ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİROİD LEZYONLARINDA TPO'NUN MOLEKÜLER VE İMMÜNOHİSTOKİMYA ÇALIŞMASI

Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH Tarafından Hazırlanan **"Tiroid Lezyonlarında TPO'nun Moleküler ve İmmünohistokimya Çalışması**" adlı tez çalışması 07/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman : Dr. Adeeb Abdulaali ABDULHUSEN

Jüri Üyeleri :

Başkan **:** Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Hayrettin SAYGIN
Biyoloji Anabilim Dalı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Tiroid Lezyonlarında TPO'nun Moleküler ve İmmünohistokimya Çalışması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (07/09/2021).

Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİROİD LEZYONLARINDA TPO'NUN MOLEKÜLER VE İMMÜNOHİSTOKİMYA ÇALIŞMASI

Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Dr. Adeeb Abdulaali ABDULHUSEN

Tiroid bezi karsinomu tüm dünyada çok yaygın bir neoplazidir. Hem malign hem de iyi huylu tiroid lezyonlarının çoğu sitolojik olarak teşhis edilebilir. Bununla birlikte, malign ve iyi huylu lezyonları ayırt etmek için kesin tanı ve sıklıkla histolojik gösterim gereklidir. Hastanın malignite korkusuyla hastaneye sevkinin başlıca nedeni olan çıkarılan tiroid bezlerinin histopatolojik sonuçları hastanın tiroid kanseri olduğunu doğruladı. Çalışma, tiroid bozuklukları Dhi Qar Hastanesi Shatra Genel Hastanesi ve Al Hussein Eğitim Hastanesi'nden muzdarip hastalardan toplanan 75 örneği içermiştir ve kalite kontrol olarak 25 numune hastalardan ve sağlıklı bireylerden (30-60) yaş aralığı, hormonlu ve moleküler analizler için tüm hastalardan ve kontrollerden kan örnekleri alındı. Bulgulara göre hastalarda en sık görülen tiroid hastalıkları tiroid toksik guatr (%30) ve tiroid karsinomu (%20) idi. Bulgular ayrıca, bu hastalıkların kadınlarda daha sık olmak üzere 30 ila 50 yaş arasındaki kişilerde oldukça yaygın olduğunu ortaya koydu. Irak'taki alakasız tüm vakalarda tiroid hormon seviyelerini tespit etmek için enzime bağlı floresan testi kullanıldı ve tiroid hastalığı grupları çeşitli derecelerde hormon seviyeleri sergiledi. Guatrın TSH seviyesi yüzde 1,61 ± 0,43 arttı. Tiroid kanseri grubunda TSH ve TR3R düzeyleri düşüktü (sırasıyla 1,46 ± 0,74 IU/mL ve 1,46 ± 0,74 IU/mL), T4 düzeyleri ise çok daha yüksekti (105,71 ± 9,85). Ekson 10'un 1708 (c 1708C>T) ve 1978 ekson 11'in (1978C>G) pozisyonlarında timin veya guanin ve transversiyon sitozini içeren TPO gen mutasyonları da vardı. Tiroid toksik guatr ve tiroid kanseri arasında, ciddi DNA kararsızlığını ve bileşik mutasyonlarını gösteren üç TG homozigot mutasyonu keşfedildi. Bu çalışmada bulunan mutasyonların çoğunluğu tiroid toksik guatr ve tiroid malignitesi gruplarındaydı. Toksik guatr ve tiroid kanseri gruplarında da DNA instabilitesi keşfedildi.

2021, 52 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Tiroid peroksidaz, Tiroid, Hidrojen peroksit, TSH

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR AND IMMUNOHISTOCHEMIA STUDY OF TPO IN TIROID LESIONS

Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Dr. Adeeb Abdulaali ABDULHUSEN

Thyroid gland carcinoma is a very common neoplasia all over the world. The majority of thyroid lesions, both malignant and benign, can be diagnosed cytologically. However, the histological demonstration is frequently required for a precise diagnosis in order to distinguish between malignant and benign lesions. The results of the histopathology of the removed thyroid nodes, which was the major cause for the patient's referral to the hospital for fear of malignancy, confirmed that the patient had thyroid cancer. The study included 75 samples collected from patients suffering from thyroid disorders in Dhi Qar Hospital Shatra General Hospital and Al Hussein Teaching Hospital and 25 samples as quality control. Age range from patients and healthy individuals (30-60). For hormonal and molecular analyses, blood samples from all patients and controls were collected. The most prevalent thyroid illnesses in patients were thyroid toxic goiter (30%) and thyroid carcinoma (20%), according to the findings. The findings also revealed that these diseases were highly prevalent in people aged 30 to 50, with a higher frequency in women. Enzyme-linked fluorescence testing was used to detect thyroid hormone levels in all unrelated cases in Iraq, with thyroid disease groups displaying various degrees of hormone levels. The goiter's TSH level increased by 1.61 ± 0.43 percent. TSH and TR3R levels were low in the thyroid cancer group (1.46 ± 0.74 IU/mL and 1.46 ± 0.74 IU/mL, respectively), whereas T4 levels were much higher (105.71 ± 9.85). There were also TPO gene mutations involving thymine or guanine and transversion cytosine at positions 1708 of exon 10 (c.1708C>T) and 1978 of exon 11 (1978C>G). Between thyroid toxic goiter and thyroid cancer, three TG homozygous mutations were discovered, indicating severe DNA instability and compound mutations. The majority of the mutations found in this study were in the groups of thyroid toxic goiter and thyroid malignancy. In the toxic goiter and thyroid cancer groups, DNA instability was also discovered.

2021, 52 pages

Keywords: Thyroid peroxidase, Thyroid, Hydrogen peroxide, TSH

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarımın da bana 2 yıllık üniversite hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkürler.

Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH
Çankırı, Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1.GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Anatomi ve Evrim **3**
2.2 Tiroid Ekseninin Düzenlenmesi **4**
2.3 Tiroid Hormonunun Bir Sentezi **6**
2.4 Tiroid Hormonu Taşınması ve Metabolizması **6**
2.5 Redoks Enzimleri Yoluyla Bir Tiroid Hormon Sentezi **8**
2.5.1 Tiroid peroksidaz tpo **8**
2.5.2 Çift oksitler (DUOX1 ve DUOX2) **9**
2.6 Tiroid Hormon Etkisi **11**
2.7 Tiroid Hormon Biyosentezinde TPO Genlerinin Rolü **13**
3. MATERYAL VE METOT **16**
3.1 Materyal **16**
3.1.1 Ekipman **16**
3.1.2 Kimyasal malzemeler **17**
3.2 Konular **17**
3.2.1 Kan testleri **17**
3.2.2 Tümör doku örneklerini toplama **18**
3.2.3 Tiroid hormonlarının tayini **18**
3.2.4 Moleküler analiz **20**
3.2.5 Tpo gen mutasyonlarının tespiti **22**
3.3 Patolojik Histolojik İnceleme **26**

3.3.1 Histolojik bölümün hazırlanması 26
3.3.2 Hematoksilen-eozin yöntemi 27
3.4 İstatistiksel Analiz 27
4. BULGULAR……. 28
4.1 Klinik Çalışmanın Özellikleri 28
4.2 Biyokimya Parametreleri 29
4.2.1 Serum TSH, T4 ve T3 seviyeleri 29
4.2.2 Yaşın TSH, T4 ve T3 kan düzeylerine etkisi 30
4.2.3 Kandaki TSH, T4 ve T3 düzeylerinin cinsiyetinin etkisi..... 31
4.3 Moleküler Araştırma 32
4.3.1 DNA hazırlığı..... 32
4.3.2 Önekler - pzr tahlili..... 33
4.3.3 Eksonik ve ekzonik-tpo genleri arasındaki intronic ekleme bölgesi mutasyon 33
4.3.4 Gen mutajenik hastalarda serum TSH, T4 ve T3 düzeyleri 35
4.4 Tiroid neoplazmalarının histopatolojisi..... 36
5. TARTIŞMA 42
6. SONUÇLAR 44
KAYNAKLAR 45
ÖZGEÇMİŞ..... 52

SİMGELER DİZİNİ

-	Eksi
%	Yüzde
<	Az
>	Büyük
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
dL	Desilitre
g	gram
IU	İnternasyonel ünite
kDa	kilodalton
L	Litre
Mg	Miligram
mL	Mililitre
nmol	Nanomol
α	Alfa
β	Beta
Ca^{++}	kalsiyum
H_2O_2	Hidrojen peroksit
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
O_2	Oksijen

KISALTMALAR DİZİNİ

AIT	Apikal iyodür taşıyıcı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DUOX	Dual Oxidase
FAD	Flavin adenin dinükleotidinin
HBG	Hormon bağlayıcı globulin
hCG	İnsan koriyonik gonadotropin
M	Mutasyon
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NOX	Nitrojen oksidin
OD	Optik yoğunluk
PH	Hidrojenin gücü
PTU	Propiltiourasil
Pzr	Polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	Reaktif oksijen türlerinden
Rpm	Dakikada gerçekleştirilen dönüş
ST3	Serbest T3
ST4	Serbest T4
T3	Triiodotironin
T4	Tiroksin
TG	Tiroid bezi
THOX	Tiroid Oksidaz
TPO	Tiroid peroksidaz enzimi
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
TTF-1	Tiroid transkripsiyon faktör-1
TTR	Transtiretin
W	Yabani tip

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Tiroid bezinin anatomic biçimi (Loevner *et al.* 2008)..... 4
Şekil 2.2 Tiroid hormonunun karmaşık bir düzenlemesi (Harris *et al.* 2001) 5
Şekil 2.3 Tiroid hormonunun bir sentezi (Bouknight 2003)..... 7
Şekil 2.4 Çift oksit formülasyonları 1/2 (DUOX1 / 2) daha sonra NADPH oksidaz 4 (NOX4) (Sukumar *et al.* 2013) 10
Şekil 2.5 Tiroid hormon reseptörünün bir eylem mekanizması (Harris *et al.* 2001) 12
Şekil 2.6 TPO'nun Tiroid hormonu oluşumundaki rolü (Mercken *et al.* 1985)..... 14
Şekil 4.1 TPO c. Tiroid bozukluğu olan hastalarda 1978C > G (Gln 660 Glu) ve altı 1708C > T mutasyonu tespit edildi. Toksik guatr ve tiroid kanseri vakalarının sayısı diğer tiroid hastalıkları gruplarına göre daha fazladır..... 34
Şekil 4.2 Tiroid dokusunun histopatolojik kesitinde fibrozis(➨) hipertiroidi li bir hastada (X10) hiperplastik değişiklikler tespit edildi..... 38
Şekil 4.3 Tiroid dokusunun histopatolojik kesitinde papiller tiroid karsinomu hastasının (X10) papiller büyüme paterni, nükleer temizlenme ve hücrelerinde oryantasyon bozukluğu (➨) saptandı. 38
Şekil 4.4 Tiroid dokusunun histopatolojik kesiti, papiller tiroid karsinomu hastasının (X10) tiroid foliküllerinin papiller büyüme paterni, nükleer temizlenme ve hücrelerin oryantasyon bozukluğunu (➨) ortaya çıkardı. 39
Şekil 4.5 Tiroid dokusunun histopatolojik kesitinde papiller tiroid karsinomu hastasının (x40) tiroid foliküllerinin papiller büyüme paterni, nükleer temizlenme ve hücrelerin oryantasyon bozukluğu (➨) saptandı. 39
Şekil 4.6 Tiroid dokusunun histopatolojik kesiti, tiroid hormon bozukluğu hastasının (X40) normal görünümlü büyüme paterni (➨) ortaya çıkardı..... 40
Şekil 4.7 Tiroid dokusunun histopatolojik kesiti, tiroid hormon bozukluğu olan hastanın (X10) normal görünümlü büyüme paterni ortaya koydu.. 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılmış aletler ve üreticiler 16
Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler 17
Çizelge 3.3 TPO genlerinin PZR amplifikasyonu için kullanılan primer ve primer modifikasyon dizilimi 24
Çizelge 3.4 TPO genlerinin PZR amplifikasyonu için kullanılan primer ve primer modifikasyon dizilimi 25
Çizelge 4.1 Yaş ve cinsiyet (n = 75) dikkate alınarak hipotiroidili hasta gruplarının ve görünüşte sağlıklı kontrollerin demografik özellikleri 28
Çizelge 4.2 Tiroid bozukluğu olan hasta gruplarında kan TSH düzeyleri (µ IU/mL), T4 (nmol/L) ve T3 (nmol/L) 30
Çizelge 4.3 Tiroid bozukluğu olan hastalarda yaşa göre kan TSH düzeyleri (µ IU/mL), T4 (nmol/l) ve T3 (nmol/L) 31
Çizelge 4.4 Tiroid bozukluğu olan hastalarda cinsiyetin TSH (µ IU/L), T4 (nmol/L) ve T3 (nmol/l) düzeylerine etkisi 32
Çizelge 4.5 Hastalar ve sağlıklı kontrol arasındaki TPO genlerindeki heterozigot ve homozigot mutasyonların demografisi 34
Çizelge 4.6 Irak tiroid bozukluklarında TPO gen mutasyonunun TSH, T4 ve T3 düzeylerine etkisi. A, B: Farklı harfler, ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları gösterir 35
Çizelge 4.7 Hipotiroidili erkeklerde guatr ve polip prevalansı. Kapsanan vakalar ultrason ve radyografinin sonucudur 36
Çizelge 4.8 Guatr, hipotiroidili kadınlarda görülen metastatik iyi huylu bir neoplazmdır. Kapsanan vakalar ultrason ve radyografinin sonucudur 36

1. GİRİŞ

Tiroid hormon sentezi, oksitleyici bir ortam olarak hidrojen oksit (H_2O_2) kullanıldığında birçok redoks tepkisini içeren karmaşık, çok aşamalı bir süreç olmuştur. Bir Hidrojen peroksit hormonun oluşturulduğu, depolandığı ve sonra serbest bırakıldığı tiroid bezinin pratik kısımları olarak ölçülen tiroid foliküllerinin lümeni tarafından çevrelenmiştir. Foliküller, folikülün merkezi lümenini sınırlayan triad hücreler adı verilen tek bir ayrılmış epitel hücre tabakası kullanılarak yapılmıştır. Lümen, ekstra foliküler boşlukla ilgilenen lümen 'sızıntısını' önlemek için dar bağlantılarla birbirine bağlanan tiroid hücrelerinin apikal yüzeyi tarafından belirlenmiştir. Folikülün dışı, kan hücrelerinin lateral bazal plazma zarları tarafından kapatılmıştır.

Tiroid bezinde bulunan protein (%50) için amaçlanan bir TG yorumları daha sonra tiroid hormonları için bir işaret gibi kullanılmıştır. Bir hormon Tiroid üretimi, TG'den gelen spesifik tirozin kalıntısının oksidatif iyot tedavisine ihtiyaç duymakta olup bu prosedür 'iyot düzenlemesi' olarak adlandırılmaktadır. İyot tedavisi, tiroid peroksidaz enzimi (TPO) tarafından uyarılmıştır. Bu süreç, oksidasyon için tasarlanmış yeterli (H_2O_2) gerektirdiğinden tiroid hormonu oluşumunda önemli bir aşamadır. 1975'te yayınlanan ciddi başrol rolüne ilişkin ana çalışma vurgulanmış olup ardından iyodür organizasyonu çalışmayan insansı tiroid nodüllerinde (H_2O_2) bir kohort azalması tanımlanmıştır (Castellani *et al.* 2006). İzole domuz paratiroid foliküllerinden lümen (H_2O_2) kaynağı, aktivasyon için kalsiyum gerektiğinden elektron donörü olarak NADPH'nin kullanıldığı enzimin paratiroid hücresinin apikal membranı olarak ayırt edilmiştir (Björkman and Ekholm 1984). Sonraki biyokimya incelenmiş olup NADPH oksidazın organları olarak üretilen H_2O_2 tiroid hücre enzimleri tanımlanmıştır (NOX) (Dupuy *et al.* 1999). (1999-2000)'de protein saflaştırması ve ardından tiroid c-DNA kitaplığı tahlili yoluyla dizileme ile tanımlanan ile bitmek üzere uygun enzimler mevcuttur. Enzimler tiroide özgü olup bu nedenle Tiroid Oksidaz olarak adlandırılmaktadır (THOX) (De Deken *et al.* 2000*)*. Daha sonra, diğer dokulardaki proteinler tanımlanmış olup isimleri, çift oksitlerin ve ardından peroksitin aktivitelerini yansıtacak şekilde DUOX1 ve 2(DUOX1) için değiştirilmiştir (Brandes *et al.* 2014). Tiroid folikülü üzerindeki (H_2O_2) asıl temeli DUOX2 izoformuydu (Dupuy *et al.* 1999).

Biyolojik reaktif oksijen türlerinden (ROS) üretilen DUOX2'den farklı olarak, patolojik olarak yükselmiş H_2O_2 seviyeleri, mitotik reseptör sinyalizasyonunun veya onkogenlerin aktivasyonunun ardından tiroid karsinojenezi ile ilişkilendirilmiştir (Choi *et al.* 2019). Bu bağlamda, zararlı reaktif oksijen türlerinin olası bir temeli olarak nitrojen oksidin (NOX4) başka bir izoformu kabul edilmiştir.

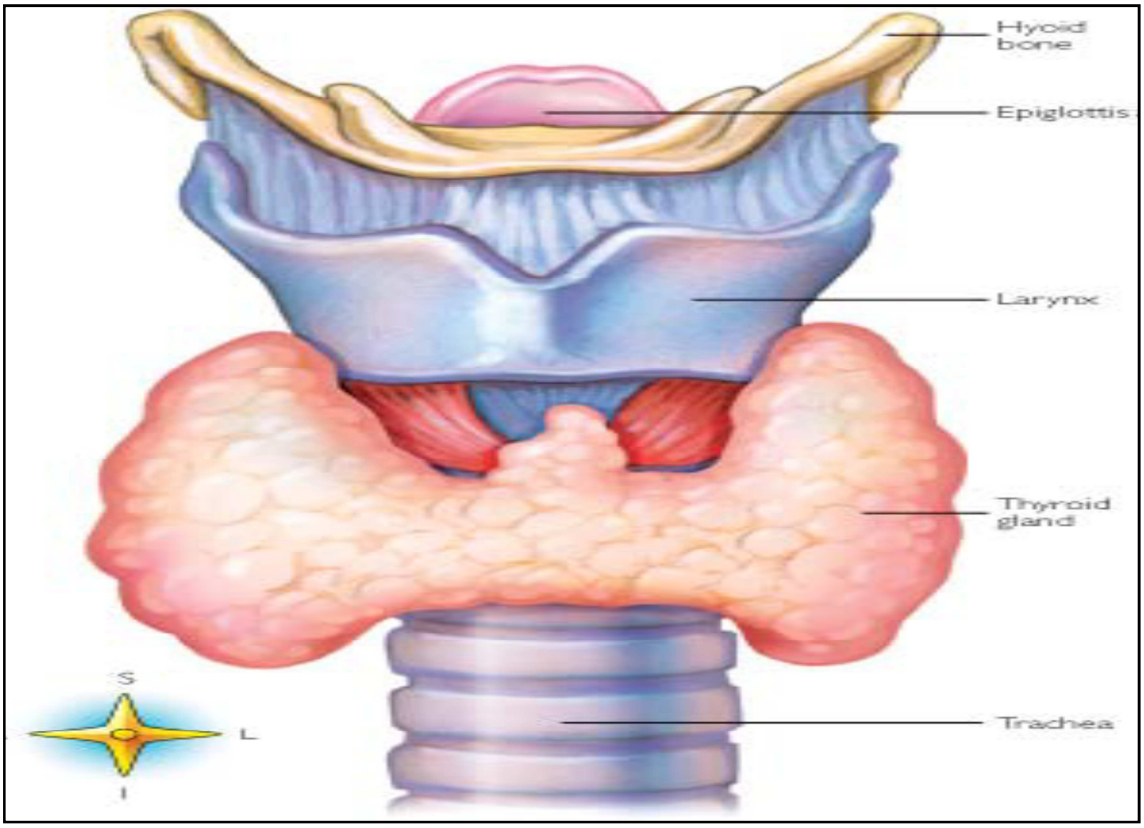
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Anatomi ve Evrim

Tiroid bezinin standart olgunlaşması, isthmus boyunca birbirine bağlı çift lobların varlığını içermektedir. Tiroid bezinin dokusu parlak bronz olup çok parlayan kesme yüzeyi mevcuttur. Normal bez, ince bir lifli kapsül içinde kapsüllenmekte olup (15 ile 25 g) ağırlığındadır. Tiroid bezinin olağan durumu, bitişik yapılarda yer alan gevşek bir düğüm olup daha sonra yüz düzlemleri ayırt edilmiştir (Şekil 2.1).

Dört paratiroid hormonu üreten paratiroid bezleri, tiroid bezinin her iki kutbu için gecikmeli bölgeye yerleştirilmiştir. Laringeal sinirlerin tekrarlaması, tiroid bezinin yan sınırlarını geçip ses tellerinin felce uğramasını engellediği için tiroid ameliyatı esnasında kabul edilmiştir. Gebeliğin üç haftasında farinksin fonlarından başlayarak bir tiroid bezi geliştirilmiştir. Bezler, dil kökündeki çekum deliğinden tiroid-lingual kanalla birlikte nüfuz etmiş olup boyunda son bir pozisyona ulaşmışlardır. Bu özellik, dil kökündeki (lingual tiroid bezi) tiroid dokusunun nadir görülen ekstrauterin bölgesinden, örneğin bir sistem geliştirmekle birlikte kist olan lingual tiroid kanalının oluşumundan sorumlu olmuştur.

Olgun bir tiroid bezi, foliküler tiroid hücrelerinden yapılmış, onları sınırlayan ve sonra onları salgılayan birçok kese içermekte olup tiroid hormonları için bir kaynak protein olan büyük miktarlarda tiroglobulin içeren iddialı bir sıvıdır (Ahmed *et al.* 2011).



Şekil 2.1 Tiroid bezinin anatomic biçimi (Loevner *et al.* 2008)

2.2 Tiroid Ekseninin Düzenlenmesi

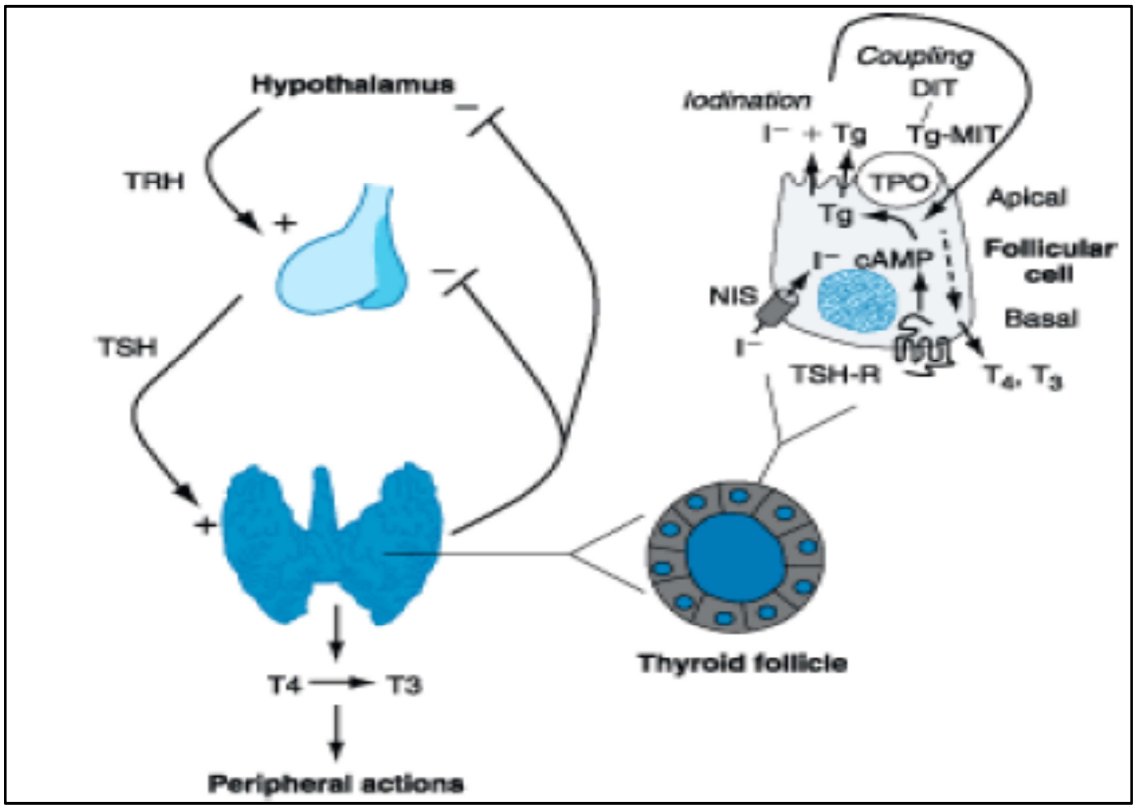
Ön hipofiz kök hücreleri, tiroid ittifakında kontrolde önemli bir rol oynayan tiroid uyarıcı hormon (TSH) salgılanmış olup daha sonra tiroid hormonu etkileşimi için en faydalı fizyolojik sembol haline gelmiştir.

Bir TSH, ek glikoprotein hormonları (luteinize edici hormon, folikül uyarıcı hormon ve insan koryonik gonadotropin (hCG) için ortak olan bir alt birimden oluşan 31 kDa'lık bir hormone olup bir TSH birimi, TSH'ye özgüdür. Tirotropin salgılatıcı hormonun (TSH) uyarılmasıyla karbonhidratların yapısındaki değişiklik düzeyi, hormonun biyolojik aktivitesinden etkilenmiştir. Tiroid ekseni, endokrin geri besleme döngüsünün bir özelliği olmuştur. Tiroid hormonu, bu tiroid hormonu sentezini ve ardından salgılanmasını uyaran hipofiz bezi tarafından TSH üretmesi için uyarılmıştır. Tiroid hormonları, TRH'yi engellemek için pasif olarak beslenmiş olup ardından (TSH) olarak şekillenmiştir (Şekil 2.2). Bu eksende bir "ayar noktası", kapsamı bir (duyarlı)

belirteç olan ve daha sonra tiroid fonksiyonu için özel olan TSH tarafından oluşturulmuştur. Bir TSH, TSH sentezinin ve ardından salgılanmasının ana ilerleyici yöneticisi olmuştur. Bir TSH, yedi zara bağlı protein G-bağlı reseptör tarafından tetiklenmiştir.

(GPZR) fosfolipaz C tarafından aktive edilerek fosfatidilinositol döngüsü oluşturulmuş olup ardından hücre içi kalsiyum salınmıştır. TSH sekresyonunun zirvesi, ekzojen TSH yönetimini müteakip yaklaşık 15 dakika içinde meydana gelmiştir.

Dopamin, glukokortikoid, ardından somatostatin TSH'yi inhibe etmesine rağmen bu ajanların ilaç dozlarında uygulanması dışında önemli bir fizyolojik önemi bulunmamaktadır. Diğer hipofiz hormonlarına benzer şekilde, TSH pulsatil bir şekilde salınıp ardından günlük bir ritim görüntülenmektedir. Ancak TSH en yüksek seviyeye geceleri ulaşmaktadır (Tonacchera *et al.* 1998).



Şekil 2.2 Tiroid hormonunun karmaşık bir düzenlemesi (Harris *et al.* 2001)

2.3 Tiroid Hormonunun Bir Sentezi

TSH tarafından iyodür taşınması, düzenlenmesi ve konjugasyonu, ardından tiroglobulin (TG) sentezi, ardından endojen sekresyon gibi birçok sentetik adım düzenlenmiştir. TSH uyarımı altında, tiroid iyodür hücreleri hücre tabanındaki kılcal ağdan çıkarılmış olup iyot, ağırlıklı olarak T4 yapmak için tirozin moleküllerini bağladığı hücre apeksine taşınmıştır. Bazı T3, T4 ve TSH, bez folikülü içindeki bir kolloidde depolanmıştır. Birlikte başlatılmış veya başlatmadan önce bir kısmı T4'ten T3'e kaldırılmıştır. İkinci basamaklar da TSH veya TSH reseptör bağlayıcı proteinlerin etkisi altında yapılmıştır.

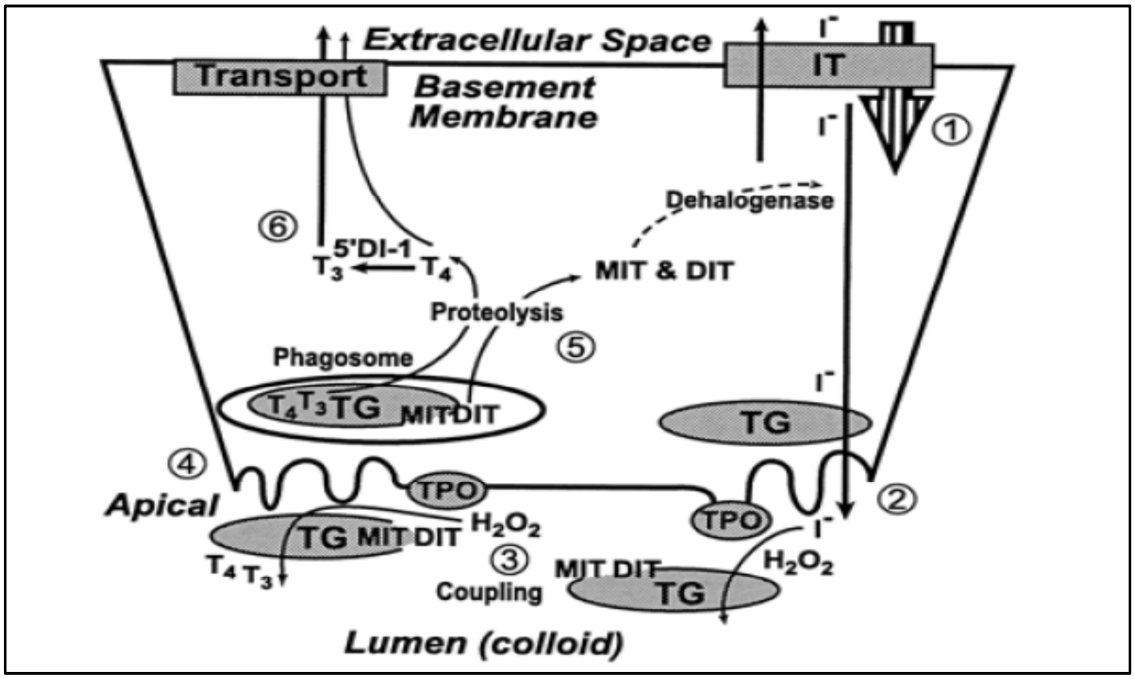
TSH reseptörünün mutasyonları, bazı toksik adenomlarda ve ardından multinodüler guatrda sürekli olarak aktif hale getirilmiştir (Burmeister *et al.* 1992). Küçük ama ölçülebilir miktarda TSH'ye bağımlı olmayan T4 salgısı da doğal olarak meydana gelmiştir (Weiss *et al.* 2010). Bir aşağı regülasyon işleminde iyodin birleştiği tirozin kalıntısı, 660 kDa glikoprotein olan (TG) molekülünün bir parçası olmuştur. TG oluşumundaki eksiklikler, bu durumlar seyrek olmakla birlikte, bazı guatr durumlarının nedeni olarak ileri sürülmüştür.

Serum (TG) değerleri, biyolojik aktivite veya yeniden ortaya çıkma belirtisi olarak iyi diferansiye tiroid karsinomlarının tedavisinde çok faydalı olmuştur. Tiroid hormonu oluşturma evreleri Şekil 2.3'te gösterildiği şekilde özetlenmiştir.

2.4 Tiroid Hormonu Taşınması ve Metabolizması

Tiroid bezi tarafından T3'ün en az 20 katı bir T4 salgılanmıştır. Her iki hormon da tiroid (hormon bağlayıcı globulin (HBG)), transtretin (TTR, daha önce tiroid hormonu bağlayıcı albümin veya TBPA olarak bilinen) ve albümin ile birlikte plazma proteinlerine dağıtılmıştır. Serumla ilişkili proteinlerin amaçları, hormonların seçilen doku bölgelerine verilmesini çok ılımlı olabilen hormon ödeneğini geciktiren dolaşımdaki hormon agregasyonunu çoğaltmak olmuştur. HBG konsantrasyonu nispeten düşük (1 ile 2 mg/dL) olmasına rağmen daha sonra tiroid hormonları için

önemli bir afinite (T4 > T3) olması nedeniyle, kısıtlayıcı hormonların yaklaşık % 80'i üretilmiştir. Albümin, tiroid hormonları için nispeten düşük bir afiniteye sahip olmasına rağmen yüksek bir plazma konsantrasyonuna sahip olup daha sonra (%10) testosterona bağlanmıştır. Daha sonra (% 30) T3 TTR'si de T4'ün (% 10)'una kadar taşınmıştır. Ama biraz T3 (Ahmed *et al.* 2011) tek serbest hormon dokular için biyolojik olarak mevcut olmuştur.



Şekil 2.3 Tiroid hormonunun bir sentezi (Bouknight 2003)

Böylece iyodür (I-) iyodür taşıyıcısı (IT) aracılığıyla dönüştürülmüştür, çünkü tiroid hücresine giden plazma daha sonra apikal zara dönüşmüş olup daha sonra tiroid peroksidazın (TPO) etkisinin altında hapishane hücresinin içinde üretilen tiroglobuline konjuge edilmiştir (TG). Hormon, kolloid endositoz yoluyla hücreye geri girdiğinde ve daha sonra T4 ve T3'ün salgılandığı bazal membrana geri döndüğünde tutulmuştur. Hormonal olmayan iyodür geri dönüştürüldü, Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

Hormon sentezi aşağıdakiler tarafından engellenmiştir: (1) İyot, tiyosiyanat, perklorat ve interlökin-1, ardından tümör nekroz faktörü alfa ile taşınmıştır; (2) Düzenleme; (3) Propiltiourasil (PTU), sonra karbimazol ve interferon beta yoluyla indirgenmiş TPO ve ardından interlökin-1 ile birleştirilmiş; (4) Önce lityum, sonra iyodür ile emzirme; (5)

Tiroglobulin proteininin iyodür ile hidrolizi ve (6) iyodin, tiroid bezi içinde PTU tarafından uzaklaştırılması ve tümör nekroz faktörü α olmuştur (Baker'ın İlkeleri, ardından da Endokrinoloji ve Metabolizmadaki Uygulamalar, Üçüncü Baskı, 2002'den kabul edilen). Tiroid ekseninin düzenlendiği homeostatik mekanizmalar, normal serbest hormon konsantrasyonlarını korumaya yöneliktir. T4'ün yaklaşık (%80)'i iyot uzaklaştırılarak (% 35) T3'e, ardından (% 45) T3'ü tersine çevirerek (rT3) metabolize edilmiştir. Geri kalanlar çoğunlukla karaciğerde glukuronid tarafından inaktive edilip daha sonra safraya atılır, ayrıca veya daha az oranda sülfonasyon yoluyla karaciğer veya böbreklerde iyodin uzaklaştırılmasından da daha az orandadır. Diğer metabolik reaksiyonlar arasında düşük biyolojik aktiviteye sahip yumrulu asetik asit türevlerini oluşturan yan zincir alaninin demineralizasyonu; veya dekarboksilasyon ya da ayrıca aktif olmayan bileşikler oluşturan eter köprüsünün bölünmesini içermektedir (Schwabl and Lipar 2002).

2.5 Redoks Enzimleri Yoluyla Bir Tiroid Hormon Sentezi

Tiroid hormon üretiminin redoks evrelerinde komplike olan çift ana enzimler o zaman TPO olmuştur (DUOX2). TPO, TG tirozin tortusuna iyodin eklenmesi ve ardından bu reaksiyonda bir elektron alıcısı olarak H_2O_2'nin TPO tarafından sağlandığı iyodotirozin zincir konjugasyonu ile katalize edilmiştir.

2.5.1 Tiroid peroksidaz TPO

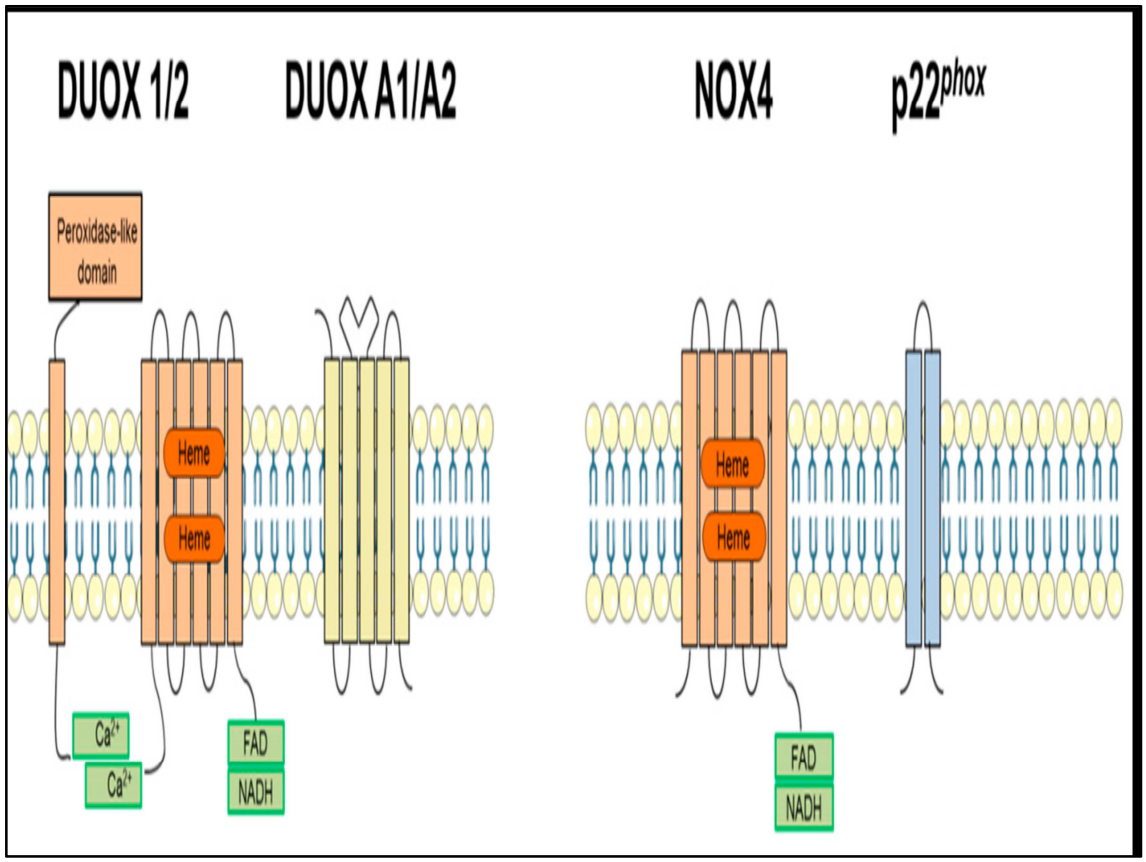
Tiroid peroksitleri, Tiroid hormonu üretiminde önemli bir rol oynayan tiroid hemoglikosilatının bir proteini olmuştur. Tiroid hormonları, ince bağırsakta emilen iyot içermektedir. Na/I kodlayıcı (NIS) aracılığıyla tiroid hücreleri tarafından dolaşımdaki alıma taşınmıştır. Yan plazma zarında iyot, oksitleyici ajan olarak H_2O_2 kullanan TPO tarafından oksitlendikten sonra folikül boşluğuna aktarılmıştır. Bir TPO, kan hücrelerinin apikal bölgesinde eksprese edilmiş bir zar protein olup hem içeren bir cep lümen Foliküllerine çıkıntı yapmıştır (Godlewska *et al.* 2014). TPO'nun aktif merkezi redüktaza duyarlıdır, dolayısıyla enzimin aktivasyonu için gereklidir. TPO aktivitesi, pasif bir TPO düzenleyicisi olarak oksitlenmiş iyot yasası ile olduğu kadar, esas olarak

TSH'yi de azaltmıştır (Taurog 1999). İyot (iyot veya iyot eksikliği) kimyasal olarak oksitlenmiştir. Yüksek oranda reaktiftir, daha sonra TPO tarafından TG'nin tirozin tortusuna dahil edilmesine izin vermektedir. Bir iyodotirozin kalıntısının sonucu daha sonra TG molekülü içinde birleştirilmiş olup ardından 3, 5, 30, 50-tetraiyodotironin elde edilmiştir (T4/tiroksin) veya 3, 5, 30-triiyodotironin (T3), T3'ten T4 ise TG'ye bağlı kalırken, daha sonra ihtiyaç duyduğu hormonun salınmasına kadar bir dosyada Folikül saklanmıştır (Virion *et al.* 1984). (TG) salgılanması gerektiğinde uyarılmış, tiroid hücreleri enjekte edilmiş, daha sonra partikül ile füzyon yoluyla bir protein parçalama işlemine tabi tutulmuşlardır. TG proteininin hidrolizi, prohormondan T3 sonra T4'ün salınmasıyla sonuçlanmıştır. T4 / T3 nihayet bitmiş olup daha sonra dönüştürülmüş tiroid hücrelerinin bazal membran taşıyıcıları tarafından kan dolaşımına taşınmışlardır.

2.5.2 Çift oksitler (DUOX1 ve DUOX2)

Bir DUOX1 sonra DUOX2, yedi üyeden oluşan NADPH oksidaz ailesine aittir; beş nitrojen oksit (NOX1-5) daha sonra ikili oksitlenmiştir; (DUOX1) 2'den fazla olan (NOX) aile enzimleri, iki hem bağı bölgesini, ardından gömülü C-terminali Sitoplazma zincirini kullanan zar proteinleri olmuştur. Flavin adenin dinükleotidinin (FAD) bağlanma bölgelerinde, sonra NADPH (Lambeth and Neish 2014), NOX1, 2, 3 ve 4 izoformları (NOX1, NOX2) ve ardından (NOX3) aktive etmek için gerekli olan membrana bağlı alt birimin p22'sini kullanan heteromorflardır. Gerçekten, (NOX1, NOX2 ve NOX3) çeşitlendirilmiş bir hücresel vazodilatörün (p47phox / NOXO1) membran transdüksiyonunu gerektirmiş olup ardından (p67phox / NOXA) ajanları aktif oksidaz için bir araya getirilmiş ve daha sonra p22phox bu süreçte kritik bir rol oynamıştır. p47phox / NOXO1 (Ambasta *et al.* 2004). NOX1, -2 a sonra -3'ten farklı olarak, NOX4 aktivasyon yapıldığı için diğer alt birimleri kullanmaya ihtiyaç duymaz, ancak sürekli bir şekilde H_2O_2 üretilir (Geiszt *et al.* 2000). NOX4 düzenlemesinde p22phox'un rolü şu anda tam olarak anlaşılmamıştır. NOX4 ile birlikte transfeksiyon çalışılmış, daha sonra p22phox, p22phox'un (NOX4) fiksasyonu, ardından / veya olgunlaşma / lokalizasyon için gerekli olduğunu öne sürmüştür (Nakano *et al.* 2007). (NOX5) izoformunun aktivasyonu, sitoplazmanın terminal N bölümlerinde bulunan EF el darbeleri yoluyla Ca2'nin bağlanmasıyla iki DUOX-as elde edilmiştir (Zhu *et al.*

2006). DUOX enzimleri, yedinci çapraz membran alanının, ardından TPO ile %40 homojenlik gösteren N-terminal peroksitlerin benzersiz dış alanının varlığıyla diğer tüm NOx'lerden ayırt edilmiştir (Song *et al.* 2010). Sonuç olarak, DUOX enzimleri tarafından süperoksit (O_2) üretilmiş ve daha sonra doğrudan H_2O_2'ye dönüştürülmüştür (Caillou *et al.* 2001). Aktivasyon, DUOX1 / 2 Ek proteinler DUOXA1 sonra ((DUOXA2)) ile eşleştirmeyi gerektirmekte olup (Grasburger and Refeto 2006), Şekil 2.4'te gösterildiği gibi. NOX4'e kıyasla DUOX1 / 2 enzimlerinin şematik yapısını göstermektedir ve izoform, tiroid ile ilişkili nitrojen oksitleri göstermektedir.



Şekil 2.4 Çift oksit formülasyonları 1/2 (DUOX1/2) daha sonra NADPH oksidaz 4 (NOX4) (Sukumar *et al.* 2013)

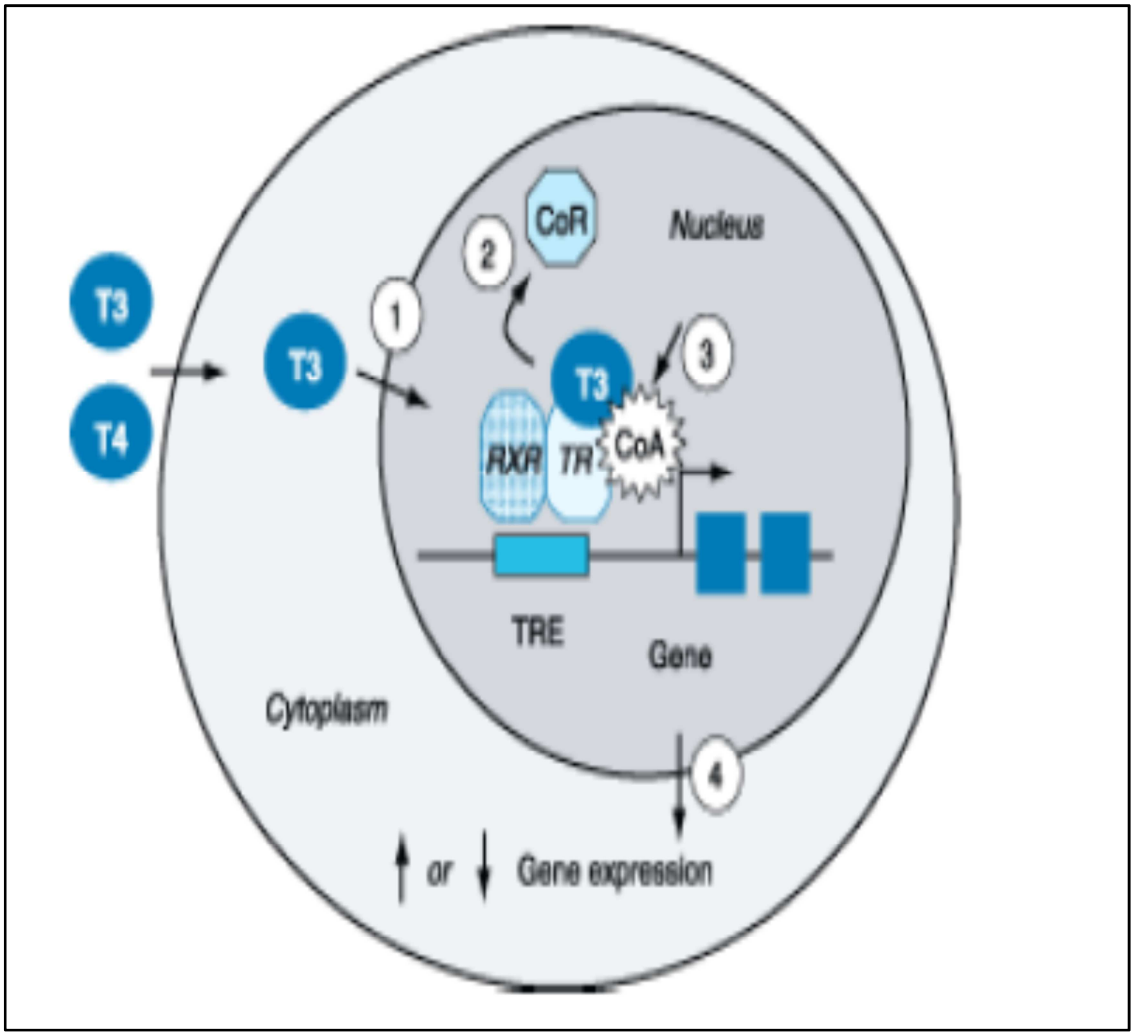
DUOX1 daha sonra 2, çift oksidaz aktivatörü veya çift oksidaz kürleme maddesi 1 ve 2 (sırasıyla DUOXA1 sonra 2) ile moleküller arası disülfid köprüleri ile sentezlenmiştir. DUOXA1 / 2, DUOX1 / 2 membran taşınması için gerekli olup ardından enzimatik olarak etkilenmiştir. DUOX1 / 2, sitoplazmik kalsiyuma bağlı alanlar tarafından CA tarafından aktive edilmiştir. DUOX1 / 2, terminal peroksidalara benzer ek bir alana

sahipti. NOX4 formları, esasen ROS olan NOX4'ü desteklemek için gerekli ve yeterli olan bir zara bağlı p22 kutusu ile heterozigot olmuştur. FAD: Flavin adenin dinükleotit bağlanma alanı (FAD); Daha sonra NADPH: dihidronutinamid – adenin Dinükleotid ayrıca fosfatlar (NADPH) -Ca^{++} bağlanma alanı; daha sonra kalsiyuma bağlanan ef-hand bölgeleri Heme olmuştur; hem bağlantısı sonra histidin kalıntısı DUOX1 ve DUOX2, aynı %77 amino asit dizileriyle benzerlik dizilerinde önemli ölçüde paylaştıkları yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerdir (sırasıyla 177 kDa ve 175 kDa), (Douketis *et al.* 2019).

2.6 Tiroid Hormon Etkisi

Tiroid hormonları, tiroid hormonu (TR'ler) α ve β reseptörleri olarak adlandırılan nükleer reseptörlere bağlanarak çalışmaktadır. Hem TRα hem de TRβ çoğu dokuda eksprese edilmiş olmasına rağmen nispi ekspresyon seviyeleri organlar arasında farklılık göstermiştir; TRα özellikle beyinde, böbreklerde, gonadlarda, kaslarda, ardından kalpte bol miktarda bulunurken, TRα ekspresyonu hipofiz bezinde ve ardından karaciğerde nispeten yüksek olmuştur.

Her iki reseptör de benzersiz izoformlar oluşturmak için farklı şekilde kesilmiştir. Eşsiz bir amino ucuna sahip olan TRβ2 izoformu, hipotalamusta ve ardından hipofiz bezinde seçici olarak eksprese edilir, çünkü tiroid ekseninden gelen refleksleri kontrol etmede rol oynadığı gösterilmiştir. TRα2 izoformu, tiroid hormonu ile bağlanması bloke edilen benzersiz bir karboksilasyon terminali içerir; TR'nin faaliyete geçmesini engellemek için çalışmaktadır. TR'ler, merkezi bir DNA bağlama alanı içinde, ardından C-terminalinin çapraz bağlı bir alanı içinde yer almıştır. Hedef genlerin promotör bölgeleri tarafından gösterildiği gibi, tiroid yanıt elemanları (TRE'ler) ile etiketlenmiş spesifik DNA dizilerine bağlanmıştır (Şekil 2.5). Gen reseptörünün transkripsiyonu uyarılmış (örneğin, miyozin ağır zinciri a) veya transkripsiyon engellenmiştir.



Şekil 2.5 Tiroid hormon reseptörünün bir eylem mekanizması (Harris *et al.* 2001)

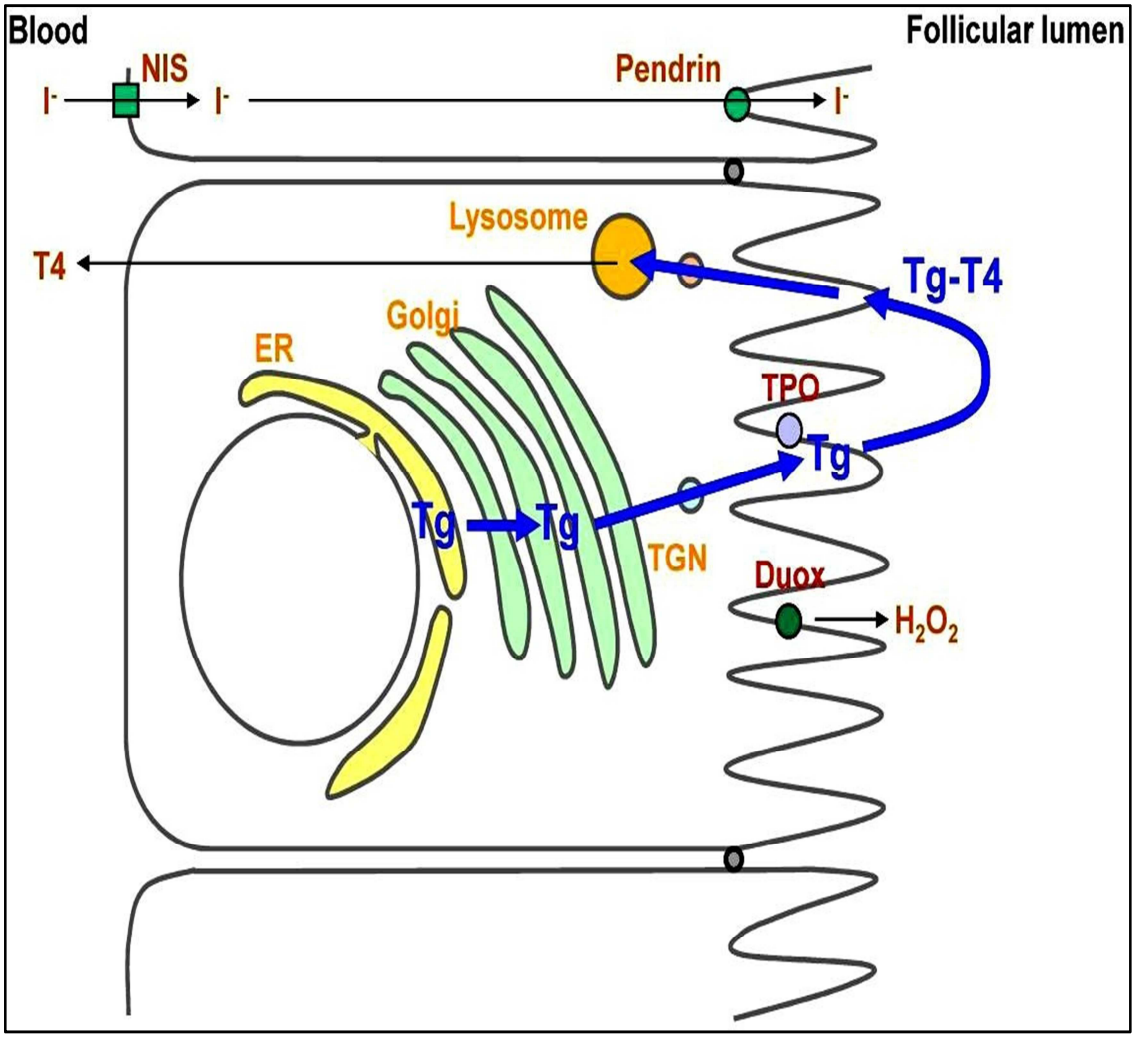
Tiroid hormonları benzer bağlantılar yoluyla TRα'ya ve ardından TRβ'ya bağlanmıştır. Bununla birlikte, T3, reseptörlerine, hormonal aktivitedeki bir artış ile açıklandığı üzere, T4'ten yaklaşık 10 ila 15 kat daha fazla afinite ile bağlanmıştır. T4'ün T3'ten fazla üretilmesine rağmen, reseptörler öncelikle T3 tarafından işgal edilmiş olup periferik dokular yoluyla T4'ün T3'e dönüşümünü yeniden üretip plazmada T3'ün biyoyararlanımını arttırmış olup ardından reseptör afinitesini artırmıştır. T3 ile TR'lere bağlandıktan sonra, onu modüle eden reseptörlerde tiroid hormonunun konformasyonel bir değişikliği ve ek transkripsiyon faktörleri ile etkileşimler meydana gelmiştir. Tiroid hormonu bağlanmasında, apo reseptörleri, gen transkripsiyonunu inhibe eden yaygın inhibitör proteinlere bağlanmıştır. Hormonların bağlanması yardımcı inhibitörlerden ayrılmış olup ardından transkripsiyonu iyileştiren adjuvan steroidlerin alınmasına izin verilmiştir. Yardımcı baskılayıcı tarafından TR etkileşimlerinin keşfi, TR sessizliğinin

hormonların bağlanmasının yokluğunda gen ifadesi olduğu gerçeğiyle açıklanmıştır. Bu nedenle, hormon eksikliği, aktif genlerin inhibisyonuna ve hormon kaynaklı uyarım kaybına neden olduğu için gen ekspresyonu üzerinde derin bir etkiye sahiptir. Bu algılar, farelerde TR genlerinin hedeflenen silinmesinin hormon eksikliğinden daha az belirgin olduğu hedeflenen sonuçlarla desteklenmiştir (TR etkileşimleri, yardımcı baskılayıcılar tarafından keşfedilmiş olup bu, TR sessizliğinin bir gen ifadesi olduğu gerçeğiyle açıklanmıştır). Hormon birliğinin yokluğu sonucunda keşfedildi ki hormon eksikliği, vücudun yeterince hormon üretmediği bir durumdur. Hormon eksikliği, gen ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir çünkü aktif bir geni inhibe etmiş olup hormon kaynaklı uyarının olmamasına neden olmuştur (Emerson and Torres 2003).

2.7 Tiroid Hormon Biyosentezinde TPO Genlerinin Rolü

Tiroid hormonu geliştirilmiş olup biyosentez yapıldıktan sonra çoklu organ sistemlerinde regülasyon yolu oluşmuştur (Kahmen 1979). Plazma zarına bırakıldığında, Tg üzerindeki tirozin tortusu, tiroid peroksidaz (TPO) tarafından iyotlanmaktadır. Bu işlem, elektron alıcısı olarak Şekil 2.6'da gösterildiği gibi tiroid hücrelerinin apikal membranında (Gillam and Kopp 2001) NAPDH oksidaz ailesinin iki üyesi (Duox1 ve Duox2) tarafından üretilen hidrojen peroksiti gerektirmektedir (Mercken *et al.* 1985).

İyot, tiroid hücrelerinin lateral ve apikal bazal membranlarında bulunan bir dizi taşıyıcının etkisiyle tiroid bezinin lümeninde TPO için kullanılabilir hale gelmiştir. TPO tarafından katalize edilen iyodin muamelesi işlemi sırasında, tirosil dioksit kalıntısının Tg ile spesifik bir eşleşmesi mevcuttur. Bu aşamada tiroid hormonları (T4 ve T3) hala tiroid bezinin folikül lümeninde yüksek konsantrasyonda depolanan Tg proteininin ayrılmaz bir parçasıdır (Liu *et al.* 2005).



Şekil 2.6 TPO'nun tiroid hormonu oluşumundaki rolü NIS: Sodyum / iyodür simportörü, TG: Tiroglobulin, TPO: Tiroid peroksidaz, TSH-R: Tiroid uyarıcı hormon, DUOX: çift oksidaz (Mercken *et al.* 1985)

Veziküler hücreler, TG'den kesilmiş iyotlu tirozinaz proteinlerini TG'yi yeniden emer, tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) oluşturur, ardından Şekil 2.6'de gösterildiği gibi kana salınır (Bianco *et al.* 2004, Orsolya 2003). Bez tarafından salgılanan tiroid hormonları, tam olarak % 90 konsantrasyonda serbest veya T4 formlarına ve yaklaşık (% 10) oranında T3 bağlıdır (Nussey and Whitehead 2001).

Harmonize Sodyum / İyodür alkali olup iyotun kan dolaşımından emilmesine yardımcı olmaktadır. Apikal iyodür taşıyıcı (AIT), beyin göçü veya diğer anyon kanallarının apikal iyodür taşıyıcıları olarak hareket etmesi önerilmiştir (Liu *et al.* 2005).

Hem TG hem de TPO genleri, promotörler, TTF-1 ve TTF-2'deki tiroide özgü transkripsiyon faktörleri üzerinde aynı bağlanma bölgelerine sahip olup genlerin her birinin güçlendirici bölgelerde TTF-1 bölgeleri mevcuttur. TG promotöründe konsensüs dizi elemanlarına bağlanan eşleştirilmiş kutu geni 8'e (Pax-8) de ihtiyaç duyulmuştur (Fabbro *et al.* 1994). TG gen ekspresyonu tiroid hücrelerinde meydana gelir ve daha sonra hipofiz bezinden salınan tiroid uyarıcı hormon (TSH) tarafından pozitif olarak düzenlenir. TSH üretimi, hipotalamusta sentezlenen ve portal sistem yoluyla ön hipofiz bezine taşınan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) tarafından kontrol edilir, burada TSH üretiminin artması sağlanır ve yeterli iyot ve folikül diyet miktarı ile birlikte salınır. Kolloid hücreler pinositoz, tiroglobulin salınmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

Bu çalışmada kullanılan araçlar Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılmış aletler ve üreticiler

ALETLER	FIRMA	ÜLKE
Analitik terazi	Stanton	İngiltere
Basınçlı fırın	Arnold ve Sorris	Almanya
Evrensel santrifüj	Hitesh	Almanya
Damıtılmış	American	Amerika Birleşik Devletleri
Güç kaynağı için sürekli elektroforez	Applex	Fransa
Koltuk Mikrofüj Eppendorf	Netherlands ve Haines GmbH 2000	Almanya
Jel elektroforez cihazı DNA ™ Cell	Applex	Fransa
Gene Flash jel dokümantasyon sistemi	Bio-imaging	Amerika Birleşik Devletleri
Bakıcı	Galencamp	Birleşik Krallık
Laminer hava akış kapağı	Categories of Geller	Birleşik Krallık
Optik mikroskop CH-2	Olympus	Japonya
Sıcak plakalı manyetik karıştırıcı	Galencamp	Birleşik Krallık
Küçük pipet (otomatik)	Eppendorf Gilson 20P, P100, P1000	Fransa
Otomatik Mini Vidas İmmünohistokimya Sistem Analisti (VIDAS)	Piomero	Fransa
Karıştırıcı	Rich	Birleşik Krallık
Oven	Galencamp	Birleşik Krallık
PZR Sistemi (Palms and palms Cyclist) energy Donates SR-101 (CR. Orbit Search)	Silicon	Japonya
EISO pH ölçek	Metrohm AG	İsviçre
Spektrofotometre	Cecil	Fransa
Spiral Karıştırıcı	Galencamp	Birleşik Krallık
Su banyosu	Precysterm	Almanya

3.1.2 Kimyasal Malzemeler

Kullanılan malzemeler Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

KIMYASALLAR	FIRMA	ÜLKE
Mutlak etanol	Fouca	Almanya
Mutlak metanol	BDH	İngiltere
Agaroz (moleküler sınıf)	Sigma	Amerika Birleşik Devletleri
Benzilpenisilin	Sigma	Amerika Birleşik Devletleri
Bromofenol Mavisi	BDH	Birleşik Krallık
Kromik asit	Prolabo	Almanya
DNA merdiveni, mark (1,000 bps)	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
DNTPs (mix)	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
EDTA	BDH	Birleşik Krallık
Etidyum bromür	BDH	Birleşik Krallık
Fetal baldır serumu	* ICCMGR	Irak
The stigma of Jamesa ?	BDH	İngiltere
Buzul asetik asit	BDH	Birleşik Krallık
Heparin	Panpharma SA	Fransa
KH2S4	Fouca	Almanya
LNA-Primer	KKU. Bio-Basic Corporation	Tayland
Kilitli nükleer Asit (LNA-PZR)	KKU home	Tayland
Metanol	BDH	United kingdom
Maggal*s*2*s*6 hours*s*2*s*a	BDH	United kingdom
Sodyum klorit	BDH	United kingdom
Na*s*2*s* Ha*s*4	Fouca	Almanya
Fitohemagglutinin	* ICCMGR	Irak
Potasyum klorür	BDH	United kingdom
RPMI 1640 modülleri	BDH	United kingdom
Sodyum karbonat	BDH	United kingdom
Streptomisin	Samara Factory	Irak
Ts3s ve Ts4s a İkinci kısayol TSH Kitleri	Piomero	Fransa
Yöntemler DNA polimeraz	KKU home	Tayland
TBE arabelleği (5x)	Sigma	Amerika Birleşik Devletleri
Sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
* ICCMGR: Irak Kanser ve Tıbbi Genetik Araştırmaları Merkezi		

3.2 Konular

3.2.1 Kan testleri

Kan testleri, hipotiroidili 100 hasta, tiroid kanserli 15 hasta ve kontrol olarak 20 sağlıklı

denekten oluşmaktadır. Yaşları (30-60) arasında değişmekteydi. 30 dakika boyunca steril bir tüpte intravenöz bir ponksiyonla 5 mL periferik kan toplanmıştır. Test tüplerinde kanın pıhtılaşmasını sağlamak için beklenilmiştir.

Serum, 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kan hücrelerinden ayrılmıştır. Oda sıcaklığında serum kullanılana kadar -20 °C'de saklanmıştur. Bu örnekler Dhi Qar Hastanesi Shatra Genel Hastanesi ve Al Hussein Eğitim Hastanesi'nden alınmıştır.

3.2.2 Tümör doku örneklerini toplama

Transfer ortamı içeren steril bir tüpte 15 hastadan tümör dokusu örnekleri toplanmıştır (Bölüm 2.6). Hastaların yaşları (30-60) arasında değişmekteydi. Bu örnekler ameliyathane Ti Kar Hastanesi Şatra Genel Hastanesi ve Al Hussein Eğitim Hastanesi'nden alınmıştır.

3.2.3 Tiroid hormonlarının tayini

- **Prensip**

Hormonlar vücudumuzda önemli bir rol oynamaktadır. Serum veya plazmada Mini-Vidas ve ayrıca EBFT (enzim bağlantılı floresan tahlili) kullanılarak keşfedilmişlerdir. Bu teknikleri kullanarak serum veya plazmadaki toplam sT3, sT4 ve TSH'yi tahmin edebiliriz.

Mini-vidas cihazının nasıl çalıştığı ve cihazın içinde gerçekleşen etkileşimleri gözlemlenmiştir. Mini Vidas cihazı, doğru sonuçlar ve hızlı performans ile karakterize edilen gelişmiş ve modern bir cihazdır (Vidas cihazı gibi daha modern cihazlar olmasına rağmen, mini Vidas cihazı şimdiye kadar yaygın olarak kullanılmaktadır). İşlem adımları, birinci bileşene (şerit) serum uygulanmıştır. Bu şerit aşağıdaki gibi 10 deliğe sahiptir:

- 1 = örnek kuyu
- 2,3,4,5 = boş kuyu
- 6 = eşlenik kuyu
- 7,8,9 = yıkama tamponu
- 10 = askıya almak

- **Protokol**

1. Reaktif, VIDAS'a uygulanmadan en az 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. (VIDAS Kullanıcı Kılavuzu) kullanarak bir iş listesi oluşturmak için VIDAS istasyonunun TSH kodu olarak PieNT Test verileri ve sT3 veya sT4.
3. Kalibre edilmiş ve izlenmiş 100 µL numune, numune şeritlerinin ilk kuyucuğuna yerleştirilmiştir.

Onuncu sT3 ve sT4 aDr TSH SPs aİkinci kısayol sT3 ve sT4 aDr TSH RegenR, ekranda gösterilen konuma yerleştirilmişlerdir. Kılavuzlu prosedür VIDAS Kullanıcı Kılavuzunda izlenmiştir. Tarama yaklaşık 40 dakika sürmektedir.

Sonuçlar, bellekte saklanan ve ardından yazdırılan bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak VIDAS tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. sT3 ve sT4 ve TSH konsantrasyonu mol/L ve IU/L olarak ifade edilmiştir (Biersack and Hotze 1991).

3.2.4 Moleküler analiz

A. Genomik DNA izolasyonu

- **Prensip**

Wizerd Genomik DNA Saflaştırma Kiti, kısa sürede tam kan hücrelerinden DNA'nın hızlı ve kolay izolasyonu için iyi bir yöntemdir. Miller (1988) tarafından bildirildiğine gore; prosedürlerine göre dört aşamalı bir sürece dayanmaktadır. Kit şunlardan oluşur:

1. Hücre parçalama solüsyonu.
2. Nükleoliz çözeltisi.
3. RNaz çözeltisi.
4. Protein çökeltme çözeltisi.
5. DNA işleme çözeltisi.

- **Protokol**

Steril koşullar altında ve Promega'nın DNA Genomik DNA Saflaştırma Kiti (A 1120) protokolüne uygun olarak.

1. Bir nükleaz – küçük, serbest, 1,5 mL santrifüj tüpü içindeki 300 ul kana dokuz yüz 1 ul solüsyon (RBCs solüsyonu - Lyses - Buffer) eklenmiştir. Tüp 5-6 kez kısaca çalkalanmış olup karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve 20 saniye 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
2. Süpernatant çıkarılıp tortu 900 µL solüsyon 1 ile yıkanmıştır. Preparat 20 saniye 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
3. Her bir tüpe 300 µL Solüsyon 2 (Çekirdek Parçalama Solüsyonu) eklenerek beyaz kan hücreleri eriyene ve karışım saflaşıncaya ve kıvamlı hale gelinceye

kadar solüsyon 5-6 kez emilmiş olup ardından 1,5 µL Solüsyon 3 (RNaz Solüsyonu) eklenmiştir.

Tüpler 2-5 kez alt üst edilmiş olup karışım 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 µL solüsyon oda sıcaklığına soğutulmuştur.

4. (protein çökeltme solüsyonu) tüplere eklenmiştir. Tüpler tam olarak 10-20 saniye döndürülmüş olup 5 dakika inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında. Hazır madde 13,000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Süpernatan, yeni bir 1,5 mL nükleaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüplere 300 µL oda sıcaklığında izopropanol eklenmiştir. Tüpler iyice döndürülerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İplik benzeri DNA'nın beyaz iplikleri görünür bir kütle oluşturana kadar hafifçe karıştırılmıştır. Hazır madde bir dakika 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
6. Süpernatan, yeni bir 1,5 mL nükleaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1 mL % 70 etanol eklenmiş olup reaksiyon tüpü hafifçe döndürülerek karıştırılmıştır. Tüpler 1 dakika boyunca 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
7. Süpernatant dikkatlice dökülüp atılmıştır. Deliği aşağı bakacak şekilde tüp 10-15 dakika filtre kağıdına yerleştirilmiştir.
8. DNA peleti, tam bir DNA çözeltisi elde etmek için 100 µL Çözelti 5 (DNA İşleme Çözeltisi) içinde çözülmüştür.
9. Bu tüpler 65°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra izolasyon DNA'sı -20 °C'de saklanmıştır.

B. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA konsantrasyonu Sanbrook vd. (1989)'a göre oranlanmıştır. 5 µl DNA solüsyonu 495 µL distile su ile seyreltilmiştir. Optik yoğunluk, referans olarak damıtılmış su kullanılarak bir ultraviyole spektrofotometre ile 260 nM'de belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu (µg/mL) = [OD 260 nM x seyreltme faktörü x 50 µg/mL Protein ile DNA kontaminasyon derecesini belirlemek için 280 nm'de ek bir ölçüm yapılmış olup AR260R / AR280R bölümü hesaplanmıştır.

C. Saflık

DNA, 1,8 veya daha yüksek bir AR260R/AR280R oranı verecektir. Değer 1,8'den azdır. DNA'nın protein ile kontaminasyonunu göstermektedir (Sanbrook *et al.* 1989). Optimal test sonuçları elde etmek için DNA saflığı ve konsantrasyonu son derece önemlidir.

3.2.5 TPO gen mutasyonlarının tespiti

3.2.5.1 Yaygın mutasyonlar

Bu çalışmada tanı için sekiz yaygın mutasyon seçilmiştir. Bu mutasyonların seçimi, toksik ve toksik olmayan guatr, hipotiroidizm ve tiroid kanseri bozuklukları ile ilişkili en yaygın mutasyonların dağılımına dayanmaktadır. Bu mutasyonların ve primerlerin yerini belirlemek için, mRNA dizileriyle tasarlanmış tam TPO genleri NCBI araçlarıyla tanımlanmıştır (Ek I, II, III ve IV'e bakınız). Bu mutasyonlar sırasıyla TPO mutasyonlarından 10 ve 11 ekzonlarındaki g1708C> T ve 1978 C> G bölgelerini içermektedir (Bikker *et al.* 1997, Kotani *et al.* 1999).

3.2.5.1.1 Ön ekler PZR

- **Prensip**

Modifiye edilmiş kalıntıya kilitlenen DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu prensibi, bağlam dizisine bağlı olarak ilişkilidir. Bu nedenle, primerler inşa edilebilir.

Mutasyona uğradığından ve değiştirildiğinden şüphelenilen lokusa bağlı olarak N tipi konformasyonda şekeri DNA formunda kısıtlayan veya "bloke eden" deoksiribonükleotitte pentoz şekerinde hafif bir değişiklik gözlenmiştir. Kilitleme, 2'-0 ve 4'-C metilenin 1,2:5,6-di-O-izopropilen-a-D-allofuranoza bağlanmasıyla sağlanmıştır. Daha sonra bu değişiklik, kapalı fosforamid nükleotit monomerlerinin sentezi için temel teşkil etmiştir. Bu monomerlerden bir veya daha fazlasını içeren

birkaç nükleotide kilit DNA adı verilmiştir (Obika *et al.* 1998). Ek olarak, LNA monomeri, yüksek füzyon sıcaklığından (Tm) ve tamamlayıcı DNA'ya karşı termal stabiliteden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, oligonükleotidi bloke eden, hassasiyeti azaltmadan mahremiyeti arttırmaktadır. Termodinamik modelin değiştirilmiş bir versiyonu kullanılarak DNA için Tm hesaplanmıştır (John and Senbet 1998).

- **Protokol**

TG ve TPO genlerinin mutasyonlarını saptamak için yirmi modifiye primer kullanılmıştır. Bu öneklerin dizileri GeneFisher ve Oligoanalyzer ile Ortak Tıp Bilimleri Koleji / Khon Kean Üniversitesi'ndeki BLAST tanıtım programları (Bio Basic Inc. Tayland lisansı altında) kullanılarak tasarlanmıştır. Bozulmuş önekler, genetik dizi homojenliğine bağlı olarak tasarlanabilmiştir. Gene Fisher ve Oligo-Analzer, tasarımcı bozulma önekleri için iki etkileşimli web tabanlı programdır. Her iki TPO Genindeki mutasyonları tespit etmek için primerler birleştirilmiştir.

- **İlk Seyreltme**

Tüm önekler Bio Basic Inc. Thailand Company tarafından farklı konsantrasyonlarda bikomol içeren liyofilize bir ürün olarak sağlanmaktadır. Bio Basic Inc. Protokol Sertifikası Tayland, 10/l süspansiyon nihai konsantrasyonuna ulaşmak için deiyonize su kullanarak başlangıç materyallerini ve süspansiyonları seyreltilme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1.2 Primer pzr bileşenleri

Primer bileşenleri - PZR bileşenlerinin reaksiyonu ve karıştırma miktarları, Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 TPO genlerinin PZR amplifikasyonu için kullanılan primer ve primer modifikasyon dizilimi

ADIM	PRIMER GIRIŞI (5 '→ 3')	LNA ASTARINI TERS ÇEVIRME (5 '→ 3')
TPO Geni		
Exon 10		
1708 C> t	FW-TPO-21 gtggtttgacccactaatac FM-TPO-22 gtggtttgacccactaatat	RW-TPO-23 cctgggaggttcagaacc
Exon 11		
1978 C> g	FW-TPO-24 cctggacttgtacaagcatcc FM-TPO-25 cctgacttgtacaagcatcg	RW-TPO-26 cgtcccattctaagtgctacg
W = yabani tip, M = mutasyon, (Bio Basic Inc. Tayland lisansı altında)		

- **İlk seyreltme**

Tüm önekler Bio Basic Inc. Thailand Şirketi tarafından farklı konsantrasyonlarda bikomol içeren liyofilize bir ürün olarak sağlanmaktadır. Bio Basic Inc. Protokol Sertifikası Tayland, 10/l süspansiyon nihai konsantrasyonuna ulaşmak için deiyonize su kullanarak başlangıç materyallerini ve süspansiyonları seyreltilme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1.3 Primer pzr bileşenleri

Primer bileşenleri- PZR bileşenlerinin reaksiyonu ve karıştırma miktarları, Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 TPO genlerinin PZR amplifikasyonu için kullanılan primer ve primer modifikasyon dizilimi

ADIM	PRIMER GIRIŞI (5 '→ 3')	LNA ASTARINI TERS ÇEVIRME (5 '→ 3')
TPO geni		
Exon 10		
1708 C> t	FW-TPO-21 gtggtttgacccactaatac FM-TPO-22 gtggtttgacccactaatat	RW-TPO-23 cctgggaggttcagaacc
Exon 11		
1978 C> g	FW-TPO-24 cctggacttgtacaagcatcc FM-TPO-25 cctgacttgtacaagcatcg	RW-TPO-26 cgtcccattctaagtgctacg
W = yabani tip, M = mutasyon, (Bio Basic Inc. Tayland lisansı altında).		

3.2.5.2 Jel elektroforezi

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri, DiMaio vd. (1982)'e göre ultraviyole ışıkta DNA alanlarının tespitinin ardından agaroz jel elektroforezi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.5.2.1 Hazır maddeler

- **Tris-Borat-Edta Tamponu (TBE)**

109 gr Tris baz, 55,54 gr borik asit ve 20 mL EDTA (0,5 m) (pH = 8,0) uygun miktarda DW ile çözülerek ve 1 litre hacime kadar DW kullanarak Tris-borat 10x tampon çözeltisi hazırlanmış olup ardından pH 7,8'e ayarlanmıştır. Çözelti, 121°C'de 15 psi'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş olup oda sıcaklığında saklanmıştır (Sanbrook *et al.* 1989).

- **0,5 Terabayt Times**

1900 mL DW içinde 100 mL 10x TBE karıştırılarak Tris-borte 0,5x tampon solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.5.2.2 Protokol

1. Yüzde bir agaroz jeli, 1 g agarozun 100 mL 1x TBE içinde çözelti berraklaşana kadar kaynatılmasıyla hazırlanmıştır. Çözeltinin 55 °C'ye soğumasına izin verilmiş olup ardından jele etidyum bromür (0,5 µg/mL) çözeltisi ilave edilmiştir. Agaroz çözeltisi, bir jel yapmak için kapalı bir plakaya dökülmüştür.
2. Kristalizasyondan sonra (Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika), tarak ve bant çıkarılmıştır. Jel, 0,5x TBE tamponu ile doldurulmuş bir jel odasına yerleştirilmiştir. Jel cepleri tamamen bir yalıtkan ile kaplanmıştır.
3. Tüm PZR karışımı (25 ul) jel ceplerine damlatılmıştır. Ek olarak, hacim karşılaştırması için 5 µL DNA uzunluk standardı uygulanmıştır.
4. Daha sonra 100 eV'de 45 dakika elektroforez yapılmıştır.
5. Elektroforez tamamlandığında jel bir UV transillüminatöre uygulanmıştır (Maniatis *et al.* 1982). Gene Flash Gel Dokümantasyon Sistemi. Gözlenen aralıkları belgelemek için bir jel dokümantasyon sistemi kullanılmıştır.

3.3 Patolojik Histolojik İnceleme

Bu yöntem (Bancroft *et al.* 1988) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Histolojik bölümün hazırlanması

Histopatolojik inceleme için alınan örnekler hemen % 10 formaldehit içinde muhafaza edilmiştir. Musluk suyu ile yıkandıktan sonra tamir edilmiş olup artan alkol konsantrasyonları aralığında (% 70, % 80, % 90, % 100) işlem görmüştür. Dokular parafin bloklara dahil edilmiş olup ardından (5-6) µm'de bölünmüştür. Tüm üniteler hematoksilen ile renklendirilmiş olup ardından eozin boyanmıştır ve patolojik değişiklikler gözlenmiştir.

3.3.2 Hematoksilen-eozin yöntemi

Histolojik kesitler aşağıdaki solüsyonlara ve reaktiflere aşağıdaki gibi yerleştirilmiştir:

1. 5 dakika boyunca zylol.
2. 1 dakika boyunca mutlak alkol. Kuruması için bir dizi etanol (% 80, % 70, % 50, % 35) ayırıp ardından 1 dakika DW'de durulama.
3. 1 dakika boyunca iyot boyama.
4. Sodyum - iyodu silmek, dokuları beyaza çevirmek ve birkaç dakika musluk suyunda durulamak için hidrojen sülfat.
5. 1 ve 5 dakika hematoksilen, ardından fazla boyayı silmek için musluk suyunda durulama.
6. Pembeye dönene kadar asidik alkol ekleyin, ardından musluk suyuyla durulamak.
7. Maviye dönene kadar kabartma tozu ekleyip, ardından musluk suyuyla durulamak. 5 dakika eozin, ardından musluk suyunda durulamak. 10.xylol 3 dakikanın ardından Kanada balsamında infüze etmek.

3.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, Minitab 15 istatistiksel analiz yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Farklı grupları kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Tüm değerler, ortalama ± ortalamanın standart sapması (M ± SD) olarak ifade edilmiştir. P değeri< 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Klinik Çalışmanın Özellikleri

Tiroid tümörü ve tiroid kanseri olan hasta ve sağlıklı kontrol grubu sayısı olmak üzere iki tiroid hasta grubundan kan örnekleri alınmıştır. Böylece guatr 30 (% 30) ve tiroid kanserli hasta gruplarının tam sayısı 20 (% 20) olarak saptanmıştır. Bu sayı kontrol grubunda ise 25 (% 25) idi. Hastalar 35-55 yaş arası ve 50 yaş üstü idi. Hem hasta hem de kontrol grupları için cinsiyet dağılım verileri, Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Erkeklerde ve kadınlarda oranlar sırasıyla % 25 ve % 48, cinsiyetler arası oranlar ise tiroid kanseri ve guatr gruplarında 7:13 ve 8:22 idi.

Çizelge 4.1 Yaş ve cinsiyet (n=75) dikkate alınarak hipotiroidili hasta gruplarının ve görünüşte sağlıklı kontrollerin demografik özellikleri

GRUPLAR	**(N) %**	**YAŞ (YIL)%**				**CINSIYET**	
		<30	35-55	> 50	sum	E	K
Sağlık Kontrol Grubu							
	25	5	15th	5	25	10	15th
Hasta grupları							
Tiroid kanseri	20	6	10	4	20	7	13
Guatr	30	7	15th	8	30	8	22
Toplam	75	18	40	17	75	25	50
X^2		6,4 **					
E: Erkek, K: Kadın: Hasta sayısı. **: çok önemli (p <0,01)							

Çizelge 4.1'de sunulan hastaların yaş dağılımı, hastaların % 40'ının 30 – 50 yaş arasında olduğunu göstermiştir. Ayrıca, görünüşte sağlıklı (kontrol) grup (25 denek) 10 (% 44) erkek ve 15 (% 56) kadından oluşmaktadır. Bu dağılımdan farklı bir lokusta, yaklaşık olarak incelenen örnekler dişileri ayırt etmiştir. Bu sonuçlar, tiroid bozukluklarının kadınlarda erkeklere göre daha yaygın olduğunu doğrulayan veri ile uyumludur (Neutel *et al.* 2002). Çalışmaların prevalansı, 30 yaşında deneklerin maksimum guatrına sahip olarak tanımlanmıştır (Oelmann *et al.* 2002). Yaşla birlikte ek guatr prevalansı, hatta guatr prevalansında azalma tespit edilmiştir. (Brander *et al.* 2000).

Yeterli iyot bulunan bölgelerde 40 yaşından sonra guatr prevalansının azaldığı tespit edilmiştir (Brander *et al.* 2000, Papini *et al.* 2007). Genel olarak tiroid hacminin erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Weiss *et al.* 1996). Önceki tüm çalışmalar, tiroid bozukluklarının kadınlarda guatr artışı anlamına geldiğini göstermiştir (Brander *et al.* 2000).

Sonuçlarımız, yaş ve cinsiyetin tiroid bozukluklarının prevalansı ve insidansı ile ilişkili olduğunu ve orta yaş ile daha yüksek olduğunu göstermektedir. Birkaç çalışma, tiroid bozukluklarının çoğunluğunun 30 ila 50 yaş arasındaki yetişkinlerde yaygın olduğunu ve insidansın kadınlarda erkeklerden daha yaygın olduğunu bildirmiştir (Nordyke *et al.* 1988, Gabriel *et al.* 2009).

4.2 Biyokimya Parametreleri

4.2.1 Serum TSH, T4 ve T3 seviyeleri

Tiroid bozuklukları ve kontrol grupları için TSH, T4 ve T3 kan seviyeleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Tiroid kanseri grubunda (105,71 ± 9,85 nmol/L) T4 düzeyleri dikkate değerdi ($p<0,05$). Ayrıca, T4 ve T3 seviyeleri önemli ölçüde artmıştır.

Toksik guatr gruplarında artışa (97,29 ± 8,71 nmol/L ve 1,84 ± 0,33 nmol/L) ek olarak, hormon düzeylerinin genel prevalansı, kontrole göre önemli ölçüde değişmiştir. Bu çalışmada TSH, T4 ve T3 düzeylerinin ortalama değerlerindeki farklılıklar yaygındı. Araştırmacılar, TSH, T4 ve T3 seviyeleri ile tiroid bozuklukları arasındaki ilişkiyi incelemekle ilgilenmektedir.

Guth vd. (2009)'de yaptıkları çalışmada, guatrın T4 ve T3'te ortaya çıkan değişikliklere bağlı olduğunu belirtmektedir. Çeşitli durumlarda hormon düzeylerinin guatr oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bazı araştırmacılar da T4 seviyesinin toksik guatr gelişimini artırdığını bulmuşlardır.

Çalışma sonuçları, toksik guatr ve tiroid kanseri olan hastalarda kandaki düşük TSH seviyelerini tespit etmeye odaklanmıştır (Guth *et al.* 2009).

Çizelge 4.2 Tiroid bozukluğu olan hasta gruplarında kan TSH düzeyleri (µIU/mL), T4 (nmol/L) ve T3 (nmol/L)

Gruplar	**Hormonlar**		
	TSH (IU/mL)	**T4 (nmol/L)**	**T3 (nmol/L)**
Sağlıklı (kontrolör)	1,42 ± 0,19 b	87,76 ± 4,49 A	1,54 ± 0,23 b
Tiroid kanseri	1,46 ± 0,74 b	105,71 ± 9,85 a	1,33 ± 0,15 b
Toksik guatr	1,61 ± 0,43 b	97,29 ± 8,71 A	1,84 ± 0,33 A
P-değeri	6,494 *	18,928 *	0,528 *
*: İstatistiksel olarak dikkate değer farklar (p <0,05), a, b: farklı harfler ortalamalar arasında istatistiksel olarak belirgin farkları gösterir.			

4.2.2 Yaşın TSH, T4 ve T3 kan düzeylerine etkisi

Çizelge 4.3'te sunulan sonuçlar, tiroid bozukluğu olan hasta grupları arasında yaş gruplarının TSH, T4 ve T3 kan seviyeleri üzerindeki etkisini göstermektedir.

Tiroid hastalıkları dışında tüm gruplarda TSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, tiroid bozukluğu grupları arasında kan T4 düzeylerinde yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Serum T4 düzeyi tiroid kanserli gruplarda yaşla birlikte azalırken, toksik guatr grubunda yaşla birlikte yükselmiştir.

Serum T3 seviyeleri, 50 yaş üstü tiroid kanseri grubundaki hastalarda diğer yaş gruplarıyla karşılaştırıldığında (sırasıyla 0,66'ya karşı 1,6 ve 1,48> 50, <30 ve 30-50 yaş) kayda değer biçimde azalmıştır (p<0,05). Diğer tiroid hasta gruplarında yaş grupları ile birlikte T3 seviyelerinde anlamlı farklılık mevcut değildir.

Sonuçlar, yaş grupları arasında T3 ve T4 düzeylerinde anlamlı bir farklılık olmadığını ve bu sonucu doğrulamaktadır. 50 yaş üstü hastalarda T3 ve T4 düzeylerinde değişiklik

olmamasına eşlik eden artan TSH düzeyleri iyot eksikliğine bağlanabilir. İyot eksikliğinin ilk fonksiyonel sonucu, tiroidin iyot alımını arttırmıştır. Bu süreç, kandaki TSH seviyesini artırarak iyileşmiştir. TSH'ye tiroid duyarlılığı, kandaki artan TSH seviyesinden daha önemlidir (Franklyn *et al.* 2008).

Çizelge 4.3 Tiroid bozukluğu olan hastalarda yaşa göre kan TSH düzeyleri (µIU/mL), T4 (nmol/L) ve T3 (nmol/L)

Gruplar	**Yaş (Yıl)**			**P. Değeri**
	<30	**35-55**	**> 50**	
TSH (0,4-4) µ. Iu/l				
Tiroid kanseri	0,25 ± 0,14	1,77 ± 1,87	1,85 ± 1,28	5,612 ns
Toksik tiroid bezi guatr	0,58 ± 0,30	2,17 ± 0,83	1,58 ± 0,70	2,491 ns
T4 (60-120) nmol/L				
Tiroid kanseri	138,50 ± 14,50	108,17 ± 10,86	77,00 ± 13,39	55,093 ns
Toksik tiroid bezi guatr	87,15 ± 16,97	106,31 ± 14,38	102,75 ± 8,92	48,354 ns
T3 (0,9-2,3) nmol/L				
Tiroid kanseri	1,66 ± 0,05 A	1,48 ± 0,15 A	0,66 ± 0,07 b	0,748 *
Toksik tiroid bezi Guatr	2,11 ± 0,68	1,83 ± 0,42	1,78 ± 0,32	1,316 ns

*: İstatistiksel olarak kayda değer fark (p <0,05), ns: istatistiksel olarak kayda değer fark. A, B: Farklı harfler, ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları gösterir.

4.2.3 Kandaki TSH, T4 ve T3 düzeylerinin cinsiyetinin etkisi

Çizelge 4.4'teki sonuçlar Tiroid bozuklukları çalışmalarında cinsel olarak etkilenen kan TSH, T4 ve T3 düzeylerini göstermektedir. Tüm tiroid bozuklukları gruplarında serum TSH ve T4 düzeylerinde cinsiyete göre anlamlı bir farklılık mevcut değildi. Bunun yanı sıra, Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi tiroid kanserli kadın grubundaki T3 seviyeleri erkeklere göre kayda değer biçimde arttı ($P < 0,05$).

Çizelge 4.4 Tiroid bozukluğu olan hastalarda cinsiyetin TSH (µIU/L), T4 (nmol/L) ve T3 (nmol/L) düzeylerine etkisi

Gruplar	**CINSIYET**		**P. Değeri**
	BKNZ.	**KADIN**	
	HORMONLAR		
TSH (µ IU/mL)			
Tiroid kanseri	1,07 ± 0,83	1,56 ± 1,05	3,558 ns
Toksik guatr	1,34 ± 0,33	1,60 ± 0,55	1,768 ns
T4 (nmol/L)			
Tiroid kanseri	92,30 ± 14,00	106,71 ± 11,50	37357 ns
Toksik guatr	104,65 ± 15,10	91,26 ± 8,53	34,188 ns
T3 (nmol/L)			
Tiroid kanseri	0,86 ± 0,18 b	1,40 ± 0,13 A	0,471 *
Toksik guatr	1,65 ± 0,24	1,88 ± 0,21	1,035 ns
ns: Istatistiksel olarak kayda değer farklılıklar, *: Istatistiksel olarak kayda değer farklar (p <0,05), a, b: Farklı harfler ortalamalar arasındaki istatistiksel olarak kayda değer farkları gösterir.			

4.3 Moleküler Araştırma

4.3.1 DNA hazırlığı

Periferik kandaki EDTA lenfositleri, Promega tarafından sağlanan Wizard Genomic DNA Arıtma Kit'in standart prosedürü izlenerek DNA'yı izole etmek için kullanılmıştır. Bir tampon çözeltisi içinde çözündürülmüş olup daha sonra bir spektrofotometre ve ultraviyole ışığa maruz bırakılan etidyum bromür ile jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Genomik DNA üretimi, kanın tazeliğine ve depolanmasına ve kan örneğindeki beyaz kan hücrelerinin miktarına bağlı olarak konsantrasyon ve saflığa göre numuneler arasında farklılık göstermiştir.

4.3.2 Önekler pzr tahlili

Hedef DNA, vahşi tipte modifiye edilmiş primerler (doğal primer) ve diğer tespit edilecek mutasyona tamamlayıcı (primer mutajen) kullanılarak ön ek reaksiyon - polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilmiştir. Fraksiyon çıktısını yükseltmek için PZR'ye TPO geninin farklı bir bölümünü tamamlayan bir çift primer dahil edilmiş olup bu da reaksiyon karışımının ve termal dolaşımın uygun, doğru ve optimal olarak hazırlandığını göstermektedir.

Ürünün yabani tipte ve mutantta bulunmasının heterozigot olduğu belirlenirken, mutant alanın varlığı mutasyon için sadece homozigozu gösterirken, vahşi türün ilkel alanının varlığı tiroid bozukluklarına ilişkin çalışmalardan elde edilen bulguların örnekleri olarak yalnızca doğasını (mutasyon olmadan) göstermektedir (Najmabadi *et al.* 2003).

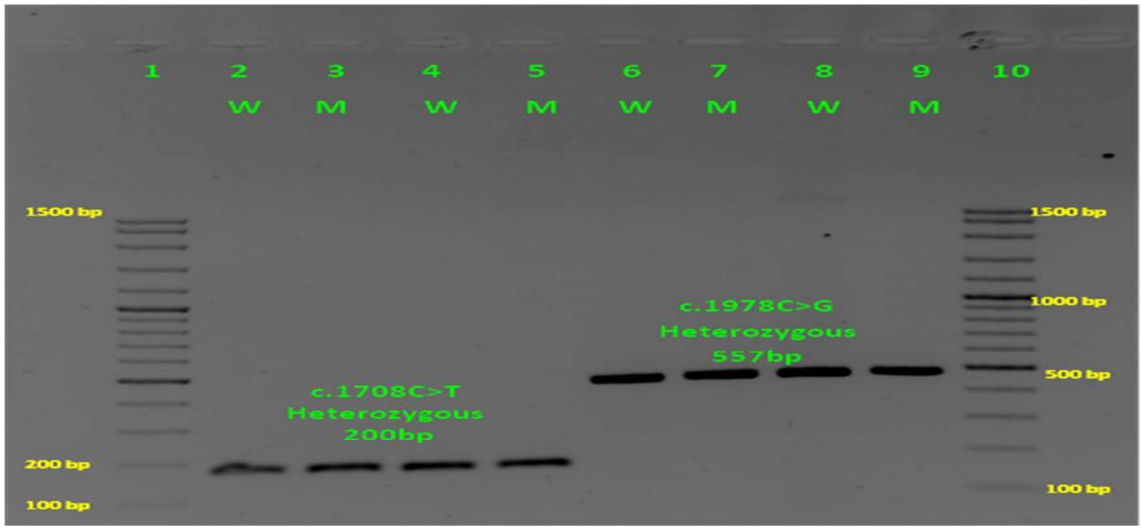
4.3.3 Eksonik ve ekzonik-TPO genleri arasındaki intronic ekleme bölgesi mutasyon

Bu çalışmada ekzonlar ve ekson-intronlar TPO genleri analiz edilmiştir. Mutajenik sonuçlar (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6)'da gösterilmiştir. TPO genlerinde iki mutasyon tespit edildiğinden tiroid bozukluğu hastalarında mutasyonlar tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 Hastalar ve sağlıklı kontrol arasındaki TPO genlerindeki heterozigot ve homozigot mutasyonların demografisi

A Adım	**GENOTIP**						
	HASTA GRUPLARI					**SAĞLIKLI KONTROL**	
	Toplam örnek	Mutant olmayan	Mutant		Toplam örnek	Mutant olmayan	Mutant
			simetrik	Heterozigot			
	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.
TPO geni							
C 1708 c> T	21	0	4	17	25	0	0
C, 1978 CE> c	29	0	8	21	25	0	0
Toplam	50	30	12	38	25	0	0
X: toksik guatr, C: tiroid kanseri.							

TPO geninde sistein dönüşümü veya timin veya guanin ile dönüşüm içeren mutasyonlar, ekson 10'un 1708 pozisyonunda (c1708C> T) ve ekson 11'in 1978 pozisyonunda (c1978C> G) Şekil 4.1'de gösterildiği gibi tespit edilmiştir. Tiroid bozukluklarına hormonal bozukluklar ve genetik bozukluklar neden olmuştur. İyot bakımından çok düşük bir diyet ve tiroid hormonu biyosentezi için gerekli bir proteini kodlamak için genlerdeki kusurlar, hormonların yetersiz üretimine yol açabilmektedir. Sonuç olarak, tiroid bozuklukları ile ilişkili TPO genlerindeki genetik kusurlar iyi belgelenmiştir.



Şekil 4.1 TPO c. Tiroid bozukluğu olan hastalarda 1978C > G (Gln660Glu) ve altı 1708C > T mutasyonu tespit edildi. Toksik guatr ve tiroid kanseri vakalarının sayısı diğer tiroid hastalıkları gruplarına göre daha fazladır

Wakitani vd. (1989)'de yaptıkları çalışmada, 1708 nükleotid pozisyonunda erken sonlandırma kodonu CGA+ TGA (Arg + stop) ile sonuçlanan tek bir nükleotid geçişini ortaya çıkarmıştır (Arg 540 stop). Bu mutasyon, hem ile ilişkili varsayılan histidin kalıntılarından birini içermeyen ampute bir proteine yol açacaktır.

Çizelge 4.6 Irak tiroid bozukluklarında TPO gen mutasyonunun TSH, T4 ve T3 düzeylerine etkisi. A, B: Farklı harfler, ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları gösterir

Grouplar	**Mutasyonlar**		
	TSH IU / litre	**T4**	**T3**
1708 c > d			
Tiroid kanseri	3,24 ± 1,50 A	85,25 ± 11,86 b	1,35 ± 0,08 b
Toksik Guatr	0,470 ± 0,22 b	111,5 ± 25,50 A	3,43 ± 1,58 A
Sağlıklı (kontrolör)	1,9 ± 0,34 b	67,16 ± 2,19 a, b	1,24 ± 0,064 a
1978 AD > Z			
Tiroid kanseri	0,11 ± 0,1 b	123,00 + 0,01 a	1,60 + 0,0 a
Toksik guatr	2,27 ± 0,73 b	85,83 ± 4,42 b	0,83 ± 0,06 A
Sağlıklı (kontrolör)	1,08 ± 0,13 b	84,16 ± 2,06 a, b	1,10 ± 0,074 A

Özetle, mevcut çalışmadaki ekson-intron ek yeri mutasyonlarının moleküler analizi, tiroid bozukluğu olan Iraklı hastalarla ilişkili üç ek yeni mutasyonunun tespit edildiğini göstermiştir.

4.3.4 Gen mutajenik hastalarda serum TSH, T4 ve T3 düzeyleri

TPO mutasyonları ile ilgili TSH, T4 ve T3 hormonlarının seviyeleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Malign dönüşüme yol açan guatr gelişiminde rol oynayan faktörler çoğalacaktır. Guatr gelişiminde TSH'nin uzun süreli uyarılmasının genellikle kabul edilebilir olduğu açıktır. Bununla birlikte, bazı TG mutasyonları vakalarında, kanda TSH yükselmemiş yetişkinlerde TSH supresyonu ile tedavi genellikle etkili olmadığı için diğer bilinmeyen mekanizmalar varsayılmalıdır (Hishinuma *et al.* 2005). Toksik guatr hastalarında, TPO 1978C> G, artan T4 seviyesi ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuçlar ayrıca tiroid kanserinde TPO (886C> G c 986A> C, Sırasıyla, toksik guatr grubunda bir takım mutasyonlarla ilişkili T3 düzeylerinde önemli bir artış göstermiştir. Öte yandan, TPO 1978 AD > Z idi. Test edilen tüm gruplar arasında T3 seviyesi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır.

Tiroid hormonlarının sentez bozuklukları, tiroid bozukluklarının yaygın bir nedenidir. Bu bozuklukların büyük çoğunluğu, biyosentezde anormalliğe neden olan TPO genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. T3 ve T4 hormonlarının sentezinde, sonuçlarımız tespit edilen mutasyonların çoğunun tiroid sentez hormonları arasındaki etkiyi arttırdığını ortaya koymuştur (Targovnik *et al.* 1993).

4.4 Tiroid neoplazmalarının histopatolojisi

Erkek hastalarda guatr, guatr ve iyi huylu tümörlerin sayıları ve farklı yaş gruplarına göre dağılımını gösterirken (Çizelge 4.7), guatr olgularının ve kadın hastalarda farklı yaş gruplarına göre iyi huylu tümörlerin sayı ve dağılımını göstermektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7 Hipotiroidili erkeklerde guatr ve polip prevalansı. Kapsanan vakalar ultrason ve radyografinin sonucudur

YAŞ/YIL	FOLIKÜLER ADENOM HASTALARI
31-40	3
41-50	8
55	4

Çizelge 4.8 Guatr, hipotiroidili kadınlarda görülen metastatik iyi huylu bir neoplazmdır. Kapsanan vakalar ultrason ve radyografinin sonucudur

YAŞ/YIL	FOLIKÜLER ADENOM HASTALARI
20 – 30	7
31-40	10
55	8

(Çizelge 4.7, Çizelge 4.8) guatrın tiroid fonksiyon bozukluğunun bir özelliği olduğunu ve tiroid hormonlarının anormal seviyelerde olması ve hastaların tedavinin erken

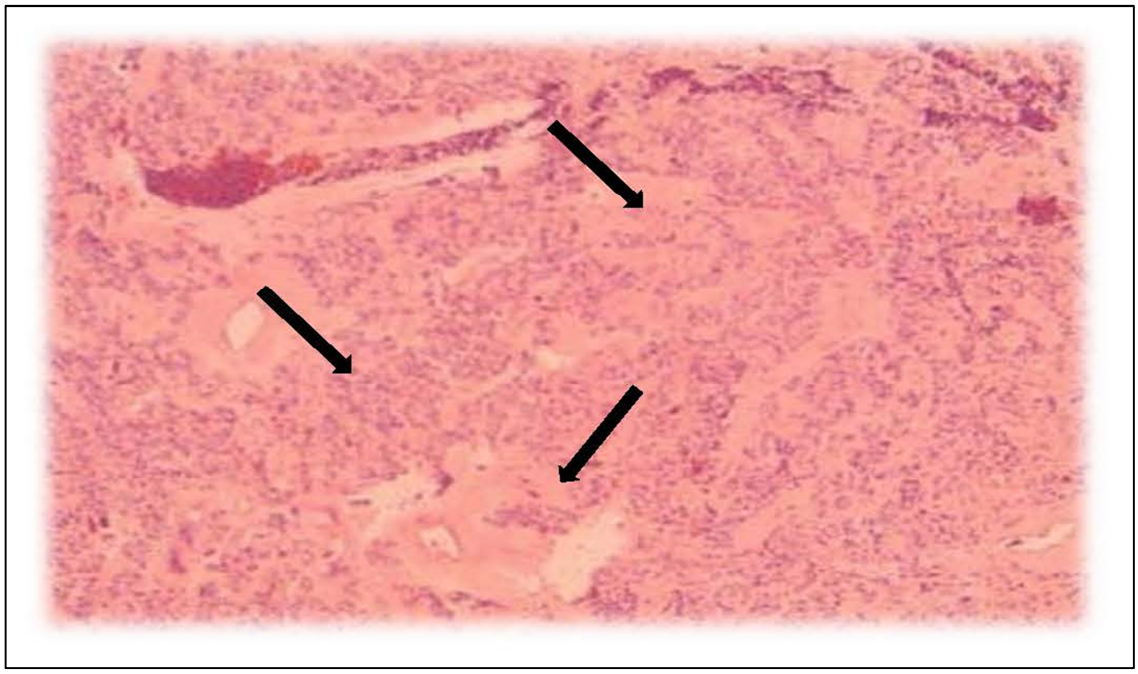
evresinde olması nedeniyle hastalarda hastalığın erken evrelerinde görülebildiğini göstermektedir. Ancak ileri yaşlarda (51 - 60) tiroid bezinin boyutunu küçülten tedavi nedeniyle guatr daha az görülmüştür. Ayrıca cinsiyetler karşılaştırıldığında guatr kadın hastalarda erkeklere göre daha sık görülmektedir. Bunun nedeni her iki cinsiyetin fizyolojik farklılıkları olabilir.

TPO Gen mutasyonları şu şekilde ortaya çıkar: sağlıklı bir kontrol grubunda. Çizelge 4.8'de gösterildiği gibi mutasyon saptanmadı. Tiroid grubundaki hastalarda ise bu gruplar arasında birçok mutasyon tespit edilmiştir.

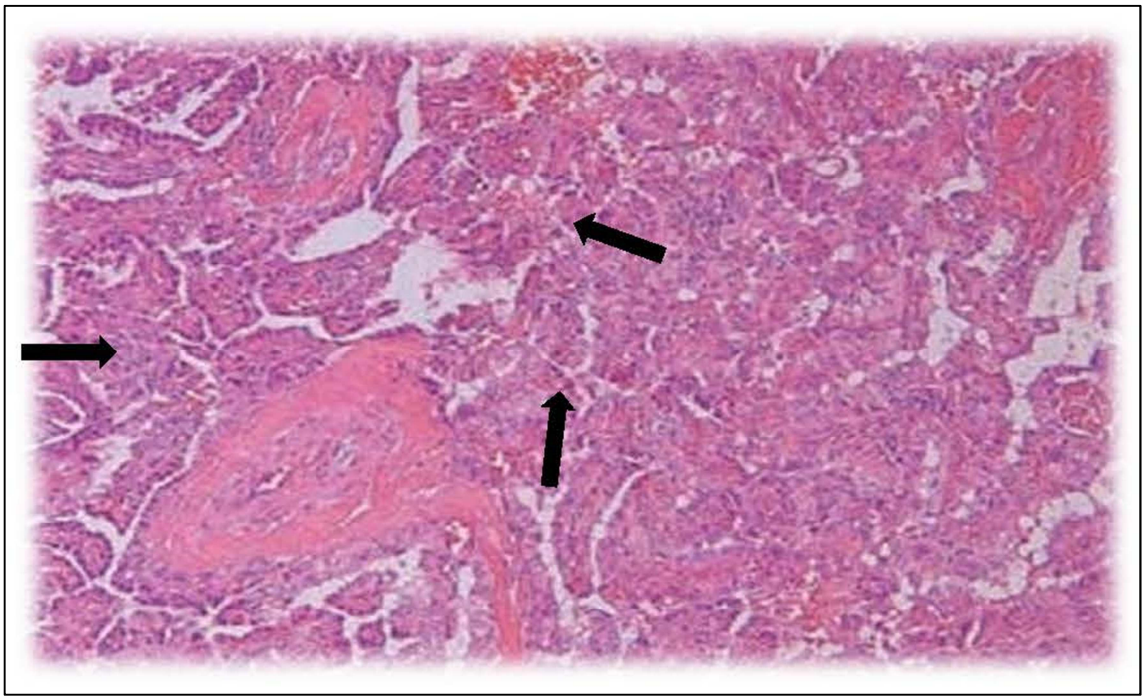
Guatr kadınlarda daha sık görülür ve östrojenin bağışıklık sistemi, özellikle de B-hücresi repertuarı üzerindeki etkisiyle ilişkili olabilir (Da Silva *et al.* 1995). Erkeklerin daha az şiddetli semptomlarla daha kötü biyokimyasal aşırı aktivite yaşadıkları öne sürülmesine rağmen yine de kadınlara oranla erkekler de daha az görülmüştür (Reed *et al.* 2014).

Tedavi sonuçlarında herhangi bir farklılık olduğunu gösteren çok az kanıt mevcuttur. İtalyan deneklerde yapılan başka bir çalışmada, erkek hastalarda tıbbi tedaviden sonra uzun süreli nüks oranında hafif bir artış bildirmektedir (Vitti *et al.* 1997). Guatrın klinik görünümünde yaşa bağlı farklılıklar da bildirilmiştir (Nordyke *et al.* 1988).

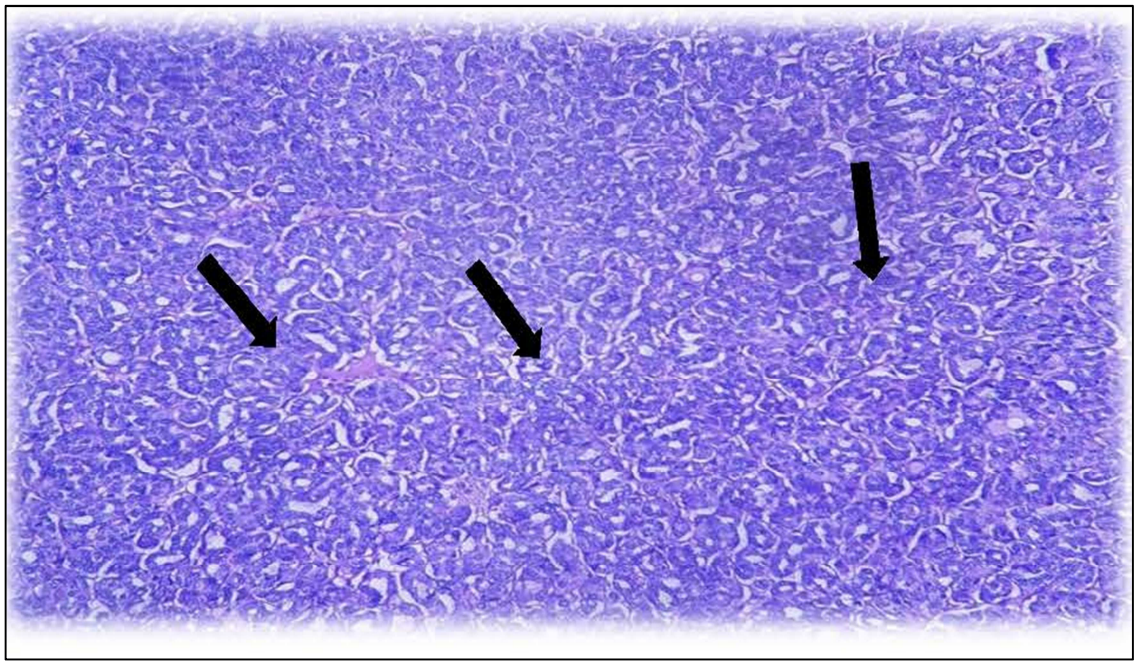
Hipertiroidi şiddeti ve antikor prevalansı yaşla birlikte azalma göstermiştir (Aizawa 1992). Bu çalışmada tiroid bezi sirozu olan bazı guatr hastaları, tiroid kanseri hastalarına tiroidektomi yapıldığı için biyopsi için histopatoloji laboratuvarlarına başvurmuştur. Bu hastalardan alınan örnekler, hipertiroidi ve fibrozisli hastalarda papiller adenomu gösteren Şekil 4.2'de ve papiller kanserli hastalarda Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterildiği gibi histopatolojik inceleme için kullanılmıştır.



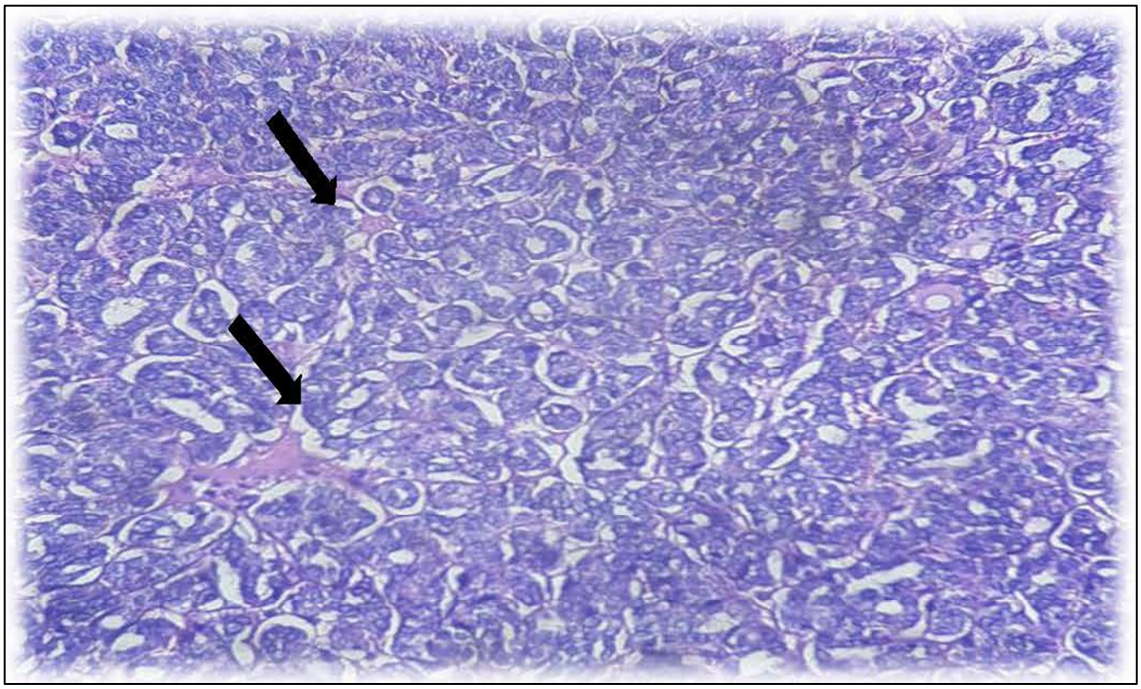
Şekil 4.2 Tiroid dokusunun histopatolojik kesitinde fibrozis(➞) hipertiroidi li bir hastada (X10) hiperplastik değişiklikler tespit edildi



Şekil 4.3 Tiroid dokusunun histopatolojik kesitinde papiller tiroid karsinomu hastasının (X10) papiller büyüme paterni, nükleer temizlenme ve hücrelerinde oryantasyon bozukluğu (➨) saptandı



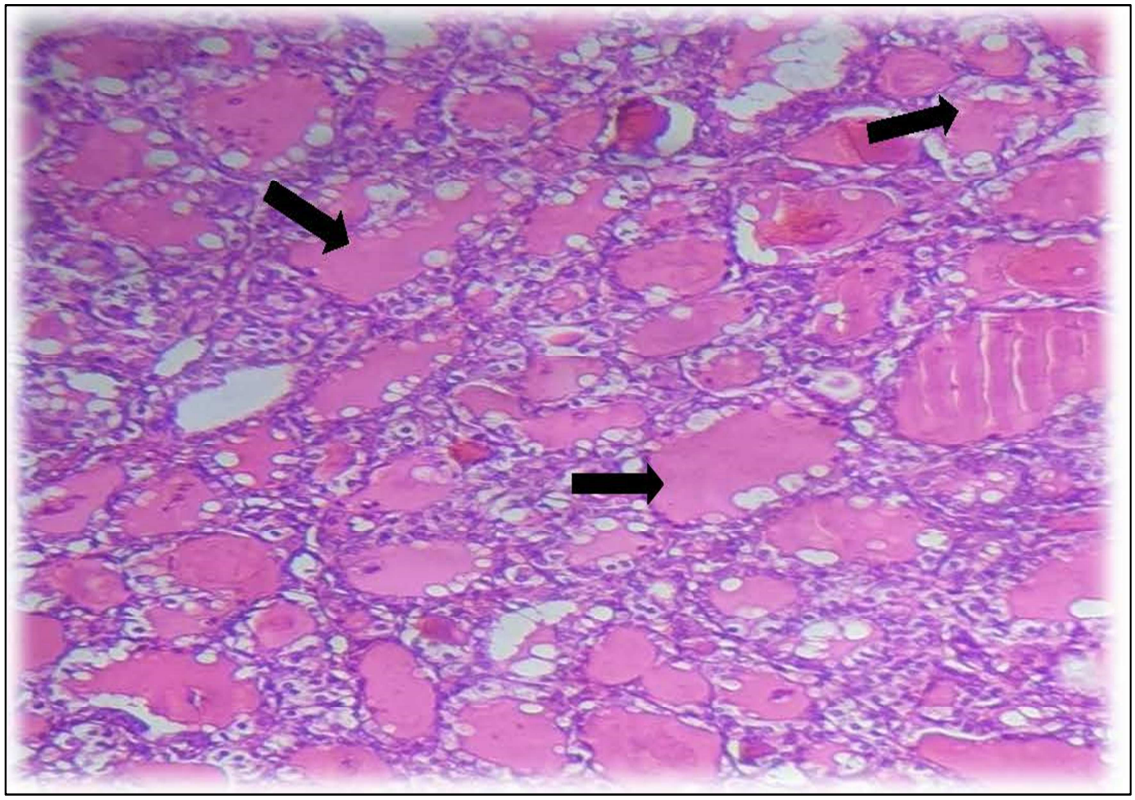
Şekil 4.4 Tiroid dokusunun histopatolojik kesiti, papiller tiroid karsinomu hastasının (X10) tiroid foliküllerinin papiller büyüme paterni, nükleer temizlenme ve hücrelerin oryantasyon bozukluğunu (➨) ortaya çıkardı



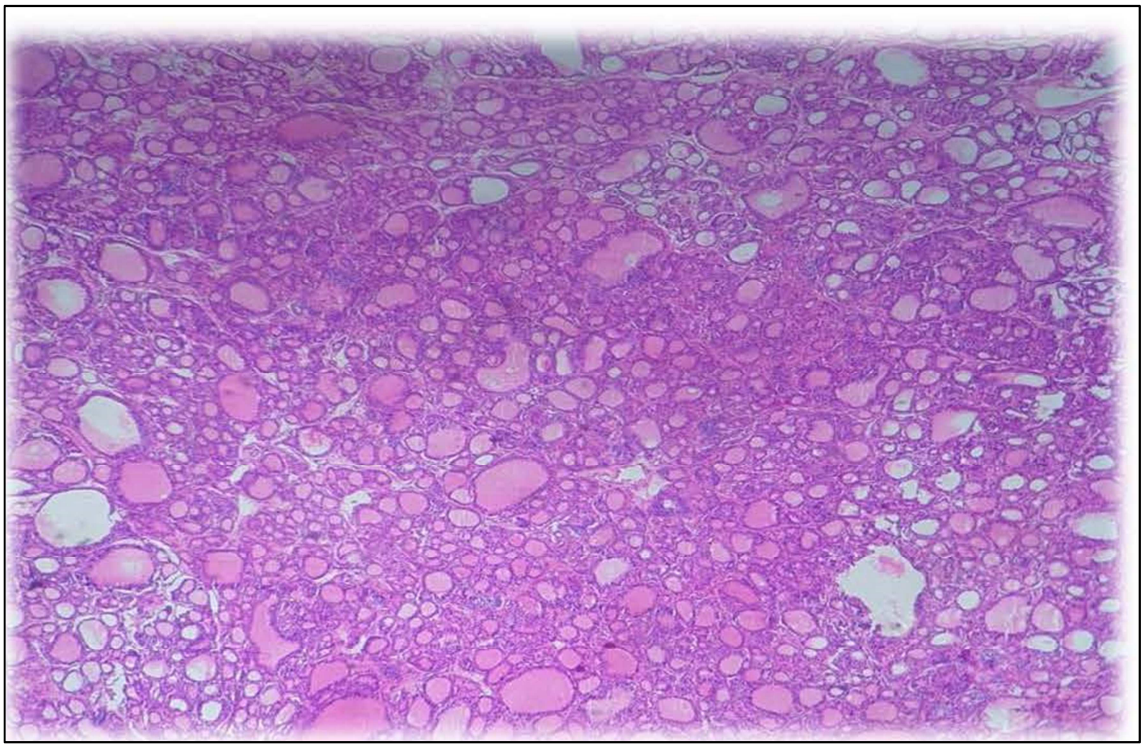
Şekil 4.5 Tiroid dokusunun histopatolojik kesitinde papiller tiroid karsinomu hastasının (x40) tiroid foliküllerinin papiller büyüme paterni, nükleer temizlenme ve hücrelerin oryantasyon bozukluğu (➨) saptandı

Tiroid bezinin streptokok lezyonları genel popülasyonda çok yaygındır. Erişkin popülasyonda palpe edilebilen tiroid nodüllerinin insidansı yaklaşık % 4 ila % 7'dir (Carroll and Miquelle 2006).

Bununla birlikte, bazı klinik durumlarda, zayıf fiksasyon nedeniyle lam örnekleri sitolojik inceleme için yeterli değildir ve tanı için iyi eğitimli bir patolog her zaman mevcut değildir. Bu gibi durumlarda doğru teşhis için daha objektif bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. Sprinklerlerden gelen nükleik asitlerin analizi ile genetik teşhis bu amaçla kullanılabilir (Şekil 4.6, Şekil 4.7). Bununla birlikte, önceki çalışmaların çoğu, tiroid tümörlerinin klinik özellikleri hakkında fazla bilgi sağlayamamıştır (Weiss *et al.* 1996).



Şekil 4.6 Tiroid dokusunun histopatolojik kesiti, tiroid hormon bozukluğu hastasının (X40) normal görünümlü büyüme paterni (➨) ortaya çıkardı



Şekil 4.7 Tiroid dokusunun histopatolojik kesiti, tiroid hormon bozukluğu olan hastanın (X10) normal görünümlü büyüme paterni ortaya koydu

5. TARTIŞMA

Elde edilen sonuçlar şu şekilde açıklanabilir: A primer seti tiroid gen analizi için spesifikti. Normal (sağlıklı) hipotiroidili hastalar arasındaki karşılaştırma, moleküler düzeyde DNA değişikliğinin meydana geldiğini düşündüren kayda değer bir fark vermektedir. Bununla birlikte, PZR amplifikasyonundan tiroid kanserli hastalarda DNA gözlemlenmiştir. Bu, tiroid fonksiyonunu ve normal gelişimi ve yanıtı kontrol eden genlerde bir mutasyonun varlığına bağlanabilir. Bu mutasyon genleri, bu amaçla kullanılan primerin hedef bölgeye duyarlı olmasını sağlayacak şekilde değiştirmiştir, dolayısıyla işlem sonucunda herhangi bir amplifikasyon meydana gelmemiştir.

Daha önce tedavi edilmiş iyi diferansiye tiroid kanseri olan hastaların çoğunda, bu oldukça hassas teknik, TSH baskılayıcı tiroid hormon tedavisi sırasında bile küçük miktarlarda tiroid dokusunu tespit edebilir. Dolaşımdaki mRNA kullanılarak geliştirilen test, duyarlılığını, az sayıda mRNA molekülünün spesifik amplifikasyonuna izin veren bir teknik olan PZR'nin kombine kullanımından almıştır.

PZR, metastatik prostat kanseri (Ghossein *et al.*1995), malign melanom, meme kanseri ve tiroid kanseri olan hastalarda küçük malign doku odaklarının yanı sıra dolaşımdaki kanser hücrelerini saptamak için kullanılmıştır (Kruger *et al.* 1996).

Bu çalışmada kullanılan dolaşımdaki tiroglobulin mRNA testinin, yakın zamanda bildirilen diğer testlerden farklı performans özelliklerine sahip olduğu görülmektedir. Ditkoff vd. (1996) inceledikleri metastatik tiroid kanserli 7 hastanın tümünde dolaşımda tiroglobulin mRNA saptadı, ancak metastazı olmayan 78 hastanın % 10'undan azında (Ditkoff *et al.* 1996) bu bulguya rastlanmıştır. Ayrıca, normal deneklerden alınan kanda tiroglobulin mRNA'sını tespit edilmiştir. Tallini vd. (1998)'de yaptıkları çalışmada, ameliyattan önce tiroid kanserli hastalardan alınan kan örneklerinde tiroglobulin mRNA'yı analiz etmiştir (Tallini *et al.* 1998). Bu hastalarda sağlam tiroid bezleri olmasına rağmen, tiroid kanserli hastalarda dolaşımdaki tiroglobulin mRNA'sı tespit edilmiştir.

Bu araştırmacıların bulguları ve bu çalışmanın sonuçları arasındaki farklar, muhtemelen bu çalışmada kullanılan tiroglobulin mRNA tahlilimizin daha yüksek duyarlılığı ile ilgilidir. TSH uyarısının yokluğunda, 200'den az tiroid hücresi/mL kan içeren numunelerde tiroglobulin mRNA'yı tespit edememiştir (Ditkoff *et al.* 1996). Tallini vd. (1998)'de yaptıkları çalışmada, saptama sınırını yaklaşık 50 - 100 tiroid hücresi/mL kana eşdeğer olarak bulmuşlardır. Buna karşılık, bu çalışma, 10 normal tiroid hücresi/mL kandaki tiroglobulin mRNA'sının saptanmasını hesaplamış olup bu, yaklaşık 3 tiroid hücresi/mL kanın deneysel gözlemine benzer bir duyarlılık göstermiştir. Tiroid kanserli hastalarda testin duyarlılığı, dolaşımdaki kanser hücrelerinde tiroglobulin ekspresyonunun düzeyine bağlı olacak ve hesaplanan duyarlılıklardan farklı olabilecektir. Bu tahliller arasındaki analitik duyarlılık farkı, oligonükleotid primerlerinin tasarımındaki farklılıkları, birinci iplik cDNA ve PZR'nin sentezi için koşulları ve RNA'nın hazırlanmasını yansıtabilmiştir.

Birkaç kanıt dizisi, periferik kanda tespit edilen tiroglobulin mRNA'sının, tiroglobulin gen ekspresyonunun ektopik transkripsiyonu temsil edebileceği lenfositlerden ziyade dolaşımdaki tiroid hücrelerinden kaynaklandığını iddia etmektedir. İlk olarak, negatif ve pozitif kontrol şeridi, elektroforezden sonra güçlendirilmiş bantlar göstermemiştir. İkinci olarak, tiroglobulin mRNA, sadece bir tur amplifikasyondan sonra periferik kan RNA'sında saptanabilmiştir. Buna karşılık, ektopik olarak eksprese edilen mRNA'ların aşırı düşük seviyelerinin tespiti tipik olarak iki ardışık yuvalanmış amplifikasyon turu gerektirmiştir (Ringel *et al.* 1998).

6. SONUÇLAR

Mevcut çalışmanın sonuçları, 30 - 50 yaş grubunda ve kadınlarda tiroid bozukluklarının prevalansının erkeklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. TPO genleri ile mutasyonlar tespit edilmiştir. Toksik tiroid grupları ile tiroid kanseri arasında benzer mutasyonlar tespit edilmiş olup toksik tiroid grupları ile tiroid kanseri arasında yüksek DNA instabilitesi tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

Ahmed, B., Yousef, M., Abdella, A., Sulieman, A. and Eltom, K. 2011. Local reference ranges of thyroid volume in Sudanese normal subjects using ultrasound. J. Thyroid Res., 4: 1-4.

Aizawa, M., 1992. Electroconductive Enzyme Membranes, In Membrane Science and Technology. CRC Press, pp. 215-250, Baghdad.

Ambasta, RK; Kumar, p. Grindling, K. Schmidt, HH; Bossi, R. and Brands, RP. 2004. Direct interaction of novel Nox proteins with p22phox is required to form the functionally active NADPH oxidase. J. Biol. Chem., 279: 45935-45941.

Bancroft, J., Cook, A. and Williamson, L., 1988. Food craving, mood and the menstrual cycle. Psychological Med., 18: 855-860.

Bianco, C.L., Deglon, N., Pralong, W. and Aebischer, P. 2004. Lentiviral nigral delivery of GDNF does not prevent neurodegeneration in a genetic rat model of Parkinson's disease. Neurobiology of disease, 17: 283-289.

Biersack, H.J. and Hotze, A., 1991. The clinician and the thyroid. European J. Nucl. Med., 18: 761-778.

Bikker, H., Baas, F. and de Vijlder, J.J., 1997. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 649-653.

Björkman, U. and Ekholm, R. 1984. Generation of H_2O_2 in isolated porcine thyroid follicles. Endocrinology, 115: 392-398.

Bouknight, A.L. 2003. Thyroid physiology and thyroid function testing. Otolaryngol Clin. North. Am., 36: 9-15.

Brander, A.E., Viikinkoski, V.P., Nickels, J.I. and Kivisaari, L.M., 2000. Importance of thyroid abnormalities detected at US screening: a 5-year follow-up. Radiology, 215: 801-806.

Brandes, R. P., Weissmann, N. and Schröder, K. 2014. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. Free Radic. Biol. Med., 76: 208-226.

Burmeister, L. A., Goumaz, M. O., Mariash, C. N. and Oppenheimer, J. H. 1992. Levothyroxine dose requirements for thyrotropin suppression in the treatment of differentiated thyroid cancer. J. Clin. Endocrinol. Metab., 75: 344-350.

Caillou, B., Dupuy, C., Lacroix, L., Nocera, M., Talbot, M., Ohayon, R., Dème, D., Bidart, J. M., Schlumberger, M. and Virion, A. 2001. Gene and protein expression in human thyroid tissue. J. Clin. Endocrinol Metab., 86: 3351-3358.

Carroll, C. and Miquelle, D.G. 2006. Spatial viability analysis of Amur tiger Panthera tigris altaica in the Russian Far East: the role of protected areas and landscape matrix in population persistence. Journal of Applied Ecology, 43: 1056-1068.

Castellani, M., Reschini, E., Ferrari, C., Matheoud, R., Marotta, G., Paracchi, A., and Gerundini, P. 2006. The trapping-only nodules of the thyroid gland: prevalence study. Thyroid, 16: 757-762.

Choi, S., Khan, M., Dhammu, T., Saxena, N., Singh, A. K., Singh, I. and Won, J. 2019. Regulation of endothelial barrier integrity by redox-dependent nitric oxide signaling: implication in traumatic and inflammatory brain injuries. Nitric Oxide, 83: 51-64.

Da Silva, L. B., Barbee Jr, T. W., Cauble, R., Celliers, P., Ciarlo, D., Libby, S., London, R. A., Matthews, D., Mrowka, S. and Moreno, J. C. 1995. Electron density measurements of high density plasmas using soft X-ray laser interferometry. Phys. Rev. Lett., 74: 3991.

De Deken, X., Wang, D., Many, M.-C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E. and Miot, F. 2000. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. J. Bio. Che., 275: 23227-23233.

DiMaio, D., Treisman, R. and Maniatis, T. 1982. Bovine papillomavirus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacterial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. amer., 79: 4030-4034.

Ditkoff, B. A., Marvin, M. R., Yemul, S., Shi, Y. J., Chabot, J., Feind, C. and Gerfo, P. L. 1996. Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. Surgery, 120: 959-965.

Douketis, J. D., Spyropoulos, A. C., Duncan, J., Carrier, M., Le Gal, G., Tafur, A. J., Vanassche, T., Verhamme, P., Shivakumar, S., Gross, P. L., Lee, A. Y. Y., Yeo, E., Solymoss, S., Kassis, J., Le Templier, G., Kowalski, S., Blostein, M., Shah, V., MacKay, E. and Schulman, S. 2019. Perioperative Management of Patients With Atrial Fibrillation Receiving a Direct Oral Anticoagulant. JAMA Internal Med., 179: 1469–1478.

Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M. S., Dème, D. and Virion, A. 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase: cloning of the porcine and human cDNAs. J. Biol. Chem., 274: 37265-37269.

Emerson, C. H. and Torres, M. S. 2003. Recombinant Human Thyroid-Stimulating Hormone. Bio. Drugs, 17: 19-38.

Fabbro, D., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Belfiore, A., Di Lauro, R. and Damante, G. 1994. Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms. Cancer Res., 54: 4744-4749.

Franklyn, J., Davis, J., GAMMAGE, M., Littler, W. A., RAMSDEN, D. and SHEPPARD, M. 2008. Amiodarone and thyroid hormone action. Clinical Endocrinology, 22: 257-264.

Gabriel, C., Peyman, A. and Grant, E.H. 2009. Electrical conductivity of tissue at frequencies below 1 MHz. Physics in medicine and biology, 54: 4863-4878.

Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P. and Leto, T. L. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc. Natl. Acad. Sci. Amer., 97: 8010–8014.

Ghossein, R. A., Scher, H. I., Gerald, W. L., Kelly, W. K., Curley, T., Amsterdam, A., Zhang, Z.-F. and Rosai, J. 1995. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. J. Clin. Oncol., 13: 1195-1200.

Gillam, M.P. and Kopp, P. 2001. Genetic regulation of thyroid development. Current opinion in pediatrics, 13: 358-363.

Godlewska, M., Góra, M., Buckle, A. M., Porebski, B. T., Kemp, E. H., Sutton, B. J., Czarnocka, B. and Banga, J. P. 2014. A redundant role of human thyroid peroxidase propeptide for cellular, enzymatic, and immunological activity. Thyroid, 24: 371-382.

Grasburger, H. and Refeto, S. 2006. Estimation of the ripening factor for double oxidase. Eukaryotic development of opera. J. Biol. Chem., 281: 18269-18272.

Guth, S., Theune, U., Aberle, J., Galach, A. and Bamberger, C.M. 2009. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. Eur. J. Clin. Invest., 39: 699-706.

Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C. F., Chandrankunnel, A., Nillni, E. A., Bjørbæk, C., Elmquist, J. K., Flier, J. S. and Hollenberg, A. N. 2001. Transcriptional regulation

of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. J. Clin. Invest., 107: 111–120.

Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M. T., Takahashi, J. K. H., Nakamura, A., McAllister, F., Numasaki, M., Watanabe, M. and Suzuki, T. 2005. IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity. J. Immunol., 175: 6177-6189.

John, K. and Senbet, L.W. 1998. Corporate governance and board effectiveness. J. Bank Financ., 22: 371-403.

Kahmen, H. 1979. Numerical filtering of refraction coefficients. In Symposium-International Astronomical Union, 89: 213-225.

Kotani, Y., Kamigaito, M. and Sawamoto, M. 1999. Re (V)-mediated living radical polymerization of styrene: ReO2I (PPh3) 2/R− I initiating systems. Macromolecules, 32: 2420-2424.

Kruger, W., Krzizanowski, C. and Holweg, M. 1996. Reverse transcriptase/ polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 122: 679-686.

Lambeth, J. D. and Neish, A. S. 2014. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. Annu. Rev. Pathol., 9: 119-145.

Liu, T., Pestilli, F. and Carrasco, M. 2005. Transient attention enhances perceptual performance and fMRI response in human visual cortex. Neuron, 45: 469-477.

Loevner, L.A., Kaplan, S.L., Cunnane, M.E. and Moonis, G., 2008. Cross-sectional imaging of the thyroid gland. Neuroimaging Clin. N. Am., 18: 445-461.

Mercken, L., Simons, M. J., Swillens, S., Massaer, M. and Vassart, G. 1985. Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431-base complementary DNA. Nature, 316: 647-651.

Miller, M.H. 1988. The Modigliani-Miller propositions after thirty years. Journal of Economic perspectives, 2: 99-120.

Najmabadi, H., Neishabury, M., Sahebjam, F., Kahrizi, K., Shafaghati, Y., Nikzat, N., Jalalvand, M., Aminy, F., Hashemi, S. B. and Moghimi, B. 2003. The Iranian Human Mutation Gene Bank: a data and sample resource for worldwide collaborative genetics research. Human Mutat., 21: 146-150.

Nakano, Y., Banfi, B., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., Allen, L. A. H. and Nauseef, W. M. 2007. Critical roles for p22 phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. Biochem. J., 403: 97-108.

Neutel, A. M., Heesterbeek, J. A. and De Ruiter, P. C. 2002. Stability in real food webs: weak links in long loops. Science, 296: 1120-1123.

Nordyke, R. A., Gilbert, F. I. and Harada, A. S. 1988. Graves' disease: influence of age on clinical findings. Archives of internal medicine, 148: 626-631.

Nussey, S.S. and Whitehead, S.A. 2001. Endocrinology an integrated approach. BIOS Scientific Publishers, pp. 123, London, UK.

Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J. I., Morio, K. I., Doi, T. and Imanishi, T. 1998. Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2′-O, 4′-C-methyleneribonucleosides. Tetrahedron letters, 39: 5401-5404.

Oelmann, B., Abdalla, M. and O'Nils, M. 2002. Robust window discriminator for photon-counting pixel detectors. IEE Proceedings-Optoelectronics, 149: 65-69.

Orsolya, L. 2003. A pénz boldogít? A jövedelem és hasznosság kapcsolatának empirikus elemzése. Közgazdasági Szemle 50. évfolyam, pp. 383-405, Hungary.

Papini, R., Valboa, G., Piovanelli, C. and Brandi, G. 2007. Nitrogen and phosphorous in a loam soil of central Italy as affected by 6 years of different tillage systems. Soil and Tillage Research, 92: 175-180.

Reed, A., Hughes, R.J. and Boyd, H. 2014. Patterns of distribution and abundance of greater snow geese on Bylot Island. Wildfowl, 53: 53-65.

Ringel, M. D., Ladenson, P. W. and Levine, M. A. 1998. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. J. Clin. Endocrinol. Metab., 83: 4435-4442.

Sanbrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 11: 25-31.

Schwabl, H. and Lipar, J. 2002. Hormonal regulation of begging behavior; In The evolution of begging. Springer, pp. 221-244, USA.

Song, Y., Ruf, J., Lothaire, P., Dequanter, D., Andry, G., Willemse, E., Dumont, J. E., Van Sande, J. and De Deken, X. 2010. Association of duoxes with thyroid

peroxidase and its regulation in thyrocytes. J. Clin. Endocrinol. Metab., 95: 375-382.

Sukumar, P., Viswambharan, H., Imrie, H., Cubbon, R. M., Yuldasheva, N., Gage, M., Galloway, S., Skromna, A., Kandavelu, P. and Santos, C. X. 2013. Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance–related endothelial cell dysfunction. Diabetes, 62: 2130–2134.

Tallini, G., Ghossein, R. A., Emanuel, J., Gill, J., Kinder, B., Dimich, A. B., Costa, J., Robbins, R., Burrow, G. N. and Rosai, J. 1998. Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease, J. Clin. Oncol., 16: 1158-1166.

Targovnik, H.M ,Medeiros-Neto, G. and Vassart, G. 1993. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. Endocrine Reviews, 14: 165-183.

Taurog, A. 1999. Molecular evolution of thyroid peroxidase. Biochimie, 81: 557-562.

Tonacchera, M., Chiovato, L., Pinchera, A., Agretti, P., Fiore, E., Cetani, F. and Vitti, P. 1998. Hyperfunctioning thyroid nodules in toxic multinodular goiter share activating thyrotropin receptor mutations with solitary toxic adenoma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 83: 492-498.

Virion, A., Michot, J. L., Deme, D., Kaniewski, J. and Pommier, J. 1984. NADPH-dependent H_2O_2 generation and peroxidase activity in thyroid particular fraction. Mol. Cell Endocrinol., 36: 95-105.

Vitti, P., Rago, T., Chiovato, L., Pallini, S., Santini, F., Fiore, E., Rocchi, R., Martino, E. and Pinchera, A. 1997. Clinical features of patients with Graves' disease undergoing remission after antithyroid drug treatment. Thyroid, 7: 369–375.

Wakitani, S., Kimura, T., Hirooka, A., Ochi, T., Yoneda, M., Yasui, N., Owaki, H. and Ono, K. 1989. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. J. Bone Joint Surg. Br., 71: 74-80.

Weiss, R. E., Dumitrescu, A. and Refetoff, S. 2010. Approach to the patient with resistance to thyroid hormone and pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 95: 3094-3102.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C. and Reynolds, B. A. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. J. Neurosci., 16: 7599-7609.

Zhu, Y., Marchal, C. C., Casbon, A.-J., Stull, N., von Löhneysen, K., Knaus, U. G., Jesaitis, A. J., McCormick, S., Nauseef, W. M. and Dinauer, M. C. 2006. Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. J. Biol. Chem., 281: 30336–30346.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mohammed Majid Abdulrazzaq AL-SABBAGH

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Ti Kar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006-2010