196	0,018	0,013	1,38	90
P197	0,023	0,014	1,64	115
P198	0,024	0,014	1,71	120
P199	0,032	0,020	1,60	160
P200	0,018	0,011	1,64	90
P201	0,072	0,039	1,85	360
P202	0,034	0,021	1,62	170
P203	0,053	0,034	1,56	265
P204	0,035	0,022	1,59	175
P205	0,027	0,019	1,42	135



P206	0,027	0,020	1,35	135
P207	0,037	0,024	1,54	185
P208	0,023	0,015	1,53	115
P209	0,016	0,012	1,33	80
P210	0,028	0,021	1,33	140
P211	0,016	0,013	1,23	80
P212	0,021	0,016	1,31	105
P213	0,094	0,073	1,29	470
P214	0,031	0,022	1,41	155
P215	0,054	0,035	1,54	270
P216	0,034	0,025	1,36	170
P217	0,033	0,022	1,50	165
P218	0,060	0,045	1,33	300
P219	0,020	0,012	1,67	100
P220	0,016	0,010	1,60	80
P221	0,028	0,019	1,47	140
P222	0,032	0,024	1,33	160
P223	0,011	0,007	1,57	55
P224	0,041	0,029	1,41	205
P225	0,043	0,033	1,30	215
P226	0,018	0,011	1,64	90
P227	0,012	0,009	1,33	60
P228	0,030	0,022	1,36	150
P229	0,043	0,030	1,43	215
P230	0,012	0,010	1,20	60
P231	0,019	0,014	1,36	95

P232	0,024	0,017	1,41	120
P233	0,017	0,013	1,31	85
P234	0,027	0,017	1,59	135
P235	0,032	0,020	1,60	160
P236	0,026	0,019	1,37	130
P237	0,014	0,012	1,17	70
P238	0,020	0,013	1,54	100
P239	0,077	0,049	1,57	385
P240	0,016	0,011	1,45	80
P241	0,025	0,018	1,39	125
P242	0,023	0,014	1,64	115
P243	0,021	0,015	1,40	105
P244	0,013	0,009	1,44	65
P245	0,047	0,037	1,27	235
P246	0,033	0,022	1,50	165
P247	0,036	0,025	1,44	180
P248	0,023	0,016	1,44	115
P249	0,081	0,044	1,84	405
P250	0,015	0,012	1,25	75
P251	0,016	0,012	1,33	80
P252	0,018	0,016	1,13	90
P253	0,017	0,015	1,13	85
P254	0,039	0,026	1,50	195
P255	0,026	0,019	1,37	130
P256	0,043	0,028	1,54	215
P257	0,051	0,031	1,65	255

P258	0,021	0,011	1,91	105
P259	0,032	0,019	1,68	160
P260	0,019	0,013	1,46	95
P261	0,02	0,013	1,54	100
P262	0,025	0,016	1,56	125
P263	0,019	0,015	1,27	95
P264	0,014	0,01	1,40	70
P265	0,028	0,017	1,65	140
P266	0,023	0,015	1,53	115
P267	0,016	0,01	1,60	80
P268	0,015	0,008	1,88	75
P269	0,03	0,021	1,43	150
P270	0,026	0,016	1,63	130
P271	0,034	0,02	1,70	170
P272	0,016	0,012	1,33	80
P273	0,019	0,015	1,27	95
P274	0,014	0,01	1,40	70
P275	0,024	0,015	1,60	120
P276	0,08	0,066	1,21	400
P277	0,151	0,12	1,26	755
P278	0,031	0,021	1,48	155
P279	0,022	0,013	1,69	110
P280	0,034	0,02	1,70	170
P281	0,022	0,015	1,47	110
P282	0,042	0,036	1,17	210
P283	0,031	0,021	1,48	155

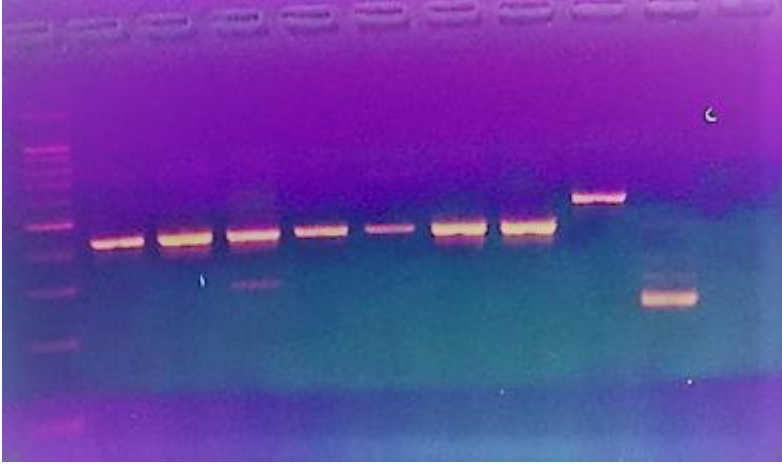
P284	0,052	0,03	1,73	260
P285	0,019	0,016	1,19	95
P286	0,042	0,027	1,56	210
P287	0,084	0,047	1,79	420
P288	0,099	0,086	1,15	495
P289	0,067	0,036	1,86	335
P290	0,03	0,02	1,50	150
P291	0,05	0,032	1,56	250
P292	0,027	0,02	1,35	135
P293	0,036	0,026	1,38	180
P294	0,028	0,025	1,12	140
P295	0,108	0,063	1,71	540
P296	0,011	0,009	1,22	55
P297	0,021	0,017	1,24	105
P298	0,079	0,053	1,49	395
P299	0,046	0,03	1,53	230
P300	0,024	0,016	1,50	120
P301	0,036	0,021	1,71	180
P302	0,017	0,012	1,42	85
P303	0,026	0,019	1,37	130
P304	0,026	0,017	1,53	130
P305	0,037	0,027	1,37	185
P306	0,017	0,015	1,13	85
P307	0,041	0,038	1,08	205
P308	0,028	0,026	1,08	140
P309	0,021	0,02	1,05	105

P310	0,018	0,019	0,95	90
P311	0,022	0,02	1,10	110
P312	0,034	0,021	1,62	170
P313	0,017	0,017	1,00	85
P314	0,018	0,018	1,00	90
P315	0,02	0,018	1,11	100
P316	0,016	0,015	1,07	80
P317	0,05	0,031	1,61	250
P318	0,161	0,137	1,18	805
P319	0,012	0,011	1,09	60
P320	0,036	0,025	1,44	180
P321	0,019	0,012	1,58	95
P322	0,012	0,01	1,20	60
P323	0,031	0,02	1,55	155
P324	0,035	0,024	1,46	175
P325	0,017	0,011	1,55	85
P326	0,026	0,018	1,44	130

#### 4.3. Mitokondriyal DNA Yuvalanmış (Nested) PZR Sonuçları

Çalışmaya alınan DNA örneklerinin tümü DNA izolasyonu sonrası 8470.-8484. nükleotidler ile 13459.- 13447. nükleotidler arasında yer alan 4977 bç sık delesyonu içeren mitokondriyal genom bölgesinin amplifikasyonu için PZR'nuna alındı. mtDNA sık delesyon bölgesi MT-LF1, MT-HR1, MT-LF2 ve MT-HR2 primerleri kullanarak çoğaltıldı ve mtDNA sık delesyonu görülen örneklerde 423 bç'lik ürün elde edildi. Elde edilen PZR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütülüp, görüntülendi (Şekil 4.1.).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 B



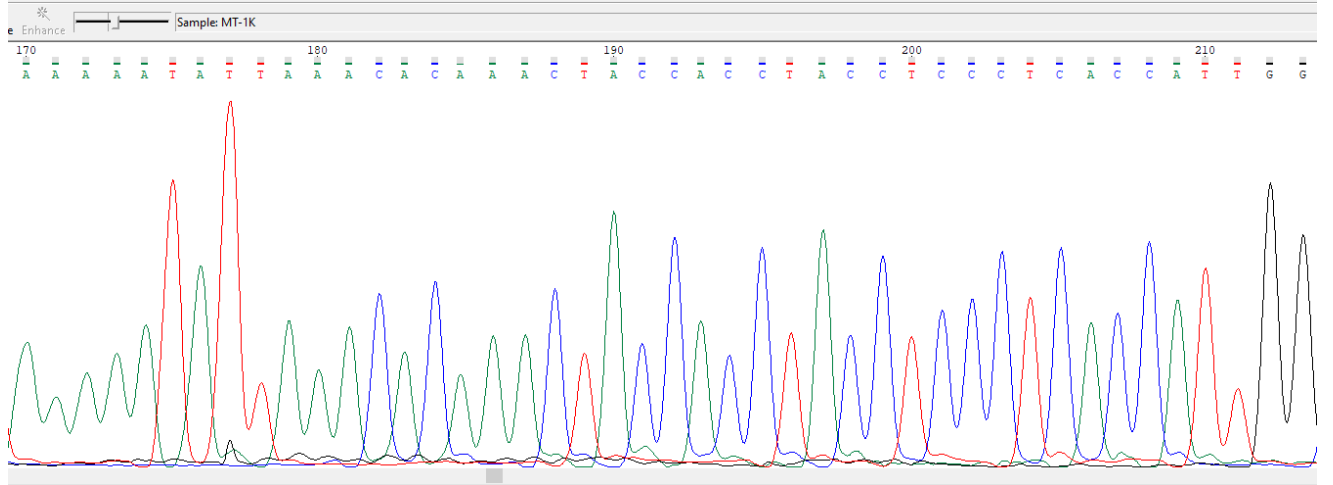
Şekil 4. 1. PZR sonuçları M: Marker (100 bç), B: Negatif kontrol, 1.2.3.4.5.6.7. nolu hasta örneklerine ait 423 bç'lik PZR ürünleri; 8 nolu hasta 500 bç'lik PZR ürünü; 9 nolu hasta 200 bç'lik PZR ürünü

PZR sonucu olarak 69 soğuk nodül, 80 sıcak nodül ve 39 çevre doku örneğinden 423 bç'lik ürün elde edilirken, 23 hastaya ait 28 DNA örneğinde farklı büyüklükte PZR ürünleri tespit edilmiştir. Bu örneklerle ait PZR sonuçları DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir.

#### 4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Safılaştırılan çevre doku ile sıcak ve soğuk nodül örnekleri Yöntem3.2.6.'da belirtildiği gibi kapiller elektroforez için cihaza yüklendi. Cihazdan elde edilen dizi analizi sonuçları GenomeLab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2 DNA dizi analizi programı kullanılarak değerlendirildi. Hastalara ait dizileme sonuçları hem çevre doku ile sıcak ve soğuk dokular arasında hem de Cambridge referans dizisi (NC-012920.1) ile blast programı kullanılarak karşılaştırıldı.

Dizi analizi yapılan 23 hastaya ait 28 örneğin 26'sında farklı büyüklüklerde sık delesyon tespit edildi (şekil 4.2 ve şekil 4.3). Ancak 2 hastaya ait örnekler NC\_012920.1 referans dizisi ile karşılaştırıldığında MT-LF1, MT-HR1, MT-LF2 ve MT-HR2 primerlerinin farklı bölgelere bağlanması sonucunda sık delesyon ile herhangi bir ilişkisi olmayan mtDNA bölgelerinin amplifiye edildiği tespit edilmiştir.



Descriptions Graphic Summary **Alignments** Dot Plot

Alignment view Pairwise  CDS feature [Restore defaults](#) Download

1 sequences selected

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) Sort by: E value [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

**Homo sapiens mitochondrion, complete genome**  
Sequence ID: [NC\\_012920.1](#) Length: 16569 Number of Matches: 2

Range 1: 13447 to 13646 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
364 bits(197)	9e-104	199/200(99%)	0/200(0%)	Plus/Plus

Query 197 ACCTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCACTAGCAGGAATACCTTTCTCACAGGTTTCTAC 256  
Sbjct 13447 ACCTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCACTAGCAGGAATACCTTTCTCACAGGTTTCTAC 13506

Query 257 TCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATACAAACGCTGAGCCCTATCT 316  
Sbjct 13507 TCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATACAAACGCTGAGCCCTATCT 13566

Query 317 ATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGCCTATAGCACTCGAATAATTCTTCACCC 376  
Sbjct 13567 ATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGCCTATAGCACTCGAATAATTCTTCACCC 13626

Query 377 CTAACAGGTCAACCTCGCTT 396  
Sbjct 13627 CTAACAGGTCAACCTCGCTT 13646

Range 2: 8279 to 8482 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	2e-100	204/209(98%)	5/209(2%)	Plus/Plus

Query 1 TACCCCTCTAGAGACCCACTGTAAGCTAACTTAGCATTAAACCTTTAAGTTGTAAGA 60  
Sbjct 8279 TACCCCTCTAGAG-CCCACTGTAAGCTAACTTAGCATTAAACCTTTAAGTT--AAAGA 8335

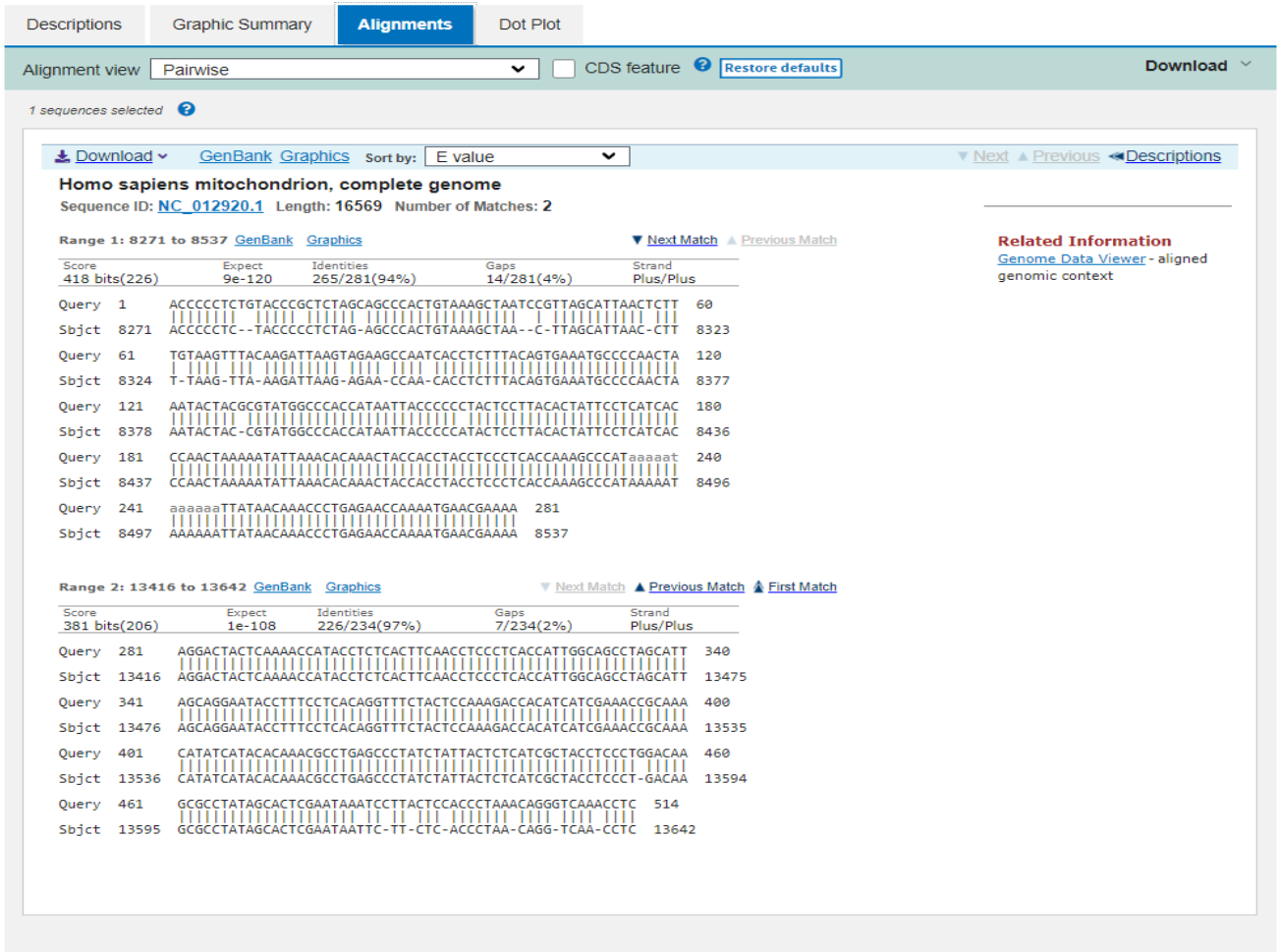
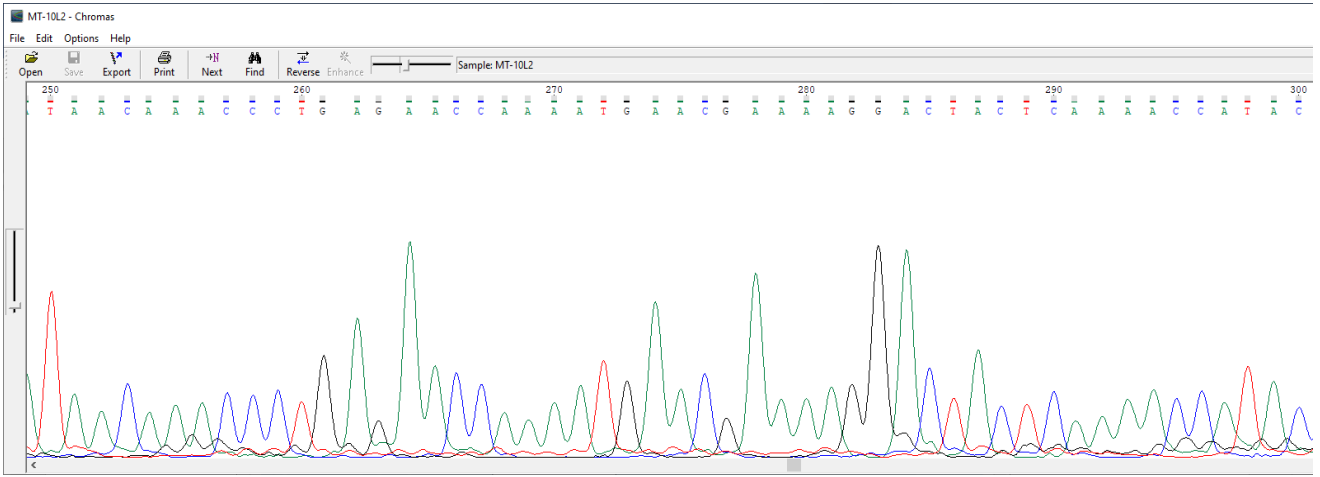
Query 61 TGTAAGAGAACCACACCTCTTTACAGTGAATGCCCAACTAAATACACCGTATGGCC 120  
Sbjct 8336 T-TAAGAGAACCACACCTCTTTACAGTGAATGCCCAACTAAATACACCGTATGGCC 8394

Query 121 CACCATAATTACCCCATACCTTACACTATTCTCATACCCCAACTAAAAATATTAA 180  
Sbjct 8395 CACCATAATTACCCCATACCTTACACTATTCTCATACCCCAACTAAAAATATTAA 8453

Query 181 ACACAACTACCACCTACCTCCCTCACCA 209  
Sbjct 8454 ACACAACTACCACCTACCTCCCTCACCA 8482

**Related Information**  
[Genome Data Viewer](#) - aligned genomic context

Şekil 4. 2. 4977 bç'lik sık delesyon sahip nodülün DNA'sından elde edilen Dizi analizi sonuçları (A) ve analiz sonucunun referans dizi ile karşılaştırılması (B)



Şekil 4. 3. 4879 bç'lik delesyonasahip nodülün DNA'sından elde edilen Dizi analizi sonuçları (A) ve analiz sonucunun referans dizi ile karşılaştırılması (B)



#### 4.5. Soğuk ve Sıcak Nodüllere Sahip Hastalarda Demografik ve Patolojik Tanı Verilerinin İstatiksel Karşılaştırılması

Sıcak nodüllere sahip hastalarda, mutasyon dağılımı aile hikayesi açısından incelendiğinde, aile öyküsü olan 31 bireyden 21 bireyde (%67,7) sık delesyon mutasyonu saptanmıştır. Bununla beraber aile öyküsü olmayan 41 bireyden 28 bireyde (%68,3) sık delesyon mutasyonu saptanmıştır. Bu bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (p 0,96) (Çizelge 4.4.). Sıcak nodüllere sahip hastalarda sigara kullanımı incelendiğinde, sigara kullanımı olan 13 bireyden 10 bireyde (%76,9), sigara kullanımı olmayan 55 bireyden 33 bireyde (%50,8) mtDNA sık delesyonu saptanmıştır ancak elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir (p 0,083) (Çizelge 4.4.). Bunun sebebi hasta grubundaki mutasyonu taşıyan örnek sayısının az olması nedeniyle, mutasyonun görülme sıklığı tam olarak saptanamamış olabilir.

Soğuk nodüllere sahip bireylerde mutasyon dağılımının aile hikayesi ile ilişkisi incelendiğinde, aile öyküsü olan 12 bireyden 9 bireyde (%75), aile hikayesi olmayan 20 bireyin hepsinde (%100) sık delesyon mutasyonu saptanmıştır (p: 0,019) (Çizelge 4.5.). Dolayısıyla, aile hikayesi ile mutasyon prevalansı arasında bir ters ilişki olduğu görülmektedir. Mutasyon dağılımı sigara kullanımı açısından incelendiğinde, sigara kullanımı olan 7 bireyden 5 bireyde (%71,4), sigara kullanımı olmayan 28 bireyden 25 bireyde (%89,3) sık delesyon mutasyonu saptanmıştır. Bu bireyler arasında da istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir (p: 0,227) (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4. 4. Sıcak nodüllere sahip hastalarda sigara kullanımı ve aile öyküsü ile sık delesyon sıklığının karşılaştırılması

	Sık Delesyon Pozitif	Sık Delesyon Negatif	p	%CI Aralığı
Sigara	var: 10 (%76,9) yok: 33 (%50,8)	var: 3 (%23,1) yok: 32 (%49,2)	0,083	3,232 (0,814-12,833)
Aile Öyküsü	var: 21 (%67,7) yok: 28 (%68,3)	var: 10 (%32,3) yok: 13 (%31,7)	0,96	0,975 (0,3592-0,650)

Çizelge 4. 5. Soğuk nodüllere sahip hastalarda sigara kullanımı ve aile öyküsü verileri ile sık delesyon sıklığının karşılaştırılması

	Sık Delesyon Pozitif	Sık Delesyon Negatif	p	%CI Aralığı
Sigara	var: 5 (%71,4) yok: 25 (%89,3)	var: 2 (%28,6) yok: 3 (%10,7)	0,227	0,300 (0,039-2,286)
Aile Öyküsü	var: 9 (%75) yok: 20 (%100)	var: 3 (%25) yok: 0 (%0)	0,019	1,333 (0,962-1,848)

Soğuk nodüller ve sıcak nodüller arasındaki sık delesyon dağılımı incelendiğinde, 107 sıcak nodülün 80'inde (%74,8), 80 soğuk nodülün 69'unda (%86,3) sık delesyon saptanmıştır (p 0,053) (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4. 6. Sıcak ve soğuk nodüllere sahip hastalarda sık delesyon sıklığının karşılaştırılması

Sık Delesyon	Sıcak Nodül	Soğuk Nodül	p	%CI Aralığı
Pozitif	80 (%74,8)	69 (%86,3)	0,053	2,117 (0,979-4,579)
Negatif	27 (%25,2)	11 (%13,8)		

Tez çalışma kapsamında PTK tanısı konulan 6 hastaya ait 11 tümör dokusunun 10'unda (%90,9) sık delesyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.).

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Literatürde mtDNA varyasyonlarının insan kanserlerinin patogenezinde rol oynadığına dair bilgiler bulunmaktadır. mtDNA'nın çeşitli nedenlerden dolayı nükleer DNA dan daha sık mutasyona uğradığı varsayılmaktadır. Ayrıca, mtDNA'nın organel içindeki reaktif oksijen türlerine (ROS) yatkınlığı onu oksidatif hasara daha duyarlı hale getirmektedir. mtDNA'nın paketlenmesinde histon proteinlerin eksikliği mutasyon hızı artar. Ayrıca, mitokondrial DNA hasar onarım sistemleri sınırlıdır; mitokondriyal sistem baz eksizyon tamir yetenekleri gösterse de nükleotid eksizyon tamirini yapma yeteneğinden yoksundur. D-loop bölgesi özellikle mtDNA'daki varyasyonlara karşı daha hassastır (Tong, 2003). En sık görülen mitokondriyal mutasyonlardan birisi de sık delesyon (common deletion) olarak adlandırılan 8470-8484 ve 13447-13459 nükleotidleri arasındaki 4977 bç'lik mtDNA dizisinin delesyonudur. Bu delesyon, 5 tRNA geni ile sitokrom c oksidaz kompleks 1 ve ATPaz alt üniteleri olmak üzere 7 geni içermektedir (Aral vd., 2010).

Yapılan bu tez çalışmasının amacı, Türk toplumunda, fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan tiroit nodülleri ile papiller tiroit kansinomlarında mitokondriyal DNA (mtDNA) sık delesyon prevalansının saptanması ve mitokondriyal DNA (mtDNA) sık delesyon varlığının papiller tiroit kanserlerinde ayırıcı tanıda kullanılabilme potansiyeli olup/olmadığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde mtDNA mutasyonlarının mide, kolon, pankreas, böbrek, meme ve akciğer kanserleri ile olan ilişkisini ele alan çok sayıda çalışma mevcuttur (Copeland vd., 2002, Chatterjee vd., 2006, Aral vd., 2007). Yapılan çalışmalarda fenotipik değişikliklerde nükleer genler ve diğer mtDNA mutasyon ve/veya polimorfizmlerinin rolü olabileceği ve çevresel faktörlerin etkisinin olduğu öne sürülmektedir. Ancak, genel bilgiler kısmında daha önce de kısaca özetlendiği üzere mtDNA mutasyonlarının tiroit hastalıklarındaki rolü henüz bilinmemektedir.

Çalışmamız kapsamında 6 tanesi PTK olmak üzere toplam 111 nodüler tiroit hastasından elde edilen sıcak ve soğuk nodüler ile çevre dokularından en sık görülen mitokondriyal mutasyonlardan biri olan sık delesyon (common deletion) varlığı araştırılmıştır. Tespit edilen sık delesyon mutasyon sıklığı ile sigara kullanımı ve aile öyküsü gibi demografik bilgiler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Soğuk nodüller ve sıcak nodüller arasındaki Sık delesyon dağılımı incelendiğinde, 107 sıcak nodülün 80'inde (%74,8), 80 soğuk nodülün 69'unda (%86,3) sık delesyon saptanmıştır (p: 0,053). Bununla beraber, malign nodüllerin tamamına yakınında mtDNA sık delesyonu

tespit edilmiştir. Bu durum literatürde yer alan ve Türk popülasyonunda 50 tiroit kanser hastası üzerine yapılan çalışma ile çelişmektedir. İlgili çalışmada, tiroit tümörleri ile komşu sağlıklı dokulardan alınan örneklerin sadece 6'sında mtDNA sık delesyonu tespit edilmiş ve mtDNA sık delesyonunun tiroit kanserleri ilişkisi olmadığı öne sürülmüştür (Aral vd., 2010).

Muller-Hocker vd., tarafından Hashimoto tiroiditi, üzerine yapılan bir çalışmada oluşan otoimmün hastalıkta sık delesyon bezin sağlıklı dokuları ile değil, sitokrom-c oksidaz kusurları ile etkilenen oksifilik hücrelerle ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Ancak, literatürde sık delesyonun, hurthle hücreli karsinomlarda, multinodüler guatrda ve foliküler adenomlarda oksifilik hücre değişikliklerinden bağımsız olarak oluşum gösterdiği bildirilmiştir (Rogounovitch, 2004).

MtDNA sık delesyonuna ilişkin literatürde yer alan benign ve malign tiroit tümörlerinden oluşan 79 vakayı (Hürthle ve Hürthle olmayan hücre neoplazmaları) kapsayan tiroit kanseri ile ilgili bir çalışmada 4977 bç sık delesyon (CD) varlığı taranmış ve sonuç olarak mtDNA sık delesyonu Hürthle hücre tümörlerinin %100'ünde, adenomların %33,3'ünde ve Hürthle olmayan hücreli papiller karsinomların %18,8'inde tespit edilmiştir (Maximo vd., 2002).

Çernobil kazasından sonra radyoizotoplarla kontamine olan bölgelerde yapılan bir çalışmada, papiller tiroit karsinom ve foliküller adenom hastalarına ait doku örneklerinde mtDNA mutasyonları araştırılmış ve sık delesyonun (4977 bç) papiller karsinom ve foliküler adenomda yaygın olduğunu bulunmuştur. (Aral ve Özer, 2007, Chatterjee vd., 2006, Rogounovitch vd., 2002).

Yapılan tez çalışması kapsamında sık delesyonun papiller tiroit karsinomun ayırıcı tanısında kullanılabilme potansiyeli olup/olmadığının belirlenmesi de amaçlanmıştır. Ancak tez çalışma sürecinin covid-19 pandemisi sürecine denk gelmesi ve mali ve teknik yetersizliklerden dolayı PTK örneklerinin büyük bir kısmı çalışılmamıştır. Dolayısıyla, hasta sayısının istatistiksel değerlendirme açısından yetersizliği nedeniyle bu konu tam ele alınamamıştır. Ancak, PTK tanısı konulan 6 hastaya ait 11 tümör dokusunun 10'unda (%90,9) sık delesyon tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber sık delesyon prevalansı kanserleşme potansiyeli yüksek olan soğuk nodüllerde sıcak nodüllere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Ancak soğuk tiroit nodüllerindeki sık delesyon prevalansının PTK tümör dokularıyla benzer olması nedeniyle PTK'lerinde ayırıcı tanıda kullanılabilme potansiyelinin olmadığı öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adaş, G., Adaş, M., Özülker, F., & Akçakaya, A. (2012). Tiroit Kanserleri. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 28, 26-34.
- Akpolat, İ (2012). Tiroit hastalıklarında patolojik değerlendirme. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29(4S), 337-348.
- Aktümsek, A (Ed.). (2010). *İnsan Fizyolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Aral C ve Ozer A (2007). Mitochondrial DNA and Cancer, *Marmara Medical Journal*; 20; 127-136
- Aral, C., Akkiprik, M., Kaya, H., Ataizi-Çelikel, Ç., Çağlayan, S., Özisik, G., . . . Özer, A. (2010). Mitochondrial DNA common deletion is not associated with thyroid, breast and colorectal tumors in Turkish patients. *Genetics and molecular biology*, 33(1), 1-4.
- Arslan M, Delibaşı T, Şahin M (2011). Thyroid Cancer. *İç Hastalıkları Dergisi*, 18: 41-48.
- Avise JC (1991). Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet*, 25: 45-69.
- Barbaro, D., Incensati, R. M., Materazzi, G., Boni, G., Grosso, M., Panicucci, E., . . . Miccoli, P. (2014). The BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer with positive or suspected pre-surgical cytological finding is not associated with advanced stages or worse prognosis. *Endocrine*, 45(3), 462-468.
- Belfiore, A., La Rosa, G. L., La Porta, G. A., Giuffrida, D., Milazzo, G., Lupo, L., . . . Vigneri, R. (1992). Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *The American journal of medicine*, 93(4), 363-369.
- Berneburg, M., Plettenberg, H., Medve-König, K., Pfahlberg, A., Gers-Barlag, H., Gefeller, O., & Krutmann, J. (2004). Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. *Journal of investigative dermatology*, 122(5), 1277-1283.
- Bircan, R (2007). İyot düzeyinin farklı olduğu bölgelerde hiperfonksiyone tiroit nodüllerinde tirotropin reseptör (tshr) mutasyon insidansının saptanması.
- Brandon, M., Baldi, P., and, & Wallace, D. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25(34), 4647-4662.
- Carew, J. S., & Huang, P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Molecular cancer*, 1(1), 1-12.
- Chatterjee, A., Mambo, E., & Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25(34), 4663-4674.
- Chen, T., He, J., Shen, L., Fang, H., Nie, H., Jin, T., . . . Li, H. (2011). The mitochondrial DNA 4,977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer. *BMC medical genetics*, 12(1), 1-9.

- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British medical bulletin*, 106(1), 135-159.
- Copeland WC, Wachsmann JT, Johnson FM ve Penta JS (2002). Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest*, 20: 557-569.
- Datta, R. V., Petrelli, N. J., & Ramzy, J. (2006). Evaluation and management of incidentally discovered thyroid nodules. *Surgical oncology*, 15(1), 33-42.
- Day, T. A., Chu, A., & Hoang, K. G. (2003). Multinodular goiter. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 36(1), 35-54
- Demir OH (2015). İyi Difarensiyeye Tiroit Kanserlerinde Nötrofil Lenfosit Oranının İlişkisi. Doktora Tezi, Tıp Fakültesi. Gaziantep.
- Dimberg, J., Hong, T. T., Nguyen, L. T. T., Skarstedt, M., Löfgren, S., & Matussek, A. (2015). Common 4977 bp deletion and novel alterations in mitochondrial DNA in Vietnamese patients with breast cancer. *Springerplus*, 4(1), 1-7.
- Eberhard, P. (2000). Genetik Atlası. *Lüleci G., SM, Alper Ö. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul*, 53-56.
- Erdoğan G (2005). Koloğlu Endokrinoloji Temel ve klinik 2. baskı. MN Medikal-Nobel, 800s, Ankara
- Faquin, W. C. (2008). The thyroid gland: recurring problems in histologic and cytologic evaluation. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132(4), 622-632.
- Fayaz, S., Fard-Esfahani, P., & Torbati, P. M. (2014). Lack of CHEK2 gene mutations in differentiated thyroid carcinoma patients using high resolution melting analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12), 5019-5022.
- Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A., & Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology*, 88(1), 41-56.
- Finnilä, S., Hassinen, I. E., & Majamaa, K. (1999). Restriction fragment analysis as a source of error in detection of heteroplasmic mtDNA mutations. *Mutation Research/Mutation Research Genomics*, 406(2-4), 109-114.
- Gendron, S. P., Mallet, J. D., Bastien, N., & Rochette, P. J. (2012). Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: a relation with corneal aging. *Mechanisms of ageing and development*, 133(2-3), 68-74.
- Hanks, J. (2001). Thyroid. Sabiston DC (ed). *Textbook of Surgery: Philadelphia: WB Saunders Comp.*
- Hegedus, L., Bonnema, S. J., & Bennedbaek, F. N. (2003). Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocrine reviews*, 24(1), 102-132.
- Henry, J. (1997). Surgical anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands and recurrent and external laryngeal nerves. *Textbook of Endocrine Surgery: WB Saunders Company, Philadelphia.*
- İşgör, A. (2000). *Tiroit hastalıkları ve cerrahisi: Avrupa Tıp Kitapçılık.*
- Kabalak T (2009). *Tiroit El Kitabı. İzmir Güven Kitapevi, 743s, İzmir*
- Karakan Hİ (2008) *İnce İğne Aspirasyon Biopsisi ve Frozen Section Yöntemlerinin Tiroit Kitlelerindeki Cerrahi Yaklaşım Üzerine Etkileri. Uzmanlık tezi. Cerrahi Kliniği, İstanbul.*

- Karataş, M. (Ed.). (2012). *Moleküler biyoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık.
- Kim, K., Kenigsberg, S., Jurisicova, A., & Bentov, Y. (2019). The Role of Mitochondria in Oocyte and Early Embryo Health. *OBM Genetics*, 3, 1-1.
- Kopp, P. (2001). Human Genome and Diseases: Review¶ The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 58(9), 1301-1322.
- Krohn, K., Fuhrer, D., Bayer, Y., Eszlinger, M., Brauer, V., Neumann, S., & Paschke, R. (2005). Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocrine reviews*, 26(4), 504-524.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., . . . Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology*. WH Freeman and Company.
- Luo, Y., Zou, Y., Wu, J., Zhang, Z. Y., Liu, F. Y., Li, L. P., & Huang, O. P. (2019). The mitochondrial DNA 4977-bp deletion and copy number alteration in Han Chinese samples with uterine fibroids. *Annals of human genetics*, 83(4), 220-230.
- Máximo, V., Soares, P., Lima, J., Cameselle-Teijeiro, J., & Sobrinho-Simoes, M. (2002). Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *The American journal of pathology*, 160(5), 1857-1865.
- Meller, J., & Becker, W. (2002). The continuing importance of thyroid scintigraphy in the era of high-resolution ultrasound. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 29(2), S425-S438
- Nagaraja, G. M., & Nagaraju, J. (1995). Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. *Electrophoresis*, 16(1), 1633-1638.
- Neff, R. L., Farrar, W. B., Kloos, R. T., & Burman, K. D. (2008). Anaplastic thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37(2), 525-538, xi. doi:10.1016/j.ecl.2008.02.003
- Nikiforova, M. N., Chiosea, S. I., & Nikiforov, Y. E. (2009). MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocrine pathology*, 20(2), 85-91.
- Oliveira, M. J., & de Oliveira, J. P. (2007). Treatment of differentiated thyroid carcinoma. *Nuclear Medicine Therapy*, 45.
- Özata M (2005). “Tiroit Hastalarına Güncel Yaklaşım”. Epsilon Yayınları, Ankara, 241-244.
- Özata M (2003). Tiroit Hastalıkları Tanı ve Tedavileri. GATA Basımevi,
- Özata M (2011). Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 2 ed. Tiroititler, Nodüler guatr, Tiroit kanserleri, ed. M. Ozata. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.165-176.
- Özçelik, S., Bircan, R., Sarıkaya, Ş., Gül, A. E., Aydın, B., Özçelik, M., . . . Cengiz, H. (2019). BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer is correlated with adverse clinicopathological features but not with iodine exposure. *Endokrynologia Polska*, 70(5), 401-408.
- Özgen, K. G. (2012). Ankara. *Mitokondriyal Dna Mutasyonları*. T. C. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.
- Özyeğin, A., & Yavuz, M. (2000). Benign tiroit tümörleri, in. *İşgör A, Tiroit hastalıkları ve cerrahisi*, 1, 365-366.

- Papotti, M. (1994). Immunocytochemical identification of oxyphilic mitochondrion-rich cells. *Appl Immunohistochem*, 2, 261-267.
- Rogounovitch, T. I., Saenko, V. A., Shimizu-Yoshida, Y., Abrosimov, A. Y., Lushnikov, E. F., Roumiantsev, P. O., . . . Yamashita, S. (2002). Large deletions in mitochondrial DNA in radiation-associated human thyroid tumors. *Cancer Research*, 62(23), 7031-7041.
- Rogounovitch, T., Saenko, V., & Yamashita, S. (2004). Mitochondrial Dna And Human Thyroid Diseases. *Endocrine Journal*, 51(3), 265-277.
- Rosenthal, A., Coutelle, O., & Craxton, M. (1993). Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic acids research*, 21(1), 173.
- Sadler, G., Clark, O., & Van Herden, J. (1999). Thyroid and parathyroid. Principles of surgery 7th Ed: Schwartz SI New York. *Mc Graw Hill PP*, 1661, 1715.
- Schaaf, C. P., Zschocke, J., & Potocki, L. (2012). *Human genetics: from molecules to medicine*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Schapira, A. H. (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet*, 368(9529), 70-82.
- Scheffler, I. (1999). Metabolic pathways inside mitochondria. *Scheffler IE, editor. Mitochondria. New York: Wiley-Liss*, 246-272.
- Serra, S., & Asa, S. L. (2008). Controversies in thyroid pathology: the diagnosis of follicular neoplasms. *Endocrine pathology*, 19(3), 156-165.
- Sevindik, E., & Abaci, Z. T. (2013). Nested PCR ve Kullanım Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 22-26.
- Skandalakis, W., & John, E. (1995). Surgical anatomy and technique. *Skandalakis Quality Medical Publishing*, 409.
- Solmaz, R. (2013). *Tiroit Hastalığının Teşhisinde Uzman Sistemlerin Kullanılması* (Yüksek Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C., & Weintraub, B. D. (2002). Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiological reviews*, 82(2), 473-502.
- Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103-123.
- Tekeoğlu, M (Ed.). (2013). *Biyoteknolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Tong, B. C., Ha, P. K., Dhir, K., Xing, M., Westra, W. H., Sidransky, D., & Califano, J. A. (2003). Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. *Journal of surgical oncology*, 82(3), 170-173.
- Ulu, E. (2015). *Türk popülasyonunda tiroit nodüllerinde, mitokondriyal DNA D-loop bölgesi mutasyonlarının analizi*. Namık Kemal Üniversitesi.
- von Kleist-Retzow, J. C., Schauseil-Zipf, U., Michalk, D. V., & Kunz, W. S. (2003). Mitochondrial Diseases-An Expanding Spectrum of Disorders and Affected Genes. *Experimental physiology*, 88(1), 155-166.
- Yiğit G. Y, R. (2001). Tiroit Fizyolojisi. Ed: Ünal G.:Tiroit Hastalıkları. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 3: 28-64.



Zimmermann, A. K., Camenisch, U., Rechsteiner, M. P., Bode-Lesniewska, B., & Rössle, M. (2014). Value of immunohistochemistry in the detection of BRAFV600E mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer cytopathology*, 122(1), 48-58.



