



**TÜRK TOPLUMUNDA FONKSİYONEL VE
NONFONKSİYONEL TİROİT NODÜLLERİ
İLE PAPİLLER TİROİT KARSİNOMLARINDA
MİTOKONDRIYAL DNA KOPYA SAYISININ
BELİRLENMESİ**

Şeyma TEKİN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Rifat BİRCAN
2021**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRK TOPLUMUNDA FONKSİYONEL VE NONFONKSİYONEL
TİROİT NODÜLLERİ İLE PAPİLLER TİROİT KARSİNOMLARINDA
MİTOKONDRIYAL DNA KOPYA SAYISININ BELİRLENMESİ**

Şeyma TEKİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Rifat BİRCAN

TEKİRDAĞ-2021

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRK TOPLUMUNDA FONKSİYONEL VE NONFONKSİYONEL TİROİT NODÜLLERİ İLE PAPİLLER TİROİT KARSİNOMLARINDA MİTOKONDRİYAL DNA KOPYA SAYISININ BELİRLENMESİ

Şeyma TEKİN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rıfat BİRCAN

Tiroit nodülleri genel olarak benign yapıdadır ve toplam tiroit nodüllerinin %4-6,5'i malignite riski taşımaktadır. Tiroit nodüllerinin fonksiyonel özelliklerine göre yaklaşık %85'i soğuk, %10'u normal ve %5'i sıcak olmasına rağmen, prevalansı ortamdaki iyot kaynağı ve coğrafik konuma göre değişiklik gösterebilir. Sıcak tiroit nodüllerinde malignite potansiyeli yaklaşık %1 veya daha az iken soğuk tiroit nodüllerinde bu risk yaklaşık %5-%15 arasında değişmektedir. Bununla beraber, papiller tiroit kanseri (PTK) ise tiroit kanserleri arasında en sık görülen kanser türüdür ve tiroit kanseri vakalarının %80'den fazlasını kapsamaktadır. Diğer taraftan, her bir hücrede mtDNA'nın 10^3 - 10^4 kopyası bulunmaktadır. Ayrıca, bir hücrede mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısı kesin olarak bilinmemektedir ve mtDNA kopya sayısı hücrelerin metabolik ihtiyaçlarına bağlı olarak her bir hücre tipi arasında değişiklik göstermektedir. Literatürde benign tiroit nodüller ile papiller tiroit kanserinin mtDNA kopya değişimlerinin saptanmasına ilişkin az sayıda yayın yer almaktadır. Yapılan bu çalışmanın amacı; Türk toplumunda, fonksiyonel ve nonfonksiyonel tiroit nodülleri ile PTK'lerinde mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısı değişimlerinin saptanması ve PTK'lerinin tümorogenezi ile mtDNA kopya sayısı değişimleri arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. Toksik MNG, MNG veya PTK tanısı konulmuş hastalara ait 74 sıcak nodül, ve 64 soğuk nodül, ve 48 PTK tümör dokusu ile bu nodüllere yakın sağlıklı çevre doku örneklerinden elde edilen DNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak teknik ve maddi yetersizlikten dolayı 48 PTK hastasının sadece 5'ine ait 5 nodülde mtDNA kopya sayısı belirlenebilmiştir. mtDNA kopya sayısının belirlenmesi LightCycler 480 II gerçek zamanlı PZR cihazında SYBR green I floresan boyası kullanılarak rölatif kantifikasyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Taranan 74 sıcak nodülün 49'unda (%66,2) mtDNA kopya sayısında artış gözlemlenirken 16 nodülde (%21,6) azalış, 9'unda (%12,2) ise herhangi bir değişim saptanmamıştır. Buna karşın, taranan 64 soğuk nodülün 22'sinde (%34,4) mtDNA kopya sayısında artış gözlemlenirken 21 nodülde (%32,8) azalış, 21'inde (%32,8) ise herhangi bir değişim saptanmamıştır (χ^2 : 15.098; p: 0.001). mtDNA kopya sayısı belirlenen 5 PTK dokusunun 2'sinde artış, 2'sinde azalış ve 1'inde mtDNA kopya sayısının değişmediği tespit edilmiştir. Bununla beraber, mevcut hasta popülasyonunda istatistiksel analizler için mtDNA T16189C varyantına sahip vaka sayısının (toplam 3 birey) yetersiz olması nedeniyle mtDNA T16189C varyantının mtDNA kopya sayısı üzerine etkisi araştırılamamıştır. Sonuç olarak kanserleşme potansiyeli yüksek olan soğuk nodüllerde sıcak nodüllere göre mtDNA kopya sayısında daha fazla azalma görüldüğü tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, literatürde yer alan mtDNA kopya sayısındaki azalmanın insan kanserlerinde tümorogenez süreci ile ilişkili olduğuna dair bilgileri desteklemektedir. **Anahtar kelimeler:** Tiroit Nodülleri, Papiller Tiroit Kanseri, mtDNA Kopya Sayısı

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER IN FUNCTIONAL AND NON-FUNCTIONAL THYROID NODULES AND PAPILLARY THYROID CARCINOMAS IN TURKISH COMMUNITY

Şeyma TEKİN

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Rifat BİRCAN

Thyroid nodules are generally benign and 4%-6.5% of total thyroid nodules are at risk of malignancy. Although about 85% of thyroid nodules are cold, 10% are normal and 5% are hot, according to their functional properties, its prevalence may vary depending on the iodine source in the environment and geographical location. The malignant potential of hot thyroid nodules is 1% or less, and this risk varies between 5% and 15% in cold thyroid nodules. However, papillary thyroid cancer (PTC) is the most common type of cancer among thyroid cancers and covers more than 80% of thyroid cancer cases. However, there are 103-104 copies of mtDNA in each cell. Also, the exact copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) in a cell is not known, and the mtDNA copy number varies between each cell type, depending on the metabolic needs of the cells. There are few publications in the literature on the detection of mtDNA copy changes in benign thyroid nodules and papillary thyroid cancer. The aim of this study; detection of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number changes in functional and nonfunctional thyroid nodules and PTKs in Turkish population and to determine the relationship between tumorigenesis of PTKs and mtDNA copy number changes. DNA samples obtained from 74 hot nodules, 64 cold nodules, and 48 PTC tumor tissues belonging to patients diagnosed with toxic MNG, MNG or PTC, and healthy surrounding tissue samples close to these nodules were included in the study. However, due to technical and financial insufficiency, mtDNA copy number could be determined in 5 nodules of only 5 of 48 PTC patients. Determination of mtDNA copy number was performed by relative quantification method using SYBR green I fluorescent dye on a LightCycler 480 II real-time PCR device. While an increase was observed in mtDNA copy number in 49 (66.2%) of 74 hot nodules scanned, a decrease was observed in 16 (21.6%) nodules and no change was detected in 9 (12.2%). On the other hand, while an increase in mtDNA copy number was observed in 22 (34.4%) of 64 cold nodules scanned, a decrease was observed in 21 (32.8%) nodules and no change was detected in 21 (32.8%) (χ^2 : 15.098; p: 0.001). It was determined that mtDNA copy number increased in 2 of 5 PTK tissues, decreased in 2, and mtDNA copy number did not change in 1 of them. However, the effect of mtDNA T16189C variant on mtDNA copy number could not be investigated due to insufficient number of cases (3 individuals in total) with mtDNA T16189C variant for statistical analysis in the current patient population. As a result, it has been determined that cold nodules with a high cancer potential have a greater decrease in mtDNA copy number than hot nodules. These findings support the information in the literature that the decrease in mtDNA copy number is associated with the tumorigenesis process in human cancers.

Key words: Thyroid Nodules, Papillary Thyroid Cancer, mtDNA Copy Number

2021, 54 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tiroit Bezi.....	3
2.2. Tiroit Nodülleri.....	3
2.2.1. Sıcak/ Normal / Soğuk Nodül.....	4
2.2.2. Benign Nodüller.....	5
2.2.3. Tiroit Bezinde Nodüler Değişim	6
2.3. Papiller Tiroit Kanseri	7
2.4. Mitokondriyal Genom (mtDNA).....	8
2.4.1. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyonu	11
2.4.2. Mitokondriyal DNA'nın Transkripsiyonu.....	12
2.4.3. Mitokondriyal Protein Sentezi.....	13
2.4.4. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	15
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	15
3.1.3. Primerler	15
3.1.4. Kullanılan Bilgisayar Programları.....	16
3.1.5. Hasta Grubu	16
3.2. Yöntem	16
3.2.1. İzole DNA Örneklerinde Spektrofotometrik Saflık ve Miktar Tayini.....	16
3.2.2. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR)	17
3.2.3. İstatiksel Analiz	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	19

4.1. Hasta Grubu	19
4.2. DNA Miktar Tayini	20
4.3. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları.....	32
4.4. Sıcak ve Soğuk Nodüllerin mtDNA Kopya Sayısı Karşılaştırılması	35
4.5. Papiller Tiroit Kanserli Dokuların mtDNA Kopya Sayısı Değişimleri.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
6. KAYNAKLAR	42



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1 PZR reaksiyonu için kullanılan primerler	16
Çizelge 4.1 Tez çalışması kapsamında incelenen hastaların demografik bilgileri	19
Çizelge 4.2 Tiroit dokularından elde edilen DNA miktarlarının kantitatif sonuçları.....	20
Çizelge 4.3 Sıcak nodüle sahip hastaların demografik ve istatistiksel olarak mtDNA kopya sayısı karşılaştırılması.....	35
Çizelge 4.4 Soğuk nodüle sahip hastaların demografik ve istatistiksel olarak mtDNA kopya sayısı karşılaştırılması.....	36
Çizelge 4.5 Sıcak nodül hastaları ile soğuk nodül hastalarının mtDNA kopya sayısı karşılaştırılması.....	36
Çizelge 4.6 Papiller tiroit kanserli hastaların demografik bilgileri ve mtDNA kopya sayısındaki % değişimleri.....	38

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Tiroit bezi anatomisi.....	3
Şekil 2.2 Tiroit nodüllerinin sınıflandırılması (Sıcak/normal/soğuk nodül)	5
Şekil 2.3 Tiroit bezinde nodüler değişim.....	7
Şekil 2.4 İnsan mitokondriyal genomunun haritası	10
Şekil 4.1 Örneklerin referans gen ve hedef gen olarak PZR' de sıralanması.....	33
Şekil 4.2 mtDNA ve nDNA örneklerinin floresan ışımalarının gösterimi	34
Şekil 4.3 mtDNA ve nDNA örneklerinin normalize değerlerinin belirlenmesi	34
Şekil 4.4 Sıcak nodüle sahip hastaların mtDNA kopya sayısındaki % değişimlerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.5 Sıcak nodüle sahip hastaların mtDNA kopya sayısındaki % değişimlerinin karşılaştırılması.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: baz çifti
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
Ct	: Döngü eşiği
CTN	: Soğuk nodül
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
GTP	: Guanozin trifosfat
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HSP	: Ağır zincir promotor bölgesi
HTN	: Sıcak nodül
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-I
IT _{H1} , IT _L	: Ağır zincir ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç yeri
kb	: Kilobaz
LSP	: Hafif zincir promotor bölgesi
MNG	: Multinodüler guatr
mRNA	: Mesajcı RNA
mtDNA	: Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
mtIF-2	: Mitokondriyal translasyon başlatma faktörü
nDNA	: Nüklear deoksiribonükleik asit
nm	: Nanometre
O _H , O _L	: Ağır ve hafif zincir replikasyon orijinleri

PTK	: Papiller tiroit kanseri
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asid
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	: Ribozomal RNA
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TGF- β 1	: Transforme edici büyüme faktörü Beta-1
TMNG	: Toksik multinodüler guatr
tRNA	: Taşıyıcı RNA
TSH	: Tiroit stimule edici hormon; Tirotropin
TSHR	: Tirotropin reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
β	: Beta
γ	: Gama
Δ	: Delta

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez hazırlama çalışması süreçlerinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman destek sağlayan, sabırlı ve anlayışlı çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Rıfat BİRCAN' a,

Yüksek lisans öğrenimim süreci boyunca deneyimlerini esirgmeden yönlendirmeleriyle destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Cenk ARAL ve Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN' e,

Tezimin analiz aşamasında emekleriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Deniz ŞİRİN ve diğer tüm Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli mensuplarına,

Yüksek lisans öğrenimim ve tez hazırlama çalışması süreçlerinde yanımda olan çalışma arkadaşım, kıymetli dostum Nazlı APAYDIN' a,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle yanımda bulunan aileme çok teşekkür ederim.

Haziran 2021

Şeyma TEKİN

Biyolog

1. GİRİŞ

Tiroit nodülleri; benign ve malign olarak tanımlanmaktadır (Tamhane ve Gharib, 2016; Tatlıpınar ve Kartal, 2015). Tiroit nodüllerinin büyük bir çoğunluğu benign yapıdadır ve %4-6,5 oranında malignite riski taşımaktadır (Nguyen vd., 2015; Tamhane ve Gharib, 2016). Tiroit nodülleri sintigrafi taramalarında tiroisitlerde iyot alımındaki azalış veya artışa bağlı olarak fonksiyonel özelliklerine göre normoaktif, hipoaktif (soğuk, fonksiyonel olmayan, normal tiroit dokusuna oranla) ve hiperaktif (sıcak, fonksiyonel olarak nodül dışı bezin süpresyonuna neden olan) nodüller olarak sınıflandırılırlar. Tüm tiroit nodüllerinin yaklaşık %85'i soğuk, %10'u normal ve %5'i sıcak olmasına rağmen, prevalansı ortamdaki iyot kaynağı ve coğrafik konuma göre değişiklik gösterebilir (Krohn vd., 2005; Tosun, 2012). Genel olarak benign nodüller, soliter nodüler ve multinodüler tiroit hastalığı olarak iki gruba ayrılabilir ve malignite riski %0-3'tür (Krohn vd., 2005; Tamhane ve Gharib, 2016). Benign nodüler tiroit hastalıkları, iyot eksikliği olan bölgelerde oldukça yaygın olan heterojen bir gruptan oluşmaktadır (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005). Soliter bir tiroit nodülü, normal boyutlarda ve morfolojide olan bir tiroit bezinde tek bir tiroit nodülü olarak bulunmaktadır (Tatlıpınar ve Kartal, 2015). Multinodüler guatr, birden fazla nodülle birlikte normal parankimal yapının deformasyonu ve tiroitin genişlemesini ifade eder. Bu nodüller boyut, morfoloji ve fonksiyon bakımından önemli ölçüde değişiklik gösterir (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005).

Tümörigenez; onkogenlerin aktivasyonu, tümör süpresörlerin (baskılayıcı) inaktivasyonu ve hücre ölümlerinin yeniden programlanması ile düzenlenen kompleks bir süreçtir. Ayrıca; mitokondri, enerji üretiminden, radikal oksijen türlerinin (ROS) üretilmesinden, kalsiyum homeostazından ve apoptatik sinyalleme düzenlenmesinden sorumlu hayati organeller olarak tümörigenezde önemli bir rol oynar (Yi, Chang, Kim ve Shong, 2017). Tiroit kanseri, kanser çeşitleri arasında en sık görülen endokrin malignitelerinden biri olup insidansı diğer tümörlere göre daha hızlı bir artış göstermektedir (Bircan vd., 2019). Papiller tiroit kanseri (PTK), tiroit kanserleri arasında en sık görülen kanser türüdür ve tiroit kanseri vakalarının %80'den fazlasını kapsamaktadır (Adaş, Adaş, Özüiker ve Akçakaya, 2012; Nguyen vd., 2015).

Her bir memeli hücresi; biri nüklear genom (veya nüklear DNA; nDNA) diğeri mitokondriyal genom (veya mitokondriyal DNA; mtDNA) olmak üzere iki farklı genoma sahiptir. İnsan mtDNA'sı 16,6 kb uzunluğunda, halkasal, çift zincirli DNA molekülüdür. Hücre başına yüksek kopya sayısına sahiptir ve bu sayı hücre tipine göre değişkenlik gösterir. Her bir

hücrede mtDNA'nın 10^3 - 10^4 kopyası bulunmaktadır. mtDNA, nDNA'dan bağımsız olarak replike olabilir (Chatterjee, Mambo ve Sidransky, 2006). Bir hücrede mitokondriyal DNA kopya sayısı kesin olarak bilinmemektedir ve bu sayı hücre tipinin metabolik ihtiyaçlarına bağlı olarak hücre tipleri arasında değişiklik göstermektedir (Dorak, 2007).

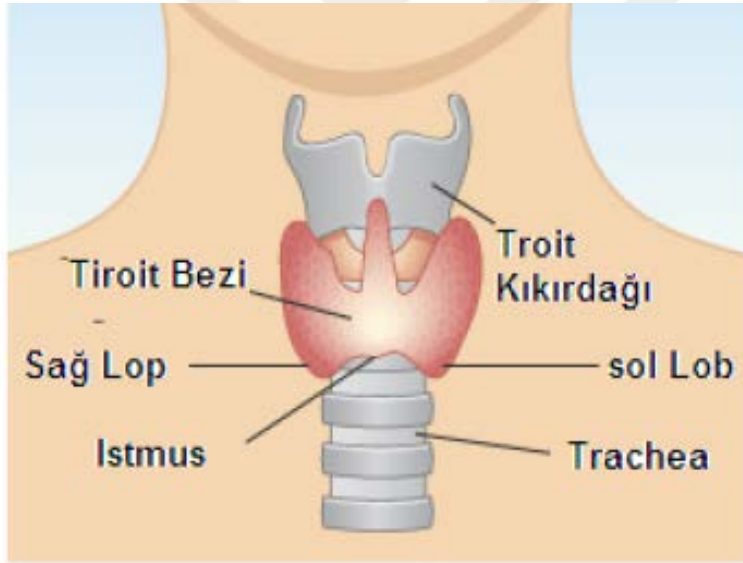
Yapılan bu çalışmanın amacı; Türk toplumunda, fonksiyonel ve nonfonksiyonel tiroit nodülleri ile PTK'lerinde mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısı değişimlerinin saptanması ve PTK'lerinin tümorogenezi ile mtDNA kopya sayısı değişimleri arasındaki ilişkinin belirlenmesidir.



2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Tiroit Bezi

Tiroit bezi, vücutta soluk borusunun ön tarafında ve boğazın tabanında yer alan önemli bir endokrin bezdir. İki kanat şeklinde lob ve bunları birbirine bağlayan bir isthmustan oluşmaktadır (Şekil 2. 1). Tiroit bezinin kontrolü normal koşullar altında hipotalamus-hipofiz arasında sağlanmaktadır. Hipotalamustan salgılanan tripeptid TRH (tirotropin salgılayıcı hormon) hipofiz bezini uyarmakta ve hipofiz bezi glukoprotein hormonu tirotropin (TSH) üretilmesini ve salgılanmasını sağlamaktadır. Hipofiz bezinden salgılanan TSH, tiroit bezinde TSH reseptörlerine bağlanarak triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4) hormonlarının tiroit bezinde sentezini ve salgılanmasını düzenlemektedir. Yapısında iyot içeren T3 ve T4 hormonları; kalp atış hızını, kan basıncını, vücut sıcaklığını ve bazal metabolizma gibi temel fizyolojik olayları kontrol etmektedir (Bircan, 2007; Nguyen vd., 2015).



Şekil 2.1 Tiroit bezi anatomisi (Taşcan, 2014).

2.2. Tiroit Nodülleri

Tanım olarak tiroit nodülü, ön boyun bölgesinde bulunan tiroit bezindeki hücrelerin çoğalmasdır (hiperplaze olmasıdır). Radyolojik olarak; bunlar, tiroit bezinde bulunan ve çevresindeki tiroit parankiminden ayrı lezyonlardır. Genel popülasyonda oldukça yaygındır ve prevalansı yaşla birlikte artış göstermektedir. Tiroit nodülleri, sıklıkla klinik ya da fiziksel muayene sırasında veya çeşitli görüntüleme yöntemleri ile tanı esnasında tesadüfen saptanmaktadır (Nguyen vd., 2015; Popoveniuc ve Jonklaas, 2012; Tamhane ve Gharib, 2016).

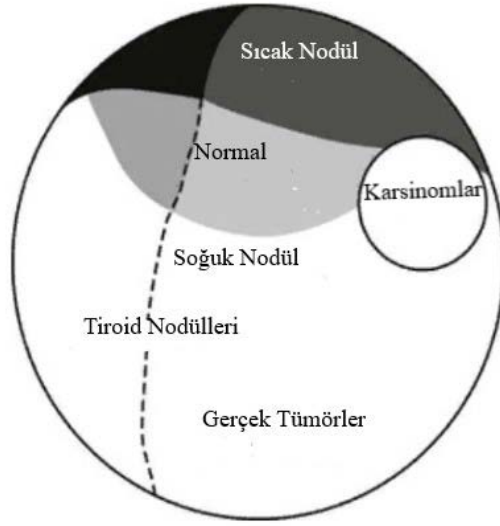
Tiroit nodül görülme sıklığı yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişmekte olup kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden 4 kat daha fazladır. Tiroit nodüler hastalıklarının kadınlarda daha yaygın görülmesinin sebebi cinsiyet hormonlarındaki farklılıklar ile izah edilebilir. Kadınlarda hem östrojen hem de progesteron hormonlarının tiroit nodül oluşumuna katkı sağladığı söylenebilir (Popoveniuc ve Jonklaas, 2012; Tatlıpınar ve Kartal, 2015). Bununla beraber; iyot eksikliği, nodüler tiroit hastalığı için epidemiyolojik bir risk faktörüdür. Nodüler tiroit hastalığının (ve guatr) prevalansı popülasyonun iyot alımı ile ters orantılıdır. Aynı zamanda, çocukluk döneminde veya mesleki uygulamalar esnasında iyonize radyasyona maruz kalınması durumu, çevresel faktörlerden sigara kullanımı ve kişinin vücut ağırlığı da tiroit nodüllerinin gelişimine neden olmaktadır (Krohn vd., 2005; Popoveniuc ve Jonklaas, 2012). Neoplastik, hiperplastik ve enflamatuvar hastalıklar da dahil olmak üzere çok çeşitli patolojik durumlar, tiroit bezinde nodüler gelişime neden olabilmektedir (Tatlıpınar ve Kartal, 2015). Kısaca, nodüler tiroit hastalıklarının gelişimi, cinsiyet ve yaşın yapısal parametreleri ile etkileşime giren çoklu çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bununla birlikte, bu faktörlerin gerçekten guatr veya nodüler tiroit hastalığına yol açıp açmadığı, nihayetinde hastanın genetik geçmişi de göz önüne alınarak değerlendirilmektedir (Krohn vd., 2005).

Tiroit nodülleri; benign [kolloid nodül, Hashimoto tiroiti, basit veya hemorajik (kanamalı) kist, foliküler adenom ve subakut tiroitit] ve malign [Papiller kanser, Foliküler kanser, Hurthle hücre (onkositik) kanser, Anaplastik kanser, Medüller kanser, tiroit lenfoma ve tiroit metastaz kanseri (en yaygın 3 primer metastaz; renal, akciğer ve baş-boyundur)] olarak tanımlanmaktadır (Tamhane ve Gharib, 2016; Tatlıpınar ve Kartal, 2015). Tiroit nodüllerinin büyük bir çoğunluğu benign yapıdadır ve %4-6,5 oranında malignite riski taşımaktadır (Nguyen vd., 2015; Tamhane ve Gharib, 2016).

2.2.1. Sıcak/ Normal / Soğuk Nodül

Nodüller sintigrafi taramalarında tiroisitlerin iyot alımındaki azalış veya artışa bağlı olarak fonksiyonel özelliklerine göre normoaktif, hipoaktif (soğuk, fonksiyonel olmayan, normal tiroit dokusuna oranla) ve hiperaktif (sıcak, fonksiyonel olarak nodül dışı bezin süpresyonuna neden olan) nodüller olarak sınıflandırılırlar. Tüm nodüllerin yaklaşık %85'i soğuk, %10'u normal ve %5'i sıcak olmasına rağmen, prevalansı ortamdaki iyot kaynağı ve coğrafik konuma göre değişiklik gösterebilir (Krohn vd., 2005; Tosun, 2012). Sıcak nodüller; çevre dokuya göre daha yoğun aktivite gösteren nodüllerdir ve tüm nodüllerin %5'ini oluşturmaktadır. Malignite oranları ise %1'in altında görülmektedir. Soğuk nodüller ise, çevre

dokuya göre aktivite göstermeyen nodüllerdir ve tüm tiroit nodüllerinin %80-85'ini kapsamaktadır. Yaklaşık olarak %10-15'i malign tümör oluşumuna neden olmaktadır. Normal (normoaktif) nodül ise nodül dışı doku ile aynı oranda aktivite gösteren nodüller olup tiroit nodüllerinin %10'unu oluşturmaktadır ve malignite riski açısından soğuk nodül gibi kabul edilmektedir (Ulusoy, 2015) (Şekil 2. 2).



Şekil 2.2 Tiroit nodüllerinin sınıflandırılması (Sıcak/normal/soğuk nodül) (Hegedüs, Paschke, Krohn ve Bonnema, 2015).

2.2.2. Benign Nodüller

Genel olarak benign nodüller, soliter nodüler ve multinodüler tiroit hastalığı olarak iki gruba ayrılabilir ve malignite riski %0-3'tür (Krohn vd., 2005; Tamhane ve Gharib, 2016).

Benign nodüler tiroit hastalıkları, iyot eksikliği olan bölgelerde oldukça yaygın olan heterojen bir gruptan oluşmaktadır. Histolojik olarak benign tiroit nodülleri iki kritere göre ayırt edilebilir (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005):

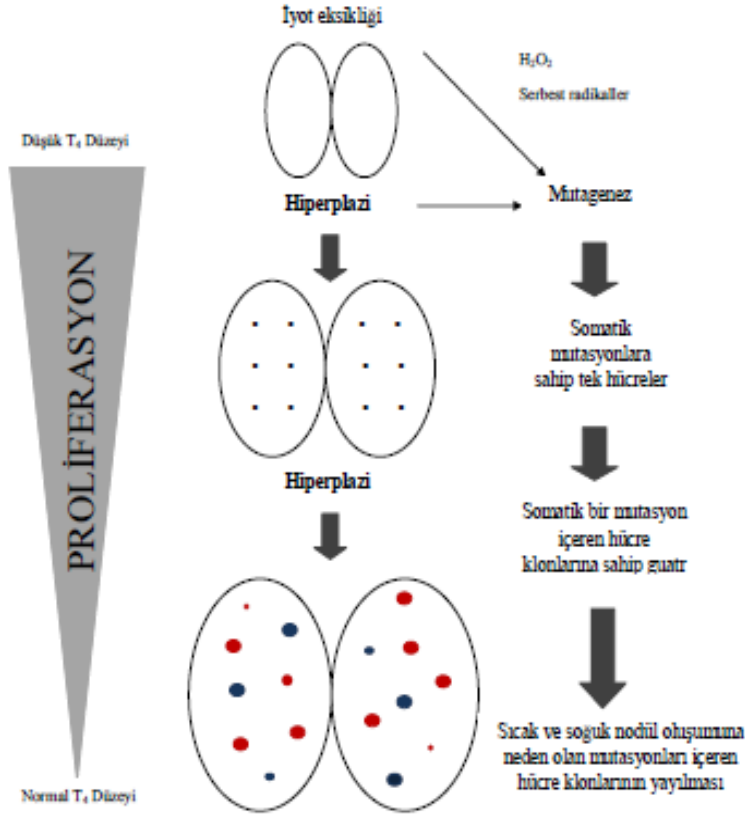
1. Kapsül ile çevrili olan enkapsüle lezyonlar (gerçek adenomlar) veya herhangi bir kapsülle çevrili olmayan adenomatöz nodüller olarak (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005),
2. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization- WHO) sınıflamasına göre morfolojik kriterler göz önünde bulundurularak (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005).

2.2.2.1. Soliter Nodül ve Multinodüler Guatr

Soliter bir tiroit nodülü, normal boyutlarda ve morfolojide olan bir tiroit bezinde tek bir tiroit nodülü olarak bulunmaktadır (Tatlıpınar ve Kartal, 2015). Multinodüler guatr (MNG) ise genellikle aynı tiroit bezinde hiperfonksiyonel, hipofonksiyonel veya normal olarak çalışan tiroit lezyonlarının bir kombinasyonu olarak bulunur. MNG, birden fazla nodülle birlikte normal parankimal yapının deformasyonu ve tiroitin genişlemesini ifade eder. Bu nodüller boyut, morfoloji ve fonksiyon bakımından önemli ölçüde değişiklik gösterir. Zamanla (bazen on yıllar içinde), birçok MNG daha da genişler ve bazıları subklinik hipertirodizm (düşük veya baskılanmış TSH ve normal serbest tiroit hormon düzeyi) geliştirir ve ardından Toksik MNG (TMNG) olarak ortaya çıkar. MNG ve TMNG' nin başlıca epidemiyolojik belirleyicileri; iyot eksikliği, yaş, cinsiyet ve guatr süresidir (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005). Multinodüler tiroitli bir hasta, soliter nodülü olan bir hasta ile aynı malignite riskine sahiptir ve nodül sayısından bağımsızdır. Bununla birlikte nodül sayısı arttıkça nodül başına malignite olasılığı azalır (Popoveniuc ve Jonklaas, 2012).

2.2.3. Tiroit Bezinde Nodüler Değişim

Tiroit nodül oluşumuna yol açabilecek olaylar üç adımda değerlendirilebilir. İlk adımda; iyot eksikliği, besinsel guatrojenler veya otoimmünite yaygın tiroit hiperplazisine neden olur. Daha sonra, bu aşamada H_2O_2 gibi serbest radikallerin etkisine bağlı oluşabilecek bir DNA hasarı ile birlikte tiroit hiperplazisi ile artan proliferasyon, bir mutasyon taşıyan daha fazla sayıda hücre ile daha yüksek mutasyon yüküne neden olur. Bu spontan mutasyonların bazıları (Ör; TSHR ve $G_{s\alpha}$ mutasyonları) tiroitin büyümesini ve fonksiyonunu uyaran cAMP sinyal ileti yolağının aktivasyonunu sağlar. Son olarak, proliferatif bir tiroit büyüme faktörünün ifadesinde [IGF-I, TGF- β 1 veya EGF (epidermal büyüme faktörü)] artışa 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 sıcak tiroit nodüllerine dönüşecek küçük odaklar oluşturabilirler. Sıcak tiroit nodüllerinde meydana gelen somatik mutasyonlar, tiroit hücrelerinde hem büyümeyi hem de hücresel işlevlerin başlamasını sağlarken soğuk tiroit nodüllerinin gelişiminde meydana gelen mutasyonlar (ras mutasyonları ve RAS/RAF/MEK/ERK/MAP sinyal ileti yolağındaki diğer mutasyonlar) sadece hücre proliferasyonunun oluşmasını sağlamaktadır (Bircan, 2007; Krohn vd., 2005) (Şekil 2. 3).



Şekil 2.3 Tiroit bezinde nodüler değişim. Tiroit nodüllerinin gelişiminde başlangıç noktası olarak iyot eksikliği ile indüklenen bir hiperplazidir. İyot eksikliği, mitogenez H_2O_2 gibi serbest radikal üretimi ile doğrudan veya hücre bölünme sayısı ve proliferasyonda meydana getirdiği artış ile dolaylı olarak indükleyerek hiperplazi hücre klonlarını oluşturur. Bu klonlardan bazıları soğuk nodül (mavi noktalar) ve bazıları ise sıcak nodül (kırmızı noktalar) oluşumuna neden olan somatik mutasyonları içerirler (Bircan, 2007).

2.3. Papiller Tiroit Kanseri

Tümörigenez; onkogenlerin aktivasyonu, tümör süpresörlerin (baskılayıcı) inaktivasyonu ve hücre ölümlerinin yeniden programlanması ile düzenlenen kompleks bir süreçtir. Ayrıca; mitokondri, enerji üretiminden, radikal oksijen türlerinin (ROS) üretilmesinden, kalsiyum homeostazından ve apoptatik sinyalleme düzenlenmesinden sorumlu hayati organeller olarak tümörigenezde önemli bir rol oynar (Yi vd., 2017).

Tiroit kanseri, kanser çeşitleri arasında en sık görülen endokrin malignitelerinden biri olup insidansı diğer tümörlere göre daha hızlı bir artış göstermektedir (Bircan vd., 2019). Tiroit kanseri, 2017 Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı resmi kanser raporuna göre Türkiye’de her iki cinsiyette üçüncü en yaygın görülen malignite (%12) olup hem de Türk kadınları arasında ikinci en yaygın görülen malignitedir (%12) (Bircan vd., 2019; <http://kanser.gov.tr>). Her ne kadar tiroit kanserinin ölüm oranı göreceli olarak düşük olsa da, hastalık nüksü ve

devamlılık oranı yüksektir ve bu da artan tedavi ve hasta morbidite ve mortalitesi ile ilişkilidir (Xing, 2013). Tiroit kanseri kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 3: 1 oranında daha sık görülür ve beyaz ve Asya/ Pasifik Adalı popülasyonlarda diğer popülasyonlardan daha yaygındır. Tiroit kanseri, herhangi bir yaş grubunda görülebilir, ancak en fazla 45- 54 yaşları arasındaki erişkinlerde görülür ve ortalama tanı yaşı 50'dir (Nguyen vd., 2015).

Farklı hücresel orijinleri, özellikleri ve prognozu ile birlikte birçok histolojik tip ve alt tipte tiroit kanseri vardır. Tiroit kanserleri, tiroit dokusunun epitelyal ve epitelyal olmayan kısımlarından gelişmektedir. Tiroit foliküler epitelinden; papiller, foliküler ve anaplastik kanserler, parafoliküler hücrelerinden ise medüller kanser köken almaktadır (Adaş vd., 2012; Xing, 2013).

Klinik olarak, tiroit kanseri 2 kategoriye ayrılmıştır (Nguyen vd., 2015):

1. Papiller ve foliküler kanserler dahil olmak üzere iyi- diferansiye (farklılaşmış) tiroit kanseri (Nguyen vd., 2015),
2. Medüller ve anaplastik kanser dahil olmak üzere kötü- diferansiye tiroit kanserleri (Nguyen vd., 2015).

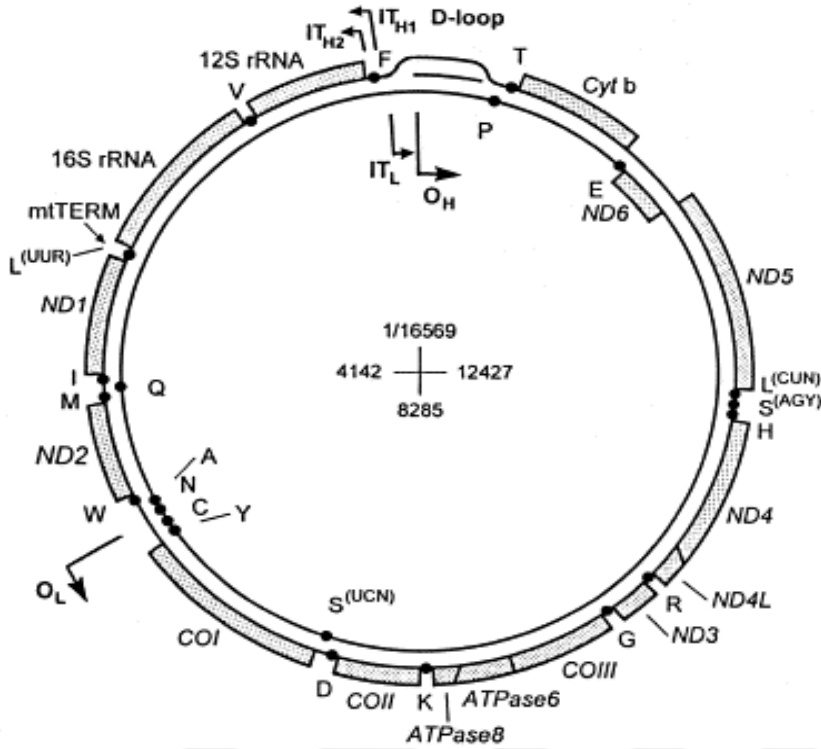
PTK, tiroit kanserleri arasında en sık görülen kanser türüdür ve tiroit kanseri vakalarının %80'den fazlasını kapsamaktadır (Adaş vd., 2012; Nguyen vd., 2015). PTK en az agresif tiroit kanser türüdür; çünkü yavaş büyüme ve metastaz yapma eğilimindedir. PTK, lenfatik olarak yayılma göstermekte ve kadınlarda görülme oranı erkeklere göre 3 kat daha fazla olmaktadır. Bununla birlikte, çocukluk çağında radyasyona maruz kalma, genetik değişiklikler, büyüme faktörleri gibi birçok faktör PTK riskini arttırmaktadır. PTK'lerinde yaş, tümör çapı, yumuşak ve çevre dokuya invazyon ile uzak metastaz en önemli prognostik faktörlerdir (Adaş vd., 2012; Gonzalez-Gonzalez vd., 2011; Nguyen vd., 2015). Bir ebeveyn veya kardeşte PTK geçmişi, hastadaki kanser gelişme riskini 3-6 kat artırır (Popoveniuc ve Jonklaas, 2012).

2.4. Mitokondriyal Genom (mtDNA)

Mitokondri; ATP üretimi, kalsiyum homeostazı, apoptoz ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde kilit rol oynayan bir organeldir (Tipirisetti vd., 2014). Bununla beraber ökaryotik hücrelerin, her biri mitokondriyal genomun çok sayıda kopyasını taşıyan yüzlerce mitokondri içermektedir (Kulawiec, Salk, Ericson, Wanagat ve Bielas, 2010). Bir hücredeki mitokondri sayısı organizma ve doku tipine göre büyük ölçüde değişiklik

göstermektedir. Mitokondri ve mtDNA'lar kalıtsal olarak bir sonraki nesile oosit yoluyla geçer. Dolayısıyla, sadece maternal olarak kalıtılır (Brandon, Baldi ve Wallace, 2006; Chinnery ve Hudson, 2013).

Her bir memeli hücresi; biri nüklear genom (veya nüklear DNA; nDNA) diğeri mitokondriyal genom (veya mitokondriyal DNA; mtDNA) olmak üzere iki farklı genoma sahiptir. İnsan mtDNA'sı 16,6 kb uzunluğunda, halkasal, çift zincirli DNA molekülüdür. Hücre başına yüksek kopya sayısına sahiptir ve bu sayı hücre tipine göre değişkenlik gösterir. Her bir hücrede mtDNA'nın 10^3 - 10^4 kopyası bulunmaktadır. mtDNA, nDNA'dan bağımsız olarak replike olabilir (Chatterjee vd., 2006). İnsan mtDNA'sı, 37 gen kodlamaktadır. Bu genlerin 13'ü oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) sistemine ait polipeptidleri kodlarken, 22'si mitokondriyal taşıyıcı RNA'ları (tRNA) ve 2'si de mitokondriyal ribozomal RNA'ları (12S-16S rRNA) kodlar. Bununla beraber, mtDNA'nın 2 komplementer zinciri guanin içeriğine göre ağır (H) ve hafif zincir (L) olarak adlandırılır ve ağır zincir guanin bakımından zenginken hafif zincir ise sitozin bakımından zengindir (Aral ve Özer, 2007; Brandon vd., 2006). Ağır zincirde; 2 rRNA geni, 14 tRNA geni ve 12 polipeptid kodlanırken, hafif zincirde ise 8 tRNA geni ve 1 polipeptid kodlanır. Memeli mtDNA'sı olağanüstü bir ekonomik organizasyon gösterir ve histon proteinleri içermezler. Diğer taraftan DNA paketlenmesinde mitokondriyal transkripsiyon faktörlerinin rolüne dair bilgiler mevcuttur. Bu organizasyondaki genler introna sahip değildir ve kontrol bölgesi dışında genler arası diziler yoktur ya da birkaç bazla sınırlıdır. mtDNA'dan kodlanan hem tRNA hem de rRNA genleri küçüktür. Protein kodlayan genlerin bazıları üst üste gelebilir ve çoğu durumda sonlanma kodonlarının yarısı kodlanmaz. Ancak mesajcı RNA'ların (mRNA) poliadenilasyonu tarafından posttranskripsiyonel olarak bu proteinler üretilir (Taanman, 1999) (Şekil 2. 4).



Şekil 2.4 İnsan mitokondriyal genomunun haritası. Dış daire, genlerin çoğunu içeren H-zinciri temsil eder; iç daire L-zinciri temsil eder. D-halkası üç zincirli bir yapı olarak gösterilmiştir. H-zinciri (O_H) ve L-zinciri (O_L) replikasyonunun başlangıç yerleri ve DNA sentezinin yönü uzun bükülmüş oklarla gösterilmiştir; transkripsiyon bölgelerinin başlatılması (IT_L , IT_{H1} , IT_{H2}) ve RNA sentezinin yönü kısa bükülmüş oklarla gösterilmektedir. Mitokondriyal transkripsiyon terminatörünün ($mtTERM$) bağlanma yeri belirtilir. Ribozomal RNA genleri: 16S, 12S, Kompleks I genleri: NADH dehidrojenaz (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6), Kompleks III genleri: Sitokrom c Oksidoredüktaz (Cyt b), Kompleks IV genleri: Sitokrom oksidaz (COI, COII, COIII), Kompleks V genleri: ATP sentaz (ATP6, ATP8) (Taanman, 1999).

mtDNA üzerinde kodlama yapmayan kontrol bölgesi 16,024 ile 576 nükleotid pozisyonlarında bulunur. Bu bölgede 3 korunmuş dizi bloğu, 3 zincirli bir D-loop bölgesi ve mitokondriyal transkripsiyon için enhancer ve promotor dizileri ile aynı zamanda ağır zincir için replikasyon orijini bulunur (Aral ve Özer, 2007; Taanman, 1999). Mitokondri, genomunu ifade etmek için gerekli mekanizmalar içermesine rağmen, bu mekanizmaların çalışmasında rol alan protein bileşenlerinin tamamı nDNA tarafından kodlanır (Carew ve Huang, 2002).

Nükleer DNA; mtDNA polimeraz γ , mtRNA polimeraz, mitokondriyal ribozomal proteinler, mitokondriyal metabolizma enzimleri vs. dahil olmak üzere mitokondriyal polipeptitlerin çoğunu kodlar. Bu proteinler için genler nükleusta replike ve transkribe olur. mRNA'lar, sitozolik ribozomlar üzerinde proteine çevrilir ve mitokondriyal proteinler, özgün peptid dizileri kullanılarak seçici olarak mitokondri içerisine aktarılır. Her hücre yüzlerce mitokondri ve binlerce mtDNA içerir (Brandon vd., 2006).

mtDNA, koruyucu histon proteinlerinin eksikliği, DNA onarımının sınırlı oluşu ve üretilen reaktif oksijen türlerinden (ROS) dolayı nDNA'ya göre 10-20 kat daha fazla mutasyon oranına sahiptir (Smits, Smeitink ve Heuvel, 2010).

2.4.1. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyonu

Bir hücre içinde, mtDNA replikasyonu yarı otonomdur ve hücre döngüsünün S fazıyla senkronize değildir (Carew ve Huang, 2002). nDNA'nın aksine mtDNA replikasyonu, hücre döngüsü tarafından yönetilmez (Chinnery ve Hudson, 2013). Mitokondriyal ve nükleer genom arasında etkileşim olmasına rağmen, mtDNA replikasyonu nükleer genomdan ayrı gerçekleşir. mtDNA'nın 2 zinciri replikasyon için iki ayrı orijine sahiptir. Ağır zincir replikasyon orijini D-loop içerisinde bulunur ve hafif zincir promotor (LSP) bölgesinin aşağısında yer alır. Buna karşılık hafif zincir replikasyon orijini O_H 'den itibaren mtDNA'nın 2/3'si kadar uzakta yer alır. Mitokondriyal replikasyon mitokondriyal transkripsiyon ile yakından ilişkili olup ağır zincir sentezi ile O_H 'da başlar ve yeni sentezlenen ağır zincir hemen hemen O_L 'yi geçtikten sonra ters yönde O_L üzerinde hafif zincir sentezi başlatılmaktadır (Aral, 2007; Brandon vd., 2006; Smits vd., 2010; Taanman, 1999) (Şekil 2. 4).

Ağır zincir sentezinin başlaması için hafif zincir transkripsiyon başlangıç yerinde (IT_L) kısa mitokondriyal transkriptler primer olarak işlev görür. Hafif zincir transkripsiyonunun başlaması ile mtDNA replikasyonu için RNA primeri oluşumunun başlaması arasında bir fark yoktur (Taanman, 1999). D loop bölgesinde yer alan promotor bölgede mitokondriyal RNA polimeraz yeni bir RNA primeri sentezledikten sonra O_H yukarısında evrimsel olarak korunmuş üç dizi bloğunda RNA-DNA hibridi oluşur ve bu diziler CSBI, CSBII ve CSBIII olarak adlandırılır. Replikasyon için gerekli olan primer ve mitokondriyal DNA polimeraz (DNA polimeraz γ) mtDNA'da yeni bir zincir sentezini başlatır (Aral, 2007; Brandon vd., 2006; Taanman, 1999). Aynı zamanda replikasyonun başlaması bağlanma yerine ya da yerlerine nDNA'dan kodlanmış transkripsiyon faktör A'nın bağlanmasıyla gerçekleşir. Replikasyon saat yönünde gerçekleşirken O_L 'ye geldiği zaman mtDNA primazı hafif zincir sentezi için RNA primeri oluşturur ve hafif zincirinin replikasyonu ters yönde başlar (Cummins, 1998; Taanman, 1999). Mitokondriyal replikasyonun sonlandırılması TAS (sonlandırma ilişkili dizi) ile gerçekleşir ve üçlü D-loop yapısı oluşturulur (Brandon vd., 2006; Taanman, 1999).

Mitokondriyal DNA replikasyonunda görev alan DNA polimeraz γ , mitokondriyal DNA sentezini gerçekleştiren bir enzimdir. 5'-3' polimeraz aktivitesine ek olarak 3'-5'

ekzonükleaz aktivitesine de sahiptir ve bu özellik mtDNA'nın replikasyonun doğru gerçekleşmesini sağlar. Aynı zamanda replikasyonda; 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 (Aral, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013; Smits vd., 2010; Taanman, 1999).

2.4.2. Mitokondriyal DNA'nın Transkripsiyonu

nDNA transkripsiyonunda her genin kendine özgü promotor bölgesi varken mtDNA'da ağır zincirde 2 tane (HSP1 ve HSP2) ve hafif zincirde 1 tane promotor (LSP) bölgesi vardır (Chinnery ve Hudson, 2013; Smits vd., 2010). Ağır zincir transkripsiyon başlangıç yeri (IT_{H1}) ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç yeri (IT_L) D-loop'ta birbirlerine 150 bp uzaklıkta bulunur. 15 bp'lik konsensus dizisiyle (5P-CANACC(G)CC(A)AAAGAYA) bir promotor dizisi transkripsiyon başlangıç yerinde bulunur. Ağır zincir transkripsiyonu; ağır zincir promotor (HSP) içerisinde bulunan ve tRNA^{Phe} genine bitişik 561 nükleotid pozisyonunda (IT_{H1}) başlar. Buna karşılık hafif zincir transkripsiyonu; hafif zincir promotor (LSP) içerisinde bulunan 407 nükleotid pozisyonunda (IT_L) başlar. Ağır zincir için 2. transkripsiyon başlangıç yeri; 12S rRNA genine bitişik tRNA^{Phe} geninde 638 nükleotid pozisyonunda (IT_{H2}) yer alır. Bu bölgenin promotor dizisi 15 bp'lik konsensus dizisiyle daha az benzerlik gösterir ve bu yer ağır zincirin transkripsiyonu için IT_{H1}'den daha az aktiftir (Aral, 2007; Taanman, 1999) (Şekil 2. 4).

Transkripsiyon; mitokondriyal polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Mitokondriyal polimerazın transkripsiyonu başlatabilmesi için mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (mtTFA), mitokondriyal transkripsiyon faktörü B1 ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü B2'ye (TFB1M ve TFB2M) ihtiyaç duymaktadır (Aral, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013; Smits vd., 2010).

Transkripsiyon mtDNA üzerinde polisistronik bir mRNA oluşturur (yani, mRNA, bir molekül içindeki tüm genleri ihtiva etmektedir). IT_{H1}'de başlayan transkripsiyon 16S rRNA geninin aşağısında 3' ucunda sonlandırılır. Böylece verimli mRNA ve tRNA'ların çoğu ağır zincirde kodlanır. IT_L'de başlayan transkripsiyon IT_{H2} gibi polisistronik mRNA oluşmasıyla sonuçlanır. IT_{H1}'de başlayan transkripsiyon 16S rRNA/tRNA^{Leu} sınırında tRNA'daki üç tekrar dizisi ile mitokondriyal sonlanma faktörünün (mTERF veya mtTERM) bu dizilere bağlanmasıyla gerçekleşir (Aral, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013; Smits vd., 2010; Taanman, 1999).

2.4.3. Mitokondriyal Protein Sentezi

Mitokondriyal protein sentezi sitoplazmik protein sentezinden bağımsız olarak mitokondriyal ribozomlarda veya mitoribozomlarda mitokondri organelinin matriksinde gerçekleşir (Taanman, 1999). Mitoribozomlar düşük RNA içeriğine sahiptir ve ~39S ve ~28S (~55S düşük sedimantasyon) ribozomal alt birimler mtDNA tarafından kodlanan 16S ve 12S rRNA içerir. 5S rRNA memeli mitoribozomlarında bulunmaz (Taanman, 1999). Mitokondriyal protein sentezinde görev alan tRNA'lar mtDNA tarafından kodlanırlar ve sitoplazmik tRNA'lara göre çok daha küçüktürler. Aynı zamanda kodon kullanımı da sitoplazmik genetik koddan farklılık gösterir (Aral, 2007). Sitoplazmik genetik kodda UGA(STOP) 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, 2007; Chinnery ve Hudson, 2013; Smits vd., 2010).

Mitokondriyal mRNA'ların 5' ucunda 7-metilguanilat şapka yapısı yoktur ve bu yüzden sitozoldeki translasyonda görülen şapka yapısının translasyonda görevli proteinler tarafından tanınma işlemi gerçekleşmez (Taanman, 1999).

Translasyon sırasında küçük ribozomal alt birim mesajcıya bağlandıktan sonra yardımcı faktörler aracılığıyla mRNA'nın 5' ucuna hareket eder. Memeli mitokondriyelerinde tanımlanmış tek başlatma faktörü mtIF-2'dir. Bu protein faktörü GTPaz ailesine aittir ve GTP ile bir kalıp varlığında küçük ribozomal alt birime fmet-tRNA bağlanmasını teşvik eder. GTP, mtIF-2 ile küçük alt birim arasındaki yakınlığı artırır ve fmet-tRNA'nın translasyon kompleksine katılmasını sağlar. GTP'nin hidrolizi ile mtIF-2 serbest kalır ve büyük ribozomal alt birimin eş zamanlı bağlanmasıyla ~55S başlatma kompleksi oluşur. Memelilerde 3 mitokondriyal uzama faktörü mtEF-Tu, mtEF-Ts ve mtEF-G olarak tanımlanmıştır (Chinnery ve Hudson, 2013; Taanman, 1999).

Translasyon sonlandırması ise sadece, durdurma kodonlarını (UAA ve UAG) tanıyan ve terminal tRNA ve yeni doğan peptit arasındaki bağın hidrolizini tetikleyen mitokondriyal serbest bırakma faktörü 1a (mtRF1a) tarafından gerçekleştirilir (Chinnery ve Hudson, 2013).

2.4.4. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı

Bir hücrede mitokondriyal DNA kopya sayısı kesin olarak bilinmemektedir ve bu sayı hücre tipinin metabolik ihtiyaçlarına bağlı olarak hücre tipleri arasında değişiklik göstermektedir (Dorak, 2007).

Literatürde çeşitli kanser türleri üzerine yapılan çalışmalarda, mtDNA kopya sayısında meydana gelen değişimlerin kanserle ilişkisi olduğuna dair veriler yer almaktadır. Ayrıca, literatürde, böbrek, karaciğer, yumurtalık, mide ve meme kanserinde tümör dokularında çevre dokuya kıyasla mtDNA içeriğinde azalma olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, aralarında papiller tiroit kanserinin de bulunduğu renal onkositoma, tükürük bezi onkositomu, baş ve boyun kanseri, kolorektal kanserler, endometriyal kanserler, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanserlerinin çoğunda mtDNA kopya sayısında artış olduğu öne sürülmektedir (Charterjee, Dasgupta ve Sidransky, 2011; Lee ve Wei, 2009; Mambo vd., 2005). Ancak, literatürde yer alan farklı bir çalışmada ise papiller tiroit kanserinde mtDNA içeriğinde artış ya da azalış bulunmadığı rapor edilmiştir (Reznik vd., 2016). Dolayısıyla, halen literatürde kullanılan moleküler yöntemlere, metodolojiye, örnek grubu ve sayısına bağlı olarak elde edilen veriler arasında tutarsızlıklar bulunmaktadır. Fakat genel olarak literatürde, mtDNA kopya sayısındaki değişimlerin kanser türüyle ilişkili olduğu öne sürülmektedir.

Kanser olgularında mtDNA kopya sayısı birkaç faktöre bağlı olarak değişim gösterebileceği öne sürülmektedir. Bunlardan birisi mutasyonun/varyasyonun olduğu mitokondriyal genom bölgesidir. Örneğin, yapılan çalışmalar mtDNA D-loop bölgesi mutasyonlarının mtDNA kopya sayısının azalmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Öte yandan kanserlerde mtDNA içeriğindeki artışın, oksidatif stresin artmasıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Charterjee vd., 2011; Lee ve Wei, 2009).

Bununla beraber benign tiroit nodüllerinde mtDNA kopya sayısı değişimleriyle ilgili herhangi bir bilgi literatürde mevcut değildir. Dolayısıyla, literatürdeki bilgiler ışığında yapılan bu çalışmanın amacı; Türk toplumunda, fonksiyonel ve nonfonksiyonel tiroit nodülleri ile PTK'lerinde mitokondriyal DNA kopya sayısı değişimlerinin saptanması ve PTK'lerinin tumörogenezi ile mtDNA kopya sayısı değişimleri arasındaki ilişkinin 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

Buz makinası, Bluewave BW, Çin

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Otoklav, Tek Bal, Türkiye

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

Vorteks, İsolab

Light Cycler® 480 II Roche, İsviçre

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Etil alkol, Sigma, ABD

Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Kiti, Almanya. Kit içeriği; ND1 geni primeri, B2M geni primerleri, SYBR gren I master mix.

3.1.3. Primerler

Çalışmada PZR esnasında kullanılan primerler Sentromer Ltd. Şti'den temin edilmiştir. Primerlerin dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 PZR reaksiyonu için kullanılan primerler

Primer	Gen Bank No	Tm (°C)	Primer Dizileri (5'→3')
ND1	NC_012920.1	58	F; 5'-CCCTAAAACCCGCCACATCT-3'
			R; 5'-GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT-3'
B2M	NG_012920.1	58	F; 5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTCAA-3'
			R; 5'-TCTCTCTCCATTCTTCAGTAAGTCAACT-3'

3.1.4. Kullanılan Bilgisayar Programları

Microsoft word, ABD

Microsoft excel, ABD

LightCycler®480 software release 1.5.039 yazılımı

3.1.5. Hasta Grubu

Yapılan bu çalışma için Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan Onay alınmıştır. Çalışmaya; Toksik MNG veya MNG tanısı konulmuş hastalara ait 74 sıcak nodül (HTN), ve 64 soğuk nodül (CTN), ve 48 PTK örneği ve çevre doku dahil edilmiştir. Olgular 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 TMNG hastaları arasından seçilmiş ve benign tiroit nodüllerinin (sıcak ve soğuk nodüller) 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 (Bircan, 2007). İzole DNA'ların 260 nm (A_{260}) ve

280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri (A_{280}) spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR)

PZR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere primelerin bağlanması ve uzaması esasına dayanan enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. Bir PZR döngüsü denatürasyon, eşleşme ve sentez olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon aşamasında DNA çift zinciri açılır ve diğer aşamada primerler bağlanarak eşleşme gerçekleşir. Son aşama olan sentezde ise primerlerin uzamasıyla birlikte DNA parçalarının üssel olarak artışı gerçekleşir (Garibyan ve Avashia,2013; Lynch ve Brown, 1990).

Mitokondriyal DNA kopya sayısının belirlenmesi; Luo ve arkadaşlarınca belirlenen kriterlere göre gerçek zamanlı PZR (real- time PCR) rölatif kantifikasyon yöntemi SYBR green I floresan boyası kullanılarak gerçekleştirildi (Luo vd., 2019).

Gerçek-zamanlı PZR, 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen ve araştırmacıların spesifik DNA parçalarını milyar kattan daha fazla çoğaltmalarını sağlayan ve gen ekspresyonunun seviyelerini ölçmek için kullanılan PZR yöntemidir (Ponchel vd., 2003; Valasek ve Repa, 2005). Rölatif kantifikasyonda ise, bilinmeyen hedef PZR ürünü bilinen PZR ürünü ile karşılaştırılır. Bunun için deneysel koşullar altında değişmesi beklenmeyen Housekeeping genleri (β aktin gibi) uygun bir iç standart olarak işlev görür (Heid, Stevens, Livak ve Williams, 1996; Valasek ve Repa, 2005). SYBR Green I, çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. Bir reaksiyon tüpündeki DNA miktarı arttıkça SYBR Green I daha fazla DNA'ya bağlanır ve floresan sinyal miktarı da artar. Bu şekilde reaksiyon tüpünde herhangi bir DNA amplifikasyonu ölçülür (Dorak, 2007; Valasek ve Repa, 2005). DNA amplifikasyonları belirli bir floresans seviyesine ulaşmak için gerekli olan PZR döngülerinin sayısı ("döngü eşiği" Ct) olarak verilir. İlk PZR döngüleri sırasında, PZR ürünlerine bağlı SYBR Green I tarafından yayılan floresans sinyali genellikle arka planın üzerine kaydedilemeyecek kadar zayıf olmaktadır. PZR'nin üstel fazı sırasında, floresans her döngüde ikiye katlanır ve bu durum iyi optimize edilmiş bir testin önemli bir göstergesidir. 30 ila 35 döngüden sonra, floresans sinyalin yoğunluğu genellikle düzleşmeye başlar ve PZR'nin doyumluğa ulaştığını gösterir. Ct, bir numunedeki ilk hedef miktarı ile korelasyon gösterdiğinden, bir hedefin değerine göre nispi konsantrasyonu, aynı floresans seviyesine

ulaşmak için gerekli olan döngü sayısındaki ($\Delta C_t = C_{t \text{ hedef gen}} - C_{t \text{ referans gen}}$) farkta yansıtılır (Dorak, 2007).

Yapılan bu çalışmada benign ve malign tiroit nodüllerinde mtDNA kopya sayısı değişimlerinin tespiti gerçek-zamanlı PZR’da rölatif kantifikasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla gerçek-zamanlı PZR’ları 2 ayrı tüpte son hacimleri 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi.

1. reaksiyon tüpü: Mitokondriyal gen olan ND1 geni reaksiyonu

9 µl kalıp DNA

0.5 µl ileri primer

0.5 µl geri primer

10 µl SYBR Green I master mix kiti

2. reaksiyon tüpü: Nüklear gen olan B2M geni reaksiyonu

9 µl kalıp DNA

0.5 µl ileri primer

0.5 µl geri primer

10 µl SYBR Green I master mix kiti

Son hacim steril su ile 20 µl’ye tamamlandı. Bu işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi ve son olarak örnekler 96 kuyucuklu plakalara aktarılarak LightCycler 480 marka gerçek-zamanlı PZR cihazına yerleştirildi. Gerçek zamanlı PZR programı olarak aşağıda belirtilen protokol uygulandı.

- 95 °C’de 5 dakika ön denatürasyon
 - 95 °C’de 10 saniye denatürasyon
 - 60 °C’de 10 saniye eşleşme
 - 72 °C’de 30 saniye sentez
- } 40 döngü

Elde edilen sonuçlar, LightCycler®480 software release 1.5.039 yazılımı üzerinden rölatif kantifikasyon analiz metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.3. İstatiksel Analiz

Yapılan bu çalışma kapsamındaki hastaların mtDNA kopya sayılarının artışı ve azalışı Pearson ki-kare testi ile değerlendirildi. “ $p \leq 0.05$ ” küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hasta Grubu

Çalışmaya klinik ve patolojik tanısı konulmuş 135 hasta dahil edilmiş olup toplamda 307 doku örneği çalışılmıştır. Bu dokulardan 48 çevre doku ve 138 nodül örneklerin analizi yapılmıştır. Ancak hastaya ait 74 sıcak nodül, 64 soğuk nodül ve 5 PTK dokusu ve çevre dokularında mtDNA kopya sayısı tayini yapılabilmektedir (Çizelge 4.1). Diğer hastalara ait çevre tiroit dokusunun bulunmaması veya arşivdeki mevcut DNA örneklerinin gerçek-zamanlı PZR reaksiyonlarının çalışmaması gibi teknik ve maddi yetersizlikten dolayı diğer örnekler için mtDNA kopya sayısı değişimlerine ilişkin analizler yapılamamıştır.

Sıcak nodülü bulunan 56 kadın ve 15 erkek olmak üzere toplam 71 hastanın 74 nodülü ve 71 sağlıklı çevre dokusu mevcuttur. Bu hastaların 16 tanesi sigara içerken 47 tanesi sigara içmemektedir ve aile öyküsü 28 hastada varken 30 hastada mevcut değildir.

Soğuk nodülü bulunan 57 kadın ve 7 erkek olmak üzere toplam 64 hastanın 64 nodülü ve 64 sağlıklı çevre dokusu mevcuttur. Bu hastaların 11 tanesi sigara içerken 39 tanesi sigara içmemektedir ve aile öyküsü 15 hastada varken 33 hastada mevcut değildir. Hastaların bir bölümünde demografik bilgiler eksiktir.

Çizelge 4.1 Tez çalışması kapsamında incelenen hastaların demografik bilgileri

Nodül Tipi	Kişi Sayısı	Nodül Sayısı	Cinsiyet	Sigara Kullanımı*		Aile Öyküsü**	
				İçiyor	İçmiyor	Var	Yok
HTN	71	74	56K, 15E	16	47	28	30
CTN	64	64	57K, 7E	11	39	15	33

*18 hastanın sigara içme durumu bilinmemektedir.

**17 hastanın aile öyküsü durumu bilinmemektedir.

HTN: Sıcak Nodül, CTN: Soğuk Nodül

K: Kadın, E: Erkek

4.2. DNA Miktar Tayini

Bölümümüzde daha önce DNA izolasyonu yapılarak arşivlenen tiroit dokularının DNA miktarı ve saflığı belirlendi. Örnek DNA'ların 260 nm (A_{260}) ve 280 nm dalga boyundaki absorban değerleri (A_{280}) spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi. Elde edilen ölçüm sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Tiroit dokularından elde edilen DNA miktarlarının kantitatif sonuçları

Örnek	A260(nm)	A280(nm)	A260/A280	DNA Miktarı(μ g/ml)
K001	0,018	0,013	1,38	90
K002	0,023	0,016	1,44	115
K003	0,087	0,045	1,93	435
K004	0,038	0,016	2,38	190
K005	0,195	0,113	1,73	975
K006	0,125	0,061	2,05	625
K007	0,216	0,125	1,73	1080
K008	0,062	0,035	1,77	310
K009	0,078	0,062	1,26	390
K010	0,097	0,051	1,90	485
K011	0,025	0,009	2,78	125
K012	0,111	0,071	1,56	555
K013	0,114	0,072	1,58	570
K014	0,09	0,05	1,80	450
K015	0,117	0,058	2,02	585
K016	0,1	0,059	1,69	500
K017	0,01	0,007	1,43	50
K018	0,009	0,004	2,25	45
K019	0,016	0,007	2,29	80

K020	0,028	0,012	2,33	140
K021	0,009	0,004	2,25	45
K022	0,01	0,004	2,50	50
K023	0,107	0,053	2,02	535
K024	0,142	0,08	1,78	710
K025	0,011			55
K026	0,052	0,025	2,08	260
K027	0,052	0,018	2,89	260
K028	0,04	0,028	1,43	200
K029	0,008			40
K030	0,016	0,006	2,67	80
K031	0,023	0,003	7,67	115
K032	0,024	0,012	2,00	120
K033	0,038	0,018	2,11	190
K034	0,024	0,013	1,85	120
K035	0,053	0,028	1,89	265
K036	0,018	0,016	1,13	90
K037	0,132	0,075	1,76	660
K038	0,131	0,076	1,72	655
K039	0,016	0,01	1,60	80
K040	0,074	0,044	1,68	370
K041	0,135	0,087	1,55	675
K042	0,048	0,027	1,78	240
K043	0,175	0,1	1,75	875
K044	0,129	0,081	1,59	645
K045	0,067	0,053	1,26	335

K046	0,03	0,026	1,15	150
K047	0,109	0,079	1,38	545
K048	0,088	0,059	1,49	440
K049	0,168	0,108	1,56	840
K050	0,062	0,041	1,51	310
K051	0,058	0,04	1,45	290
K052	0,061	0,04	1,53	305
K053	0,04	0,027	1,48	200
K054	0,032	0,020	1,60	160
K055	0,025	0,005	5,00	125
K056	0,045	0,018	2,50	225
K057	0,101	0,053	1,91	505
K058	0,075	0,030	2,50	375
K059	0,033	0,022	1,50	165
K060	0,065	0,040	1,63	325
K061	0,033	0,021	1,57	165
K062	0,044	0,030	1,47	220
K063	0,100	0,062	1,61	500
K064	0,089	0,059	1,51	445
K065	0,007	0,012	0,58	35
K066	0,059	0,041	1,44	295
K067	0,052	0,036	1,44	260
K068	0,067	0,048	1,40	335
K069	0,088	0,061	1,44	440
K070	0,045	0,033	1,36	225
K071	0,083	0,055	1,51	415

K072	0,115	0,078	1,47	575
K073	0,025	0,030	0,83	125
K074	0,124	0,081	1,53	620
K075	0,172	0,114	1,51	860
K076	0,009	0,014	0,64	45
K077	0,064	0,045	1,42	320
K078	0,027	0,03	0,90	135
K079	0,024	0,027	0,89	120
K080	0,01	0,01	1,00	50
K081	0,019	0,014	1,36	95
K082	0,053	0,032	1,66	265
K083	0,009	0,01	0,90	45
K084	0,033	0,021	1,57	165
K085	0,046	0,028	1,64	230
K086	0,069	0,043	1,60	345
K087	0,051	0,032	1,59	255
K088	0,434	0,405	1,07	2170
K089	0,168	0,106	1,58	840
K090	0,061	0,038	1,61	305
K091	0,559	0,308	1,81	2795
K092	0,012	0,011	1,09	60
K093	0,036	0,029	1,24	180
K094	0,161	0,099	1,63	805
K095	0,114	0,07	1,63	570
K096	0,093	0,062	1,50	465
K097	0,161	0,09	1,79	805

K098	0,033	0,027	1,22	165
K099	0,072	0,05	1,44	360
K100	0,069	0,043	1,60	345
K101	0,048	0,029	1,66	240
K102	0,278	0,172	1,62	1390
K103	0,26	0,15	1,73	1300
K104	0,111	0,064	1,73	555
K105	0,177	0,093	1,90	885
K106	0,09	0,047	1,91	450
K107	0,242	0,149	1,62	1210
K108	0,016	0,019	0,84	80
K109	0,028	0,026	1,08	140
K110	0,044	0,032	1,38	220
K111	0,139	0,084	1,65	695
K112	0,084	0,064	1,31	420
K113	0,100	0,068	1,47	500
K114	0,033	0,027	1,22	165
K115	0,026	0,028	0,93	130
K116	0,051	0,035	1,46	255
K117	0,026	0,021	1,24	130
K118	0,030	0,027	1,11	150
K119	0,052	0,040	1,30	260
K120	0,112	0,069	1,62	560
K121	0,076	0,046	1,65	380
K122	0,032	0,023	1,39	160
K123	0,087	0,053	1,64	435

K124	0,016	0,013	1,23	80
K125	0,041	0,034	1,21	205
K126	0,021	0,016	1,31	105
K127	0,057	0,044	1,30	285
K128	0,010	0,013	0,77	50
K129	0,088	0,073	1,21	440
K130	0,058	0,048	1,21	290
K131	0,354	0,204	1,74	1770
K132	0,103	0,061	1,69	515
K133	0,049	0,035	1,40	245
K134	0,073	0,058	1,26	365
K135	0,031	0,025	1,24	155
K136	0,035	0,024	1,46	175
K137	0,062	0,040	1,55	310
K138	0,049	0,034	1,44	245
K139	0,175	0,104	1,68	875
K140	0,060	0,044	1,36	300
K141	0,031	0,026	1,19	155
K142	0,043	0,029	1,48	215
K143	0,123	0,073	1,68	615
K144	0,282	0,182	1,55	1410
K145	0,045	0,033	1,36	225
K146	0,202	0,126	1,60	1010
K147	0,075	0,046	1,63	375
K148	0,073	0,049	1,49	365
K149	0,028	0,024	1,17	140

K150	0,084	0,055	1,53	420
K151	0,071	0,045	1,58	355
K152	0,022	0,017	1,29	110
K153	0,015	0,018	0,83	75
K154	0,030	0,023	1,30	150
K155	0,028	0,023	1,22	140
K156	0,052	0,036	1,44	260
K157	0,015	0,015	1,00	75
K158	0,037	0,026	1,42	185
K159	0,015	0,014	1,07	75
K160	0,019	0,016	1,19	95
K161	0,064	0,042	1,52	320
K162	0,033	0,026	1,27	165
K163	0,022	0,018	1,22	110
K164	0,021	0,017	1,24	105
K165	0,020	0,015	1,33	100
K166	0,023	0,018	1,28	115
K167	0,030	0,023	1,30	150
K168	0,042	0,034	1,24	210
K169	0,038	0,26	0,15	190
K170	0,036	0,024	1,50	180
K171	0,038	0,032	1,19	190
K172	0,015	0,010	1,50	75
K173	0,020	0,013	1,54	100
K174	0,016	0,011	1,45	80
K175	0,033	0,027	1,22	165

K176	0,034	0,021	1,62	170
K177	0,022	0,017	1,29	110
K178	0,028	0,020	1,40	140
K179	0,080	0,059	1,36	400
K180	0,033	0,023	1,43	165
K181	0,041	0,028	1,46	205
K182	0,089	0,062	1,44	445
K183	0,023	0,018	1,28	115
K184	0,045	0,030	1,50	225
K185	0,038	0,025	1,52	190
K186	0,021	0,015	1,40	105
K187	0,021	0,015	1,40	105
K188	0,045	0,027	1,67	225
K189	0,028	0,018	1,56	140
K190	0,018	0,013	1,38	90
K191	0,023	0,014	1,64	115
K192	0,024	0,014	1,71	120
K193	0,032	0,020	1,60	160
K194	0,018	0,011	1,64	90
K195	0,072	0,039	1,85	360
K196	0,034	0,021	1,62	170
K197	0,053	0,034	1,56	265
K198	0,035	0,022	1,59	175
K199	0,027	0,019	1,42	135
K200	0,027	0,020	1,35	135
K201	0,037	0,024	1,54	185

K202	0,023	0,015	1,53	115
K203	0,016	0,012	1,33	80
K204	0,028	0,021	1,33	140
K205	0,016	0,013	1,23	80
K206	0,021	0,016	1,31	105
K207	0,094	0,073	1,29	470
K208	0,031	0,022	1,41	155
K209	0,054	0,035	1,54	270
K210	0,034	0,025	1,36	170
K211	0,033	0,022	1,50	165
K212	0,060	0,045	1,33	300
K213	0,020	0,012	1,67	100
K214	0,016	0,010	1,60	80
K215	0,028	0,019	1,47	140
K216	0,032	0,024	1,33	160
K217	0,011	0,007	1,57	55
K218	0,041	0,029	1,41	205
K219	0,043	0,033	1,30	215
K220	0,018	0,011	1,64	90
K221	0,012	0,009	1,33	60
K222	0,030	0,022	1,36	150
K223	0,043	0,030	1,43	215
K224	0,012	0,010	1,20	60
K225	0,019	0,014	1,36	95
K226	0,024	0,017	1,41	120
K227	0,017	0,013	1,31	85

K228	0,027	0,017	1,59	135
K229	0,032	0,020	1,60	160
K230	0,026	0,019	1,37	130
K231	0,014	0,012	1,17	70
K232	0,020	0,013	1,54	100
K233	0,077	0,049	1,57	385
K234	0,016	0,011	1,45	80
K235	0,025	0,018	1,39	125
K236	0,023	0,014	1,64	115
K237	0,021	0,015	1,40	105
K238	0,013	0,009	1,44	65
K239	0,047	0,037	1,27	235
K240	0,033	0,022	1,50	165
K241	0,036	0,025	1,44	180
K242	0,023	0,016	1,44	115
K243	0,081	0,044	1,84	405
K244	0,015	0,012	1,25	75
K245	0,016	0,012	1,33	80
K246	0,018	0,016	1,13	90
K247	0,017	0,015	1,13	85
K248	0,039	0,026	1,50	195
K249	0,026	0,019	1,37	130
K250	0,043	0,028	1,54	215
K251	0,051	0,031	1,65	255
K252	0,021	0,011	1,91	105
K253	0,032	0,019	1,68	160

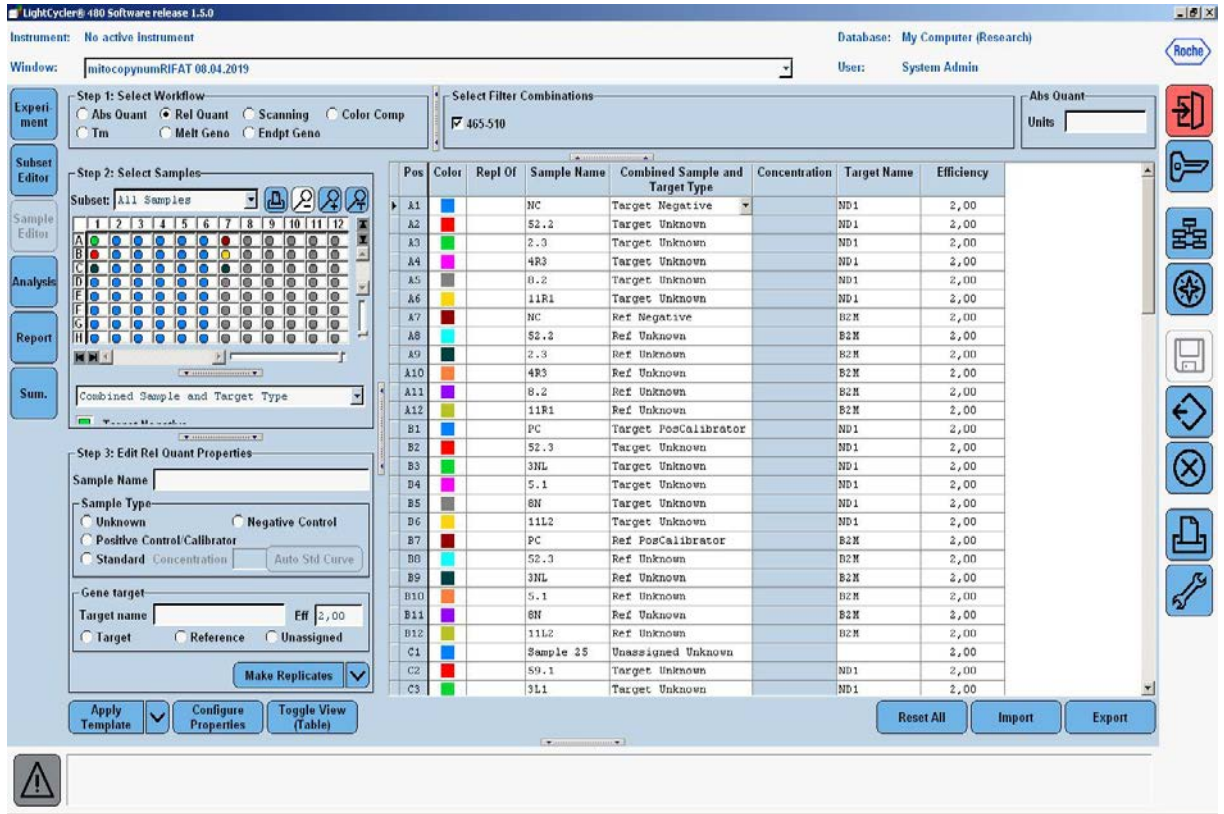
K254	0,019	0,013	1,46	95
K255	0,02	0,013	1,54	100
K256	0,025	0,016	1,56	125
K257	0,019	0,015	1,27	95
K258	0,014	0,01	1,40	70
K259	0,028	0,017	1,65	140
K260	0,023	0,015	1,53	115
K261	0,016	0,01	1,60	80
K262	0,015	0,008	1,88	75
K263	0,03	0,021	1,43	150
K264	0,026	0,016	1,63	130
K265	0,034	0,02	1,70	170
K266	0,016	0,012	1,33	80
K267	0,019	0,015	1,27	95
K268	0,014	0,01	1,40	70
K269	0,024	0,015	1,60	120
K270	0,08	0,066	1,21	400
K271	0,151	0,12	1,26	755
K272	0,031	0,021	1,48	155
K273	0,022	0,013	1,69	110
K274	0,034	0,02	1,70	170
K275	0,022	0,015	1,47	110
K276	0,042	0,036	1,17	210
K277	0,031	0,021	1,48	155
K278	0,052	0,03	1,73	260
K279	0,019	0,016	1,19	95

K280	0,042	0,027	1,56	210
K281	0,084	0,047	1,79	420
K282	0,099	0,086	1,15	495
K283	0,067	0,036	1,86	335
K284	0,03	0,02	1,50	150
K285	0,05	0,032	1,56	250
K286	0,027	0,02	1,35	135
K287	0,036	0,026	1,38	180
K288	0,028	0,025	1,12	140
K289	0,108	0,063	1,71	540
K290	0,011	0,009	1,22	55
K291	0,021	0,017	1,24	105
K292	0,079	0,053	1,49	395
K293	0,046	0,03	1,53	230
K294	0,024	0,016	1,50	120
K295	0,036	0,021	1,71	180
K296	0,017	0,012	1,42	85
K297	0,026	0,019	1,37	130
K298	0,026	0,017	1,53	130
K299	0,037	0,027	1,37	185
K300	0,017	0,015	1,13	85
K301	0,041	0,038	1,08	205
K302	0,028	0,026	1,08	140
K303	0,021	0,02	1,05	105
K304	0,018	0,019	0,95	90
K305	0,022	0,02	1,10	110

K306	0,034	0,021	1,62	170
K307	0,017	0,017	1,00	85
K308	0,161	0,137	1,18	805
K309	0,012	0,011	1,09	60
K310	0,036	0,025	1,44	180
K311	0,019	0,012	1,58	95
K312	0,012	0,01	1,20	60
K313	0,031	0,02	1,55	155
K314	0,035	0,024	1,46	175
K315	0,017	0,011	1,55	85
K316	0,026	0,018	1,44	130

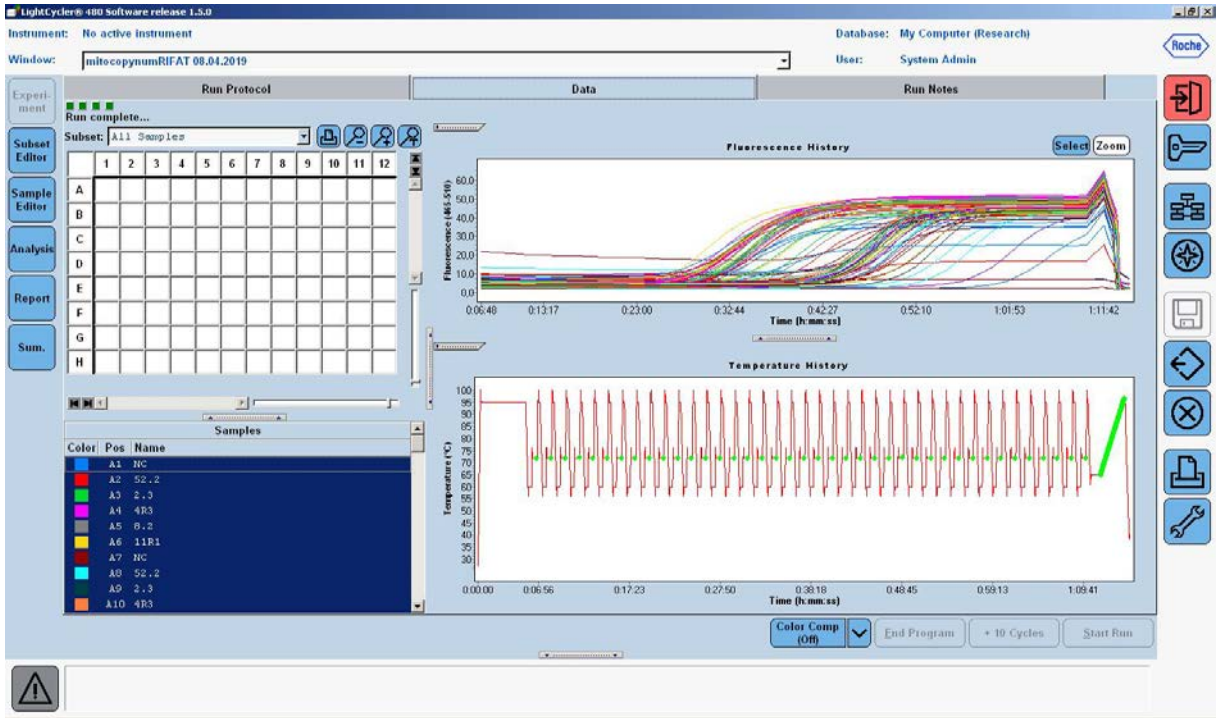
4.3. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

Çevre doku ve benign ve malign tiroit nodüllerinden elde edilen DNA örnekleri Yöntem 3.2.2' de belirtildiği gibi Gerçek Zamanlı PZR'de referans gene (B2M) göre hedef genin (ND1) kantitatif sonuçları hesaplanmıştır. Gerçek zamanlı PZR'de Şekil 4.1' de gösterildiği gibi örneklerin hedef gen ve referans gen olarak sıralaması yapılmıştır.

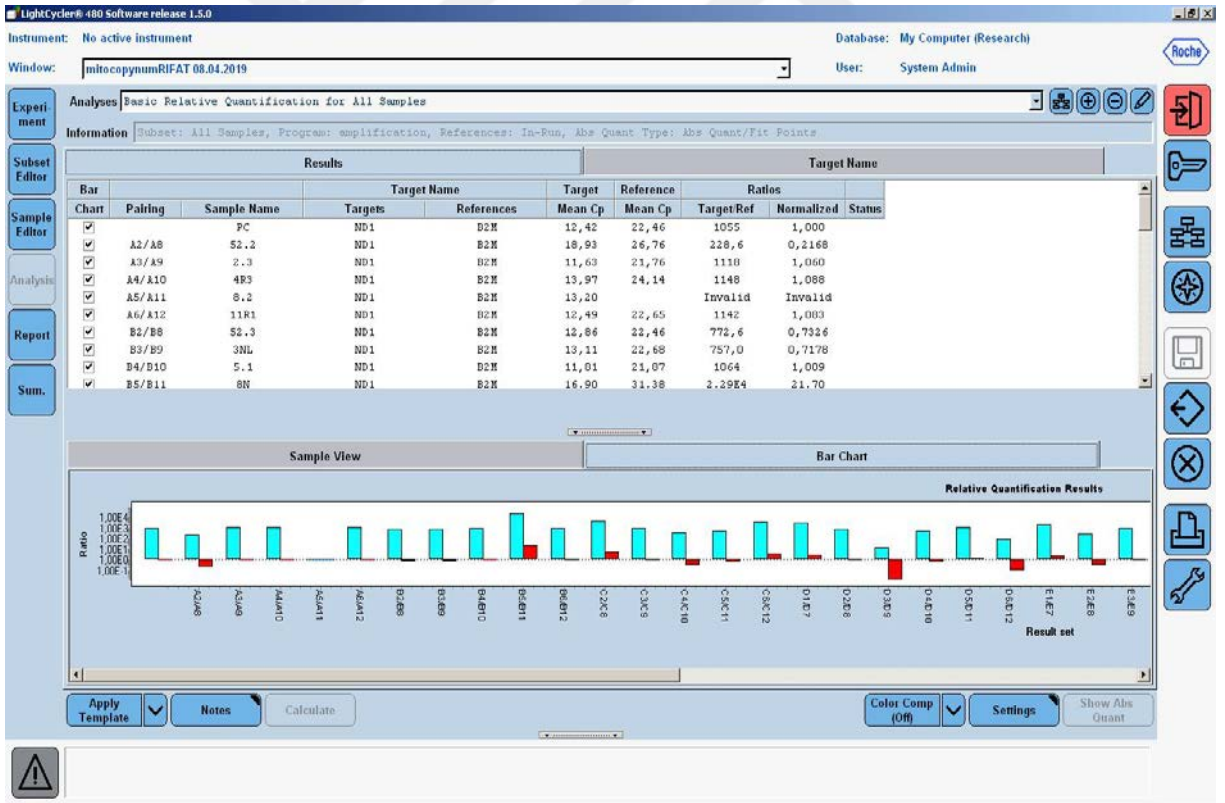


Şekil 4.1 Örneklerin referans gen ve hedef gen olarak PZR' de sıralanması

PZR'ye aktarılan örnekler analiz sırasında floresan ışımaya yapmalarına göre oluşturdukları eğriye göre ΔC_t değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.2) ve böylece nDNA ile mtDNA arasındaki normalize edilen değerler belirlenerek mtDNA kopya sayısındaki değişimler hesaplanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2 mtDNA ve nDNA örneklerinin floresan ışımalarının gösterimi



Şekil 4.3 mtDNA ve nDNA örneklerinin normalize değerlerinin belirlenmesi

4.4. Sıcak ve Soğuk Nodüllerin mtDNA Kopya Sayısı Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen sıcak nodül ve soğuk nodüle sahip hastaların cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsünün mtDNA kopya sayısının artış/azalış olarak karşılaştırılması Pearson ki-kare testi kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3 Sıcak nodüle sahip hastaların demografik ve istatistiksel olarak mtDNA kopya sayısı karşılaştırılması

			mtDNA Kopya Sayısı			Total	P değeri
			Artış	Azalış	Nötr		
SICAK NODÜL	Cinsiyet	Kadın	37 (66,1%)	14 (25,0%)	5 (8,9%)	56 (100,0%)	0,572
		Erkek	12 (80,0%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)	15 (100,0%)	
		Total	49 (69,0%)	16 (22,5%)	6 (8,5%)	71 (100,0%)	
	Sigara	İçmiyor	28 (59,6%)	13 (27,7%)	6 (12,8%)	47 (100,0%)	0,765
		İçiyor	11 (68,8%)	3 (18,8%)	2 (12,5%)	16 (100,0%)	
		Total	39 (61,9%)	16 (25,4%)	8 (12,7%)	63 (100,0%)	
	Aile Öyküsü	Yok	23 (76,7%)	5 (16,7%)	2 (6,7%)	30 (100,0%)	0,29
		Var	12 (42,9%)	10 (35,7%)	6 (21,4%)	28 (100,0%)	
		Total	35 (60,3%)	15 (25,9%)	8 (13,8%)	58 (100,0%)	

Çizelge 4.4 Soğuk nodüle sahip hastaların demografik ve istatistiksel olarak mtDNA kopya sayısı karşılaştırılması

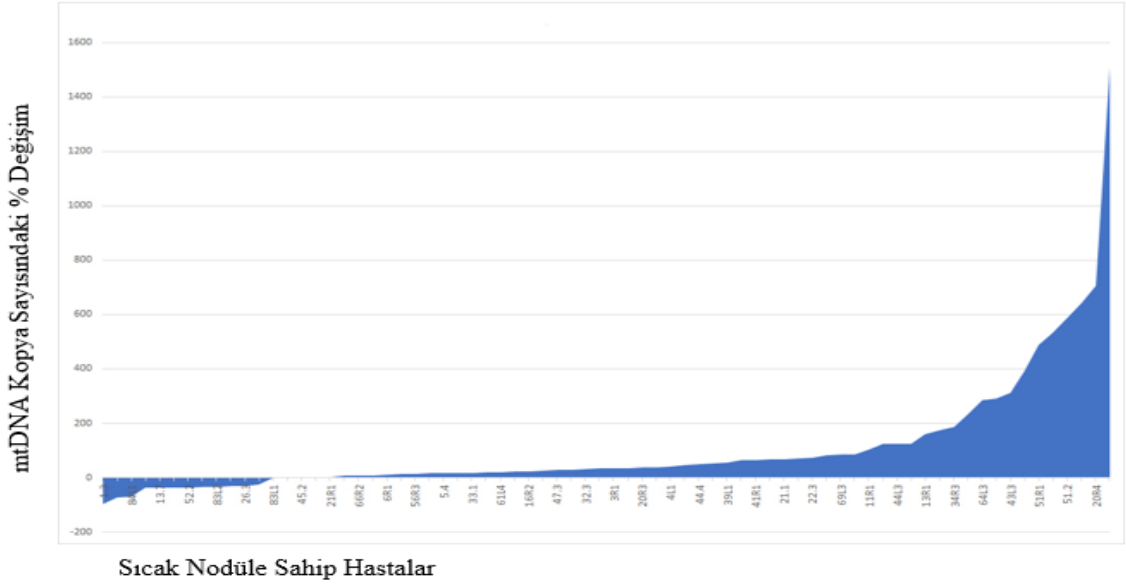
			mtDNA Kopya Sayısı				P değeri
			Artış	Azalış	Nötr	Total	
SOĞUK NODÜL	Cinsiyet	Kadın	17 (29,8%)	19 (33,3%)	21 (36,8%)	57 (100,0%)	0,056
		Erkek	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0 (0%)	7 (100,0%)	
		Total	22 (34,4)	21 (32,8 %)	21 (32,8%)	64 (100,0%)	
	Sigara	İçmiyor	12 (30,8%)	13 (33,3%)	14 (35,9%)	39 (100,0%)	0,140
		İçiyor	7 (63,6%)	2 (18,2%)	2 (18,2%)	11 (100,0%)	
		Total	19 (38,0%)	15 (30,0%)	16 (32,0%)	50 (100,0%)	
	Aile Öyküsü	Yok	11 (33,3%)	11 (33,3%)	11 (33,3%)	33 (100,0%)	0,277
		Var	8 (53,3%)	2 (13,3%)	5 (33,3%)	15 (100,0%)	
		Total	19 (39,6%)	13 (27,1%)	16 (33,3%)	48 (100,0%)	

Sıcak ve soğuk nodüllerin de mtDNA kopya sayısı karşılaştırılmasının istatistiksel ve grafiksel olarak analizi yapılmıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4.1, Şekil 4.2).

Çizelge 4.5 Sıcak nodül hastaları ile soğuk nodül hastalarının mtDNA kopya sayısı karşılaştırılması

	mtDNA Kopya Sayısı				P değeri
	Artış	Azalış	Nötr	Total	
Sıcak Nodül	49 (66,2%)	16 (21,6%)	9 (12,2%)	74 (100,0%)	0,001
Soğuk Nodül	22 (34,4%)	21 (32,8%)	21 (32,8%)	64 (100,0%)	
Total	71 (51,4%)	37 (26,8%)	30 (21,7%)	138 (100,0%)	

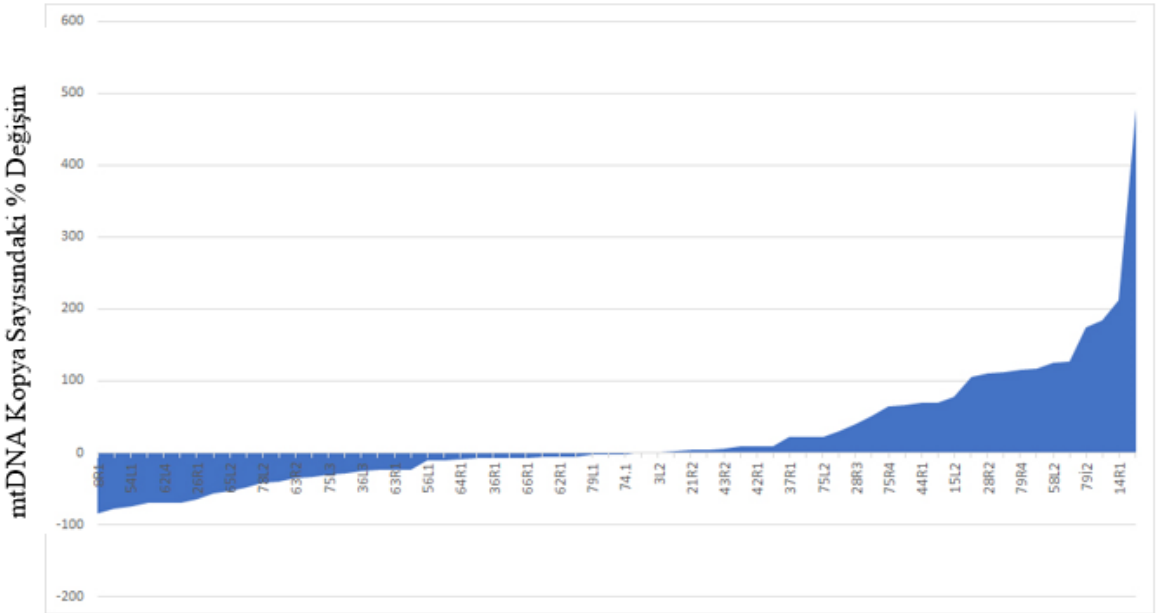
Sıcak Nodüllerde mtDNA Kopya Sayısındaki % Değişimler



Sıcak Nodüle Sahip Hastalar

Şekil 4.4 Sıcak nodüle sahip hastaların mtDNA kopya sayısındaki % değişimlerinin karşılaştırılması

Soğuk Nodüllerde mtDNA Kopya Sayısındaki % Değişimler



Soğuk Nodüle Sahip Hastalar

Şekil 4.5 Sıcak nodüle sahip hastaların mtDNA kopya sayısındaki % değişimlerinin karşılaştırılması

4.5. Papiller Tiroit Kanserli Dokuların mtDNA Kopya Sayısı Değişimleri

Papiller tiroit kanserli hastalara ait verilerin mtDNA kopya sayısındaki artış/azalış % değişimleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. mtDNA kopya sayısı belirlenen 5 PTK dokusunun 2'sinde artış, 2'sinde azalış ve 1'inde mtDNA kopya sayısının değişmediği tespit edilmiştir. Çizelge 4.6'da gösterilen soğuk nodüller PTK dokularına ait nodüllerdir.

Çizelge 4.6 Papiller tiroit kanserli hastaların demografik bilgileri ve mtDNA kopya sayısındaki % değişimleri

Hasta Kodu	Nodül Tipi	Cinsiyet	Sigara Kullanımı	Aile Öyküsü	mtDNA kopya sayısı % değişim
PTK1	Çevre	K	Yok	Yok	146
	Soğuk				
PTK2	Çevre	K	Yok	Yok	13
	Soğuk				
PTK3	Çevre	E	Yok	Yok	101
	Soğuk				
	Soğuk				
PTK4	Sıcak	K	Bilinmiyor	Var	40
	Soğuk (hiperplazi)				

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde çeşitli kanser türlerinde, mtDNA kopya sayısındaki değişiklikler ve kanserle ilişkisine dair çok sayıda çalışma yer almaktadır. Bölüm 2.4.4'te bahsedildiği gibi mtDNA kopya sayısındaki değişikliklerin literatürde çok çeşitli kanser türlerinde artış/azalış karşılaştırılması yapılmıştır. Literatürde, böbrek, karaciğer, yumurtalık, mide ve meme kanserinde tümör dokularında çevre dokuya kıyasla mtDNA içeriğinde azalma olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, aralarında PTK'lerinin de bulunduğu renal onkositoma, tükürük bezi onkositomu, baş ve boyun kanseri, kolorektal kanserler, endometriyal kanserler, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanserlerinin çoğunda mtDNA kopya sayısında artış bulunmuştur (Chatterje vd., 2011; Lee ve Wei, 2009; Mambo vd., 2005). Aynı zamanda PTK'lerine yönelik yapılan bir çalışmada ise PTK'inde mtDNA içeriğinde artış ya da azalış bulunmadığı rapor edilmiştir (Reznik vd. 2016). Başka bir çalışmada ise PTK örneklerinde normal dokuya kıyasla mtDNA kopya sayısında dört kat artış olduğu belirtilmiş olup, klinikopatolojik özelliklerle anlamlı bir ilişkisi bulunmadığı bildirilmiştir (Su vd., 2016). Bu bilgiler ışığında, mtDNA kopya sayısındaki değişimlerin kanser türüyle ilişkili olduğu ve kanser olgularında mtDNA kopya sayısı birkaç faktöre bağlı olarak değişim gösterebileceği öne sürülmektedir.

Bununla beraber, literatürde mtDNA D-loop bölgesi ve mtDNA genlerinin biyosentez, mitokondrinin idamesi ve biyoenerjitik fonksiyonu açısından gerekli olduğu, herhangi bir mtDNA mutasyonu veya mtDNA kopya sayısında azalışın mitokondriyal genlerin ifadesinde değişime neden olabileceği, bunda oksidatif fosforilasyonda defektlere ve aerobik solunumda artan ROS oluşumuna neden olabileceği belirtilmektedir (Wu vd. 2005). Dolayısıyla, azalan mtDNA içeriğinin ETS'nin verimliliğini etkileyebileceği, ATP:ADP oranını düşürebileceği ve ROS oluşumunu teşvik edebileceği literatürde öne sürülmekte olup buna bağlı olarakta multifaktöryel hastalıkların, diyabetin ve kronik arter hastalıklarının gelişimine katkıda bulunabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, artan ROS oluşumunun mtDNA dahil birçok hücresel komponentte hasara neden olabileceği; hasar gören mtDNA düzgün bir şekilde onarılamadığı takdirde mtDNA mutasyonlarının oluşabileceği; bu mutasyonların sonuç olarak tümörögenезin başlamasına ve kanser gelişiminin devamına yol açabileceği literatürde yer almaktadır (Lu, Sharma ve Bai, 2009).

Literatürde yer alan PTK'lerinde mtDNA kopya sayısı üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların çelişkili olması ve benign tiroit nodüllerinde mtDNA kopya sayısı

değişimlerine ilişkin bilgilerin yetersiz olması nedeniyle bu tez çalışması planlanmıştır. Daha önce belirtildiği üzere çalışmanın amacı; fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan tiroit nodülleri ile papiller tiroit karsinomlarında mtDNA kopya sayısı değişimleri belirlenerek literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir. Ancak Covid-19 pandemisi nedeniyle alınan tedbirler neticesinde oluşan teknik sorunlar nedeniyle papiller tiroit kanserine ait örneklerin bir bölümünde gerçek-zamanlı PZR reaksiyonları gerçekleştirilememiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında toplamda; 138 tane sıcak ve soğuk nodül dokuları ile onların 76 tane çevre dokularına ait DNA örneklerinde mtDNA kopya sayısı değişimleri analiz edilebilmiştir. Sıcak nodüle sahip hastaların; kadınlarda erkeklere göre ($p > 0,572$), sigara içmeyen kişilerde sigara içen kişilere göre ($p > 0,765$), aile öyküsü bulunmayan kişilerde aile öyküsü bulunan kişilere göre ($p > 0,29$) mtDNA kopya sayısında değişimlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Buna karşın, soğuk nodüle sahip hastalarda ise çevre dokuyla kıyaslandığında erkek hastalara ait soğuk nodüllerde kadın hastalara göre mtDNA kopya sayısında azalış olduğu ve elde edilen verinin istatistiksel olarak anlamlılığa yakın olduğu tespit edilmiştir. ($p: 0,056$). Diğer taraftan bu grupta sigara içmeyen kişilerde sigara içen kişilere göre ($p > 0,140$), aile öyküsü bulunmayan kişilerde aile öyküsü bulunan kişilere göre ($p > 0,277$) mtDNA kopya sayısında değişimlerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir. Sıcak ve soğuk nodüller arasında mtDNA kopya sayısındaki artış/azalış karşılaştırılması yapıldığında sıcak nodüllerde çevre sağlıklı dokuya göre mtDNA kopya sayısında artışın daha fazla olduğu buna karşın soğuk nodüllerde yaklaşık 1/3'ünde çevre sağlık dokuya göre mtDNA kopya sayısında azalma, diğer 1/3'ünde ise herhangi bir değişim saptanmamıştır ($p: 0,001$).

Dolayısıyla, soğuk tiroit nodüllerinde malignite riskinin yaklaşık %5-%15 arasında değiştiği ve diğer tiroit nodüllerine göre oldukça yüksek olduğu göz önünde bulundurulursa soğuk nodüllerin %32,8'inde saptanan mtDNA kopya sayısındaki azalışın literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Ancak bu verileri teyit etmek ve PTK tümörogenezinde mtDNA kopya sayısı değişimlerinin rolünü aydınlatmak için nonfonksiyonel benign tiroit nodülleri, invazif ve noninvazif mikroPTK ve makroPTK örneklerinden oluşan büyük heterojen bir grupta çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bununla beraber, çevre dokularına kıyasla sıcak nodüllerin %66,2 ve soğuk nodüllerin %34,4'ünde görülen mtDNA kopya sayısındaki artış, bu hücrelerde artan enerji ihtiyacı ve/veya azalan oksidatif fosforilasyon kapasitesi telafisinin bir sonucu olabilir. Bu nodüllerde artan

mitokondriyal biyogenezin mitokondriyal miyopatilerden muzdarip hastaların kaslarında mitokondrilerin aşırı proliferasyonunun bir sonucu olarak düzensiz kırmızı liflerin gelişimine benzer olması mümkündür (Lee vd. 2005).

Sonuç olarak kanserleşme potansiyeli yüksek olan soğuk nodüllerde sıcak nodüllere göre mtDNA kopya sayısında daha fazla azalma görüldüğü tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, literatürde yer alan mtDNA kopya sayısındaki azalmanın insan kanserlerinde tümorogenez süreci ile ilişkili olduğuna dair bilgileri desteklemektedir. Ancak, mevcut bulguları teyit etmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. KAYNAKLAR

- Adaş, G., Adaş, M., Özülker, F. ve Akçakaya, A. (2012). Tiroit kanserleri. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 28 (Ek sayı 1): 26-34. doi:10.5222/otd.suppl.2012.026.
- Aral, C. (2007). *Mitokondriyal DNA değişimlerinin kanser ile ilişkisinin araştırılması*. (Doktora Tezi), Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Aral, C. ve Özer, A. (2007). Mitochondrial DNA and cancer. *Marmara Medical Journal*, 20(2): 127-136.
- Bircan, R. (2007). *İyot düzeyinin farklı olduğu bölgelerde hiperfonksiyone tiroit nodüllerinde tirotropin reseptör (TSHR) mutasyon insidansının saptanması* (Doktora Tezi), Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bircan, R., Gözü, H. I., Ulu, E., Sarıkaya, Ş., Gül, A. E., Şirin, D. Y., Özçelik, S. ve Aral, C. (2019). The mitochondrial DNA control region might have useful diagnostic and prognostic biomarkers for thyroid tumors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127(7): 423-436. <https://doi.org/10.1101/291435>.
- Brandon, M., Baldi, P. ve Wallace, D.C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25: 4647-4662. doi: 10.1038/sj.onc.1209607.
- Carew, J.S. ve Huang, P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Molecular Cancer*, 1: 9.
- Chatterjee, A., Dasgupta, S. ve Sidransky, D. (2011). Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Philia)*, 4(5): 638-654. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0326.
- Chatterjee, A., Mambo, E. ve Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25: 4663-4674. doi: 10.1038/sj.onc.1209604
- Chinnery, P.F. ve Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, 106: 135-159 doi: 10.1093/bmb/ldt017.
- Cummins, J. (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of Reproduction*, 3: 172-182.
- Dorak, M. T. (2007). *Real-time PCR*. UK: Taylor & Francis.
- Garibyan, L. ve Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR). *J Invest Dermatol*, 133(3), e6. doi:10.1038/jid.2013.1.
- Gonzalez-Gonzalez, R., Bologna-Molina, R., Carreon-Burciaga, R. G., Gomezpalacio - Gastelum, M. G., Molina-Frechero, N. ve Salazar-Rodríguez, S. (2011). Papillary thyroid carcinoma: differential diagnosis and prognostic values of its different variants. review of the literature. *ISRN Oncology*, 2011: 9. doi:10.5402/2011/915925.
- Hegedüs, L., Paschke, R., Krohn, K. ve Bonnema, S.J. (2015). Multinodular goiter. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism*.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. ve Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.

- Krohn, K., Fuhrer, D., Bayer Y., Eszlinger M., Brauer V.; Neumann S. ve Paschke R. (2005). Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocrine Reviews* 26(4), 504–524. doi: 10.1210/er.2004-0005.
- Kulawiec, M., Salk, J.J., Ericson, N.G., Wanagat, J. ve Bielas, J.H. (2010). Generation, function, and prognostic utility of somatic mitochondrial dna mutations in cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51:427-439. doi: 10.1002/em.20582.
- Lee, H-C. ve Wei, Y-H. (2009). Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 674-701. doi:10.3390/ijms10020674.
- Lee, H-C., Yin, P-H., Lin, J-C., Wu, C-C., Chen, C-Y., Wu, C-W., Chi, C-W., Tam, T-N., Wei Y-H. (2005). Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 1042:109-122. doi: 10.1196/annals.1338.011.
- Lu, J., Sharma, L.K. ve Bai, Y. (2009). Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell Res* 19(7): 802-815. doi:10.1038/cr.2009.69.
- Luo, Y., Zou, Y., Wu, J., Zhang, Z-Y., Liu, F-Y., Li, L-P. ve 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: 220-230. doi: 10.1111/ahg.12303.
- Lynch, J. R. ve Brown, J. M. (1990). The polymerase chain reaction: Current and future clinical applications. *J Med Genet*, 27: 2-7.
- Mambo, E., Chatterjee, A., Xing, M., Tallini, G., Haugen, B. R., Yeung, S-C. J., Sukumar S. ve Sidransky, D. (2005). Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int. J. Cancer*, 116, 920-924. doi:10.1002/ijc.21110.
- Nguyen, Q. T., Lee, E. J., Huang, M. G., Park, Y.I.; Khullar, A. ve Plodkowski, R.A. (2015). Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *American Health & Drug Benefits*, 8(1), 30-40.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D. ve Markham A.F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC biotechnology*, 3: 18.
- Popoveniuc, G. ve Jonklaas, J. (2012). Thyroid Nodules. *Med Clin North Am.*, 96(2), 329-349. doi: 10.1016/j.mcna.2012.02.002.
- Reznik, E., Miller, M. L., Şenbabaoğlu, Y., Riaz, N., Sarungbam, J., Tickoo, S. K., Al-Ahmadie, H.A., Lee, W., Seshan, V.E., A Ari Hakimi, A.A ve Sander, C. (2016). Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife*, 5: e10769. doi: 10.7554/eLife.10769.

- Smits,P., Smeitink, J. ve Heuvel L.V.D. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 24. doi:10.1155/2010/737385.
- Su, X., Wang, W., Ruan, G., Liang, M., Zheng, J., Chen, Y., Wu, H., Fahey III, T.J., Guan, M. ve Teng, L. (2016). A comprehensive characterization of mitochondrial genome in papillary thyroid cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1594. doi:10.3390/ijms17101594.
- Taanman, J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 103-123.
- Tamhane, S. ve Gharib, H. (2016). Thyroid nodule update on diagnosis and management. *Clinical Diabetes and Endocrinology*, 2:17. doi: 10.1186/s40842-016-0035-7.
- Taşcan, M. (2014). *Hadim ilçesi ve yöresinde tiroit bezi hastalıklarının yoğunluğu*. (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Tatlıpınar, A. ve Kartal, İ. (2015). The evaluation of thyroid nodules. *Thyroid Disorders Ther*, 4: 2. doi: 10.4172/2167-7948.1000181.
- Tipirisetti, N.R, Govatati, S., Pullari, P., Malempati, S., Thupurani, M. K., Perugu, S., Guruvaiah, P., Rao, K. L., Digumarti, R.R., Nallanchakravarthula, V., Bhanoori, M. ve Satt, V. (2014). Mitochondrial control region alterations and breast cancer risk: a study in south indian population. *Plos one.*, 9(1): e85363. doi:10.1371/journal.pone.0085363.
- Tosun F.C. (2012). Tiroit sintigrafisi. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*, 29, 289-300. doi: 10.5835/jecm.omu.29.s4.016.
- Ulusoy, B. (2015). Tiroit nodüllerine yaklaşım. *Turkish Archives of Otorhinolaryngology*, 53: 173-82. doi: 10.5152/tao.2015.1014.
- Valasek, M. A. ve Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29: 151–159. doi:10.1152/advan.00019.2005.
- Wu, C-W., Yin, P-H., Hung, W-Y., Li, A.F-Y., Li, S-H., Chi, C-W., Wei, Y-H. (2005). Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*. 44(1): 19-28. doi: 10.1002/gcc.20213.
- Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(3): 184–199. doi:10.1038/nrc3431.
- Yi, H-S., Chang, J. Y., Kim, K. S. ve Shong, M. (2017). Oncogenes, mitochondrial metabolism, and quality control in differentiated thyroid cancer. *The Korean Association of Internal Medicine*, 32: 780-789. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.420>.