



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BENİGN ve MALİGN TİROİD NODÜLLERİNİN PROTEOMİK
PROFİL FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

YASEMİN UÇAL

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aysel Özpınar

İSTANBUL-2018

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tanısı kolaylıkla konulamayan ve özellikle şüpheli kategorisine giren tiroid nodüllerinin, ayırıcı tanısına katkı sağlayacak araştırmalar tiroid patolojisinde önem arz etmektedir. Bu nedenle ileri proteomik teknikleri kullandığımız bu çalışmada tanısı kolay yapılamayan papiller tiroid kanseri varyantlarının protein profillerini belirlemeyi ve ayırıcı tanıya katkı sağlayacak proteinleri bulmayı hedefledik.

Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora programına başladığım ilk günden itibaren kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, aynı zamanda tezimin planlanması, her türlü deneysel aşama ve teorik kısımda destek olan değerli hocam Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

Patoloji ile ilgili her alanda desteğini esirgemeyen ve iş yoğunluğuna rağmen bu alandaki sorularıma sabırla cevap veren değerli hocam Prof. Dr. Ümit İnce'ye,

Hasta örneklerinin toplanmasında sırasında destek olan Prof. Dr. Mete Düren'e ve Acıbadem Maslak Hastanesi ekibine,

Lisansüstü eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Programı'nın değerli öğretim üyelerine,

Çalışmanın çeşitli basamaklarında desteği olan değerli çalışma arkadaşlarım; Muazzez Ceren Yılmaz, İrep Uras, Cavit Kerem Kayhan, Aybüke Ekşioğlu, Pınar Barut, Ece Güneyi ve Gupse Aktaş'a,

Doktora eğitimim süresince manevi desteklerini her zaman gösteren, onlarsız bir lisansüstü eğitimi düşünemediğim sevgili arkadaşlarıma,

En zor zamanlarımda eğitimim için hep destek olan ve varlığını her an hissettiren sevgili annem Ayşegül Furtun, sevgili babam Alpkan Furtun ve canım eşim Ekin Uçal'a gönülden teşekkür ederim.

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenen 214S012 numaralı (Tübitak 1001 Projesi) ve 110664 numaralı (Uluslararası COST Projesi) “Benign ve Malign Tiroid Nodüllerinin Proteomik Profil Farklılıklarının Maldi-Görüntüleme Yöntemi Ile Belirlenmesi” başlıklı proje kapsamında yapılmıştır. TÜBİTAK’a projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca; Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul Kalkınma Ajansı (ISTKA) “Yeni Nesil Kütle Spektrometresi Görüntüleme Teknolojisi ile Klinik Tarama ve Tanı Metotlarının Geliştirilmesi” başlıklı proje ile desteklenmiştir. MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi çalışmaları için özel olarak geliştirilmiş olan bu cihazla projenin önemli bir basamağını tamamladığım için ISTKA’ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Tarihçe.....	4
2.2 Tiroid Bezi ve Önemi.....	5
2.3 Tiroid Bezi Üzerine Etkili Hormonlar	5
2.4 Tiroid Bezi Tarafından Üretilen Hormonlar	6
2.5 Tiroid Hormon Üretimi ve Salınımının Düzenlenmesi.....	9
2.6 Tiroid Hormon Reseptörleri ve Sinyal Yolakları.....	10
2.7 Tiroid Hormonlarının Görevleri.....	12
2.7.1 Büyüme ve Gelişme ile İlgili Görevler	13
2.7.2 Metabolik Görevler	13
2.8 Tiroid Fonksiyon Testleri.....	16
2.8.1 TSH	16
2.8.2 Serum T4 ve T3 Konsantrasyonu.....	17

2.8.3 Tg	18
2.8.4 Tiroid Otoantikör Testleri	18
2.8.5 İyot Metabolizmasının Anlaşılmasına Yönelik Testler.....	19
2.9 Tiroid Bezi Hastalıkları.....	20
2.9.1 Subklinik Hipotiroidizm	20
2.9.2 Hipotiroidizm	20
2.9.3 Subklinik Hipertiroidizm	21
2.9.4 Hipertiroidizm/Tirotoksikoz	22
2.9.5 Tiroiditler	22
2.9.6 İyot Eksikliği Nedeniyle Gelişen Hastalıklar.....	23
2.9.7Türkiye’deki İyot Durumunun Belirlenmesi ve Çevresel Guatrojenler.....	24
2.10 Tiroid Nodülleri	25
2.11 Tiroid Kanseri	26
2.12 Diferansiye Olmayan Tiroid Kanseri.....	27
2.13 Diferansiye Tiroid Kanseri	27
2.13.1 Tanı Yöntemleri	28
2.13.2 Tedavi Yöntemleri	28
2.14 Medüller Tiroid Kanseri.....	29
2.15 Foliküler Tiroid Kanseri.....	29
2.16 Papiller Tiroid Kanseri.....	30
2.16.1 Histopatolojik Varyantlar ve Tanıda Karşılaşılan Problemler	30

2.16.2 PTK'nın Ayırıcı Tanısında Kullanılan Genomik Teknikler ve Limitasyonları	31
2.16.3 Biyobelirteç Çalışmaları.....	32
2.17 Proteomik Teknikler.....	32
2.18 Jel Bazlı Proteomik Çalışmalar	33
2.18.1 İki Boyutlu Jel Elektrophorezi	33
2.19 Jel İçermeyen Proteomik Çalışmalar	34
2.19.1 LC-MS/MS Çalışmaları	36
2.19.2 MALDI-Görüntüleme Çalışmaları.....	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	38
3.1 Çalışma Planı	38
3.2 Gereçler	40
3.3 Yöntem.....	43
3.3.1 Cerrahi Operasyonlar	43
3.3.2 Dokuların Histopatolojik Karakterizasyonu	44
3.3.3 İki Boyutlu Jel Elektrophorezi	44
3.3.4 LC-MS/MS İle Protein Tanımlaması	51
3.3.5 MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi	53
3.3.6 BRAF Mutasyon Analizi	56
3.3.7 İmmünohistokimya	58
4. BULGULAR.....	60
4.1 İki Boyutlu Jel Elektrophorezi Sonuçları.....	60

4.2 LC-MS/MS ile Protein Tanımlaması	69
4.2.1 FV-PTK ve CV-PTK Kanseri Arasındaki Protein Farklılıkları.....	69
4.2.2 CV-PTK ve FV-PTK Dokularında IQGAP Proteinlerinin Miktar Değişiklikleri	74
4.2.3 CV-PTK örneklerinde Moleküler Yolak Analizine Bağlı Hücre İskelet Proteinlerinin Değişiklikleri.....	75
4.3 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi ile Peptid Analizi	76
4.3.1 MALDI-Görüntüleme Çalışmalarının Tiroid Dokusu için Optimizasyonu.....	76
4.3.2 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Yönteminin Tiroid Dokusuna Uygulanması	79
4.3.3 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Yöntemi ile CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP Dokularının Peptid Farklılıklarının Belirlenmesi	82
4.4 BRAF V600E Mutasyon Taraması	85
4.5 İmmünohistokimya ile Validasyon	86
4.5.1 IQGAP1 ve IQGAP2 Antikorlarının Optimizasyonu	86
4.5.2 IQGAP1 ve IQGAP2 Antikorlarının Tiroid Dokularına Uygulanması	87
5. TARTIŞMA /SONUÇ.....	90
6. KAYNAKLAR	98
6. EKLER.....	112
6. ÖZGEÇMİŞ	115

KISALTMALAR

A-CHCA:	Alfa-siyanohipoksisinamik asit
AmP:	Amonyum fosfat monobazik
ATK:	Anaplastik tiroid kanseri
BSA:	Bovin serum albumin
cAMP:	Siklik adenzin monofosfat
CHAPS:	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamoniyo]-1-propansulfonat
CV-PTK:	Klasik varyant papiller tiroid kanseri
Da:	Dalton
DIT:	Diiyodotirozin
DTT:	Ditiyotretol
ESI:	Elektrosprey iyonizasyonu
EtOH:	Etanol
FDR:	Yanlış bulgu oranı
FFPE:	Formaline sabitlenmiş parafine g���lm��ř
FTK:	Foliküler tiroid kanseri
FV-PTK:	Foliküler varyant papiller tiroid kanseri
GLUT-4:	Glukoz taşıyıcı-4
HCl:	Hidroklorik asit

H&E:	Hematoksilen ve Eosin
İİAB:	İnce iğne aspirasyon biyopsisi
ITO:	İndiyum kalay oksit
LC-MS:	Likit kromatografisi-kütle spektrometresi
MALDI:	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon
MIT:	Monoiyodotirozin
MTK:	Medüller tiroid kanseri
m/z:	Kütle/yük
NaCl:	Sodyum klorid
NIFTP:	Papiller benzeri nükleer özellikleri olan noninvazif foliküler tiroid neoplazmı
NIS:	Sodyum/iyodür simpatörü
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PTK:	Papiller tiroid kanseri
RAI:	Radyoaktif iyot
RAIU:	Radyoaktif iyot alımı
ROC:	Alıcı işlem karakteristikleri
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
T3:	L-triiyodotironin
T4:	L-tiroksin
TBG:	Tiroksin bağlayıcı protein
TFA:	Trifluoroasetik asit

Tg:	Tiroglobulin
TH:	Tiroid hormonu
TR:	Tiroid hormon reseptörü
TRH:	Tirotropin salgılatıcı hormon
Tris:	Hidroksimetil aminometan
TSH:	Tiroid stimülan hormon
TPO:	Tiroid peroksidaz
TOF:	Uçuş zamanlı
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Tiroid bezinin anatomik yerleşimi	5
Şekil 2. Tiroid hormon sentezinin şematik gösterimi	8
Şekil 3. Tiroid hormon sentezinin düzenlenmesi	10
Şekil 4. Nükleer TR'nin yapısı	11
Şekil 5. MAPK ve PI3K-AKT yolları tarafından yönlendirilen tiroid tümörigenezinin progresyon modeli	31
Şekil 6. Kütle spektrometresinde bulunan temel bileşenler	34
Şekil 7. İş akış planı	39
Şekil 8. Araştırmada uygulanan deneysel yöntemler	40
Şekil 9. Örnek havuzlarının oluşturulmasına yönelik iş akış şeması	47
Şekil 10. FFPE dokuların tümör odaklarının belirlenmesi	56
Şekil 11. Benign dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 3-10NL, 17 cm)	60
Şekil 12. FV-PTK dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 3-10NL, 17 cm)	61
Şekil 13. CV-PTK dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 3-10NL, 17 cm)	61
Şekil 14. CV-PTK, FV-PTK ve Benign dokuya ait havuzun (200 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 4-7, 17 cm)	62
Şekil 15. pH 4-7 jellerden elde edilen master jel görüntüsü	63

Şekil 16. Farklı spotların Benign, CV-PTK ve FV-PTK jellerindeki görüntüsü ve master jel ile karşılaştırılması	64
Şekil 17. CV-PTK-Benign, FV-PTK-Benign, CV-PTK-FV-PTK jellerinin lineer regresyon sonuçları	65
Şekil 18. CV-PTK, FV-PTK ve Benign dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 6-10, 17 cm)	66
Şekil 19. pH 6-10 jellerden elde edilen master jel görüntüsü	67
Şekil 20. CV-PTK-Benign, FV-PTK-Benign, CV-PTK-FV-PTK jellerinin lineer regresyon sonuçları	68
Şekil 21. Her üç grupta tanımlanan proteinlerin Venn diyagramları	70
Şekil 22. CV-PTK, FV-PTK ve benign örneklerdeki proteinlerin hiyerarşik kümeleme analizi.	71
Şekil 23. Volcano grafiği ile CV-PTK ve FV-PTK'deki farklı proteinlerin gösterilmesi	72
Şekil 24. IQGAP1 ve IQGAP2 proteinlerinin miktar değişiklikleri	74
Şekil 25. Papiller tiroid karsinomunda bilinen ve ön görülen protein etkileşimleri .	75
Şekil 26. Farklı konsantrasyonlarda AmP içeren matriksin spektrumunda gözlemlenen α -CHCA matriks pikleri. (A) Bir dizi α -CHCA pikleri üç bağımsız kontrol matriks deneyinde belirgin olarak artmaktadır ($p < 0.005$). (B) A-CHCA'da AmP olmadan elde edilen MALDI-TOF spektrumu. (C) A-CHCA içerisine 10 mM AmP eklenmesiyle elde edilen MALDI-TOF spektrumu. (D) α -CHCA içerisine 20 mM AmP eklenmesiyle elde edilen MALDI-TOF spektrumu.	76
Şekil 27. FFPE tiroid karsinom dokusunda peptitlerin MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi. (A) Tek başına α -CHCA, α -CHCA+10 mM AmP veya α -CHCA+20 mM AmP ile kaplanan doku kesitlerinin MALDI-TOF kütle spektrumunun karşılaştırılması. (B) ROC analizinden sonra α -CHCA içerisinde AmP içeren matriks ile kaplanan dokuların tümör bölgesinde daha yüksek sinyal yoğunluğuna sahip	

temsili m / z görüntüleri (AUC> 0.640) (C) İlgili doku kesitinin optik görüntüsü. (D) H & E Boyalı doku kesiti. (E) A-CHCA'da 10 mM AmP ile kaplanan doku kesitinin hiyerarşik kümeleme analizi. (F) Sadece α -CHCA ile kaplanan doku kesitinin hiyerarşik kümeleme analizi	78
Şekil 28. CV-PTK dokusunun tümör ve tümöre komşu bölgelerine ait spektrum ve bu bölgelerdeki iyon görüntüleri (Tümör: m/z 936.962, Tümöre komşu: m/z 2307.098)	80
Şekil 29. ROC analizi sonucunda tümör ve tümöre komşu bölgelerden seçilen ayırıcı peptidler. (A-B) Tümör bölgesinde yüksek olarak peptidler (m/z 1293, m/z 994) (C-D) Tümöre komşu bölgede yüksek olan peptidler (m/z 2307, m/z 1434)	81
Şekil 30. CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP vakalarına ait örnek 3 adet spektrumun görüntüsü	82
Şekil 31. Varyantlar arasında anlamlı farklılık gösteren m/z değerleri (p<0.05)	84
Şekil 32. BRAF V600E mutasyonu pozitif ve negatif olan iki hastaya ait amplifikasyon grafiği	85
Şekil 33. Çalışma grubunda BRAF V600E mutasyon görülme sıklığı	85
Şekil 34. BRAF V600E mutasyonu tespit edilen ve edilmeyen örneklerin histolojik varyantlara göre dağılımı	86
Şekil 35. IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının immünohistokimya optimizasyonu (A,C) IQGAP1 antikorunun (1:300) meme kanseri dokusundaki görüntüsü (B,D) IQGAP2 antikorunun (1:300) safra kesesi dokusundaki görüntüsü	87
Şekil 36. CV-PTK dokusunun tümör odağında IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının immünohistokimyasal boyaması	88
Şekil 37. IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP vakalarında immünohistokimya boyaması	89

TABLÖLAR

Tablo 1. TH'larının fizyolojik ve biyokimyasal etkileri	12
Tablo 2. TSH ölçümünün tek başına yanıltıcı olabileceği durumlar.....	17
Tablo 3. İyot eksikliğine bağlı olarak gelişen hastalıklar.....	24
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	41
Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar.....	42
Tablo 6. Kullanılan tampon çözeltiler.	45
Tablo 7. pH 3-10 ve pH 4-7 stripler için IEF parametreleri.....	48
Tablo 8. pH 6-10 stripler için IEF parametreleri	48
Tablo 9. Polimeraz zincir reaksiyonu parametreleri.....	58
Tablo 10. İki boyutlu jellerden elde edilen protein tanımlamaları ($p<0.05$)	69
Tablo 11. FDR düzeltilmesinden sonra klasik varyant ve foliküler varyant arasında ifade değişikliği gösteren proteinler	73
Tablo 12. Varyantlar arasında anlamlı farklılık gösteren m/z değerleri ($p<0.05$).....	83

ÖZET

Günümüzde çok sık rastlanan tiroid nodüllerinin histopatolojik tanısının konulmasını sağlayan en güvenilir ve ucuz yöntem İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi'dir (İİAB). Ancak, ayırıcı tanıda ayırım kriterlerinin yeterli olmayışı bazı nodüllerin histopatolojik tanısını zorlaştırmaktadır. Papiller Tiroid Kanseri (PTK) en yaygın endokrin malignitedir ve farklı histolojik varyantları mevcuttur. Özellikle, Foliküler Varyant Papiller Tiroid Kanseri'nin (FV-PTK) İİAB yöntemi ile histopatolojik olarak tanı konulmasında zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle, ayırıcı tanının ya da ayırım yapacak tekniklerin geliştirilmesi tiroid patolojisi için büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, klinikte en sık görülen varyantlardan klasik (CV-PTK) ve FV-PTK taze dondurulmuş dokuları 2 boyutlu jel elektroforezi ve LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve protein profilleri belirlenmiştir. Ayırıcı tanıya katkısı olabilecek proteinler imünohistokimya ile valide edilmiştir. Aynı zamanda, bu vakaların formaline sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) dokuları MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi ile analiz edilip ayırıcı tanıya katkı sağlayabilecek anlamlı farklı peptidler belirlenmiştir. Çalışma grubundaki BRAF V600E mutasyonu FFPE örneklerin tümör bölgelerinden kesitler alınarak tespit edilmiştir.

BRAF V600E mutasyon taraması sonucunda mutasyon görülen vakaların çoğunluğunun (%69) CV-PTK vakası olduğu tespit edilmiştir. Protein profillerine göre, özellikle benign ve FV-PTK örneklerinin çok sayıda ortak protein içerdiği ve aktin iskelet proteinlerinin ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde sorumlu olan proteinlerin tiroid patolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tiroid, Papiller Tiroid Kanseri, Proteomik, LC-MS/MS, MALDI-Görüntüleme

SUMMARY

Distinguishing Proteomic Profiles of Benign and Malignant Thyroid Nodules

Nowadays, the most reliable and inexpensive method for establishing the histopathological diagnosis of thyroid nodules is Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB). However, the lack of discrimination criteria in differential diagnosis leads to the failure of the successful diagnosis of some nodules. Papillary Thyroid Cancer (PTC) is the most common endocrine malignancy and has different histological variants. Especially, Follicular Variant Papillary Thyroid Cancer (FV-PTC) is solely characterized by nuclear features and the diagnosis of these nodules can be challenging. For this reason, the development of differential diagnosis or differentiation techniques is of great importance in thyroid pathology.

In our study, classical (CV-PTC) and FV-PTC fresh frozen tissues were analyzed by 2-D gel electrophoresis and LC-MS/MS in order to determine the protein profiles. Proteins that may be contributing to differential diagnosis have been validated by immunohistochemistry. Additionally, statistically significant peptides were identified by matrix-assisted laser desorption / ionization (MALDI) Mass spectrometry imaging from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissues. The BRAF V600E mutation in the study group was determined by cross-sectioning the tumor regions of the FFPE samples.

It has been determined that CV-PTC is the majority (69%) of cases with BRAF V600E mutation. Especially benign and FV-PTC cases were found to contain a large number of common proteins according to their protein profiles. It has also been shown that actin cytoskeletal proteins and proteins responsible for the regulation of the cytoskeleton play an important role in thyroid pathology.

Keywords: Thyroid, Papillary Thyroid Cancer, Proteomics, LC-MS/MS, MALDI-Mass Spectrometry Imaging

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klinikte en sık rastlanan endokrin malignite tiroid kanserleridir. Tiroid kanseri tüm malignitelerin yaklaşık %2,1'ini oluşturur ve bu malignitenin yaklaşık %77'si kadınlarda görülmektedir (1). Özellikle son zamanlarda tiroid kanserinin insidansı diğer malignitelerden daha hızlı artmaktadır. Bu hızlı artışın geliştirilen tanı teknikleri ve sağlık hizmetlerinin insanlara daha rahat ulaşması ile bağlantılı olduğu çeşitli otoritelerce öne sürülmektedir. Ancak, Amerikan SEER Gözlem, Epidemiyoloji Sonuçları programı verilerine göre yalnızca tiroid kanseri insidansı değil aynı zamanda tiroid kanserine bağlı mortalite oranının da özellikle son yıllarda arttığı bildirilmektedir (2). Ülkemizde, gerek endemik iyot yetersizliğinin görülmesi gerekse iyot alımını engelleyen çevresel kontaminantlara maruziyetin fazla olması nedeniyle tiroide bağlı rahatsızlıklar sıklıkla görülmektedir (3). Nitekim Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı'nın Türkiye'de kanser kayıtçılığı verilerine bakıldığında tiroid kanserlerinin kadınlarda görülme sıklığı dünyada yüz binde 4-5 olduğu bildirilirken, bu oranın ülkemizde yüz binde 16 seviyesine çıktığı belirtilmektedir (4). Ülkemizde yaklaşık 4 kat daha sık görülen tiroid kanserleri, bu alanda yapılacak ve ayırıcı tanıya katkı sağlayacak çalışmalar açısından önem arz etmektedir.

Tiroid nodüllerinin histopatolojik tanısında kullanılan İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi'nde (İİAB) ayırıcı tanı ya da ayırım teknikleri büyük önem taşımaktadır. İİAB sonucunda patologlar tarafından şüpheli kategorisine konulan tiroid nodüllerinin, benign ya da malign olarak karakterize edilmesi veya malign olarak tespit edilen nodülün doğru alt tipinin bulunması hasta sağlığı açısından önemlidir. Ancak bugüne kadar yapılan tüm çalışmalara rağmen özellikle İİAB yöntemiyle tanı konulmasında zorluklar yaşanan papiller tiroid kanserinin (PTK) foliküler varyantının (FV-PTK) tanısını sağlayacak moleküllerin belirlenmesinde istenilen başarı yakalanamamıştır. Ayırıcı tanıya katkısı olabileceği düşünülen genetik mutasyonların ya da hücre yüzey belirteçlerinin FV-PTK vakalarındaki prevelans

farklılıkları nedeniyle klinikte yaygın olarak kullanılamamaktadır. FV-PTK'nın histopatolojik karakterizasyonu yalnızca çekirdek özelliklerine dayandığı için tiroid patolojisinde öznel ve tartışmalı tanıya neden olabilmektedir.

FV-PTK'nın tanısında yaşanan zorluklar nedeniyle 2016 yılında Nikiforov ve arkadaşları invazif olmayan enkapsüle FV-PTK vakalarını "papiller benzeri nükleer özellikleri olan noninvazif foliküler tiroid neoplazmı" (NIFTP) olarak adlandırmış ve tanı ölçütlerinde değişiklikler yapmışlardır (5). Tanım olarak, NIFTP foliküler bir mimariye ve PTK'nın bazı nükleer özelliklerini gösteren hücrelere sahiptir. Bu nükleer özellikler hem benign tiroid nodülleri ile hem de invazif FV-PTK ile örtüştüğü için, NIFTP'lerin Bethesda sınıflandırmasına göre belirsiz kabul edilmesine ve sitolojik materyallerinden kesin teşhisin engellenmesine neden oluyordu (6). Bu yeni tanımlamayla birlikte, NIFTP tanısı alan hastaların total tiroidektomi yerine lobektomi ile tedavi edilmesi önerilmektedir (7). Ancak, Nikiforov ve arkadaşları tarafından yapılan yeni tanımlamanın ileriki dönemde hasta sağlığı açısından herhangi bir problem çıkarıp çıkarmayacağı tam olarak bilinmemektedir (8). Literatürde, metastaza çeviren ender enkapsüle FV-PTK veya benign foliküler adenom vakaları mevcuttur (9). Bu nedenle, yanlış tanıyı ve dolayısıyla yanlış tedavi stratejilerini engellemek adına FV-PTK vakalarının ayırıcı tanısına destek olacak moleküllere ihtiyaç bulunmaktadır.

Son yıllarda hızla gelişmekte olan proteomik tekniklerin; nodüllerde belirli zamanda belirli yerde bulunan tüm proteinlerin yapısını, yerleşimini, miktarını, translasyon sonrası modifikasyonunu ve protein-protein etkileşimini aydınlatmasından dolayı, histopatolojik olarak karakterizasyonu kolay yapılamayan FV-PTK'nın ayırıcı tanısına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Literatürde, geniş örneklem büyüklüğünde farklı proteomik tekniklerin tiroid dokusuna uygulandığı bir biyobelirteç çalışması bulunmamaktadır. Bu amaçla, çalışmada tedavisi gereği Maslak Acıbadem Hastanesi'nde ameliyat olan papiller tiroid kanseri hastalarının ameliyat esnasında çıkarılan dokuları hem taze dondurulmuş olarak hem de formaline sabitlenip parafine gömülü (FFPE) olarak kullanılmıştır. Kanser dokuları ve bu dokulara komşu benign dokular kullanılarak başta MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi yöntemi olmak üzere 2 boyutlu jel elektroforezi, likit kromatografisi-

kütle spektrometresi (LC-MS) gibi çeşitli proteomik teknikler ile çalışılmıştır. Böylece, klinikte en sık karşılaşılan papiller tiroid kanserinin klasik (CV-PTK) ve foliküler varyantının proteomik profillerinin incelenmesi ve ayırıcı tanıya katkı sağlayacak potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

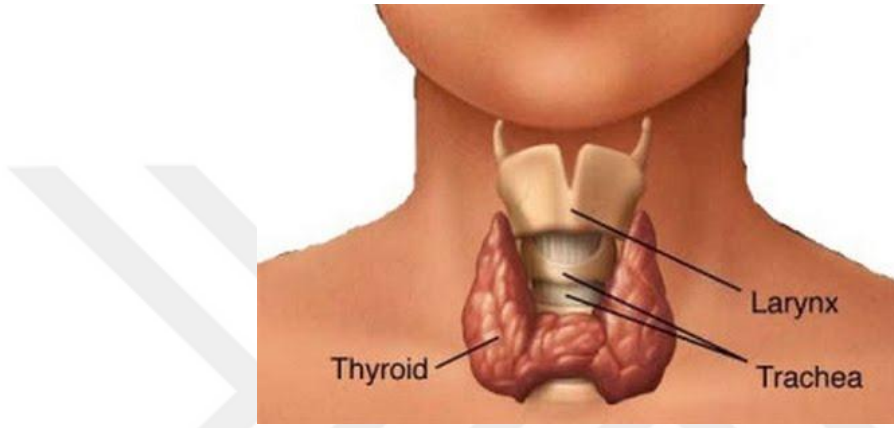
2.1 Tarihçe

Tiroid terimi Yunancada kalkan şekilli anlamına gelen “thyreoides” kelimesinden köken almıştır. Büyümüş tiroid bezlerinden ilk kez M.Ö. 2700 yıllarında Çin’de bahsedilmiş ve Çinlilerin M.Ö 1600’den bu yana büyümüş tiroid bezlerinin tedavisinde yanmış sünger ve yosun kullandıkları bildirilmektedir (10). Ayrıca, antik Mısır Uygarlığı’ndaki hiyeroglif yazıtlarında kadınlarda tiroid bezinin boyutu ile ilgili şekillerin olduğu belirtilmektedir. Ancak, tiroid bezi ile ilgili batı tıbbındaki ilk referans 1656 yılında tiroid bezinin ana görevinin “trakeayı kayganlaştırmak” olduğu bildirilmiştir (11). 1800’lü yılların başına gelindiğinde ise, tiroid bezinin kan akışını beyinden yönlendiren vasküler şant olarak görev aldığı düşünülmekteydi. Tiroid bezi ile ilişkili ilk hastalık, 1811 yılında Burns tarafından tanımlanan tiroid kanseridir (11).

Tiroid cerrahisi ile ilgili bilinen ilk tiroidektomi operasyonu 1884 yılında toksik guatr tedavisinde uygulanmıştır. Özellikle, İsviçreli cerrah Theodore Kocher (1841-1917) 2000’den fazla tiroidektomiye başarı ile gerçekleştirmiştir (11). Ancak, tiroidektomi uygulanan hastalarda görülen zayıflık, solgunluk, anemi ve zihinsel bozukluk gibi ortak semptomlar tiroid bezinin beyinden kan akışını yönlendiren bir şant olmasından ziyade farklı görevlerinin olabileceğini düşündürmüştür. 1891 yılında Murray’in tiroidektomi uygulanan hastalara tiroid özütleri enjekte ederek iyi bir klinik yanıt oluşturduğu bildirilmektedir. Tüm bu çalışmalarla birlikte; Theodore Kocher, 1909 yılında tiroid bezinin fizyolojisi, patolojisi ve ameliyatı üzerine yaptığı çalışmalar nedeniyle Nobel Ödülünü alan ilk cerrah olmuştur (12).

2.2 Tiroid Bezi ve Önemi

Tiroid bezi kahverengi renkli, boynun ön tarafında ve strep kasların arkasında yer alan endokrin bir organdır. Tiroid bezinin ağırlığı yaklaşık 20 gram olmakla beraber, vücut ağırlığı ve iyot alımına bağlı olarak tiroid bezinin ağırlığı değişiklik göstermektedir (13). İki lobdan oluşan tiroid bezinin anatomik yerleşimi Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Tiroid bezinin anatomik yerleşimi (14)

Tiroid bezi dışarıdan gıda ve su yoluyla alınan iyot mineralini kullanarak tiroid hormonları üreten, depolayan ve gerektiğinde kana veren endokrin bezdir. Tiroid bezi tarafından üretilen tiroid hormonları vücut için çok önemlidir ve çeşitli eylemlere sahiptir. Tiroid bezi, doku metabolizması ve gelişiminde önemli bir rol oynamakta ve bunu yaparken çeşitli organ sistemlerini etkilemektedir. Genel olarak, memelilerde normal gelişim, büyüme, sinirsel farklılaşma ve metabolik düzenleme için önemlidir (13).

2.3 Tiroid Bezi Üzerine Etkili Hormonlar

Tiroid bezine etki eden hormonlardan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) hipotalamusun para-ventriküler nükleusundan salgılanmakta ve hipofiz bezine etki etmektedir. TRH, ön hipofiz bezindeki tirotrof hücreleri üzerindeki reseptörleri

aktive etmekte ve tiroid stimulan hormon (TSH) sentezini ve salınımını tetiklemektedir (15).

Ön hipofiz bezinden salgılanan TSH ise tiroid bezi üzerine etki ederek tiroid bezi fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlamaktadır. TSH, doğrudan tiroid foliküler hücrelerin bazolateral zarında ifade edilen TSH reseptörüne etki etmektedir. TSH, sodyum/iyodür simpatörü (NIS) tarafından aracılık edilen iyodür alımını düzenlemekte ve ardından normal tiroid hormonu sentezi ve sekresyonu için gerekli olan bir dizi adım takip edilmektedir (15). Bu sayede tiroid bezinde hormon üretimi, tiroid bezine iyot alımı ve tiroid bezinin büyümesi düzenlenmektedir. TSH salınımının azalması veya artması ile dolaşımdaki tiroid hormon düzeylerindeki değişikliğe tepki verilmekte ve bazal tiroid hormon düzeylerinin korunması amaçlanmaktadır.

2.4 Tiroid Bezi Tarafından Üretilen Hormonlar

Tiroid bezinin ana işlevi, vücuttaki metabolik süreçlerin düzenlenmesi için gerekli olan tironamin olarak adlandırılan iki hormonu (L-tiroksin (tetraiyodotironin-T4) ve L-triiodotironin-T3) üretmektir. T4 hormonu, 1919 yılında Edward C. Kendall tarafından tanımlanmış ve 1950 yılında bu alanda yaptığı çalışmalar sebebiyle Nobel ödülünü almıştır (16). T4 hormonunun tanımlanmasından yaklaşık 35 yıl sonra, tiroid bezindeki tiroglobulinin bir unsuru olarak T3 hormonu tanımlanmıştır. Bundan kısa bir süre sonra ise bu alanda çalışmalar yapan birkaç laboratuvar T3 hormonunun; bazal metabolik hız, amfibiyan metamorfozu, lipid metabolizması ve hipofiz fonksiyonu gibi fizyolojik deneylerde T4 hormonundan daha aktif olduğunu doğrulamıştır (17).

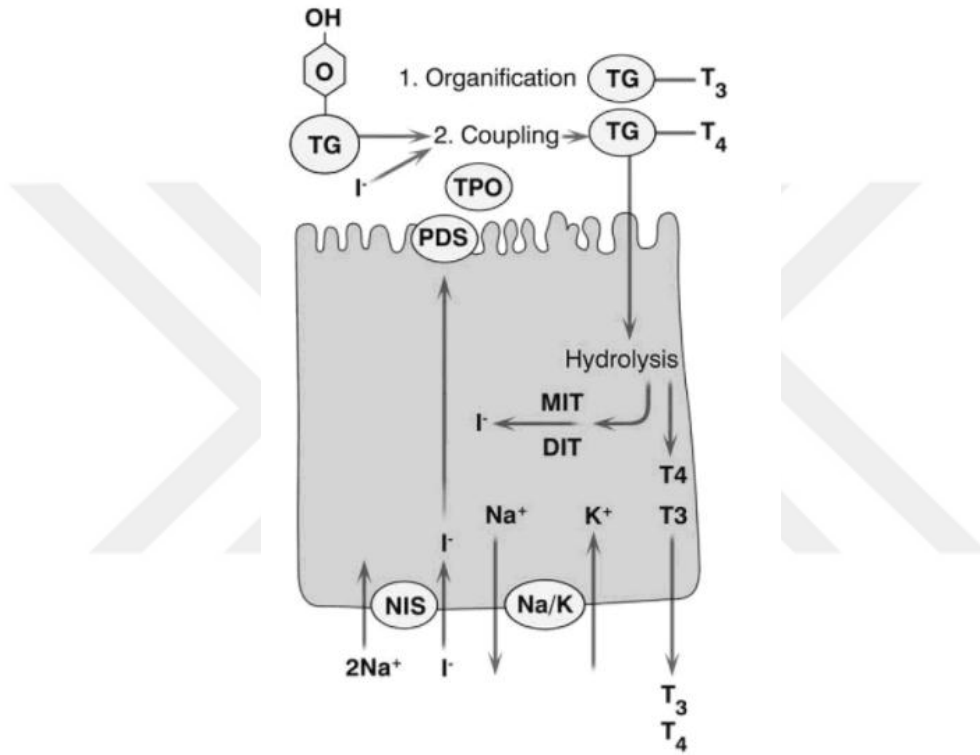
Tiroid hormonlarını üretmek için gerekli olan en kritik hammadde iyottur. Vücutta normal fizyolojinin devamlılığı için gerekli olan günlük iyot alım miktarı yetişkinlerde 150 µg, gebelerde 220-250 µg ve emziren kadınlarda ise 250-290 µg olarak belirlenmiştir (18). Sağlıklı bir erişkinde, yaklaşık 15-20 mg depolanmış iyot bulunmaktadır (19). Vücuda alınan iyot, ince bağırsak yoluyla absorbe edilmekte ve plazmada taşınıp tiroid bezinde konsantre edilmektedir. İyot eksikliği durumunda

iyotun tiroid bezi tarafından tutunması %80'lere ulaşırken, yeterli iyot alımında bu oran %10 civarında seyretmektedir (19). İyotun tiroid folikül hücresi içerisine alınımı tiroid bezinin bazolateral membranında bulunan NIS taşıyıcısı tarafından gerçekleştirilmektedir. NIS aracılı iyot translokasyonunda, Na^+ 'un elektrokimyasal gradyanına doğru hareketi sonucunda çıkan enerji eş zamanlı olarak iyotun elektrokimyasal gradyanının tersine doğru hareketi için kullanılmaktadır. Bazolateral membrandaki Na^+ gradyanı ise $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPaz}$ 'ının çalışması ile sağlanmaktadır (20). Levy tarafından önerilen modelde, Na^+ iyonunun öncelikle NIS'e bağlandığı ve ardından Na^+ ve NIS'in iyot ile bir kompleks oluşturup iyotla birlikte iki Na^+ iyonunun hücre içerisine alındığı belirtilmektedir (21).

Tiroid folikül hücresinin içerisine alınan iyot, apikal membranda bulunan pendirin isimli taşıyıcı tarafından foliküler lümene verilmektedir (22). Tiroid hormon (TH) sentezinde öncü protein olarak görev alan tiroglobulin (Tg) apikal membrandan hücre içerisine alınmaktadır. Tg, tiroid bezinde bulunan en bol proteindir ve foliküler lümen içerisindeki konsantrasyonu 200-300 g/L'ye erişebilmektedir. Temel işlevi tiroid hormonlarının sentezi ve depolanması için bir polipeptid omurgası sunmaktır, ayrıca iyot alımının az ya da düzensiz olduğu durumlarda iyot depolamaktadır (23). Tiroid hormon sentezinin ilk basamaklarında Tg, iyot ile organifiye edilmektedir. Bunun sonucunda, monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) olarak adlandırılan iyotlu tirozin türevleri oluşmaktadır. Tiroid peroksidaz enzimi (TPO) tarafından hidrojen perkoksit varlığında katalizlenen reaksiyon sonucunda MIT ve DIT, T_3 ve T_4 hormonu oluşturmak üzere birleşmektedir (Şekil 2). Buna göre, 2 DIT T_4 hormonunu, 1 DIT 1 MIT ise T_3 hormonunu oluşturmaktadır. Tiroid hormonları belirli bir süre tiroid foliküllerinde depo edildikten sonra, Tg proteolize tabi tutulmaktadır. Tg'nin endopeptidazlar başta olmak üzere çeşitli proteazlar, glikohidrolazlar, fosfatazlar ve sülfatazlar için substrat olduğu bildirilmektedir. Buna göre, öncelikli olarak T_3 ve T_4 hormonunu serbest bırakmak için erken ve seçici parçalanmalar gerçekleşmekte ve ardından proteoliz tamamlanmaktadır. Ardından, salınan hormonlar dolaşıma katılmaktadır (24).

Serbest kalan T_3 ve T_4 hormonlarının dolaşıma katılabilmesi için ilk başta lizozomal kompartmanlardan sitoplazmaya, sitoplazmadan da hücre dışına taşınması

gerekmektedir. Uzun yıllar boyunca, tiroid hormonlarının basit difüzyon yoluyla tiroidlerden salındığı öne sürülmüştür. Ancak bu görüş henüz tam olarak ispat edilmemiştir. T_3 ve T_4 hormonları yapısal olarak lipofilik bileşikler olduğu için, bunların aminoasit yan zinciri ve fenolat kısımları üzerinde yükler bulunmaktadır. Dolayısıyla da, basit difüzyon ile tiroid hormonlarının salınması birçok görüşe göre olası değildir, ancak tam olarak mekanizması da açıklığa kavuşmamıştır (25).



Şekil 2. Tiroid hormon sentezinin şematik gösterimi (26)

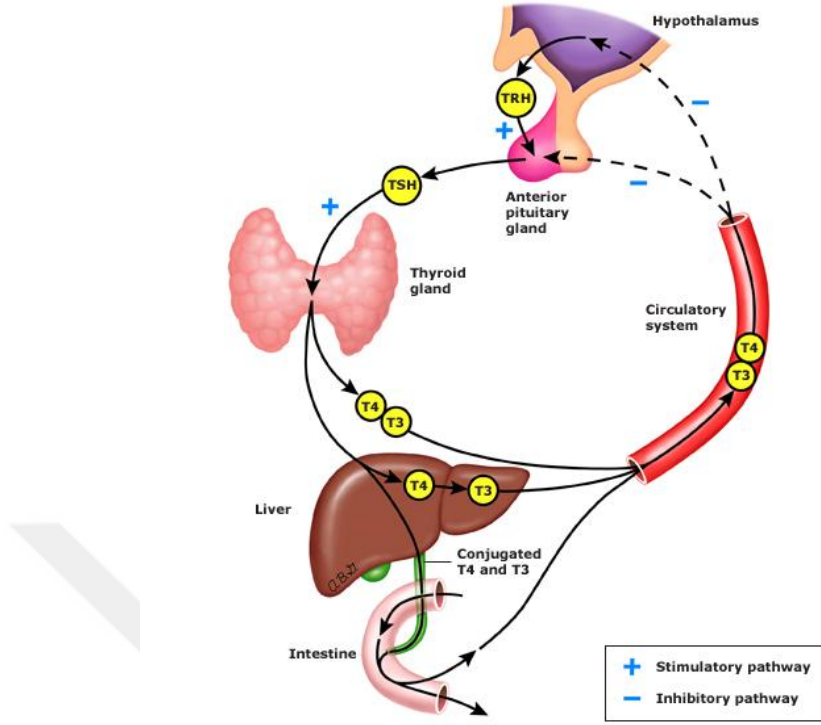
TH dolaşımında tiroksin bağlayıcı protein (TBG), transtiretin veya albumine bağlanarak taşınmaktadır (26). Plazmada serbest olarak taşınan T_3 ve T_4 miktarı son derece azdır. TBG ile taşınan tiroid hormonları, dolaşımında taşınan tiroid hormonlarının %75'ini oluşturmaktadır. TBG'nin T_4 'e çok daha yüksek afinitesi vardır ve plazmada bulunan TBG miktarı yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. Tiroid hormonları, TBG, transtiretin ve albuminden rahatlıkla ayrılabilmekte ve difüzyon ya da membran reseptörlerinin yardımı ile hücrelere giriş yapmaktadır (26).

TH'larının periferik dokulara alınması ve hedef hücrelere girmesinde, monokarboksilat taşıyıcı 8 ve 10, organik anyon taşıyıcı protein ve spesifik olmayan L-tipi amino asit taşıyıcılarının görev yaptığı bilinmektedir. En iyi tanımlanmış spesifik taşıyıcı ise monokarboksilat taşıyıcı 8 proteinidir ve yaygın şekilde ifade edilmektedir (27). Hatta, bu proteinde gözlenen mutasyonların Allan-Herndorn-Dudley X bağlantılı psikomotor retardasyon sendromuna neden olduğu gösterilmiştir (28).

2.5 Tiroid Hormon Üretimi ve Salınımının Düzenlenmesi

Tiroid hormon üretiminin düzenlenmesinde en önemli kontrol faktörü iyot bulunabilirliği ve TSH'dır. Yetersiz miktarda iyot, tiroid hormonunun yetersiz üretimine ve dolayısıyla daha fazla TSH ile tiroid bezinin uyarılmasına neden olmaktadır. Aşırı miktarda iyot ise, akut olarak tiroid hormon sentezini inhibe etmektedir. İnhibisyon mekanizmasının tam olarak nasıl gerçekleştiği bilinmemesine rağmen, aşırı miktarda iyotun TPO aktivitesini inhibe eden çeşitli moleküllerin sentezini tetiklediği 1948 yılında Jan Wolff ve Lyon Chaikoff tarafından öne sürülmüştür (29), (30).

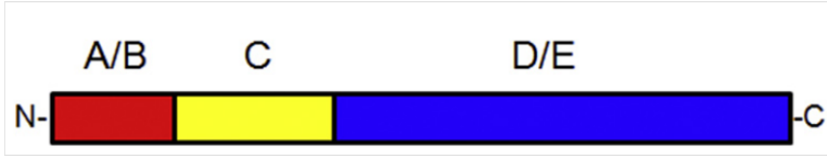
TSH, tiroid hormonu sentezi ve salınımında birçok adımı etkilemektedir. TSH'ın tiroid hormon sentezi üzerine etkisi Gq/fosfolipaz C ile gerçekleşirken, tiroid hormon salınımı üzerine etkisi ise siklik adenosin monofosfat (cAMP) yoluyla gerçekleşmektedir. Buna göre TSH; NIS, TPO, Tg ve hidrojen peroksit üretimini uyarmakta, tirozin grupları arasında iyodinasyonun ve hormonogenezin önceliğini belirlemekte ve Tg'nin tiroisitler tarafından içe alınımını düzenlemektedir. Ayrıca, T3 ve T4 hormonları negatif geri bildirim mekanizması ile TRH ve TSH salınımı azaltmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3: Tiroid hormon sentezinin düzenlenmesi (31)

2.6 Tiroid Hormon Reseptörleri ve Sinyal Yolakları

İnsanlarda, nükleer reseptör süper ailesine ait iki alt tip tiroid hormon reseptörü ($TR\alpha$ ve $TR\beta$) bulunmaktadır. Bu iki genin diferansiyel eklemesine bağlı olarak $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ gibi çoklu TR'lerin yanı sıra üç kesik form, $\Delta\alpha 1$, $\Delta\alpha 2$, $\Delta\beta$ 'da üretilmektedir. $TR\alpha 1$ ve $TR\beta 1$ neredeyse tüm dokularda ifade edilmektedir, ancak organizmanın gelişim aşamasına ve belirli doku türüne bağlı olarak ifade edilme oranı ve görevi değişmektedir (32). Böylelikle, çoğu T3 hedef dokusunun ağırlıklı olarak $TR\alpha 1$ veya $TR\beta 1$ reseptörlerine yanıt verici olduğu veya izoform özgünlüğünden yoksun olduğu bildirilmektedir (33). Bu süperailenin diğer üyeleri gibi, TRlerde, ligandan bağımsız transaktivasyon (AF1) için A/B bölgesi, DNA bağlanma alanı için bir C bölgesi, D etki alanı ve ligand bağlama, dimerizasyon ve ligand bağımlı transaktivasyon (AF2) için bir E bölgesi bulunmaktadır (Şekil 4) (34).



Şekil 4: Nükleer TR'nin yapısı (34)

Tiroid hormonu, prohormon olan T₄'den aktif form olan T₃'e aktive edildikten sonra geniş bir gen yelpazesinde düzenleme yapmaktadır. Tiroid hormonunun her bir hücrede tetiklediği sinyal yolları komplekstir. Sinyal yolağı; hücre ve dokuya spesifik tiroid hormon taşıyıcılar, çoklu TR izoformları, ekspressörler ve koaktivatörler ile etkileşimler nedeniyle yüksek oranda düzenlenmektedir. T₃ hormonunun başlıca sinyal yolu, ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri olan nükleer TR'ler aracılığı ile oluşmaktadır. TR'ler, hedef genlerdeki TH-yanıt elemanlarına retinoid X reseptörleri ile bir homodimer veya heterodimer olarak bağlanmakta ve T₃ direkt olarak gen ifadesini düzenlemektedir. Ligand bağımlı olmayan TR'ler DNA cevap elementleri için T₃ bağımlı TR'ler ile rekabet etmektedir. Ligand bağımlı olmayan TR'lerin önemli transkripsiyon baskılayıcı oldukları ve gelişim sırasında önemli role sahip oldukları bildirilmektedir (35). Buna göre, ligand bağımlı olmayan TR'lerin çeşitli baskılayıcı proteinlerle etkileşime girdiği, bunun sonucunda da histon deasetilazların gen ifadesini engellediği bildirilmektedir. Buna karşılık, T₃ bağımlı TR'lerin steroid reseptör koaktivatör 1 ve diğer koaktivatör proteinlerle hormon bağımlı şekilde etkileştiği ve bunun sonucunda hedef genin ifadesini aktifleştirildiği bildirilmektedir (27).

Tiroid hormonlarının nongenomik etkileri, doğrudan gen ekspresyonunu etkilemeyen eylemleri içermektedir. Nükleer aktivasyon ile TH etkileri birkaç saat ile gün arasında ortaya çıkarken, membran reseptörleri vasıtasıyla biyolojik etkiler birkaç dakika içerisinde hızla uygulanmaktadır. Bu hızlı tepkiler; fosfolipaz C, inositol trifosfat, diaçilgliserol, protein kinaz C, hücre içi Ca⁺² sinyal yolağı, adenil siklaz, protein kinaz A ve Ras/Raf1 serin-treonin kinaz/MAPK yolağına bağlı ikincil haberciler üzerinden gerçekleşmektedir (36). Ayrıca, integrin $\alpha\beta 3$ 'ün hücre dışı bölgesi, T₄ için bir membran reseptörü olarak görev yapmaktadır (37). Integrin $\alpha\beta 3$ üzerindeki TH membran reseptörü, TR $\beta 1$, östrojen reseptör α , STAT1 α , STAT3 ve

p53 gibi nükleer faktörlerin fosforile edildiği MAPK'yi (ERK1/2) harekete geçirdiği bildirilmektedir (38).

2.7 Tiroid Hormonlarının Görevleri

Tiroid bezinden salgılanan tiroid hormonlarının çok çeşitli görevleri mevcuttur. TH'larının fizyolojik etkileri genel olarak, metabolik görevler ve büyüme ve gelişme üzerine görevler olarak özetlenmektedir (Tablo 1). Örneğin, tiroid hormonları bazal metabolik hızı korumakta, adaptif termojenezi kolaylaştırmakta, iştah, besin alımını ve vücut ağırlığını düzenlemektedir. Bu etkilere özellikle iskelet kası ve yağ dokusu üzerindeki etkisiyle aracılık edilmektedir. Ayrıca; TH'nun yağ asidi, kolesterol ve karbonhidrat homeostazı üzerindeki eylemleri de metabolizmanın düzenlenmesi için son derece önemlidir.

Tablo 1: TH'larının fizyolojik ve biyokimyasal etkileri (17)

Büyüme ve Gelişme ile İlgili Görevler	Metabolik Görevler
Birçok memelinin doğum sonrası gelişimi	Endotermelerde bazal metabolik hız düzenlenmesi
Fetal beyin ve kemiğin fonksiyonel ve biyokimyasal olgunlaşması	Su ve Na ⁺ iyonlarının hücre membranlarından hareket ettirilmesi
Mitokondriyal solunum enzimleri ve mitokondriyal zarların sentezinin düzenlenmesi	Kalsiyum ve fosfor metabolizması
	Kolesterol ve diğer lipid metabolizmalarının düzenlenmesi
	Nitrojen (üre, kreatin) metabolizması
	Oksidatif fosforilasyon ve enerji metabolizmasının kontrolü

2.7.1 Büyüme ve Gelişme ile İlgili Görevler

TH'ları birçok memelinin fetal gelişimi ve neonatal beyin gelişimi için son derece önemlidir. Özellikle, miyelinasyon ve nöronal/glial hücre farklılaşması ile ilişkili genlerin TH tarafından düzenlendiği belirtilmektedir (39). Londra Klinik Topluluk Komitesi tarafından 1888 yılında tiroid fonksiyonu ve mental retardasyon arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Tiroid fonksiyonlarındaki bozulmaların, duyu ve kognisyon da dahil olmak üzere, zihinsel durumu önemli ölçüde etkilediği bildirilmektedir (40). TH'larının, iskelet gelişiminde, kemik kütlesinin korunmasında ve etkili kırık iyileşmesi için gerekli olduğu çok eski yıllardan beri bilinmektedir. 1850 yılında Thomas Curling atireozis ile ilişkili olarak kretenizmi tanımlamış, 1873 yılında ise tiroid bezinin olmaması ile kretenizm arasında nedensel bağlantı saptanmıştır (27). Ayrıca, yetişkinlerde tirotoksikoz sekonder osteoporozun önemli bir nedenini oluşturmaktadır.

Ayrıca, T3 hormonunun mitokondri üzerinde önemli etkileri olduğu bildirilmektedir. Örneğin, oksijen tüketiminin uyarılması, mitokondriyel genomunun ifadesi ve mitokondriyogenez üzerinde çeşitli etkilerinin olduğu belirtilmektedir. 1970'lerde yapılan çalışmalarda hipotiroid farelere T3 hormonu enjeksiyonunun farelerin mitokondrisinde oksijen tüketiminin ve oksidatif fosforilasyonun arttığı gösterilmiştir (41). Yapılan çalışmalara göre, mitokondri iç zar üzerindeki proton sızıntısının önemli bir TH hedefi olduğu gösterilmiş ve bu sayede oksijen tüketiminin arttığı öne sürülmüştür (42).

2.7.2 Metabolik Görevler

TH'nun enerji harcamalarını düzenlediği hipotezini destekleyen çok sayıda bilgi mevcuttur. Bu hipotezlerden ilki Magnus-Levy tarafından 1895 yılında ortaya atılmış ve TH'nun enerji harcamasının düzenlenmesine ilişkin önemli hücresel süreçleri etkilediği belirtilmiştir (43). TH'nın bazal metabolik hızla ilgili birçok metabolik yolun davranışını modüle ettiği gösterilmiştir.

Termonötral bir ortamda vücut, zorunlu termojenez yoluyla sıcaklığını muhafaza edebilmektedir. Örneğin metabolik süreçlere eşlik eden ısı üretiminde olduğu gibi vücut zorunlu termojenez ile sıcaklığını korumaktadır. Ancak, ortam

sıcaklığı termonötral'in (insanlarda 23⁰C) altına düştüğünde ısı koruma mekanizmalarının aktivasyonunu uyarabilmektedir. TH, hem kahverengi adipoz doku termojenezini hem de bazal metabolizma hızını arttırarak, zorunlu ve adaptif termojenezi düzenlenmektedir (44). Bazal metabolik hız, insanlardaki enerji harcamalarının birincil kaynağıdır ve bazal metabolik hızdaki olası azalmalar, obezite ve kilo alımına neden olmaktadır. TH'nun, bazal metabolik hızın ana düzenleyicisi olduğu bilinmekle birlikte, bunu hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiği henüz net olarak bilinmemektedir (45). Genel olarak, TH metabolik süreçler için ATP üretimini arttırarak ve iyon gradyanları yaratarak bazal metabolik hızı uyarmaktadır. TH'nu doğrudan ya da dolaylı yoldan uyaran iki iyon gradyanı, hücre zarı boyunca Na⁺/K⁺ gradyanı ve sitoplazma ve sarkoplazmik retikulum boyunca Ca²⁺ gradyanıdır. TH, hücredeki Na⁺ seviyesini ve hücre dışındaki K⁺ seviyelerini değiştirebilmekte, böylece gradyan korumak için Na⁺-K⁺-ATPaz şeklinde ATP tüketimini gerektirmektedir (45).

Özellikle iskelet kaslarında, TH mitokondriyal iç zardan proton sızıntısını arttırmaktadır. Böylece, ATP sentezi için gerekli proton güdü kuvveti azaldığı için daha fazla oksidasyon uyarılarak ATP sentezini muhafaza edilmektedir. Klinik olarak bakıldığında, hipotiroidizmden ötiroidizme geçildiğinde TH ile indüklenen enerji harcamaları, ATP üretiminde belirgin bir artış olmaksızın yalnızca ısı üretimine neden olmaktadır. Hipertiroidide ise; hem ATP sentezinde hem de ısı üretiminde bir artış söz konusudur. ATP sentezinin arttırılmasına bir katkı da, T3 hormonu tarafından sitoplazmada üretilen indirgeyici eşdeğerleri mitokondriyel zar içerisine aktararak ATP oluşumuna katkı sağlayan mitokondriyel gliserol-3-fosfat dehidrogenazın sentezinin indüksiyonunu düzenlemektedir.

Glukoz homeostazı, gıda alımı ile birlikte, insülin sekresyonunun düzenlenmesini ve hedef dokudaki etkisini içeren son derece karmaşık bir mekanizma ile gerçekleştirilmektedir. TH, glukoz metabolizmasının özellikle hepatik glukoz çıkışı ve insülin duyarlılığı olmak üzere çeşitli basamaklarını etkilemektedir (46). TH, farklı organlarda insülin agonistik ve antagonistik etkileri göstermektedir. Tüm bu etkiler, normal glukoz metabolizması için gerekli olan ince dengede gerçekleşmektedir. TH'nın eksikliği veya fazlası karbonhidrat metabolizmasında

değişikliklere neden olarak bu dengeyi bozabilmektedir. Örneğin, klinik olarak, TH'nun fazlalığı bozulmuş glukoz toleransı, hepatik insülin direnci ve artmış hepatik glukoz üretimi ile ilişkilidir (47). TH, gastrointestinal kanaldan glikoz absorpsiyonunu arttırmaktadır. Bunu insüline duyarlı glukoz taşıyıcı-4 (GLUT-4) transkripsiyonunun pozitif regülasyonuna aracılık ederek gerçekleştirdiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, GLUT-4 geninin promoter bölgesinde fonksiyonel bir tiroid hormon yanıt elementi tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (48).

TH'ları lipid metabolizmasının; lipid sentezi, mobilizasyonu ve degradasyonu dahil olmak üzere birçok basamağını etkilemektedir. Örneğin, TH'ları yağ dokusunda depolanan trigliseridlerin mobilizasyonunu arttırdığı için lipid substratlarının kullanımını teşvik etmektedir. Özellikle, plazma esterleşmemiş yağ asitleri ve gliserolün konsantrasyonunun artması bu eylemi yansıtmaktadır (49). Genel olarak, nötral yağlar, fosfolipidler, lipoproteinler, bazı yağ asitlerinin miktarının TH ile ters orantılı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, TH her ne kadar yağ asitlerinin oksidasyonunu uyarsa da karaciğerde lipogenezi indüklediğine dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır (50). Bunun dışında, TH'ları kolesterol sentezindeki önemli basamakları indüklemektedir.

Kreatin ve kreatinin atılımının ise hipotiroidizm ve tirotoksikoz durumlarından etkilendiği literatürde belirtilmektedir. Genel olarak, TH fazlalığı kreatinüriyi tetiklediği ve buna bağlı olarak serum kreatinin konsantrasyonunun arttığı bildirilmektedir. TH'larının protein metabolizmasındaki katabolik aksiyonu ise bilinmektedir. Ancak, hipotiroid kişilere TH verildiğinde bu hormonların anabolik aktiviteyi tetiklediği de bilinmektedir (51).

Vitamin metabolizmasına bakıldığında; tiyamin, riboflavin, nikotinamid ve B12 vitaminine olan ihtiyacın özellikle hipertiroidizm durumunda arttığı, hipotiroidizm durumunda ise azaldığı belirtilmektedir. Vitamin metabolizmasındaki tüm bu değişimlerin, TH'larının genel olarak metabolizmayı etkilemesine bağlı sekonder bir etkisinin olduğu öne sürülmektedir (52).

2.8 Tiroid Fonksiyon Testleri

Tiroid hastalığı olan kişiler genellikle tiroid büyümesi (diffüz ya da nodüler), TH eksikliği (hipotiroidi) semptomları ve TH fazlalığı (hipertiroidi) semptomları ile kliniklere başvurmaktadır. TH bozukluklarının belirlenmesi için tiroid fonksiyon testleri yapılmaktadır. Bu testlerin yorumlanmasında normal tiroid fizyolojisi ile patofizyoloji arasındaki farkın ve benzerliğin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Örneğin, normal değerler arasında çıkan TH seviyeleri her zaman tiroid hastalığının olmadığını göstermeyebilir (53). Ayrıca, hipotiroidi veya hipertiroidinin klinik semptomları özgül olmayabilir. Bu nedenle, şüphelenildiğinde tiroid fonksiyon testleri ile teyit önem arz etmektedir.

Tiroid fonksiyonunun değerlendirildiği laboratuvar testleri alt kategorilerde incelenmektedir (54):

1. TSH
2. Serum T4 ve T3 konsantrasyonu
3. Tiroid otoantikör testleri
4. TH'nın dokudaki etkisini yansıtan testler

2.8.1 TSH

TSH, tiroid fonksiyonunun belirlenmesi için bir ilk tarama testi olarak önerilmektedir. Bunun nedeni, serum TH ile TSH arasında ters logaritmik-lineer bir ilişki olmasından kaynaklı TSH'nın serbest T3 ve serbest T4 düzeylerindeki değişikliklere dinamik olarak yanıt vermesindendir. Örneğin, hipertiroidi tanısında en hassas yöntem TSH düzeyinin ölçümüdür. Ayrıca, TSH düzeyinin belirlenmesiyle tiroid bezine bağlı primer hipotiroidi, tirotoksikoz, subklinik tiroid hastalıkları saptanabilmektedir. Bununla birlikte, yalnızca TSH ile yapılan taramalar bazı vakaların ya yanlış tanı ile sonuçlanmasına neden olmakta ya da bazı hastalıkların gözden kaçmasına neden olmaktadır (55) (Tablo 2). Tüm bu nedenlerden dolayı, birçok laboratuvar da TSH ile TH'larının (total veya serbest) ölçümü birlikte gerçekleştirilmekte ve tiroid fonksiyonu yorumlanmaktadır.

Tablo 2: TSH ölçümünün tek başına yanıltıcı olabileceği durumlar (55)

Yalnızca TSH Ölçümünün Yanıltıcı Olabileceği Klinik Durumlar

Tirotoksikoz nedeniyle yakın zamanda tedavi almış olmak (TH konsantrasyonları normale döndüğünde bile TSH bastırılmış kalabilir)

Tiroid dışı hastalıklar

Santral hipotiroidizm (örneğin hipotalamik / pituitier bozukluklar)

TSH salgılayan hipofiz adenomu

TSH testinde interferans yapan faktörlerin bulunması

Tiroid hormonuna direnç

TH transportu veya TH metabolizması bozuklukları

Laboratuvarlarda TSH ölçümü, immünoradyometrik veya immünokemilüminisans yöntemleri ile yapılmaktadır. Bu yöntemlerin analitik ve fonsiyonel hassasiyetlerinin 0.01 mU/ml'den daha az olduğu belirtilmektedir (19). Genel olarak laboratuvarlar TSH için normal değer sınırlarını 0.35-4.5 mU/mL olarak vermektedir (19). Ancak yaş, gebelik durumu gibi faktörler göz önünde bulundurularak TSH'nın normal değer sınırlarıyla ilgili yorum yapılması gerektiği bildirilmektedir. Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği ve Amerikan Tiroid Birliği kılavuzları ise, serum TSH düzeylerinin ≥ 10 mIU/L'den fazla olan ve saptanamayan serum TSH (<0.1 mIU/L) düzeyleri olan kişilerin tedavi edilmesini önermektedir (56).

2.8.2 Serum T4 ve T3 Konsantrasyonu

TSH ölçümü ile birlikte serum TH'larının ölçülmesi tiroid fonksiyonu hakkında geniş bilgi sunmaktadır. Klinikte sıklıkla immünometrik yöntemlerle serbest T4 ölçümleri yapılmaktadır. Bunun nedeni, çeşitli hastalıklar veya kullanılan ilaçlara bağlı olarak TH bağlayan proteinlerin düzeyleri değiştiğinde veya TH'larının bu bağlayıcı proteinlere afiniteleri değiştiğinde, total hormon ölçümü yanıltıcı olabilmektedir. Her ne kadar immünometrik yöntemlerle serbest T4 ölçümü yapılabilse de, bu ölçümlerde kullanılan ticari malzemeler iyi standardize

edilmemiştir. Ayrıca, gebelik, böbrek yetmezliği, tiroid dışı hastalıklar ve genetik hastalıklar gibi durumlarda tiroid hormonlarında saptanan beklenmedik sapmaların daha rahat değerlendirilmesi için LC-MS yöntemleri de klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, *in vivo* nedenler (anormal bağlayıcı proteinler, heterofil antikorlar, otoantikorlar) ve *in vitro* nedenlerden (serbest yağ asitleri, analiz antikorları, intrinsik seyreltme) dolayı kütle spektrometresi yaklaşımlarının radyoimmün test ve immün teste kıyasla yüksek özgünlüğe sahip olduğunu ortaya koymuştur (57). T3 testleri ise, özellikle hipertiroidi teşhisi veya hipertiroidinin düzeyini belirlemek için kullanılmaktadır. Hipertiroidi olan hastalarda T3 hormon düzeyinin yükseldiği, hatta TSH düzeyi düşük bazı kişilerde serbest T4 düzeyinin normal olmasına rağmen T3 düzeyinin arttığı belirtilmektedir (58).

2.8.3 Tg

Tg normal tiroid hücreleri ve ayrıca tiroid kanseri hücreleri tarafından üretilen bir proteindir. Dolayısıyla nodül varlığında Tg ölçümünün malignite açısından tanısal değeri bulunmamaktadır. Kılavuzlara göre; Tg'nin ölçümü eğer tiroidektomi uygulanmışsa ve radyoimmüno test tedavisi sonrası rekürren hastalığın saptanmasında önem arz etmektedir (19). Tüm bu nedenlerle, anti-Tg ölçümünün tiroid bezi fonksiyonunun birincil ölçütü olmadığı bildirilmektedir. Günümüzde klinik laboratuvarlarda 0.1 ng/ml düzeyine kadar hassasiyetle Tg ölçülebilmektedir. Fakat, diferansiye tiroid kanserinin takibinde yüksek anti-Tg antikorlarının varlığında Tg sağlıklı bir şekilde ölçülememektedir. Bu nedenle, serum Tg düzeyi ile birlikte anti-Tg'ye de bakılması gerektiği bildirilmektedir (19).

2.8.4 Tiroid Otoantikör Testleri

Vücudun bağışıklık sistemi, lenfositler tarafından üretilen antikörler aracılığı ile belirli antijenlere karşı immün cevap oluşturmaktadır. Hipotiroidizm veya hipertiroidizm bulunan birçok hastada, lenfositler tiroid bezine karşı antikör üretmekte ve bunun sonucunda ya tiroid bezi daha çok uyarılmakta ya da hasar görmektedir. Tiroid bezinde probleme neden olan başlıca iki antikör; TPO ve Tg'dir. Serum anti-TPO ölçümü özellikle otoimmün tiroid hastalıklarının araştırılmasında sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. Genellikle; Hashimoto tiroiditi, post-partum tiroidit ve Graves hastalığında saptanmaktadır (19). Otoimmün tiroid rahatsızlığı bulunan ve anti-TPO düzeyi yüksek olan kişilerde anti-Tg'de yüksek bulunmaktadır. Bu nedenle, anti-Tg antikörünün tanıya çok fazla katkısı olmadığı bildirilmektedir.

Bir diğer antikör ise; farklı biyolojik aktiviteye sahip immünoglobulinlerden meydana gelen TSH reseptör antikörüdür. Bu immünoglobulinlerin TSH'ın kendi reseptörüne bağlanmasını engelleyen veya uyarıcı özellikleri olabilmektedir. Stimulan antikörlerin, cAMP üretimini arttırdığı, bloke edici antikörlerin ise cAMP üretimini engelledikleri belirtilmektedir (59).

2.8.5 İyot Metabolizmasının Anlaşılmasına Yönelik Testler

Çeşitli hastalıklarda tiroid bezine iyot alımı farklılaştığı için, radyoaktif iyot alımı (RAIU) ölçülerek özellikle hastaların tedavi kararı ve şekli belirlenmektedir. Örneğin, Graves' hastalığı, TSH üreten tümör ve toksik multinodüler guatrda yüksek RAIU gözlenirken; tiroiditler, hipotiroidiler ve bazı ilaçları (tiyonamidler, lityum, amidaron) kullanan hastalarda RAIU düşüktür (60). İyot, iyodür formunda, tiroid hastalıklarında yaygın olarak kullanılan iki radyoaktif form haline getirilmektedir: I-123 ve I-131. I-123 en ideal izotoptur ve tiroid hücrelerine zararsızdır. I-131 ise, I-123'e benzer şekilde davranmakta ancak tiroid hücrelerine zarar verebilmektedir. Bu radyoaktif iyot moleküllerinin her birinden salınan radyasyon; tiroid fonksiyonu, tiroid dokularının büyüklüğü ve konumu hakkında bilgi vermektedir. I-123 kullanılarak yapılan tiroid taramasından sonra özel bir radyasyondan korunma önleminin alınmasına gerek olmadığı bildirilmektedir (61). Tiroid hücreleri

üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle nadiren I-131 tiroid taraması için kullanılmaktadır (62).

2.9 Tiroid Bezi Hastalıkları

2.9.1 Subklinik Hipotiroidizm

Subklinik hipotiroidizm, normal serum serbest TH düzeyine rağmen normalin üstünde TSH düzeyinin saptanması olarak tanımlanmaktadır. Subklinik hipotiroidizmde genellikle herhangi bir klinik semptoma rastlanmaz. Subklinik hipotiroidizmin bilinen bir tiroid hastalığı olmayan toplumdaki prevalansı %3-%8 arasındadır (63). Ayrıca, prevalansın yaşla birlikte arttığı ve kadınlarda daha yüksek olduğu da bildirilmektedir (64).

Subklinik hipotiroidizm tanısının konulmasında üst sınırın üzerinde TSH (≥ 4 -5 mU/mL) ve normal serbest T4 düzeyleri aranmaktadır. Ancak, bazı durumlarda TSH düzeylerinin bir kısmı kendiliğinden normal sınırın içerisine düşmektedir. Bu gibi durumlarda, tekrarlayan testlerle tanının teyit edilmesi gerekmektedir. Serum TSH düzeyi için kesin üst sınırın belirlenmesinde halen tartışmalar olduğu için serum TSH'nın (<10 mIU/L) hafif yükselmesi durumunda tedavi sürecinin nasıl ilerleyeceği ile ilişkili soru işaretleri mevcuttur (65). Ancak, TSH düzeyi 10 mIU/L'nin üzerine çıktığı durumlarda, levotiroksin tedavisinin genellikle uygun olduğu kabul görmektedir (66).

2.9.2 Hipotiroidizm

Hipotiroidizm, TH hormon yetersizliği veya eksikliğinden kaynaklı bir rahatsızlıktır. Genel olarak, serum serbest T4 düzeyi düşüktür, serum TSH yüksektir. Primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere 3 alt tipi mevcuttur. Primer hipotiroidizm, tiroid bezinde görülen bozukluğun TH sentezinin ve salgılanmasının azalmasına neden olmasından kaynaklanmaktadır. Primer hipotiroidizmin en sık görülen nedenleri; otoimmün tiroidit (Hashimoto tiroidit), tiroidektomi veya RAI tedavisidir

(19). Sekonder hipotiroidizm, hipofiz bezindeki bir bozukluktan kaynaklanır ve buna bağılı olarak TH sentezi ve salınımı azalmaktadır. Tersiyer Hipotiroidizm ise hipotalamustaki bir bozukluktan kaynaklı TH sentezi ve salınımı azalmaktadır (67). Sekonder ve tersiyer hipotiroidizme, santral sinir sisteminden kaynaklandığı için santral hipotiroidizm de denilmektedir. Santral hipotiroidizm de; serum serbest T4 düzeyinin düşük olmasına karşın, serum TSH düzeyi aynı oranda yükselmemiş olarak görülmektedir (67).

Hipotiroidizm çoğu hastada kalıcıdır, bu nedenle hastaya tanı konulduktan sonra ömür boyu TH replasman tedavisi görmek zorundadır. Genel olarak TSH seviyeleri 10 mIU / L'den daha yüksek olan kişilerde sentetik levotiroksin tedavinin temel dayanağıdır ve sağlam bir hipotalamik-pitüiter-tiroid eksenini olması koşuluyla doz her 4 ile 6 haftada bir normal TSH düzeyine göre titre edilmektedir (68).

2.9.3 Subklinik Hipertiroidizm

Subklinik hipertiroidizm, referans seviyesinin altında TSH ve normal serum TH seviyeleri ile karakterizedir. Subklinik hipertiroidizmin tanısı öncelikli olarak biyokimyasaldır ve “normal” TSH düzeyinin tanımına bağılıdır (69). Subklinik hipertiroidizmin görülme sıklığının %0.5- %15 arasında değiştiği bildirilmektedir (69). Endojen subklinik hipertiroidizmin en yaygın nedeni, tiroid bezinin aşırı TH salgılamasıdır. Ayrıca, tiroid hormon tedavisinde doz aşımı ve Graves' hastalığı da önemli nedenler arasındadır. Yaşlı insanlarda ise toksik multinodüler guatr subklinik hipertiroidizmin en yaygın nedenidir (70).

Subklinik hipertiroidizmin tanısı biyokimyasal olarak yapıldığı için, TSH'ın baskılanmasına neden olacak herhangi bir neden yoksa geçici durumlardan ayırmak amacıyla belirli aralıklarla tiroid fonksiyon testlerinin yeniden talep edilmesi gerekmektedir (19). Tedavide ise; subklinik hipertiroidizme sebep olan nedenlere bağılı olarak farklı yaklaşımların uygulandığı belirtilmektedir. Örneğin, TSH düzeyi <0.1 mU/L ise ve hastanın komplikasyon riski yüksek ise mutlaka tedavi süreci başlamalıdır. Ancak, riski olmayan geç hastalarda iyot kısıtlaması ile takip sürecinin gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (19) .

2.9.4 Hipertiroidizm/Tirotoksikoz

Tirotoksikoz terimi, artmış TH'u ifade eden genel bir klinik durumdur. Tirotoksioz, çeşitli etyolojilere sahip bir sendromdur. Klinik semptomlar veya biyokimyasal bulgular artmış tiroid hormonu etkisini ortaya koyduğunda, tanı ve tedavi yöntemleri etyolojiye bağlı olarak şekillendirilmelidir (71). Hipertiroidizm ise, tiroid bezinden artmış TH sentezinden kaynaklı TH fazlalığını ifade etmektedir.

Tanı için, TSH ve serbest T4 düzeyleri kontrol edilmektedir. Baskılanmış TSH ile birlikte yüksek serbest T4 ve/veya T3 klinik hipertiroidizme işaret etmektedir. Tanı konulduktan sonra, RAIU testleri ile etyolojiye yönelik testler yapılması gerekmektedir. Bu sayede azalmış RAIU (tiroidit, egzojen tiroid kullanımı) artmış RAIU'dan (Graves' hastalığı, toksik adenom) ayrılabilceği bildirilmektedir (19). Hastalığın etyolojisine bağlı olarak tedavi seçenekleri değerlendirilmektedir.

2.9.5 Tiroiditler

Tiroidit, tiroid bezinin iltihaplanması anlamına gelen genel bir terimdir. Tiroiditin en belirgin özellikleri inflamasyon, fibroz ve lenfositik infiltrasyonu kapsamaktadır. Her ne kadar farklı etyolojilerle meydana gelse de folikül yıkımı tiroiditlerin karakteristik özellikleridir. Tiroiditlerin sınıflandırılması, semptomların başlangıcı, inflamasyon süreci veya hücrel infiltrasyona bağlıdır (72). Klinik olarak; akut tiroidit, subakut granümatöz tiroidit, sessiz (post-partum) tiroidit, kronik (Hashimoto) tiroiditi ve diğer tiroiditler olarak sınıflandırılmaktadırlar (19). Subakut granümatöz tiroiditi, genel olarak viral enfeksiyon sonucu oluşmakta, üst solunum yolu enfeksiyonu görülmektedir ve ağırlı tiroid bezi hastalıklarının en çok görülen nedenidir. Akut tiroidit ise; viral etyoloji dışında kalan enfeksiyöz ajanlarla oluşmaktadır. Bu tip tiroiditte, tiroid bölgesinde ağrı ve hassasiyet görülmektedir. Hashimoto tiroiditi, en sık görülen kronik otoimmün tiroidittir. Hashimoto tiroiditli hastalarda genellikle guatr ve/veya hipotiroidi gözlenmektedir. Klasik Hashimoto tiroiditinin en belirleyici özelliği olan guatr genellikle aşamalı olarak gelişmekte ve rutin muayene veya ultrasonografi esnasında tespit edilmektedir (73). Sessiz (post-

partum tiroidit) tam nedeni bilinmemekle birlikte, Hashimoto tiroiditine çok benzer bir otoimmün hastalık olduğu düşünülmektedir. Hashimoto tiroiditinde olduğu gibi post-partum tiroiditte de anti-tiroid antikorlarının (anti-TPO, anti-Tg) miktarı artmaktadır. Anti-tiroid antikorları pozitif olan kadınların post-partum tiroiditi geçirme olasılıklarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Genellikle asemptomatik pozitif antikorları olan kadınların, gebelikle birlikte bağışıklık sisteminde görülen dalgalanmalardan dolayı post-partum tiroidit geçirdikleri öne sürülmektedir (74). Diğer tiroiditler ise; RAI tedavisi uygulandıktan sonra radyasyona bağlı olarak gelişen tiroidit, tiroid bezinin sert palpasyonu veya kaza sonrası gelişen travmaya bağlı tiroidit ve interferon- α , interlökin-2, amiodaron gibi ilaçlara bağlı olarak gelişen ilaca bağlı tiroiditlerden oluşmaktadır (19).

2.9.6 İyot Eksikliği Nedeniyle Gelişen Hastalıklar

İyot eksikliğinin görüldüğü durumlarda, T3 hormonu T4 hormonuna kıyasla daha fazla üretilmekte ve tiroid bezinin iyot yakalama kapasitesi artmaktadır. Bu sayede kısıtlı miktardaki iyot daha ekonomik olarak kullanılmaktadır. İyot yetersizliği ve buna bağlı olarak ortaya çıkan subklinik hipotiroidizm tüm dünyada önemli bir sorundur (75). Tablo 3’de iyot eksikliğine bağlı olarak gelişen ve iyot replasmanı ile önlenebilen hastalıklar özetlenmiştir (76).

Tablo 3: İyot eksikliğine bağlı olarak gelişen hastalıklar

İyot Eksikliğine Bağlı Gelişen Hastalıklar
Diffüz ve Nodüler Guatr Düşük iyot alımı T4 ve T3 üretimini düşürmekte, bu da T4 ve T3 üretimini normale döndürmek için artmış TSH salınımı ile sonuçlanmaktadır. TSH aynı zamanda tiroit büyümesini uyarmaktadır. Böylece, guatr iyot yetersizliğine cevabın bir parçası olarak ortaya çıkmaktadır.
Hipertiroidizm İyot eksikliği diffüz ve nodüler guatr sıklığını arttırmaktadır. Zamanla, eğer iyot eksikliği çok şiddetli değilse tiroid büyümesi ve buna bağlı olarak fonksiyon artışı gözlenmektedir. Bu durum da toksik guatr ve hipertiroidi ile sonuçlanmaktadır.
Hipotiroidizm Çok düşük iyot alımına bağlı hipotiroidi artık çok nadir olarak görülmektedir. Yetişkinlerde hipotiroidin genel bulguları ve guatr görülmektedir.
Kretenizm Çocuklarda, entellektüel gelişimdeki problemlerin yanı sıra, diğer nörolojik ve somatik kusurlar birlikte görülmektedir.
Yenidoğan ve Bebek Ölümleri Şiddetli iyot yetersizliği, yenidoğan ve bebek ölümlerini arttırmaktadır. İyot eksikliğinin giderilmesi ile bu oran %50'ye kadar azaltılmaktadır.

2.9.7 Türkiye'deki İyot Durumunun Belirlenmesi ve Çevresel Guatrojenler

İyot eksikliğinin giderilmesi için dünyada önerilen en etkin, ucuz ve istikrarlı yöntem sofra tuzlarının iyotlanmasıdır. 1990 yılında, Birleşmiş Milletler Çocuklar için Dünya Zirvesi'nde dünya çapında iyot yetersizliğinin ortadan kaldırılması için hedefler ortaya konulmuştur (77). Çoğunlukla, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tavsiyeleri doğrultusunda çeşitli ülkelerde tuz iyodinasyonu programları yürütülmeye başlanmıştır (78). Ülkemizde tüm sofra tuzlarının iyotlanması için yasal düzenlemeler 1999 yılında tamamlanmış, ardından 2000'li yıllardan itibaren de

iyotlu tuz kullanımı yaygınlaştırılmıştır. Ancak, idrar iyot düzeylerinin ölçüldüğü araştırmalar sonucunda ülkemizde halen kısmi iyot eksikliğinin olduğu belirtilmektedir (3).

Ülkemizde iyotlu tuz kullanımı yaygınlaştırılmasına rağmen tiroid bezi hastalıklarının, özellikle de kadınlarda hipotiroidizmin arttığı gözlenmektedir (75). Bu artışın sebebi olarak çevresel guatrojenlere maruziyetin artması öne sürülmektedir (3). Perklorik asit, nitrat, tiyosiyanat gibi çevresel kimyasallar iyotun tiroid bezine alımını engellemekte ve uzun süreli maruziyet sonucunda azalmış tiroid hormon üretimi gözlenmekte ve sonuç olarak hipotiroidizm vakaları yaşanmaktadır. Perklorik asit silah sanayisinde, havai fişeklerde, hava yastığı sistemlerinde kullanılmaktadır (79). Ayrıca, çeşitli endüstriyel atıkların yer altı sularına karışması sonucunda perklorik asite maruziyet gıdalar ve içme suları ile gerçekleşmektedir (80). Bu çevresel guatrojenin iyotun tiroid bezine alınmasında görevli olan NIS'e afinitesi ise iyottan 30 kat daha fazladır (81,82). Perklorik asitten sonra iyodun tiroid bezine alımını engelleyen diğer potansiyel NIS inhibitörü ise tiyosiyanattır. Özellikle, tütün dumanı insan vücudunda tiyosiyanata metabolize olan önemli miktarda siyanür içermektedir (83). Doğal olarak gıdalar ve süt ile de tiyosiyanat vücuda alınmaktadır (84). Çeşitli gıdalarda ve suda saptanan nitrat da, perklorik asit ve tiyosiyanat ile benzer mekanizma ile tiroid bezine iyot alımını engellemektedir. Nitratin yarı ömrü çok kısa olduğu için, herhangi bir birikim bilinmemektedir (85). Ancak, diğer çevresel guatrojenlerle etkileşimi neticesinde tiroid fonksiyonlarının etkilenebileceği öne sürülmektedir (75).

2.10 Tiroid Nodülleri

Tiroid nodülü terimi, tiroit bezinde bir yumru oluşturan anormal büyüme anlamına gelmektedir (86). Tiroid nodüllerinin büyük çoğunluğu benign olmasına rağmen, küçük bir kısmı tiroid kanseri oluşturabilmektedir. Erken evrede tiroid kanserini teşhis edebilmek için, tiroid nodüllerinin uzmanlar tarafından değerlendirilmeleri gerekmektedir. Tiroid nodülleri sıklıkla görülmektedir, ayrıca hassas görüntüleme tekniklerinin artan kullanımı ile tesadüfen saptanan tiroid

nodüllerinin oranı hızla artmaktadır. Tüm dünyada tiroid nodüllerinin görülme sıklığı iyot eksikliği ile doğru orantılıdır. İyot eksikliği olan alanlarda, yetişkinlerin %50'sine kadar tiroid nodülleri görülmekteyken, iyot yeterli alanlarda yetişkinlerin %5'inde tiroid nodülü görülmektedir (87). Nodüller; kist, malign veya benign tümör, tiroidit, Graves hastalığı veya kolloid nodüler hastalığı gösterebilmektedir.

2.11 Tiroid Kanseri

Tiroid bezindeki kanserler endokrin organlarda saptanan malign tümörler içerisinde en sık görülen kanserlerdendir. Tiroid kanserleri, tüm kanserlerin %2,9'unu oluşturmaktadır (88,89). Normal tiroid bezi histolojik olarak iki ana parankimal hücre tipinden oluşmaktadır. Foliküler hücreler, iyotu konsantre edip tiroid hormonu üretmektedirler. Bu hücre tipinden hem iyi diferansiye tipte kanserler ((PTK) ve foliküler (FTK)) hem de anaplastik tiroid kanserleri (ATK) köken almaktadır. İkinci hücre tipi olan C veya parafoliküler hücreler ise, kalsitonin hormonu üretmekte ve medüller tiroid kanseri (MTK) bu hücrelerden köken almaktadır (90).

Tiroid kanseri insidansı kadınlarda erkeklere göre 3 kat daha fazladır, ancak ölüm oranlarının kadın ve erkeklerde aynı olduğu belirtilmektedir (91). Tiroid kanserlerinin etyolojik faktörleri tam olarak belirlenmemiştir, ancak radyasyona maruz kalma tiroid kanserinin görülme sıklığını arttırmaktadır. Özellikle, II. Dünya Savaşı sırasında Hiroşima ve Nagazaki'de atom bombasına maruz kalındıktan sonra ve Çernobil kazası sonrasında tiroid kanserinde ciddi artış meydana geldiği bildirilmektedir (92,93). Radyasyona maruz kaldıktan sonra tiroid kanseri görülme sıklığının daha fazla olmasına rağmen, hastalığın biyolojik davranışı hem radyasyona maruz bırakılmış hem de radyasyona bağlı olmayan tiroid kanserlerinde benzer olduğu görülmektedir (94). Bu nedenle, radyasyona maruz kalmanın hastalığın tetiklenmesi için önemli olmasına rağmen, malignite agresifliğinin belirlenmesinde rol oynamadığı düşünülmektedir (94).

2.12 Diferansiye Olmayan Tiroid Kanserleri

Diferansiye olmayan tiroid kanserleri , foliküler tiroid epitelinden köken alan fakat tiroid bezinin tipik farklılaşma özelliklerinden yoksun kanserlerdir. Buna göre, bu tipteki tiroid kanserlerinin iyot alımı, Tg sekresyonu, TSH'a cevabı farklılaşmıştır ve diferansiye olmayan tiroid kanserleri en agresif tiroid kanserlerini oluşturmaktadır (95).

Diferansiye olmayan tiroid kanserleri aynı zamanda ATK olarak da bilinmektedir. ATK, tüm tiroid kanserlerinin %2'sinden azını kapsamaktadır. Ancak agresifliği nedeniyle medyan sağ kalım süresi yaklaşık 5 aydır (96). ATK'nın risk faktörleri tam olarak bilinmemekle beraber, hastalarda guatr öyküsü ve daha önceden geçirilmiş diferansiye tiroid kanseri öyküsü bulunabilmektedir. Tümörlerin diferansiyasyonu azaldıkça daha fazla mutasyon gösterme eğiliminde olmaktadır (97).

ATK çeşitli şekillerde görülmektedir. Ancak genellikle boyunda bir yumru veya nodül olarak bulunmaktadır. Bazı vakalarda yutkunma, solunum güçlüğü veya ses kısıklığı gibi zorluklar da ortaya çıkmaktadır. Hastalığın teşhisinde öncelikli olarak İİAB yöntemi kullanılmaktadır. Ancak tanı konulduktan sonra, hasta durumunun tam olarak değerlendirilmesi (kan testleri, kanserin yayılıp yayılmadığını ve kanserin tam olarak yerin, belirlemek için görüntüleme taramaları) gerekmektedir (98). ATK, radyoaktif iyot tedavisine veya TSH baskılayıcı tedaviye yanıt vermemektedir. Bu nedenle, bu vakaların çok disiplinli bir ekiple konsültasyonunun yapılması, cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapinin birlikte düşünülmesi gerekmektedir (98).

2.13 Diferansiye Tiroid Kanserleri

Tiroid bezi, tiroid hormonu sentezleyen ve depolayan foliküler hücreler ve kalsitonin hormonu sentezleyen parafoliküler hücreler olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Tiroid kanserleri köken aldıkları doku tipine göre foliküler hücre kökenli tümörler, parafoliküler kökenli tümörler (MTK) ve diğerleri olarak sınıflandırılırlar. Foliküler hücrelerden köken alan tümörler TSH ile uyarılmaya

devam eder, dolayısıyla tiroid hormon sentezi ve tiroglobulin üretimini gerçekleştirirler. Tüm bu nedenlerle, bu tümörlere diferansiye tiroid kanserleri denilmektedir. Diferansiye tiroid kanserleri tiroid kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. WHO sınıflandırmasına göre diferansiye tiroid kanserleri papiller ve foliküler tiroid kanserleri olarak ikiye ayrılmaktadır (94).

2.13.1 Tanı Yöntemleri

Diferansiye tiroid kanserlerinin tanısında İİAB başta olmak üzere fiziksel muayene, laboratuvar testleri, ultrasonografik ve sintigrafik bulgular kullanılmaktadır. Ancak tek başına tiroid fonksiyon testleri, sintigrafi ve ultrasonografi bulguları nodüllerin benign ya da malign ayrımına ilişkin bilgi vermemektedir (99).

İİAB %95'e yakın bir tanı duyarlılığı ve özgüllüğü ile tiroid nodüllerinin benign veya malign olarak karakterize edilmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. İİAB, palpe edilebilen tek veya baskın nodüler için boyuttan bağımsız olarak önerilmektedir. Ancak, İİAB yöntemi her ne kadar güvenilir ve uygun maliyetli bir yöntem olsa da, ayırıcı tanıda ayırım kriterlerinin yeterli olmayışı nedeniyle İİAB sonucu 'şüpheli' olan nodüller vardır. İİAB sonucu şüpheli olgularda cerrahi müdahalenin kesin tanı konanlar kadar sıklıkla yapıldığı da belirtilmektedir (100). Hasta sağlığı ve ekonomik faktörler göz önünde bulundurulduğunda ayırıcı tanıda ayırım kriterlerinin varlığı önem arz etmektedir.

2.13.2 Tedavi Yöntemleri

Diferansiye tiroid kanserlerinin tedavisinde ilk adım cerrahi operasyondur. Genellikle total tiroidektomi ile tiroid bezi tamamen çıkarılmaktadır. Özellikle papiller tiroid kanserlerinde sıklıkla multifokalite görüldüğü için diğer odaklardan nüksün engellenmesinde tüm tiroid bezinin çıkarılması avantajlıdır. Ayrıca, subtotal tiroidektomi veya lobektomi radyoaktif iyot kullanımını zorlaştırmaktadır. Bir diğer

önemli nokta ise; hasta izleminde önemli bir belirteç olan tiroglobulini kullanabilmek için hastaya total tiroidektomi yapılmış olması gerekmektedir.

Her ne kadar tiroidektomi diferansiye tiroid kanserleri için sıklıkla başvuru olan bir yöntem olsa da; rekürren laringeal sinir yaralanmaları karşılaşılan komplikasyonların başında gelmektedir (101). Bu nedenle de, tiroid patolojisinde ayırıcı tanı ve ayırım ölçütlerinin varlığı gereksiz cerrahi girişimleri önleyebilecektir. Diferansiye tiroid kanserlerinde cerrahi operasyondan sonra radyoaktif iyot tedavisi önerilmektedir. Yüksek dozda I-131 verilerek tiroid kanser hücrelerinin yok edilmesi sağlanmaktadır (61).

2.14 Medüller Tiroid Kanseri

MTK, tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %1-%2'sini oluşturmaktadır. MTK, tiroid bezinin parafoliküler hücrelerinden köken aldıkları için diğer tiroid kanserlerinden farklıdır. Bu hücreler tiroid hormonu sentezlemez, ancak bunun yerine kalsitonin hormonu üretmektedirler. MTK olgularının çoğunluğu sporadik olmasına rağmen, yaklaşık %20 oranında kalıtsal nedenlerden dolayı da görülmektedir. Genellikle, RET onkogeninde mutasyonlar ve tip 2 çoklu endokrin neoplazi sendromunun bir parçası olarak görülmektedir (102).

2.15 Foliküler Tiroid Kanseri

FTK, diferansiye tiroid kanserlerinin %10-%20'sini oluşturmaktadır. Özellikle iyot eksikliğinin görüldüğü alanlarda, FTK'nın görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir (103). WHO verilerine göre, FTK kapsüler ve/veya vasküler invazyon varlığı ve PTK'ya özgü nükleer özelliklerin olmaması ile tanımlanmaktadır. FTK'nın kan damarlarını istila etme eğilimi nedeniyle, bölgesel lenf düğümlerine değil de daha uzak organlara metastaz yapma özelliği olduğu bildirilmektedir (103).

2.16 Papiller Tiroid Kanseri

PTK klinikte en sık görülen tiroid malignitesidir. PTK, endokrin kanserlerden kaynaklanan toplam endokrin kanserlerinin %96'sını ve endokrin kanserler nedeniyle ölümlerin %66,8'ini oluşturmaktadır (91).

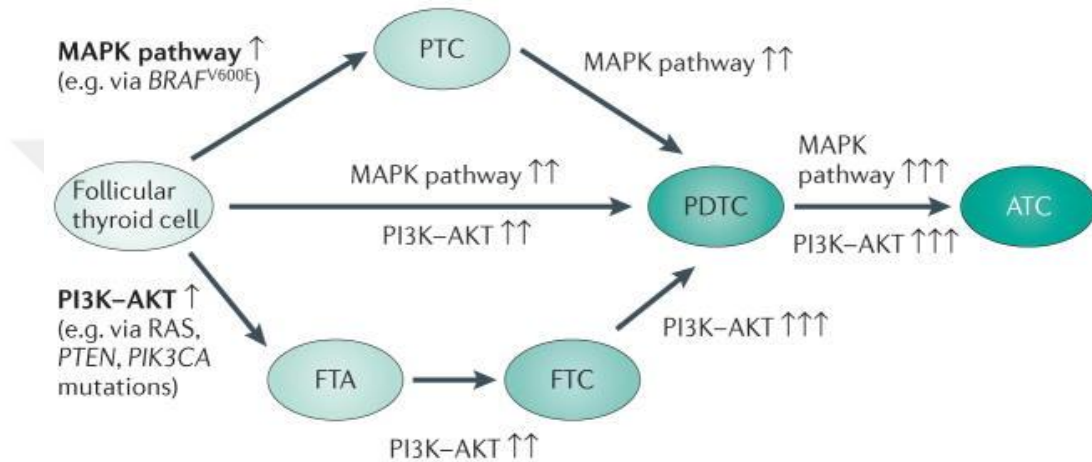
2.16.1 Histopatolojik Varyantlar ve Tanıda Karşılaşılan Problemler

PTK klinikte rastlanan en yaygın endokrin malignitedir (104). Papiller tiroid kanserinin histopatolojik varyantları mevcuttur. Bu varyantlardan CV-PTK papiller yapı göstermektedir. FV-PTK ise papiller yapı görülmez; tümör foliküllerden oluşmuştur. Bu folikülleri oluşturan hücrelerde papiller karsinom için tipik olan çekirdek değişiklikleri vardır. Ancak bu çekirdek değişiklikleri klasik varyanta oranla daha silik/belirsiz olabilmektedir (104). Gerek papiller yapıların bulunmaması gerekse papiller tiroid karsinomu çekirdek özelliklerinin silik/belirsiz olması foliküler varyantlarda sitolojik incelemede kesin bir tanı verilmesini engelleyebilmektedir.

FV-PTK'nın histopatolojik karakterizasyonu yalnızca çekirdek özelliklerine dayandığı için tiroid patolojisinde tartışmalı tanıya neden olabilmektedir. 2016 yılında bu alandaki tartışmalara son vermek amacıyla Nikiforov ve arkadaşları tarafından invazif olmayan FV-PTK vakaları NIFTP olarak adlandırılmış ve tanı kriterleri bu ölçüde yeniden düzenlenmiştir (5). Yapılan bu tanı değişikliği ile hastalara yapılacak gereksiz cerrahi müdahalenin ve operasyon maliyetinin engellenmesi planlanmıştır. Ancak bu yeni tanımlama ile NIFTP olgularının benign olarak adlandırılması patologlar arasındaki tartışmayı dindirmemiştir (105,106). Tiroid patolojisinde NIFTP'lerin benign yerine düşük-riskli tiroid kanserleri olarak adlandırılmaları birçok patolog tarafından talep edilmektedir (105). Tüm bu nedenlerle, PTK'nın histopatolojik varyantlarından FV-PTK'nın ayırıcı tanısı için yapılacak biyobelirteç çalışmaları önem arz etmektedir.

2.16.2 PTK'nın Ayırıcı Tanısında Kullanılan Genomik Teknikler ve Limitasyonları

Tiroid karsinogenezine çeşitli genetik değişiklikler katkıda bulunmaktadır. Bu genetik değişikliklerin farklı fonksiyonları vardır ve özellikle hücre yüzeyinde bulunan tirozin reseptörleri, sitoplazmik sinyal proteinleri ve nükleer transkripsiyon faktörlerin fonksiyonlarını etkilemektedir (107). Tiroid kanserlerinde yaygın olarak görülen genetik değişiklikler Şekil 5’de verilmiştir.



Şekil 5. MAPK ve PI3K-AKT yolları tarafından yönlendirilen tiroid tümörigenezinin progresyon modeli (108)

Tiroid kanserinin ayırıcı tanısına katkı sağlaması hedeflenen moleküllerden; BRAF V600E, RET/PTC, RAS, PAX8/PPAR gamma sporadik mutasyonları papiller tiroid kanserinin histopatolojik varyantları arasında farklılık göstermektedir (109). Örneğin, papiller tiroid kanserinin sıklıkla karşılaşılan histopatolojik varyantlarından klasik papiller tiroid kanserinde BRAF V600E mutasyonu %35-%70 arasında görülmesine rağmen, papiller tiroid kanserinin foliküler varyantında bu oran yalnızca %5 ile %20 arasındadır (110). Bir diğer moleküler biyobelirteç olan RET/PTC rearanjmanının papiller tiroid kanserinde görülme sıklığı da %5 ile %80 arasında değişmektedir (111). Dolayısıyla, geliştirilen moleküler teknikler ve hedeflenen moleküller tiroid kanserinin ayırıcı tanısı için yeterli değildir.

2.16.3 Biyobelirteç Çalışmaları

Tiroid kanserinin ayırıcı tanısı için sınırlı sayıda biobelirteç çalışması yapılmıştır (112). Bunun öncelikli nedeni tiroid bezinin benzersiz fizyokimyasal özelliklerinden kaynaklanan teknik sorunlardır. Tiroid bezinin yapısında bol miktarda bulunan Tg proteini, organın foliküller yapısı, stroma, kan damarları ve eritrositler genel olarak biyobelirteç çalışmalarını sınırlandırmaktadır.

Tiroid malignitelerini tespit etmek amacıyla son 40 yıldan beri birçok moleküler teknik geliştirilmeye çalışılmış ve birçok molekül hedeflenmiştir (109). Bu amaçla, biyobelirteç araştırmalarında ilk olarak serum analiz edilmiş, serumdan elde edilecek biyobelirteçlerin duyarlılığının yüksek ve spesifik olması hedeflenmiştir. En önemli serum biyobelirteçlerinden olan kalsitonin medüller tiroid kanserinin biyobelirtecidir, ancak kalsitonin analizi de kullanılan yöntemlere göre farklılık göstermektedir (113). PTK için geliştirilmeye çalışılan serum biyobelirteçleri ise malign ve benign tümör ayırımında başarılı olamamıştır. Örneğin, Makki ve arkadaşları tarafından serum proteinlerinin araştırıldığı çalışmada, PTK ve benign nodüller arasındaki protein farklılığı araştırılmıştır. Bu amaçla literatürdeki diğer çalışmalarda tespit edilen proteinlerin miktarları serumda analiz edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda hasta serumunda araştırılan proteinlerin benign ve PTK hastalarında anlamlı farklı olmadığı gösterilmiştir (114).

2.17 Proteomik Çalışmalar

Proteom, genom tarafından kodlanan tüm proteinleri tanımlamaktadır. Proteomik, belirli koşullar altında belirli bir zamanda bir hücre, doku veya tüm organizmadaki proteinlerin geniş çaplı analizidir. Proteomik tekniklerde, genetik kod veya mRNA bolluğu yerine işlevsel moleküller doğrudan ele alındıkları için genom tabanlı teknolojilere kıyasla birçok avantaj sunmaktadırlar (115). Proteom; transkripsiyon, translasyon, protein devri ve posttranslasyonel modifikasyonların kombinasyonunun sonucudur. Dolayısıyla, proteomik genomun aksine son derece dinamik bir kavramı ifade etmektedir.

Proteomik kullanılarak tıbbın her alanında ve tıp dışı alanlarda da araştırmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda; kanser teşhis, tedavi ve prognoz tahmini, immün yanıt tayini, mikroorganizma tayini ve alt gruplara ayrılması, besin alerjisinin tespiti gibi farklı alanlarda araştırmalar yapılmaktadır (116–118). Proteomik teknikler arasında, proteinlerin büyük ölçüde araştırılabilmesine imkan sağlayan kütle spektrometresi yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Proteomik çalışmalarda, kütle spektrometresinin uygulandığı 3 temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar; protein ekspresyonunun belirlenmesi, protein etkileşimlerinin tanımlanması ve protein modifikasyonlarının yerlerinin belirlenmesidir (119).

2.18 Jel Bazlı Proteomik Çalışmalar

2.18.1 İki Boyutlu Jel Elektroforezi

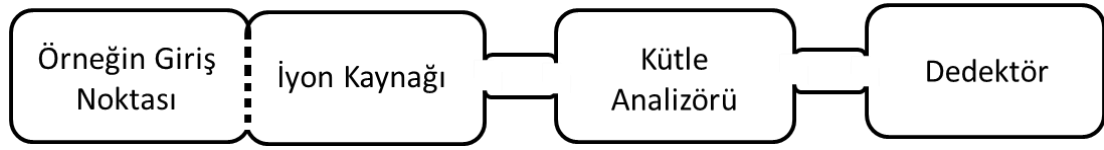
İki boyutlu jel elektroforezi, 1975 yılında geliştirilmiştir ve o tarihten itibaren daha fazla proteinin bu yöntem ile tanımlanabilmesi için metodolojik iyileştirmeler yapılmıştır (120). Bu yöntemde proteinler öncelikli olarak izoelektrik odaklamayla izoelektrik noktalarına göre ayrılmaktadır. Ardından, proteinler moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile ayrılmakta ve jelden kesilen protein spotları kütle spektrometresi ile analiz edilmektedir. İki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında karşılaşılan en büyük sorun protein çözünürlüğüdür. Bu nedenle denatüre edici koşullar altında 2 boyutlu jel elektroforezi çalışmaları yapılmaktadır. Proteinlerin denatürasyonunu ve çözünürlüğünü sağlamak için iki tür reaktif kullanılmaktadır. Kullanılan üre ve tiyoüre sayesinde kovalent olmayan bağlar zayıflatılarak proteinler açılabilir. Ayrıca, ikinci boyutun ayırımında kullanılan iyonik deterjanlar sayesinde —genellikle sodyum dodesil sülfat (SDS) — amino asit deterjan etkileşimi artırılmaktadır. SDS’de, uzun hidrokarbon zinciri ve buna bağlı iyonik polar bir baş bulunmaktadır. Hidrofobik hidrokarbon zinciri ile hidrofobik aminoasitlere bağlanan SDS, amino asit-deterjan etkileşimini amino asit-amino asit etkileşimine kıyasla daha fazla arttırmaktadır ve böylece denatürasyonu sağlamaktadır.

Özellikle son yıllarda yapılan birkaç metodolojik iyileştirme, 2 boyutlu jel elektroforezi çalışmalarına katkı sağlamıştır. Örneğin, immobilize edilmiş izoelektrik odaklama şeritleri, amfolit esaslı tamponlar, yüksek hassasiyetli boyalar ve jel görüntüleme yazılımlarının geliştirilmesi yöntemin iyileştirilmesine destek olmuştur (121). Ancak, 2 boyutlu jel elektroforezinin bir takım kısıtlamaları mevcuttur. Bunlardan bazıları, tekrarlanabilirlik ile ilgili yaşanan sorunlar, düşük miktardaki proteinlerin jelde zayıf gösterimi, aşırı asidik/bazik proteinlerin veya aşırı büyük ve hidrofobik proteinlerin jelde gösterimlerinde problem yaşanmaktadır (121).

2.19 Jel İçermeyen Proteomik Çalışmalar

Her ne kadar 2 boyutlu jel elektroforezi çalışmaları proteomik araştırmalar için standart bir araç olmasına rağmen, bu yöntem karmaşık protein sistemlerinin analizinde analitik kısıtlamalara sahiptir. Bu analitik kısıtlamaların önüne geçebilmek için bilinen en temel yöntem örneklerin mikro düzeyde ayrımının yapıp kütle spektrometresinde analiz edilmesidir. Kütle spektrometresinde, bir molekülün kütle/yük (m/z) oranını ölçerek kütleini belirlemektedir. İyonlar, nötr bir türe ait bir yükün kaybı veya kazanımı yaratılarak üretilmektedir. İyon oluşumu gerçekleşikten sonra, iyonlar elektrostatik olarak bir kütle analizörüne yönlendirilmekte ve m/z değerlerine göre ayrılan iyonlar tespit edilmektedir. Moleküler iyonizasyon, iyon ayrımı ve iyon tesbitinin sonucunda bir spektrum ortaya çıkmaktadır ve bu sayede moleküler kütle ve hatta yapısal bilgi sağlanmaktadır. Spektrum, m/z 'ye karşılık iyon bolluğunun bir grafiğidir ve birim yük başına Dalton (Da) cinsinden sunulmaktadır.

Genel olarak kütle spektrometrelerinde bulunan 4 temel bileşen—örneğin giriş ağzı, iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü, iyon dedektörü—Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Kütle spektrometresinde bulunan temel bileşenler

İyonlar kütle spektrometresinin vakumunda analiz edildiği için, kütle spektrometresindeki en önemli reaksiyonlardan bir tanesi ilgilenilen analitlerin gaz fazı iyonlarına dönüştürülmesidir (122). Özellikle son 20 yılda, büyük moleküler ağırlıklı, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşiklerin gaz fazı iyonuna dönüşmesini sağlayan iyonizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ile ilgili çabalar neticesinde 2002 yılında kimya dalında Nobel ödülünü John Fenn ve Koichi Tanaka almıştır (123). ESI’de iyonlar atmosferik basınç altında, çözelti bazlı bir numunenin +500V ve +4,500V arasındaki voltajdan potansiyel farkı olan karşı elektrota küçük bir kılcaldan geçirilerek üretilmektedir. Protonasyon ve deprotonasyon ile ilgili analitlere yük kazandırılmakta veya yük kaybettirilmektedir ve böylece ekovalent olmayan biyomakromoleküler komplekslerin bozulmadan iyonize olması sağlanmaktadır (124).

MALDI’de, örnek spesifik bir dalga boyundaki lazerden gelen ışını absorblayan matriks içerisinde çözünmekte, iyonlaşmakta ve kütle analizöründe analiz edilmektedir. MALDI’de genellikle tekli protonlanmış analitler oluşmaktadır, ancak iyonların oluştuğu mekanizma tam olarak bilinmemektedir (122). MALDI’nin sağladığı birçok avantaj mevcuttur. Öncelikle, lazerin titreşimli doğası nedeniyle iyonlar farklı evrelerde oluşmaktadır. Kütle analizi iyon oluşumu ile senkronize edilirse çok az numune harcanmaktadır. Bu nedenle, MALDI kullanılarak alt femtomol örneklerinden veri sağlanmaktadır. MALDI’de genellikle tek yüklü iyonlar oluştuğu için uçuş zamanlı (TOF) kütle analizörleri ile birlikte bir veya birden fazla analit için moleküler ağırlık bilgisi hızlıca sağlanmaktadır. Ayrıca, MALDI tuzlara ve tamponlara nispeten yüksek toleranslıdır. ESI’nin aksine, MALDI’de iyonlar fizyolojik seviyelerde tuz içeren numunelerden üretilebilmektedir (122).

Kütle spektrometresinde farklı kütle analizörleri sayesinde iyonlar farklı şekillerde ölçülmektedir. Ancak tüm analitik ölçüm şekillerinde, doğruluk ve hassasiyet önem arz etmektedir. Kavramsal olarak, en basit kütle analizörü TOF kütle spektrometresidir. TOF kütle spektrometresinde, iyonlar hızlarına bağlı olarak ayrılmaktadır ve iyonların dedektöre ulaşmaya kadar geçen süresi bir yarış olarak düşünülmektedir (125). Teorik olarak, iyonların hepsi iyon kaynağında aynı zamanda ve aynı yerde oluşturulmakta ve daha sonra sabit bir potansiyel yardımıyla TOF sürüklenme tüpünde hızlandırılmaktadır. Aynı yüke sahip olan tüm iyonlar hızlandıktan sonra aynı kinetik enerjiyi elde ettiğinden, düşük m/z iyonları yüksek m/z iyonlarından daha yüksek hızlara ulaşmaktadır. Manyetik sektör analizörlerinde ise, iyonizasyon kaynağından hızlanan iyonlar manyetik alanla eğilmekte ve alanın merkezi çevresinde sabit bir yarıçapı benimsemektedir. Bu tip analizörlerde kütle spektrumu, manyetik alanın kuvveti taranarak elde edilmektedir (126). Kuadrupol analizörlerinde kütle ayrımı iyonların dinamik bir elektrik alandaki hareketinin sonucudur ve doğrudan iyonun m/z değerine bağlıdır. Kuadrupollerde kütle analizi, silindirik dört çubuğa uygulanan radyo frekansı voltajlarının ve doğru akımın bir fonksiyonudur. Doğru akım/radyo frekansı kuadrupol voltajları değiştirilerek iyonlar taranmaktadır. Kuadrupol kütle analizöründe iki boyutta (x ve y) elektrik alanları bulunmaktadır ve iyonlar alana dik (z yönünde) hareket ederken, kuadrupol iyon kapanı kütle analizörlerinde ise üç boyutta da elektrik alan mevcuttur. Bu nedenle bu tip kütle analizörlerinde iyon sahada hapsolmuştur (127). Fourier-Transform iyon siklotron rezonans kütle analizöründe ise; iyonların siklotron frekansından faydalanılarak analiz yapılmaktadır. Burada, iyonlar sabit manyetik ve elektrik alanının olduğu bir kapanda tutulmakta ve manyetik alana dik bir elektrik alan tarafından uyarıldıktan sonra daha büyük bir siklotron çapına uyarılmaktadırlar.

2.19.1 LC-MS Çalışmaları

Jel içermeyen proteomik çalışmaların en başında likit kromatografisinin kütle spektrometresi ile birlikte kullanıldığı LC-MS yaklaşımı gelmektedir. LC-MS tabanlı proteomik tekniklerde, karmaşık protein karışımları öncelikle enzimatik olarak kesilmeye tabi tutulur, daha sonra ortaya çıkan peptid ürünleri ise bir kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmektedir (128).

2.19.2 MALDI-Görüntüleme Çalışmaları

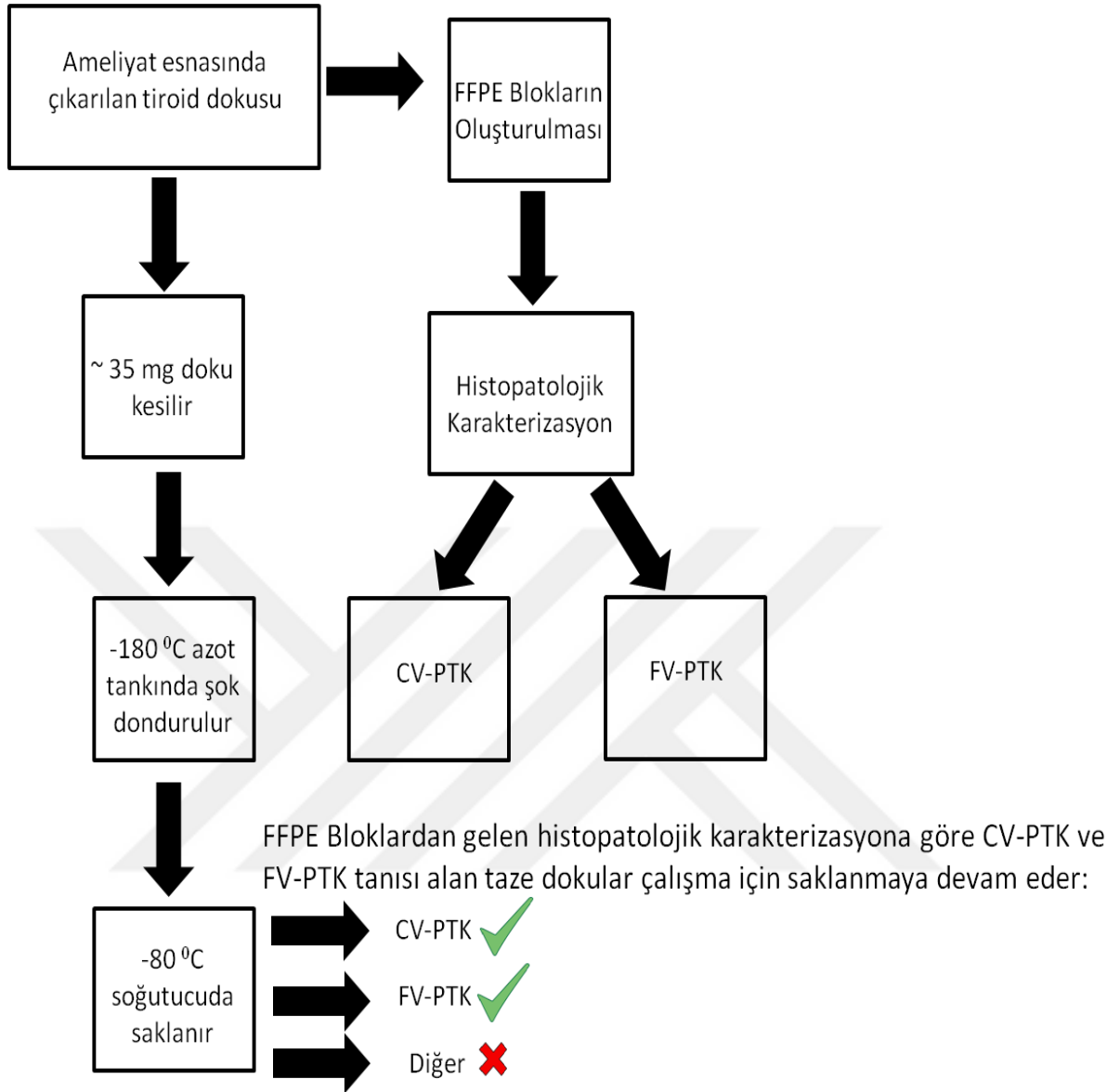
Kütle spektrometresinin analitik kabiliyeti ile mikroskobik bilginin birleşimi, bir doku içerisindeki spesifik hücre tiplerinde meydana gelen moleküler işlemleri araştırıp anlamaya yardımcı olmaktadır. MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresinde, dokuların üzeri bir matriks ile kaplanmakta ve kütle spektrometresinde ileri analiz için desorpsiyon/iyonizasyona yardımcı olmaktadır. İyonizasyon sürecinde, lazer sadece matriks tabakasına vururken, alttaki doku sağlam kalmaktadır ve aynı doku kesitinde ölçüm sonrası histolojik analiz gerçekleştirilmektedir. Temel prensip olarak, matriks lazer enerjisini emmekte ve analitleri gaz faza aktarmaktadır. Tüm bu proses iyonlaşmayı teşvik etmektedir, iyonlaşan analitler dedektör tarafından tespit edilmektedir. MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi yöntemi ile peptid, protein, protein modifikasyonu, lipid, ilaç ve ilaç metaboliti gibi çok geniş spektrumda analit analiz edilmektedir (129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Planı

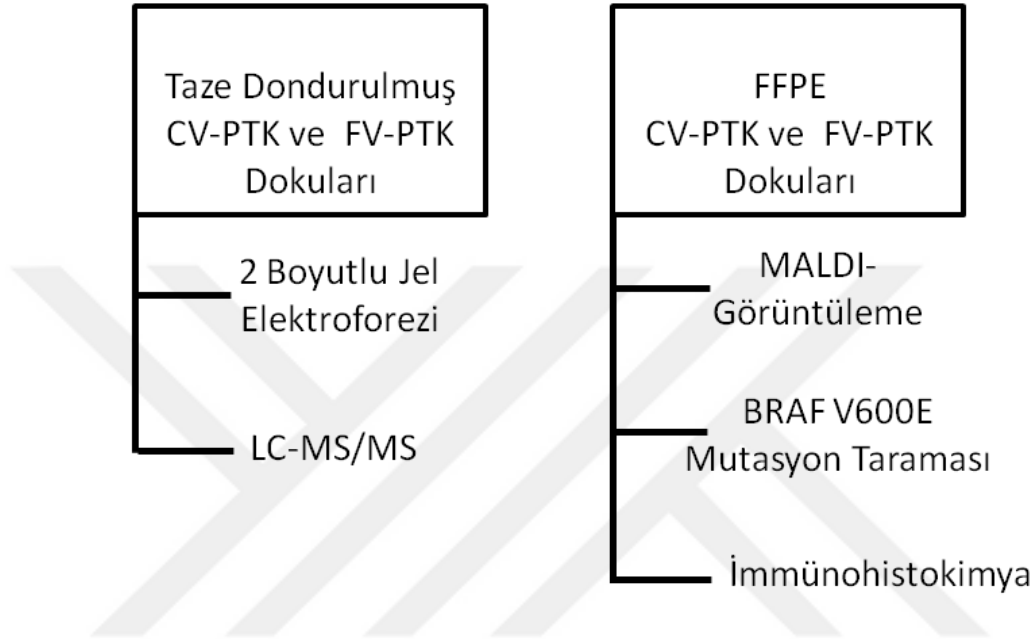
Bu tez çalışmasında, tedavisi gereği Maslak Acıbadem Hastanesi'nde ameliyat olan PTK hastalarının ameliyat esnasında çıkarılan tiroid dokuları kullanılmıştır. Tiroid dokuları patologlar tarafından histopatolojik olarak incelenmiş ve doku takibinin ardından karakterize edilmiştir.

Çalışmada toplanan dokulara ilişkin iş akış planı Şekil 7'de verilmiştir. Buna göre ameliyat esnasında çıkarılan herbir tiroid dokusunun yaklaşık 35 mg kadarı kesilip eppendorf tüplere konulmuş, tüplerin üzerine en az 3 belirteç içeren hasta protokol numarası, doku cinsi ve tarihi yazılmıştır. Tüpler hızlı bir şekilde -180°C azot tankında şok dondurulup ardından -80°C soğutucuda saklanmıştır. Taze dokudan histopatolojik karakterizasyon rahatlıkla yapılamadığı için, Maslak Acıbadem Hastanesi Patoloji Laboratuvarı Tiroid İnceleme Protokolleri'ne göre patoloji uzmanları tarafından dokuların histopatolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Tanısı CV-PTK ve FV-PTK olan dokular kaydedilmiş ve bu tanıya uyan taze dokular -80°C soğutucu da analiz zamanına kadar saklanmaya devam edilmiştir.



Şekil 7. İş akış planı. Şekilde belirtilen FV-PTK dokularının bir kısmı 2016 yılında yayınlanan ve tanı FV-PTK'nın tanı kriterinin değişmesine neden olan yayından (5) sonra iki ayrı patalog tarafından bu dokular gözden geçirilmiş ve bir kısmı yeni tanımlamaya göre NIFTP olarak adlandırılmıştır.

Çalışmada uygulanan deneysel basamaklar ise Şekil 8’de özetlenmiştir. Buna göre, -80 °C soğutucuda saklanan örnekler 2 boyutlu jel elektroforezi ve LC-MS/MS çalışmalarında, aynı dokuların FFPE blokları ise MALDI-Görüntüleme, BRAF V600E mutasyon analizi ve immünohistokimya çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 8. Araştırmada uygulanan deneysel yöntemler. Taze dondurulmuş CV-PTK ve FV-PTK dokuları 2 boyutlu jel elektroforezi ve LC-MS/MS için kullanılmıştır. FFPE CV-PTK ve FV-PTK dokuları ise MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi, BRAF V600E mutasyon taraması ve immünohistokimya için kullanılmıştır. Şekilde belirtilen FV-PTK dokularının bir kısmı 2016 yılında yayınlanan ve tanı FV-PTK’nın tanı kriterinin değişmesine neden olan yayından (5) sonra iki ayrı patalog tarafından bu dokular gözden geçirilmiş ve bir kısmı yeni tanımlamaya göre NIFTP olarak adlandırılmıştır.

3.2 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri, malzemeler ve kimyasallar Tablo 4 ve Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka/Model
MALDI TOF/TOF Kütle Spektrometresi	RapifleX MALDI Tissuetyper Bruker Daltonics
LC-MS/MS Kütle Spektrometresi	Thermo Fischer Scientific Q-Exactive Plus Orbitrap
Matriks ve Tripsin Uygulama İstasyonu	SunCollect SunChrom GmbH
İnkübasyon Kutusu	SunDigest SunChrom GmbH
ITO Kaplı Lam	Bruker Daltonics
Santrifüj	MicroL17 Thermo Fischer Scientific
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4 ⁰ C ve -20 ⁰ C)	Kirsch Medical
Derin dondurucu (-80 ⁰ C)	Haier Biomedical
Hassas Analitik Terazî	Kern ABJ
Etüv (37 ⁰ C)	Hera Term Oven Thermo Scientific
Otoklav	Nüve SteamArt
pH Metre	Thermo Scientific
Vorteks	VWR VV3
Mikro Hacimli Spektrofotometre	Hitachi U-1900
Real Time PCR Cihazı	CFX Connect Real-Time PCR Biorad
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Mikrosantrifüj	Combi-Spin Biosan
Çalkalayıcı Isı Bloğu	Witeg Wisd Laboratory Instruments
Azot Tankı	Thermo 30 Thermo Scientific
Homojenizatör	Retsch MM400
Izoelektrik Fokoslama Cihazı	Protean i12 IEF Cell Biorad
İkinci Boyutta Ayrım Cihazı	Serva Electrophoresis GmbH
Floresans Jel Görüntüleme Cihazı	Typhoon FLA 9500 GE Healthcare
Jel Görüntüleme Cihazı	Chemidoc Imaging System Biorad

Tablo 4: Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri (Devamı)

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka/Model
0.5, 1.5 ve 5 mL Hacimli kapaklı Tüpler	Axygen ve Eppendorf
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0.1-1000 µL)	Axygen
5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler	Isolab
15 ve 50 mL hacimli Steril Falkon Tüpler	Isolab
Çeşitli Cam Malzemeler	Isolab
Mikrotom	Leica Biosystems
İmmünohistokimya Cihazı	Benchmark XT Ventana Medical Systems
Spot Kesme Aleti	2D Spot Picker Gel Company
Dijital Patoloji Lam Tarayıcısı	Panoromic 250 Flash III 3D Histech Digital Pathology Company

Tablo 5: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma/Kodu
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma, 433209
(Hidroksimetil)aminometan (Tris)	Sigma, 252859
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, 862010
Üre (CH ₄ N ₂ O)	SERVA Electrophoresis, 24525.01
Tiyoüre (CH ₄ N ₂ S)	Merck, 107979
3-((3-kolamidopropil) dimetilamonyo)-1-propansülfonat (CHAPS)	SERVA Electrophoresis, 17038.03
Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
pH 3-10 Amfolit	SERVA Electrophoresis, 43368.01
DL-Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	GE Healthcare, 17-1318-02
Gliserol	Sigma, G5516
Benzonase	Merck, 70746-3
Metanol (CH ₃ OH)	Sigma, 322415

Tablo 5: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar (Devamı)

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma/Kodu
Kloroform (CHCL ₃)	Sigma, 288306
2D Quant Kit	GE Healthcare, 80648356
Lightning Red Floresans Boya	SERVA Electrophoresis, 43400.01
İyodoasetamit (C ₂ H ₄ INO)	GE Healthcare, RPN6302
Asetonitril (C ₂ H ₃ N)	Merck, 100029
Amonyum bikarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Merck, 5.33005
Tripsin	Promega, V5111
Trifloro asetik asit (TFA) (C ₂ HF ₃ O ₂)	Sigma, T6508
A-siyano-4-hidroksisinamik asit (α -CHCA)	Proteochem, p9100
Bovin serum albumin (BSA)	Bruker Daltonics, 8217498
Peptid Standartı	Bruker Daltonics, 8222570
4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-ethansülfonik asit, (HEPES)	Sigma, H3375
Lysl Endopeptidaz-C	Wako Chemicals, 125-05061
Formik Asit (HCOOH)	Sigma, 106526
Ksilen	Sigma, 214736
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Merck, 111727
Tripsin Gold	Promega, V5280
Trisodyum sitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Merck, 567446
FFPE DNA Kiti	Amoy Diagnostics Co., ADx FF03
BRAF V600 Mutasyon Kiti	Amoy Diagnostics Co., ADx BR04
IQGAP1 Rabbit Poliklonal antikoru	Novus Biologicals, NBP1-06529
IQGAP2 Rabbit Poliklonal antikoru	Novus Biologicals, NBP2-37885
OptiView DAB IHC Kiti	Ventana Medical Systems, 760-700

3.3 Yöntem

3.3.1 Cerrahi Operasyonlar

Bu tez çalışmasında, tedavisi gereği Maslak Acıbadem Hastanesi'nde ameliyat olan PTK hastalarının ameliyat esnasında çıkarılan tiroid dokuları kullanılmıştır. Buna göre; 50 adet papiller tiroid karsinomunun klasik CV-PTK, 50 adet ise FV-

PTK. Ayrıca, kontrol amaçlı olarak tiroidektomi yapılan ancak kanser tanısı almayan hastaların benign dokuları toplanmıştır (n=50).

Bu tez çalışması Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu tarafından 25 Mart 2014 tarihinde incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur (ATADEK 2014-621) (EK 1). Tez çalışması kapsamında tedavisi gereği ameliyat olan PTK hastalarının ameliyat esnasında çıkarılan tiroid dokularının tez çalışmasında kullanımı için katılımcılardan aydınlatılmış onam formları alınmıştır.

3.3.2 Dokuların Histopatolojik Karakterizasyonu

Çalışmaya alınan papiller tiroid karsinomu dokusunun, foliküler ve klasik varyant ayrımı uluslararası histopatolojik tanı kriterlerine göre belirlenmiştir. Bu kriterler; WHO Tümör Sınıflandırılması; ‘Pathology and Genetics’; ‘Tumors of Endocrine Organs’ fasikülünde ve ‘College of American Pathologists’ organizasyonunun tiroid karsinomu protokollerinde tanımlanmıştır.

2016 yılında Nikiforov ve arkadaşlarının invazif olmayan FV-PTK vakalarını NIFTP olarak adlandırmalarından sonra, çalışmaya dahil edilen tüm FV-PTK vakaları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve tanı kesinleştirilmiştir (5). Buna göre, 13 FV-PTK vakasının tanısı NIFTP olarak değiştirilmiştir.

3.3.3 İki Boyutlu Jel Elektroforezi

Öncelikle, 2 Boyutlu Jel Elektroforezi çalışmalarının tiroid dokusuna adapte edilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu optimizasyon çalışmalarında; striplere yüklenecek örnek miktarı, izoelektrik fokuslama protokolü, örneklerin floresans boya ile boyanması, ikinci boyutun optimizasyonu gibi çeşitli parametreler üzerinde çalışılmıştır. Jellerin tekrarlanabilirlik çalışmalarının da sonuçlarını aldıktan sonra aşağıda belirtilen şekilde iki boyutlu jel elektroforezi çalışmaları yürütülmüştür.

Çalışma Dokularının Homojenizasyonu

Çalışma dokularının homojenizasyonu için optimizasyon çalışmaları başarı ile tamamlanmıştır.

Tablo 6’da verilen tampon çözeltiler 2 boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

Tablo 6. Kullanılan tampon çözeltiler

Lizis Tamponu	Rehidrasyon Tamponu	Dengeleme Tamponu
150 mM NaCl	7M Üre	6M Üre
50 mM Tris-HCl, pH 7.5	2M Tiyoüre	100 mM Tris-HCl, pH 8.8
%0.3 SDS	%4 CHAPS	%30 gliserol
	Bromofenolblue	%2 SDS
	%2 Amfolit	
	%2 DTT	

Buna göre;

1. 80 °C soğutucuda eppendorflar içerisinde saklanan tiroid dokuları teker teker soğutucudan çıkarılıp tartılmıştır.
2. Ardından eppendorf tüplere 1M önceden soğutulmuş NaCl eklenerek dokular yıkanmıştır.
3. Kandan arınan dokulara 1 ml lizis tamponu eklenmiş ve dokular teker teker homojenize edilmiştir.
4. Retsch Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Almanya) homojenizatör kullanılarak paslanmaz 2 mm’lik çelik bilyeler yardımı ile örnekler homojenize edilmiştir. Homojenizasyon 10 siklus, 30 mHZ de gerçekleştirilmiştir. Her bir siklus arasında örneği içeren mikrosantrifüj tüpü

sıvı nitrojene temas ettirilerek örneklerin ısınması engellenmiştir.

5. Homojenizasyonun ardından örnekler yukarıda belirtilen liziz tamponu içerisinde çözülmüştür.
6. Eravcı ve arkadaşlarının (130) önerdiği şekilde, 150u/ml Benzonase örneğe ilave edilmiştir.

Benzonase, DNA ve RNA'nın tüm formlarını (tek zincir, çift zincir, linear, dairesel) parçalayan ve bu işlemi düşük sıcaklıkta gerçekleştirebilen bir endonükleazdır. Yüksek sıcaklık ürenin karbamilasyonunu tetiklediği için, örneğe eklenen endonükleazın düşük sıcaklıkta çalışabilmesi özellikle 2 Boyutlu jel elektroforezi çalışmaları için önem teşkil etmektedir (131).

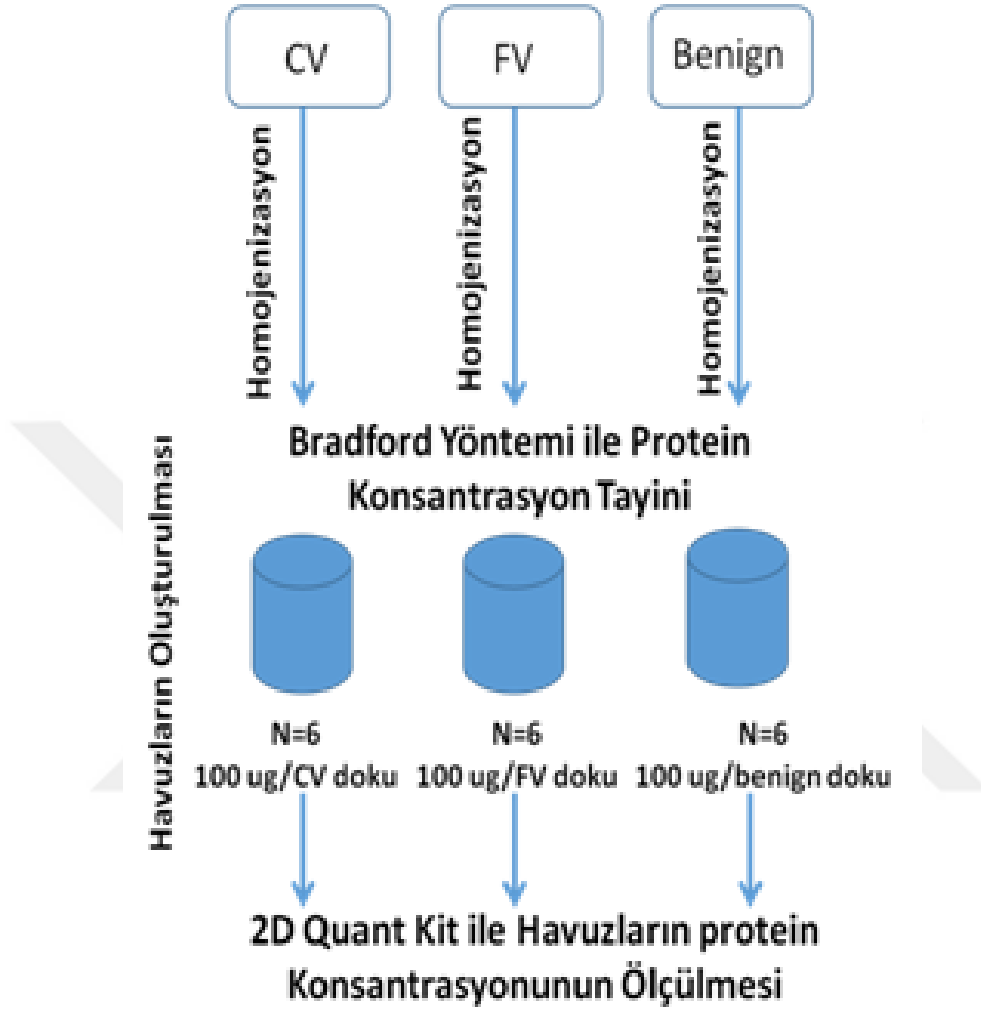
7. Tüpler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında ajitasyona bırakılmış ardından ise Metanol/Kloroform çöktürmesi ile örnek temizlenmiştir.
8. Metanol/Kloroform çöktürmesinin ardından örnekler rehidrasyon tamponunda çözülmüş ve gece boyunca +4⁰ C soğuk odada ajitasyona bırakılmıştır.
9. Örnekler, 10 mM DTT eklenmiş ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
10. 16000 G'de 15 dakika boyunca santrifüj edilen örneklerin supernatantları toplanarak örnekler 2 Boyutlu jel elektroforezi uygulamalarına hazır hale getirilmiştir.

Doku homojenizasyonunun ardından, Brown ve arkadaşları (2006) ve Netea-Maier (2008) 'in kullandığı protokol baz alınmıştır (132,133).

Çalışma Dokularının Gruplandırılması

Her bir dokudan elde edilen proteinlerin konsantrasyonu Bradford Yöntemi ile ölçülmüştür. Her bir örnekten eşit miktarda protein (100 ug) alınarak; CV-PTK, FV-PTK ve Benign grupların havuzları oluşturulmuştur (134,135). Her bir havuzda n=6 örnek olacak şekilde havuzlar oluşturulmuştur. Oluşturulan havuzların protein konsantrasyonları, iki boyutlu jel elektroforezi için geliştirilen 2D Quant Kit (GE Healthcare) ile tayin edilmiştir. 2D Quant Kit ile belirlenen protein

konsantrasyonlarına bağlı kalınarak 2 boyutlu jel elektroforezleri yapılmıştır. Örnek havuzlarının oluşturulmasına ilişkin iş akış şeması Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9. Örnek havuzlarının oluşturulmasına yönelik iş akış şeması

2D Quant kit ile protein konsantrasyonu ölçülen havuzların, 2 Boyutlu jel elektroforezi deneylerine başlamadan önce SDS-PAGE ile ölçümlerinin doğru yapıldığı tespit edilmiştir. Böylece, çok adımlı 2 boyutlu jel elektroforezi deneylerine başlamadan önce, örneklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

Striplerin Rehidrasyonu

Çalışmada, 17 cm pH 3-10, pH 4-7 ve pH 6-10 stripler (Serva Electrophoresis GmbH, Almanya) kullanılmıştır. Üretici talimatlarına uyarak pH 3-10 ve pH 6-10 striplere 100 µg protein, pH 4-7 striplere 200 µg protein yüklenmiştir.

i. pH 3-10 ve pH 4-7 Striplerin Rehidrasyonu

pH 3-10 striplere 100 µg, pH 4-7 striplere 200 µg protein yüklenecek kadar örnek ile birlikte toplam hacim 300 µl olacak şekilde rehidrasyon tamponu eklenmiştir. Örnekler, Lightning Red (Serva Electrophoresis GmbH) floresans boyası eklenmiş ve üretici protokolüne göre boyama işlemi yapılmıştır.

ii. pH 6-10 Striplerin Rehidrasyonu

pH 6-10 striplere 100 µg protein yüklenmiştir. Striplerin rehidrasyonu bazik proteinlerin rehidrasyonuna uygun olarak Kane ve arkadaşlarının (2006) protokolüne göre yapılmıştır (136).

İzoelektrik Fokuslama

Striplere yüklenen proteinlerin birinci boyutlarında izoelektrik noktalarına göre ayırım gerçekleştirilmiştir. İzoelektrik fokuslama IEF PROTEAN i12 IEF CELL (Biorad) cihazı kullanılarak, Tablo 7 ve Tablo 8’de verilen izoelektrik fokuslama parametreleri ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. pH 3-10 ve pH 4-7 stripler için IEF parametreleri

Adım	Volt	Gradyen	µAmp	Değer
1	250	Rapid	50	00:30 saat
2	10000	Gradyen	50	2:00 saat
3	10000	Rapid	50	60000 Volt-saat
4	1000	Hold	50	

Tablo 8. pH 6-10 stripler için IEF parametreleri

Adım	Volt	Gradyen	μ Amp	Değer
1	300	Gradyen	50	00:01 saat
2	300	Rapid	50	3:00 saat
3	1400	Gradyen	50	06:00 saat
4	1400	Rapid	50	10:00 saat
5	3500	Gradyen	50	3:00 saat
6	3500	Rapid	50	2:00 saat

Dengeleme

Birinci boyutta ayrılan proteinler ikinci boyutta ayırma öncesi rotatör üzerinde dengeleme tamponuna %2 DTT eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Ardından aynı tampona %4.5 oranında iodoasetamit eklenerek tampon tazelenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk boyunca tekrar rotatör üzerinde bekletilmiştir. Bu şekilde dengeleme işlemi tamamlanmış ve stripler ikinci boyutta yürütmeye uygun hale gelmiştir.

İkinci Boyutta Ayrım

Yatay elektroforez sistemi (Serva Electrophoresis GmbH), sabit sıcaklıkta (15°C) jellerin ikinci boyutta ayrılması ve küçük moleküler ağırlıklı proteinlerin difüzyonunu engellemesi gibi avantajları nedeniyle dikey elektroforez (BioRad Laboratories) sistemi yerine kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre yatay elektroforez sisteminde proteinlerin ikinci boyutta ayrımları gerçekleştirilmiştir.

Jellerin Taranması

Elde edilen jeller, Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) kullanılarak scan edilmiştir. Görüntüleme 100µm çözünürlük derecesinde uyarım için 488 nm ve emisyon için 520 nm dalgaboyları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Scan edildikten sonra; jeller gece boyu fikse edilip ardından spot kesimine kadar %20 EtOH içerisinde +4°C de saklanmıştır.

Jellerin İstatistiksel Analizi

Jellerden kesilecek spotların belirlenmesi için PDQuest Advanced 2D Analysis Software V8.0.1 (Biorad, USA) kullanılmıştır. Tüm jellere ait görüntüler yazılıma aktarılmış, ardından jellerde spot seçimi duyarlılık, spot büyüklüğü, Gaussian dağılım seçilerek yapılmıştır. Jellerden master jel oluşturulmuş, ardından tüm jellerde ortak olan spotlar belirlenmiştir. Farklı spotların belirlenmesi için spotlara Student t-test uygulanmış ve p değeri $p < 0.005$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. CV-PTK-FV-PTK, CV-PTK-Benign, FV-PTK-Benign jeller arasında 2 kat üzerinde anlamlı farklılık gösteren spotlar lineer regresyon ile gösterilmiştir.

Protein Tanımlaması

İki boyutlu jellerden kesilecek spotlar belirlendikten sonra, spot kesme kalemi (2D Spot Picker, GelCompany) kullanılarak spotlar kesilmiş ve Lobind tüplere (Eppendorf) aktarılmıştır. Ayrıca, her bir jelin boş kısmından jel kesilerek pozitif kontrol olarak analiz edilmiştir. Spotlar aşağıdaki protokole göre hazırlanmıştır.

1. Spotlar yıkama tamponu ile yıkanmıştır (% 50 asetonitril, %50 50 mM amonyum bikarbonat tamponu).
2. Yıkama işleminin ardından, %100 asetonitril ile spotların dehidrasyonu sağlanmıştır.
3. Spotlar, 10 mM DTT ile muamele edilerek redüksiyon yapılmıştır.
4. Ardından, 55 mM iyodoasetamit ile muamale edilerek alkillenmiştir.
5. Spotlar tekrardan yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
6. %100 asetonitril ile dehidrasyon yapılmıştır.
7. Spotlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

8. Her bir spota 125 ng tripsin eklenerek, 37°C’de gece boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
9. Tripsin ile kesim işlemini durdurmak için, her bir örneğe %50 formik asit eklenmiştir.
10. Peptidler yeni lobind tüplere aktarılmıştır.
11. Geride kalan tüm peptidleri toplamak için, ilk olarak %50 asetonitril ve %1 formik asit içeren solüsyon ile yıkama yapılmıştır.
12. Ardından, ikinci ekstraksiyon %100 asetonitril ile yapılarak tüm peptidler toplanmıştır.
13. Örnekler, vakum konsantratör kullanılarak kurutulmuştur.
14. Tuzlardan ve diğer kontaminant maddelerden temizleme işlemi Stage-Tip’ler ile gerçekleştirilmiştir. Stage-Tip pürifikasyonu için Rappsilber ve arkadaşlarının makalesindeki basamaklar takip edilmiştir (137)
15. Stage-Tip ile tuzlardan arındırıldıktan sonra örnekler %60 asetonitril ve 0.1% TFA içerisinde çözülerek MALDI TOF MS ile analiz için hazırlanmıştır.
16. Doygun α -CHCA MALDI matriks çözeltisi (20 mg/ml α -CHCA, %33 asetonitril, %0.1 TFA) hazırlanmıştır.
17. Örnekten ve α -CHCA MALDI matriks çözeltisinden 1:1 oranında alınarak Ground Steel Target (Bruker Daltonics) üzerine 1 μ l karışım eklenmiş ve kurumaya bırakılmıştır.

İki boyutlu jellerden spot kesilip tanımlama yapılmadan önce, farklı miktarlarda Bovin Serum Albumin (BSA) 1 boyutlu SDS page jel elektroforezi ile yürütülmüş ve yukarıda yazılı protokol öncelikle BSA için uygulanmıştır. BSA kullanılarak yapılan protokol optimizasyon çalışması sonucunda 1 μ g BSA, 400 ng BSA ve 100 ng BSA başarı ile tanımlanmıştır. Tanımlamada herhangi bir keratin kontaminasyonuna rastlanmamıştır.

Jellerden kesilen spotların tanımlaması RapifleX MALDI Tissue Typer (Bruker Daltonics) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 700-2600 Da kütle aralığında, lazer gücü tüm çalışma süresince sabit kalacak biçimde (%35-40 arasında), lazer vuruşu 300

olacak şekilde tamamlanmıştır. Her bir çalışma öncesinde, metod kurulmadan önce üretici talimatına göre hazırlanmış peptid standartları (Peptid Std II, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır. Elde edilen pik listeleri FlexAnalysis yazılımı (Bruker Daltonics) kullanılarak MASCOT veritabanında (Matrix Science) tanımlanabilir formata dönüştürülmüş ve Uniprot insan referans proteom veritabanı kullanılarak tanımlama yapılmıştır.

3.3.4 LC-MS/MS ile Protein Tanımlaması

İki boyutlu jel elektroforezi çalışmaları, proteomik tekniklerin en temelini oluşturmaktadır. Ancak, özellikle membran proteinleri, bazik proteinler ve organel proteinlerinin 2 boyutlu jel elektroforezi ile görüntülenmesi kolaylıkla yapılamamaktadır (138,139). İki boyutlu jel elektroforezinin eksik kaldığı bu noktaları tamamlamak amacıyla ‘label free quantification’ ile bir adet çalışma seti (CV (n=6), FV (n=6) ve benign (n=6)) havuz oluşturmada Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) cihazı ile analiz edilmiştir.

Aşağıdaki basamaklarda, örneklerin hazırlanması ve analizine ilişkin detaylar sunulmaktadır:

Örneklerin Hazırlanması

Örnekler, 2 Boyutlu jel elektroforezi için uygulanan aynı örnek hazırlama yöntemi ile hazırlanmıştır.

1. Her bir örneğe denatürasyon tamponu (6M Ure, 2M tiyoüre in 10 mM HEPES (pH 8.0)) eklenmiş ve yaklaşık 3 saat oda sıcaklığında protein pelletleri çözülmüştür.
2. İnkübasyonun ardından, örnekler 350 mM DTT eklenmiş ve yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Ardından, 55 mM iyodoasetamid eklenmiş ve yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra, 0.5 ug/ul Lysl Endopeptidaz-C enzimi eklenmiş ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
5. 0.5 ug/ul tripsin enzimi eklenmiş ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Örneklerin tuzlardan ve diğer kontaminant maddelerden temizleme işlemi son derece uygun bütçeli ve proje bursiyerleri tarafından yapılan Stage-Tip'ler ile gerçekleştirilmiştir. Stage-Tip pürifikasyonu için Rappsilber ve arkadaşlarının makalesindeki basamaklar takip edilmiştir (137).

LC-MS/MS ile Örneklerin Analizi

Hazırlanan peptidler, 5%–45% asetonitril gradienti ve 0.1% formik asit ile 240 dk boyunca, 200 nL/min akış hızında EASY-nLC II (Thermo Fisher Scientific) sisteminden geçirilmiştir. Q Exactive plus cihazında tam tarama ve ardından daha yüksek enerji çarpışma ayrıştırması kullanılarak en iyi 10 MS/MS taraması ile veri bağımlı modda çalıştırılmıştır. Tam taramalar 70.000 çözünürlük, 3x10⁶ iyon hedef değeri ve maksimum 20 ms enjeksiyon süresi ile gerçekleştirilmiştir. MS / MS taramaları 17.500 çözünürlük, 1x10⁶ hedef değer ve maksimum 60 ms enjeksiyon süresi ile gerçekleştirilmiştir.

Protein Tanımlaması

Elde edilen pik listeleri, MaxQuant yazılımının (v 1.5.1.2) standard iş akışı izlenerek ham veri dosyalarından üretilmiştir (140). Protein tanımlaması ise; Uniprot insan referans proteom veritabanı ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

İstatistiksel Analiz ve Varyantlar Arası Farklı İfade Edilen Proteinlerin Belirlenmesi

Veri analizi, internetten ücretsiz olarak indirilebilen Perseus (V. 1.5.8.2) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. MaxQuant analizinden proteinlerin 'label-free quantification' sinyal yoğunlukları alınmış ve logaritma 2 tabanına göre transforme edilmiştir. Ölçülen değerlerin geçerli sayılabilmesi için, bir sette bulunan 6 örneğin en az 4'ünde ölçümün yapılmış olması kabul edilmiştir. Eksik değerler, tüm veri kümesindeki en düşük 'label-free quantification' sinyal yoğunluğunun değeri ile değiştirilmiştir.

Protein kantifikasyonu ve istatistiksel önem Welch's Testi ile yapılmıştır ve alfa-hatasının düzeltilmesi Benjamini-Hochberg tarafından tarif edilen yanlış bulgu oranı (False Discovery Rate (FDR)) kullanılarak yapılmıştır.

3.3.5 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi

MALDI-Görüntüleme çalışmalarının tiroid dokusuna göre optimizasyonu ilk olarak Autoflex III MALDI-TOF kütle spektrometresi'nde (Bruker Daltonics, Almanya) başarı ile yapılmıştır. Ardından, MALDI-Görüntüleme çalışmaları için özellikle geliştirilmiş olan yeni nesil RapifleX MALDI-Tissue Typer (Bruker Daltonics, Almanya) kütle spektrometresi cihazı alındığı için, tiroid dokusunda yapılan tüm optimizasyon çalışmaları yeniden yapılmıştır. Optimizasyon çalışmalarının ardından, MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi çalışmaları aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

Örnek Hazırlama

Tiroid dokularından 3 µm'lik kesitler MALDI-Görüntüleme çalışması için Indiyum Kalay Oksit (ITO) kaplı lamlara (Bruker Daltonics, Almanya) alınmıştır. CV-PTK ve FV-PTK'ya ait dokulara aynı deneysel prosedürün uygulanması ve olası biasın engellenmesi adına ITO lamin üzerine 1 adet CV-PTK ve 1 adet FV-PTK yan yana incelenmek üzere yerleştirilmiştir. Böylece, 2 dokuya aynı anda tüm işlemler uygulanmış ve ardından aynı anda klasik ve folliküler varyant örneklerinin MALDI-TOF/TOF (RapifleX MALDI-Tissue Typer) cihazında analizi karşılaştırmalı olarak aynı koşullar altında analiz edilmiştir. FV-PTK dokularının bazıları 2016 yılında yapılan yeni tanımlamayla NIFTP olarak adlandırılmış ve elde edilen peptid profilleri bu çerçevede değerlendirilmiştir (5).

Dokuların ön hazırlığı, aşağıda yazılan protokole göre yapılmıştır. Buna göre;

1. 1 saat boyunca 60⁰Clik fırında lamaların fiziksel deparafinasyonu
2. Kimyasal deparafinasyon için 2x 5 dk boyunca ksilen ile muamele
3. Rehidrasyon:
2x 3 dk 100% EtOH
3 dk 70% EtOH

3 dk 30% EtOH

2x3 dk dH₂O

4. 10 mM Sitrat Çözeltisi ile antijen geri kazanımı yapılmıştır.

Tripsin Uygulama

Tiroid dokularında MALDI-Görüntüleme ile peptid analizinin yapılabilmesi için, proteinlerin doku üzerinde tripsin enzimi ile kesilmesi gerçekleştirilmiştir. 10 mM NH₄HCO₃ içerisinde 0.025 µg/µl tripsin hazırlanmış ve ardından, 5 µl/dk hızında ve 45.30 mm uzaklıktan (Z=45.3mm) 5 katman olacak şekilde tripsin ile SunCollect Örnek Hazırlama İstasyonu (SunChrom Wissenschaftliche Gerate GmbH, Almanya) kullanılarak kaplanmıştır.

Tripsin ile kaplama işleminin ardından, 50⁰C ve yüksek nem derecesinde lamalar 2 saat boyunca kontrollü bir şekilde SunDigest İnkübasyon İstasyonu (SunChrom Wissenschaftliche Gerate GmbH, Almanya) kullanılarak inkübe edilmiştir.

Matris Kaplama

Tiroid Dokularının MALDI-Görüntüleme ile analiz edilebilmesi için dokuların öncelikli olarak matris ile kaplanması gerekmektedir. Bunun amacı, dokuları direk lazer atışının yaratacağı tahribattan korumak ve aynı zamanda tripsin ile kesimi gerçekleşen peptidlerin iyonlaşmasını kolaylaştırmaktır (141).

MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi ile analiz etmek istediğimiz tiroid dokusu peptidlerinin moleküler ağırlıkları düşünüldüğünde bunları en iyi iyonlaştıracak matrisin α-CHCA olduğuna karar verilmiş ve çalışmalarda 7 mg/ml α-CHCA matris %50 Asetonitril ve %0,3 TFA içerisinde hazırlanmıştır. Lamlara matris uygulanması SunCollect Örnek Hazırlama İstasyonu (SunChrom Wissenschaftliche Gerate GmbH, Almanya) kullanılarak, 7 kat boyunca 10 µl/min, 20 µl/min, 30 µl/min ve 40 µl/min (4kere) akış hızlarında yapılmıştır.

MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Çalışması

MALDI-Görüntüleme çalışmaları RapifleX MALDI-Tissue Typer kütle spektrometresi kullanılarak, 700-2600 Da kütle aralığında, lazer gücü tüm çalışma

süresince sabit kalacak biçimde (%35-40 arasında), tarama aralığı 50 µm ve lazer vuruşu 300 olacak şekilde tamamlanmıştır.

Her bir çalışma öncesinde, metod kurulmadan önce üretici talimatına göre hazırlanmış peptid standartları (Peptid Std II, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır. Her çalışma sonrasında cihaz vakumdan kesilerek iyon kaynağın firma tarafından gösterildiği şekilde temizlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Veri analizi MALDI-Görütüleme çalışmaları için özel olarak geliştirilmiş olan Scils Lab (Bruker Daltonics) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Analiz için öncelikle, tek peptidlerin lokalizasyonları kontrol edilmiştir, ardından Scils Lab tarafından sunulan segmentasyon analizi ile birlikte hiyerarşik sınıflandırma yapılmıştır. Tümör ve tümöre komşu doku arasında farklılık gösteren peptidler Alıcı İşlem Karakteristikleri (ROC) analizi ile tespit edilmiştir (AUC değer 0.7'nin üzerinde olanlar dikkate değer alınmıştır). Varyantlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren peptidler ise parametrik olmayan Friedman testi ve Dunn's Multiple Comparison testi ile tespit edilmiştir ($p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir).

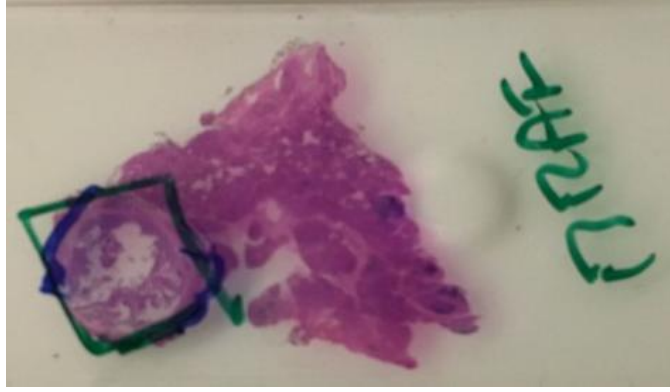
Dokularda tesit edilen monoisotopik peptidlerin sayısı ise internetten ücretsiz olarak indirilen mMass yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir.

3.3.6 BRAF Mutasyon Analizi

BRAF V600E mutasyon analizinde, FFPE dokuların tümör odakları kullanılmıştır ve aşağıda belirtilen çalışma planı izlenmiştir:

FFPE Dokuların Tümör Odaklarının Belirlenmesi

FFPE dokulardan 3 µm'lik kesitler alınarak Hematoksilen & Eosin (H&E) boyaması yapılmıştır. Genetik çalışma yapılacak tümör odakları seçilmiştir. Aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere BRAF mutasyon analizi yapılacak kısım işaretlenmiş ve doku üzerinde bu kısım çizilerek kesit alınmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. FFPE Dokuların tümör odaklarının belirlenmesi

Tümör Odaklarından Kesit Alınması

FFPE tiroid dokularından 4µm'lik 5 adet tümör odağına ait kesit alınarak mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur.

Tümör odaklarının kesitleri alındıktan sonra; AmoyDx FFPE DNA kiti (Amoy Diagnostics Co., Ltd) kullanılarak üretici talimatlarına göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (AmoyDx ® FFPE DNA/RNA Kit 2016). Aşağıdaki basamaklar takip edilerek DNA izolasyonu ve miktar tayini yapılmıştır.

Parafinin Uzaklaştırılması

Etanol ile Rehidrasyon

Doku Parçalanması

DNA İzolasyonu

DNA Miktar Tayini

DNA Konsantrasyonlarının tayini Meriton SMA 1000 UV spektrometre kullanılarak ölçülmüştür. 2 µl'lik DNA ölçüm için alınıp, herbir örnek için ikişer tekrarlı DNA konsantrasyonları ölçülmüş ve 260nm/280nm optik yoğunluk değerleri not alınmıştır. DNA kalitesi için 260nm/280nm OD değeri yaklaşık 1.8 olan DNA'lar polimeraz zincir reaksiyonuna alınmıştır.

Yüksek kalitede DNA elde edilemeyen örneklerden tekrar izolasyon yapılmış ve konsantrasyonları yeniden ölçülmüştür.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu; CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA) kullanılarak yapılmıştır. BRAF V600E mutasyon analizi için tüm örnekler 2 ng/ul olacak şekilde dilüsyon yapılmış ve AmoyDx Braf V600 Mutations Detection Kit (Amoy Diagnostics Co., Ltd) kullanılmıştır. Kitin içerisinde çıkan pozitif kontrol ve saf su kullanılarak oluşturulan negatif kontrol her bir polimeraz zincir reaksiyonunda örneklerle birlikte yüklenmiştir. Master karışım, Taq polimeraz enzimi ve örnekten alınan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde beyaz 96 kuyucuklu pleyte dağıtılmıştır.

Kullanılan BRAF V600 polimeraz zincir reaksiyonunun parametreleri aşağıdaki şekilde verilmiştir (Tablo 9). Örnekler, CFX Manager Software (BioRad, USA) kullanılarak analiz edilmiştir.

Tablo 9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Parametreleri

Hedef Sıcaklık °C	Süre
Ön İnkübasyon	
95 °C	5 dakika
Amplifikasyon	
95 °C	25 saniye
64 °C	20 saniye
72 °C	20 saniye
Soğutma	
40 °C	30 saniye

3.3.7 İmmünohistokimya

LC-MS/MS çalışmasının sonuçlarına göre FDR düzeltilmesinden sonra anlamlı farklılık gösteren IQGAP1 ve IQGAP2 proteinleri CV-PTK (n=13), FV-PTK (n=13) ve NIFTP (n=13) vakalarında immünohistokimya yöntemi ile incelenmiştir. FFPE dokulardan 3 µm'lik kesitler alınarak immünohistokimya yapılmıştır. Aşağıda yazılan protokol takip edilerek Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems) cihazında boyama işlemi yapılmıştır.

IQGAP 1 Antikoru (Rabbit Polyclonal, Novus Biologicals) için Protokol:

1. Fiziksel deparafinasyon için 80⁰C'de 20 dakika boyunca örnekler bekletilmiştir.
2. Deparafinasyon işleminin devamı Ventana Benchmark XT cihazında EX prep solüsyonu kullanılarak yapılmıştır.
3. Antijen geri kazanımı ısı ile indüklenmiş epitop geri kazanımı yapılarak Tris-EDTA tampon (pH 7.8) ile 95⁰C'de 16 dakika boyunca standart CC1 (cell conditioning solution 1) solüsyonu kullanılarak yapılmıştır.
4. Ardından IQGAP1 antikoru (1:300 dilüsyon) ile 44 dakika boyunca muamele gerçekleştirilmiştir.

IQGAP 2 Antikoru (Rabbit Polyclonal, Novus Biologicals) için Protokol:

1. Fiziksel deparafinasyon için 80⁰C'de 20 dakika boyunca örnekler bekletilmiştir.
2. Deparafinasyon işleminin devamı Ventana Benchmark XT cihazında EX prep solüsyonu kullanılarak yapılmıştır.
3. Antijen geri kazanımı ısı ile indüklenmiş epitop geri kazanımı yapılarak Tris-EDTA tampon (pH 7.8) ile 95⁰C'de 24 dakika boyunca standart CC1 (cell conditioning solution 1) solüsyonu kullanılarak yapılmıştır.
4. Ardından IQGAP1 antikoru (1:300 dilüsyon) ile 40 dakika boyunca muamele gerçekleştirilmiştir.

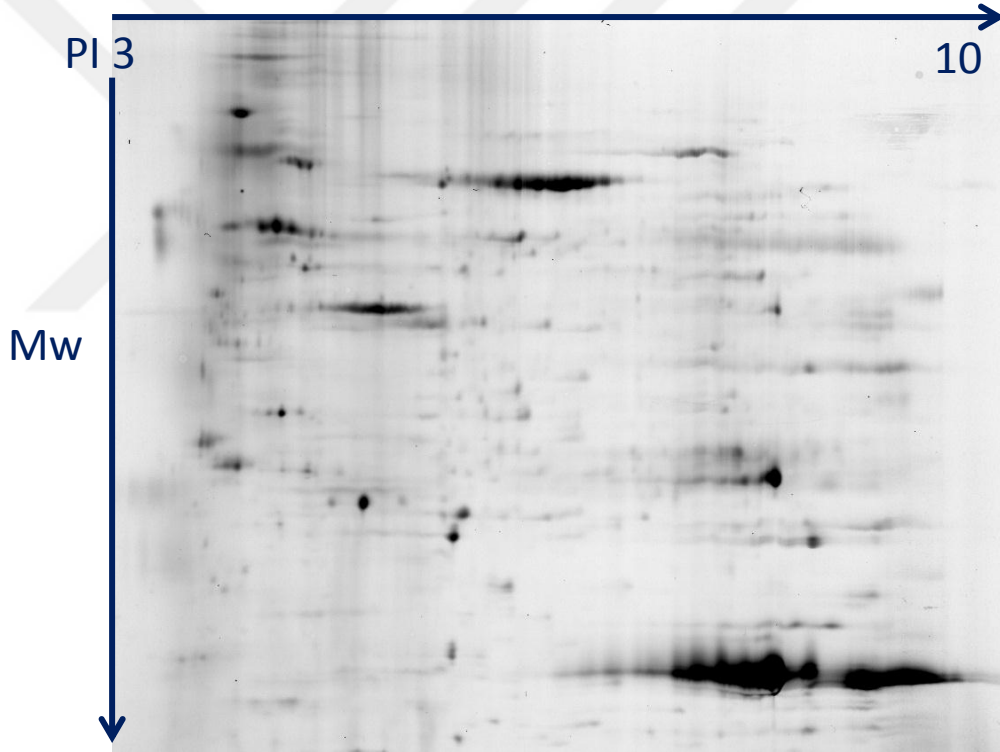
Her iki antikor öncelikli olarak, antikorların çalışma prospektüsünde belirtilen kontrol dokularında çalışılmıştır. Buna göre, IQGAP1 için meme kanseri dokusu, IQGAP2 için ise safra kesesi dokusu optimizasyon için kullanılmıştır. Optimizasyon için kullanılan dokulardan elde edilen sonuçlara göre her iki antikor için antijen geri kazanımı süreleri, antikor dilüsyonu ve antikor ile muamele süreleri optimize edilmiştir. Her iki antikor için OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems) kullanılmıştır.

Ayrıca, İHK için kullanılan vakaların yedek kesitleri alınmıştır. Bu yedek kesitlerden H&E boyaması yapılmış, böylece tümör odaklarındaki antikor boyamaları detaylı olarak belirlenmiştir. Tüm lamalar Panoromic 250 Flash III (3D Hitech Digital Pathology Company) kullanılarak taranmıştır.

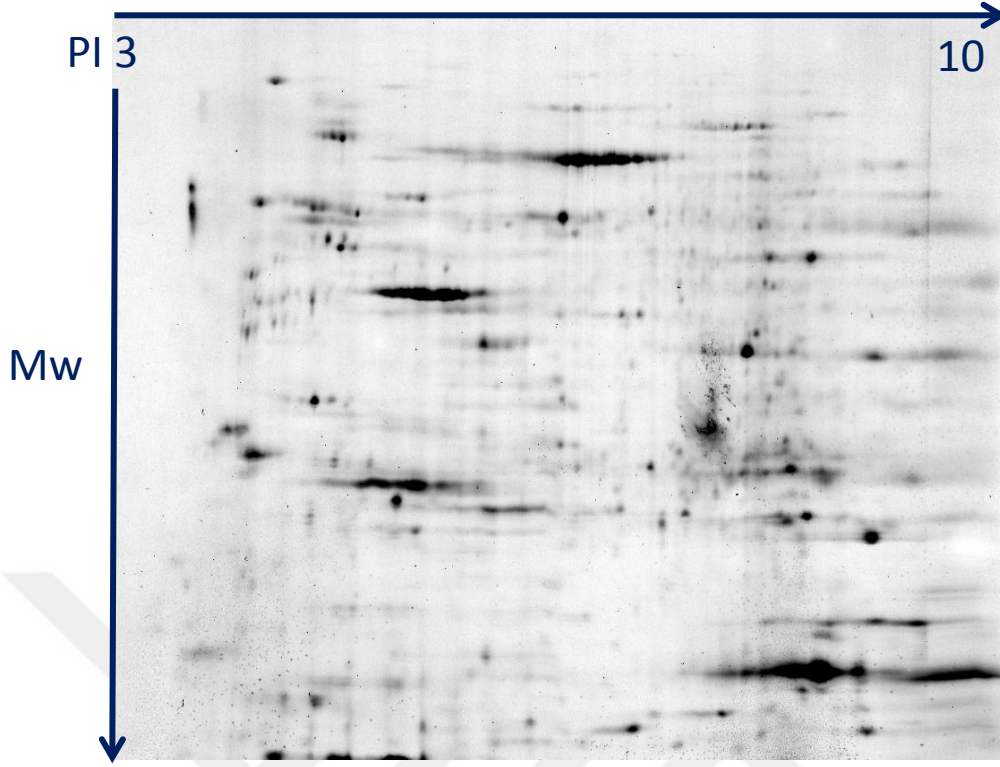
4. BULGULAR

4.1 İki Boyutlu Jel Elektroforezi Sonuçları

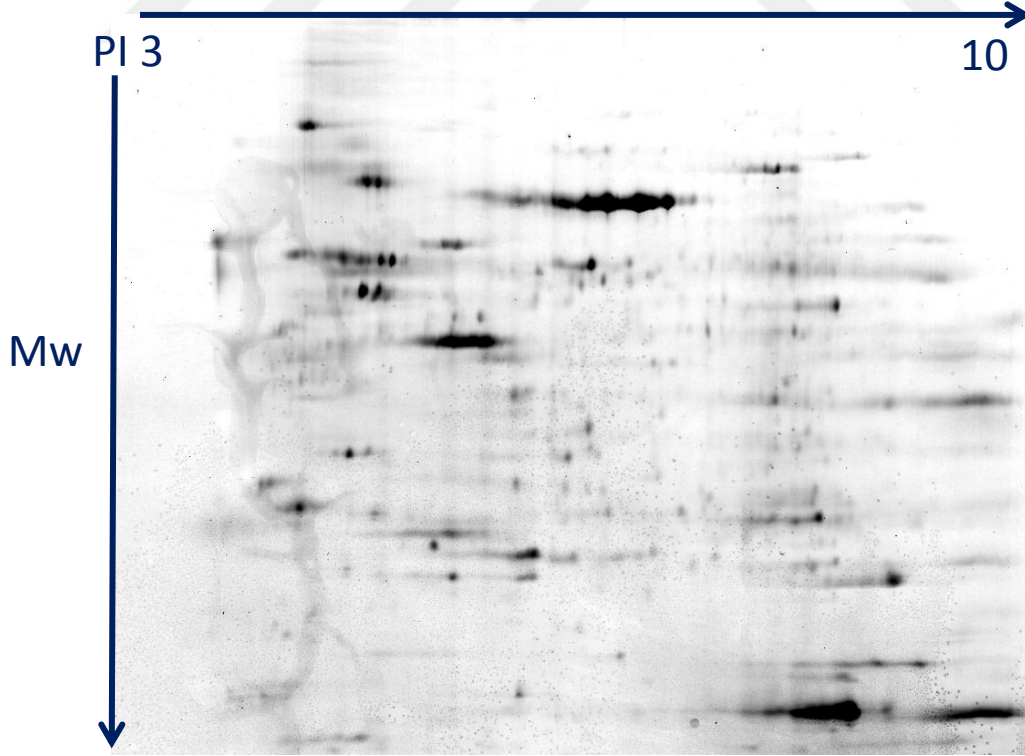
CV-PTK, FV-PTK ve benign dokulara ait tüm proteomik profili görmek adına pH 3-10 arasında jeller yürütülmüştür. Bu amaçla; CV-PTK, FV-PTK ve benign dokularından oluşturulan örnek havuzlarından 100ug protein alınarak, pH 3-10 NL aralığında 17 cm'lik jeller kullanılarak 3'er teknik tekrar ile 2 boyutlu jel elektroforezi yapılmıştır. CV-PTK, FV-PTK ve benign örnek havuzlarının pH 3-10 NL aralığındaki örnek jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 11, 12, 13).



Şekil 11. Benign dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 3-10NL, 17 cm)

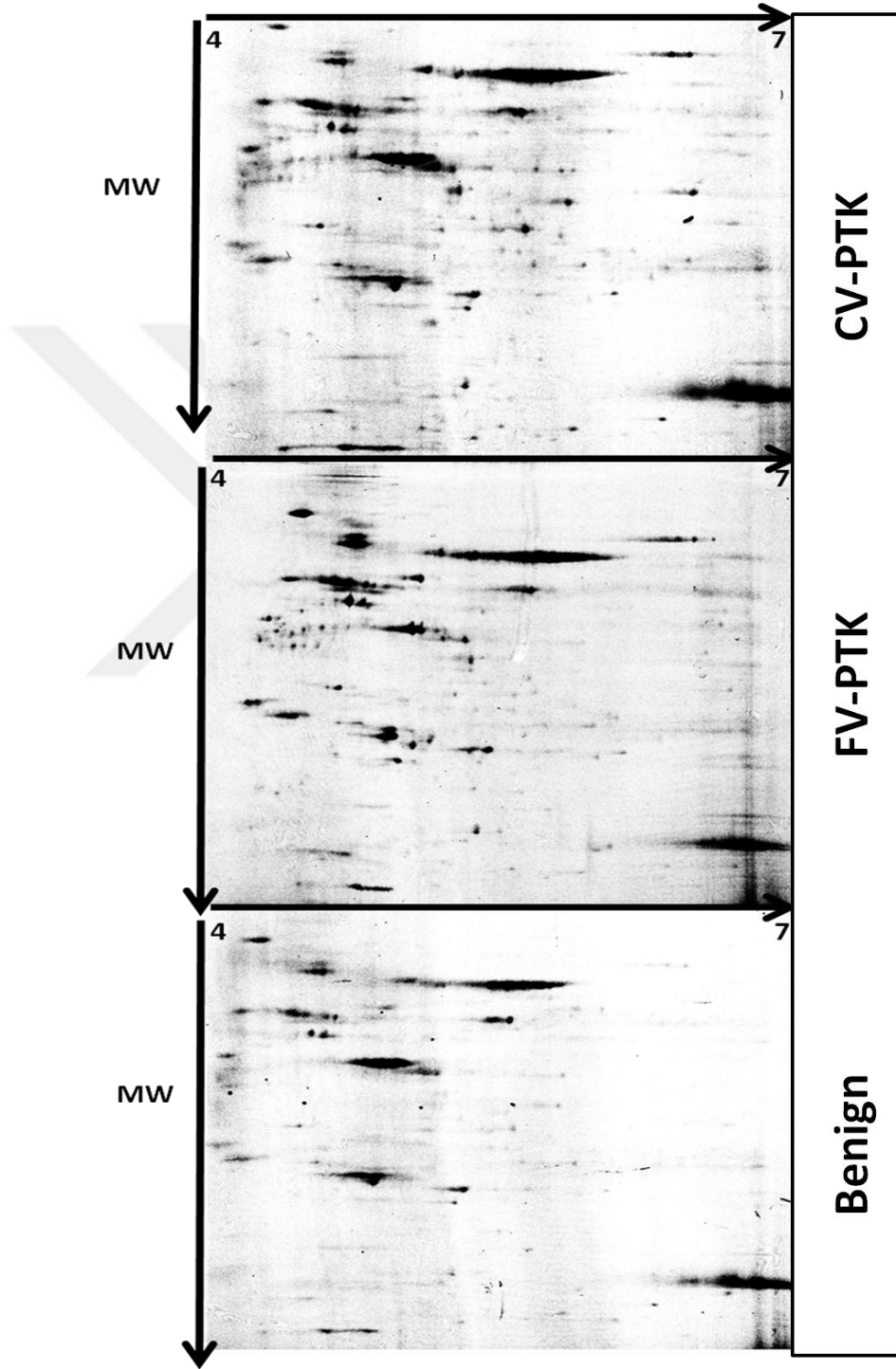


Şekil 12. FV-PTK dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 3-10NL, 17 cm)



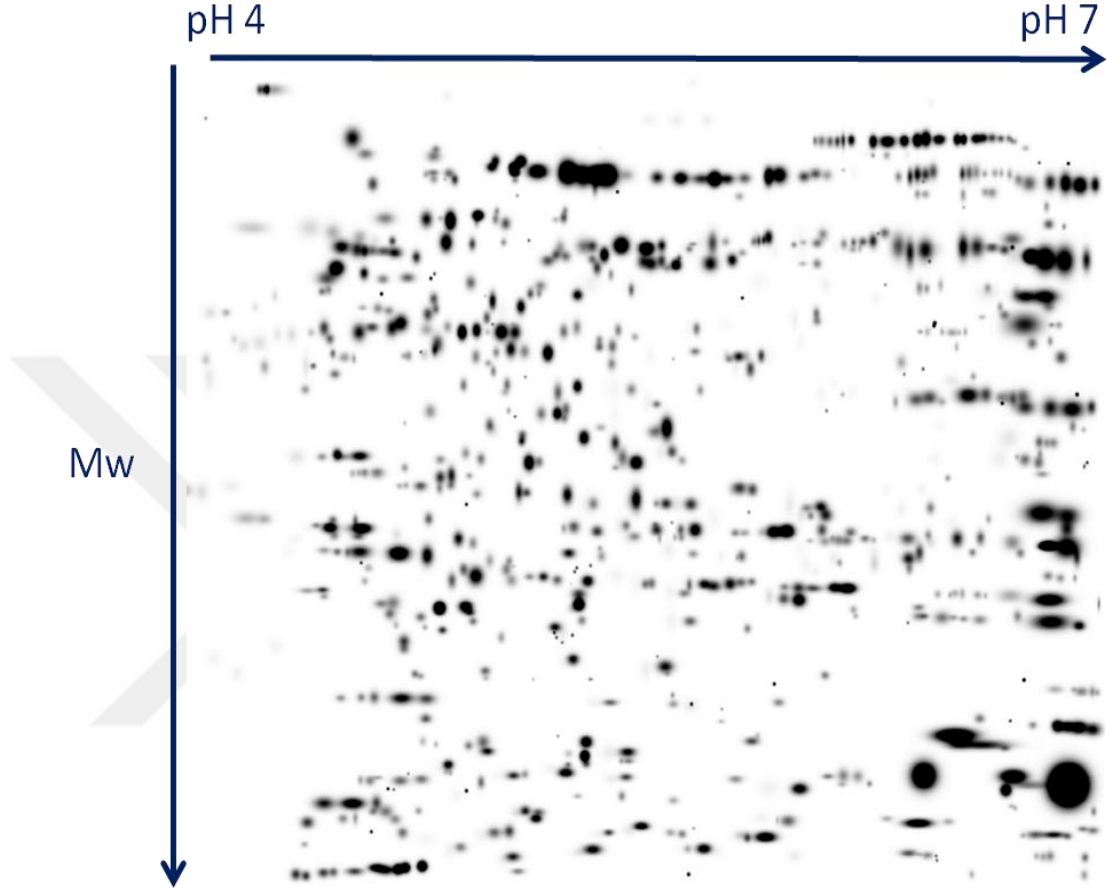
Şekil 13. CV-PTK dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 3-10NL, 17 cm)

Ayrıca, MALDI-kütle spektrometresinde protein tanımlamasının rahat yapılabilmesi için, örnek havuzları en az 3 tekrarlı olacak şekilde pH 4-7 aralığında ve pH 6-10 aralığında 17 cm'lik jellerde yürütülmüştür. pH 4-7 aralığında yürütülen örnek jellere ait görüntü Şekil 14'de verilmiştir.

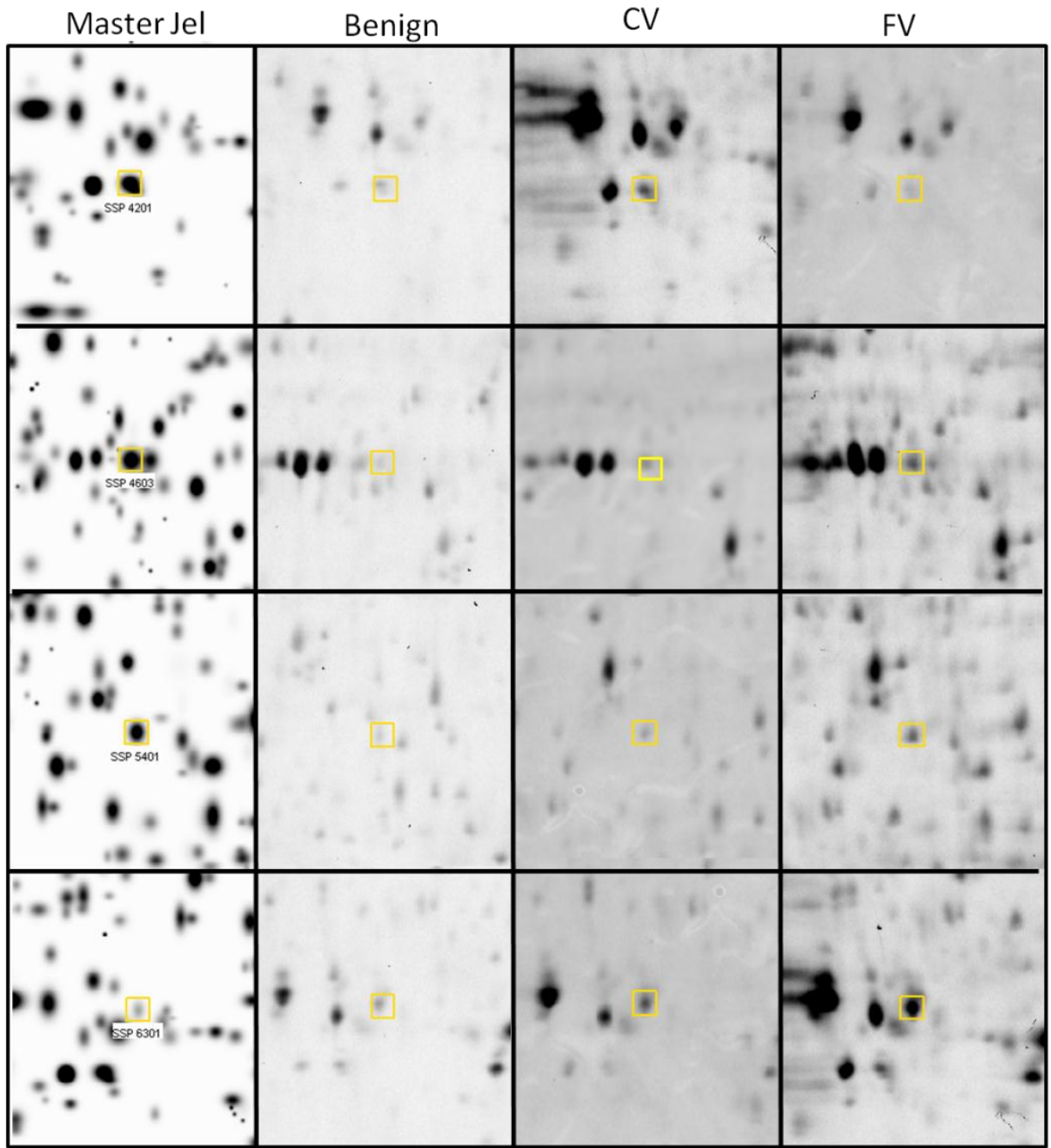


Şekil 14. CV-PTK, FV-PTK ve Benign dokuya ait havuzun (200 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 4-7, 17 cm)

Elde edilen pH 4-7 jellerden Pdquest yazılımı ile master jel görüntüsü oluşturulmuştur (Şekil 15). Yapılan analiz sonucunda örnek olarak 4 farklı spotun her 3 gruptaki görüntüsü detaylı olarak Şekil 16’da verilmiştir.

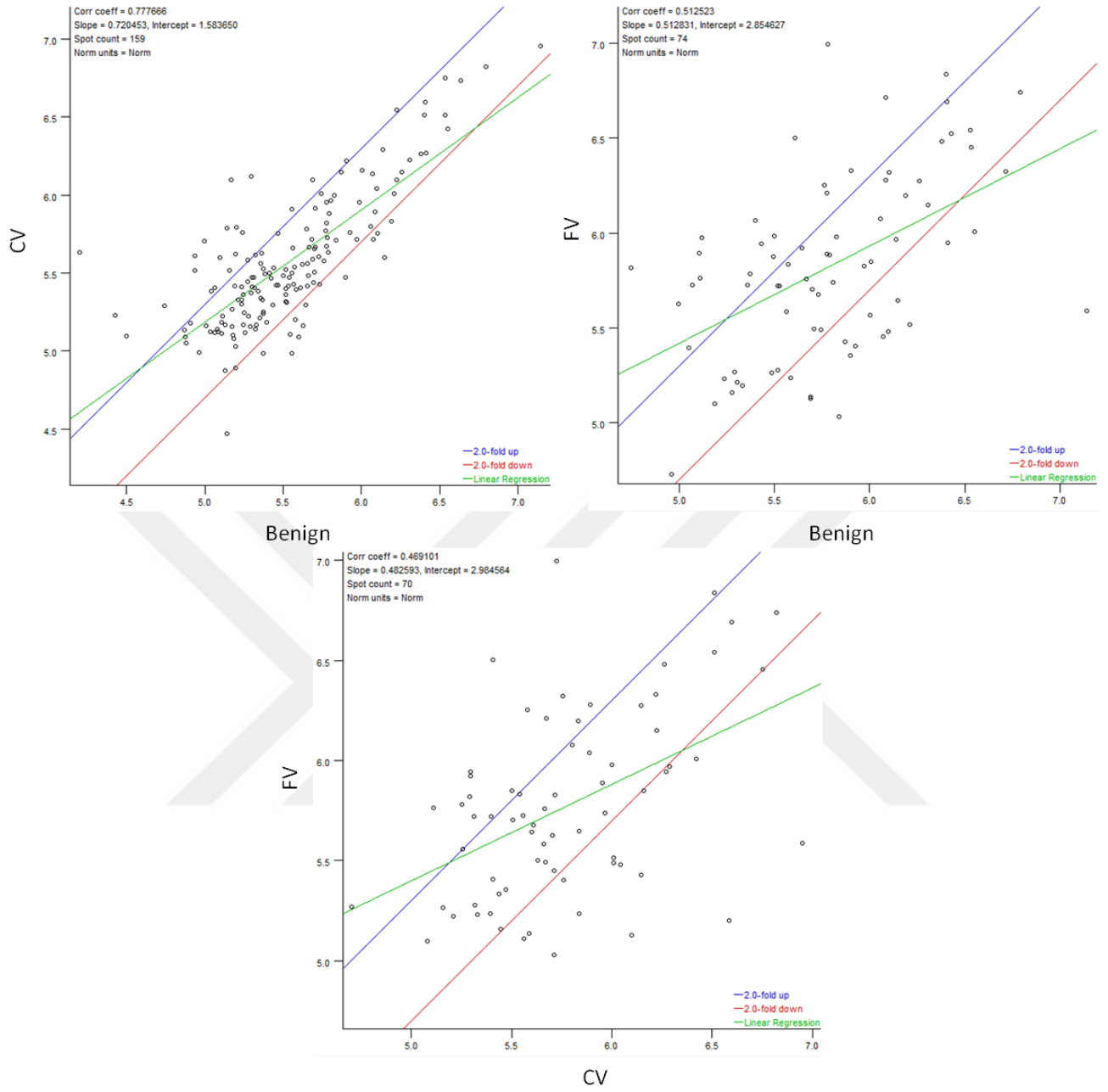


Şekil 15. pH 4-7 jellerden elde edilen master jel görüntüsü



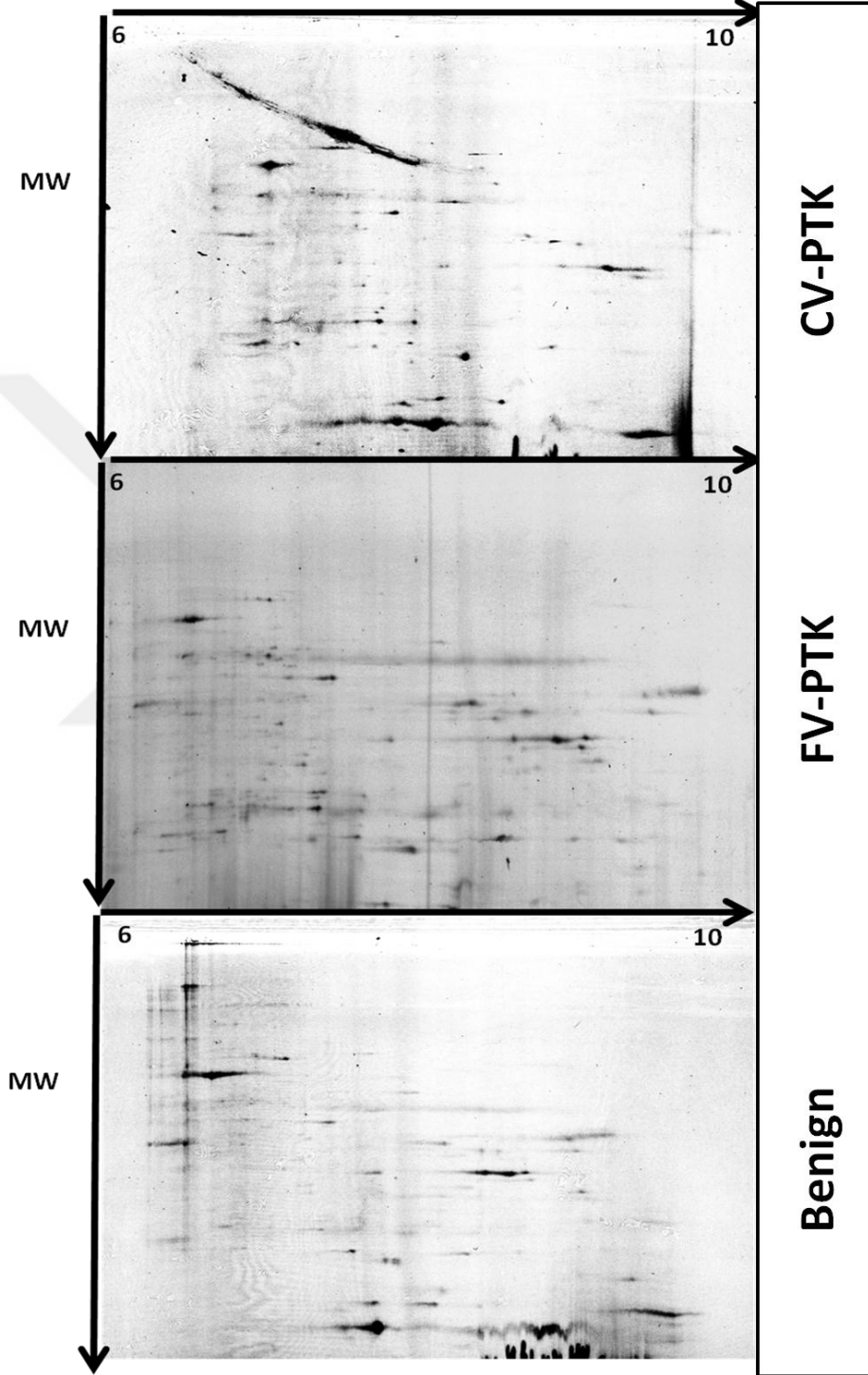
Şekil 16. Farklı spotların Benign, CV-PTK ve FV-PTK jellerindeki görüntüsü ve master jel ile karşılaştırılması

Lineer regresyon analizi sonucunda; FV-CV, FV-Benign ve CV-Benign arasında farklılık ($fc > 2$) gösteren spotlar belirlenmiştir (Şekil 17). Ancak, lineer regresyon sonucunda 3 grup arasında istatistiksel anlamlı olarak farklılık gösteren spotlar bulunamamıştır ($p < 0.05$).



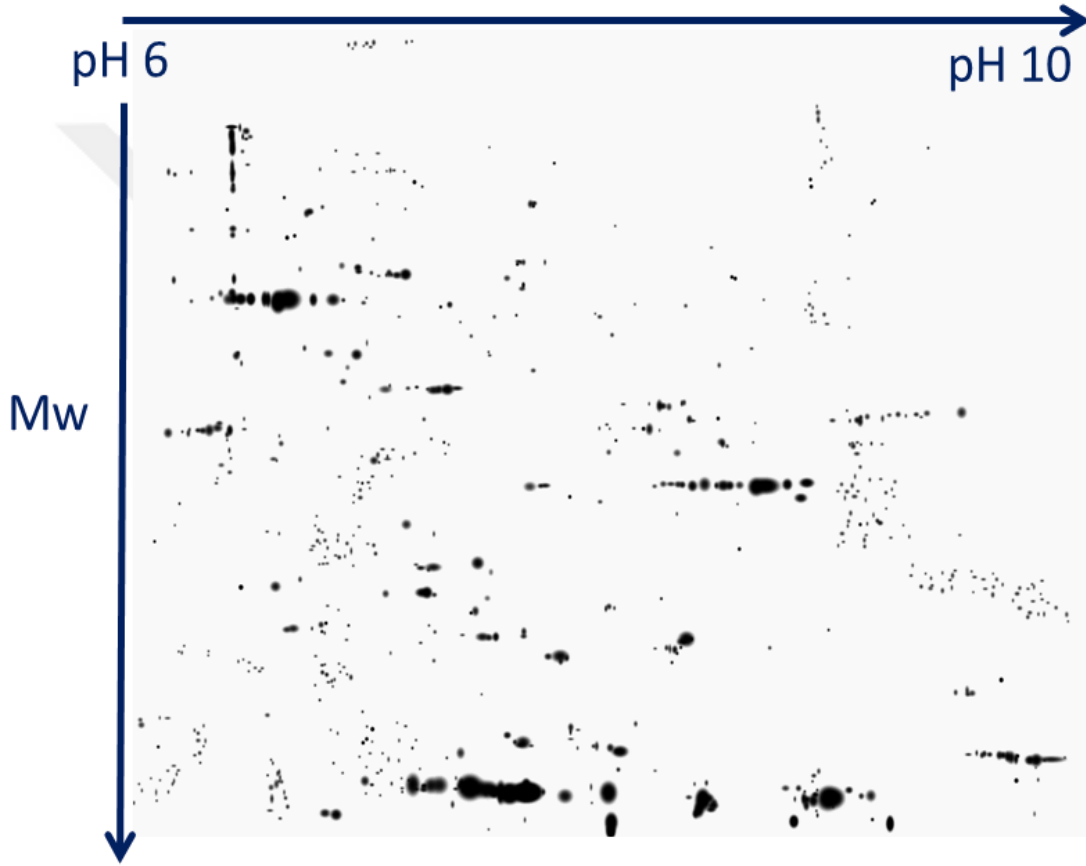
Şekil 17. CV-PTK-Benign, FV-PTK-Benign, CV-PTK-FV-PTK jellerinin lineer regresyon sonuçları. Her 3 grafikte de mavi çizginin üzerinde kalan ve kırmızı çizginin altında kalan spotlar 2 kat değişiklik gösteren spotlardır. Ancak bu spotların hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermemiştir.

Bazık bölgedeki proteinlerin araştırılmasında, pH 6-10 aralığında stripler kullanılarak en az 3 tekrarlı olacak şekilde örnekler yürütülmüştür. Bu aralıktaki örnek 3 jel görüntüsü Şekil 18’de verilmiştir.

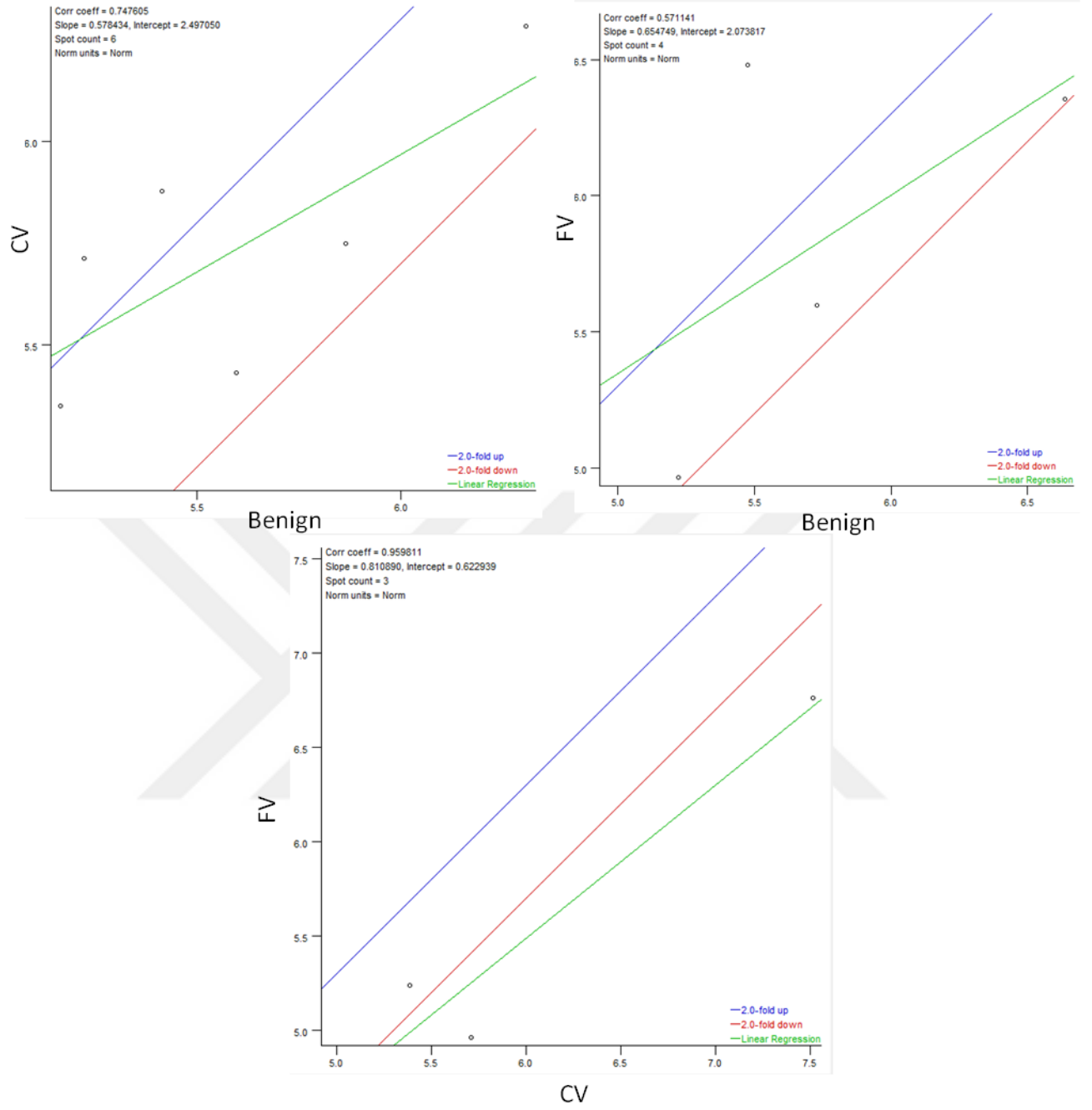


Şekil 18. CV-PTK, FV-PTK ve Benign dokuya ait havuzun (100 ug protein örneği) 2 Boyutlu Jel elektroforezi görüntüsü (pH 6-10, 17 cm)

Elde edilen pH 6-10 jellerden Pdquest yazılımı ile master gel görüntüsü oluşturulmuştur (Şekil 19). Gruplar arasında farklılık gösteren bazik proteinlerin analizinde lineer regresyon grafikleri kullanılarak FV-CV, FV-Benign, CV-Benign arasındaki olası farklılıklar incelenmiştir. Ancak, gruplar arasında farklılık gösteren spotlar görülse de anlamlı farklılık gösteren ($p < 0.005$) spotlar bulunmamıştır (Şekil 20).



Şekil 19. pH 6-10 jellerden elde edilen master gel görüntüsü



Şekil 20. CV-PTK-Benign, FV-PTK-Benign, CV-PTK-FV-PTK jellerinin lineer regresyon sonuçları. Her 3 grafikte de mavi çizginin üzerinde kalan ve kırmızı çizginin altında kalan spotlar 2 kat değişiklik gösteren spotlardır. Ancak bu spotların hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermemiştir.

İki boyutlu jel elektroforezi sonrası PDQuest yazılımı kullanılarak yapılan spot analizi sonucunda hiçbir protein istatistiksel olarak anlamlı farklı görülmediği için, jellerden bazı spotlar kesilmiştir ve tanımlanmıştır. Kesilecek spotlar seçilirken bol bulunan (high abundant) protein kümelerinden uzak durulmuştur. Bu spotlardan MASCOT skoru 56'nın üzerinde olan ($p < 0.005$) 9 protein tanımlanmıştır (Tablo 10).

Tablo 10. İki boyutlu jellerden elde edilen protein tanımlamaları ($p < 0.05$)

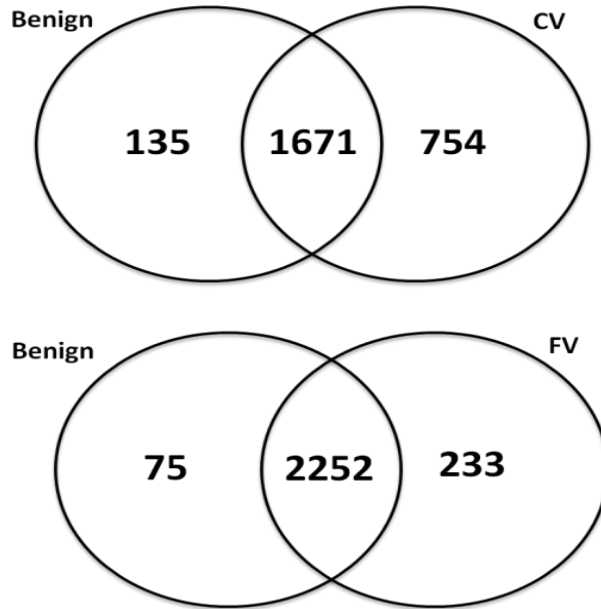
Protein Name	Entry Name (UniProt)	Gene Name	Accession Number	Mascot Score
Vimentin	VIME_HUMAN	VIM	P08670	58
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN	ATP5B	P06576	109
Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMAN	HSPB1	P04792	58
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	ACTB1	P60709	64
Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	ACTG 1	P63261	64
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	PDIA3	P30101	84
Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	PDIA6	Q15084	58
Serotransferrin	TRFE_HUMAN	TF	P02787	88
Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMA N	APOA 1	P02647	117

4.2 LC-MS/MS ile Protein Tanımlaması

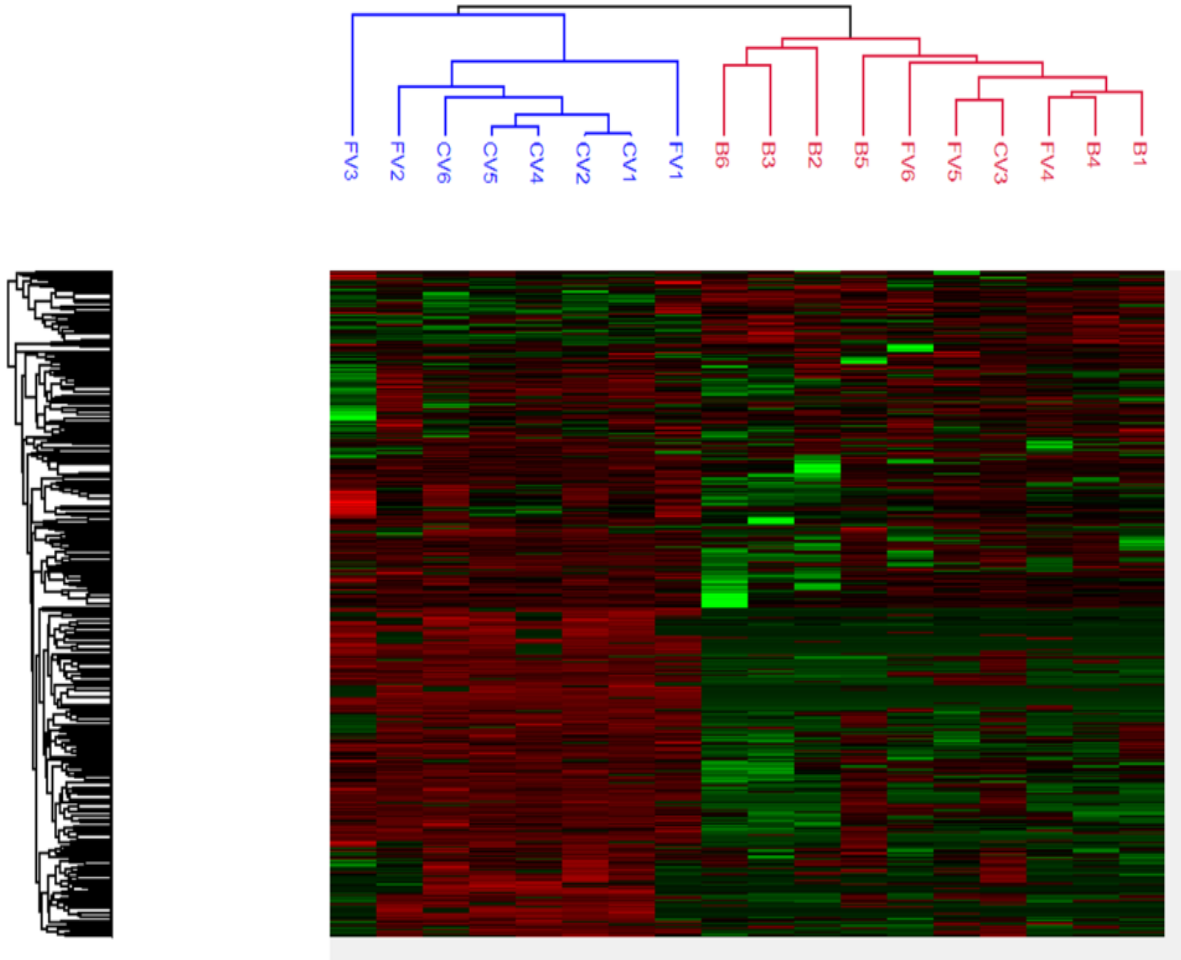
LC-MS/MS analizi sonucunda proteinlerin LFQ sinyal yoğunlukları alınıp, logaritma 2 'ye göre transforme edilmiştir. Buna göre, toplam 18 dokuda (n=6 CV, n=6 FV, n=6 Benign) 5100 protein tanımlaması yapılmıştır. Bu proteinlerin 2560'ı yöntemde belirtilen ölçülen değerin geçerli sayılabilmesi şartını yerine getirerek istatistiksel teste tabi tutulmuştur.

4.2.1 FV-PTK ve CV-PTK Kanserleri Arasındaki Protein Farklılıkları

Şekil 21'de gösterilen Venn diyagramı, her 3 grupta tanımlanan proteinlerin kesişimini göstermektedir. Benign ile FV-PTK arasındaki ortak proteinler (n=2252), benign ile CV-PTK arasındaki ortak proteinlerden (n=1671) belirgin derecede fazladır. Tüm örneklem gruplarında protein ekspresyonlarının hiyerarşik kümeleme analizi, benign dokulardan CV-PTK'nın net bir ayrımını gösterirken, FV-PTK vakaları CV-PTK ve benign dokular arasında belirgin bir fark göstermemiştir (Şekil 22). Buna göre, FV-PTK ve benign olgularda tanımlanan daha fazla sayıdaki ortak proteinin hiyerarşik kümeleme analizi ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.

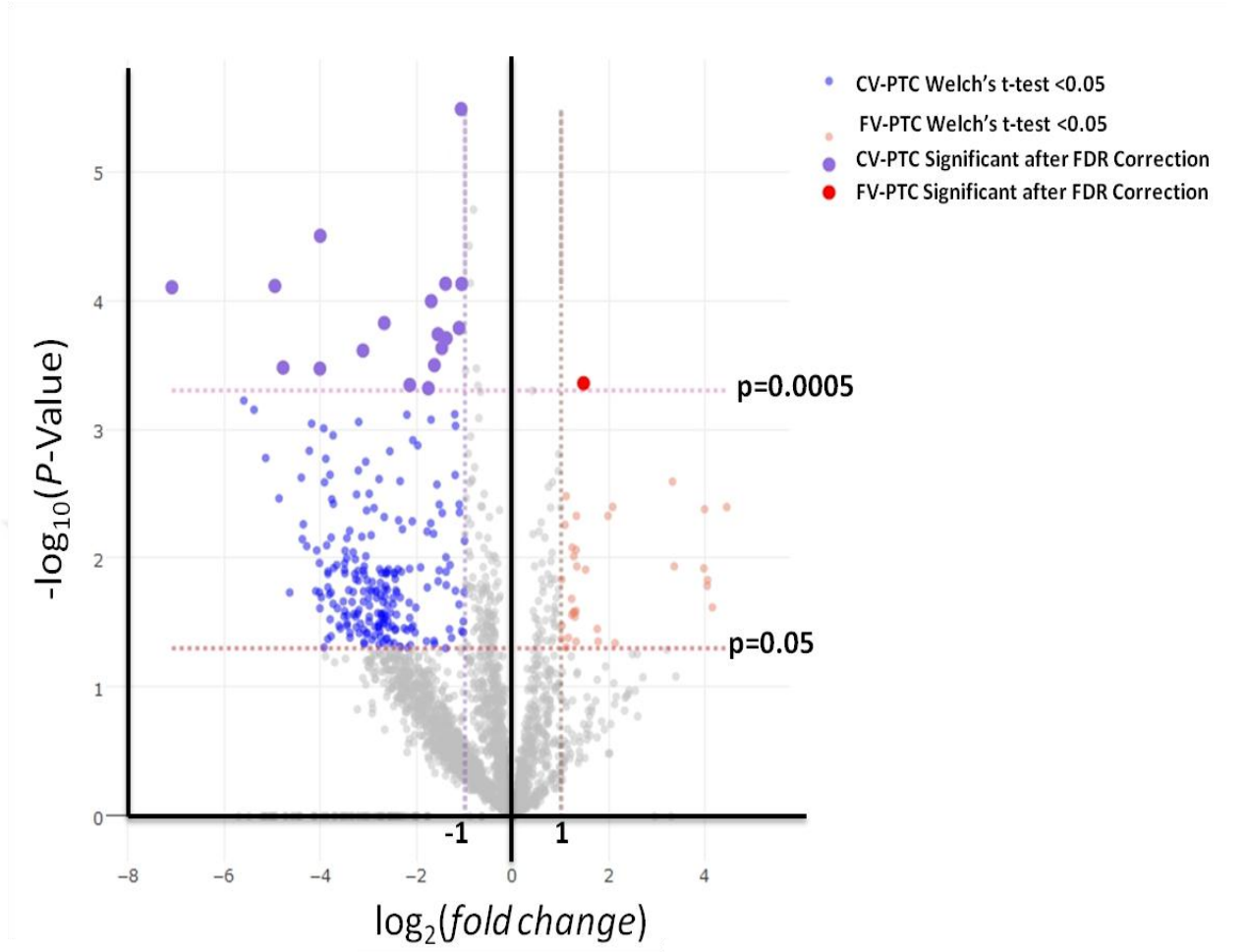


Şekil 21. Her üç grupta da tanımlanan proteinlerin Venn diyagramları. Her üç grubun da proteom profillemesi, 2.560 protein tanımlamasına katkıda bulundu ($p < 0.05$). Proteinlerin % 65'inin benign ve CV-PTK'de ortak olduğu, proteinlerin % 88'inin benign ve FV-PTK'de ortak olduğu bulunmuştur



Şekil 22. CV-PTK, FV-PTK ve benign örneklerdeki proteinlerin hiyerarşik kümeleme analizi

Ayrıca, CV-PTK ve benign dokuların proteomlarının karşılaştırılması sonucunda 296 proteinin miktarlarının farklı olduğu gösterilmiştir ($fc \geq 2$, FDR p değeri <0.0005). FV-PTK ve CV-PTK dokularının proteomları karşılaştırıldığında ise, 27 proteinin miktarının farklı şekilde değiştiği gösterilmiştir (FDR p-değeri <0.0005) (Tablo 11 ve Şekil 23). Şekil 18’de FDR-p <0.0005 ’in üzerindeki noktalar, FV-PTK ve CV-PTK’de önemli ve farklı şekilde değişen proteinleri göstermektedir. Bu 27 proteinden yalnızca iki tanesi FV-PTK’de artmışken, 25 tanesi CV-PTK vakalarında artış göstermiştir.



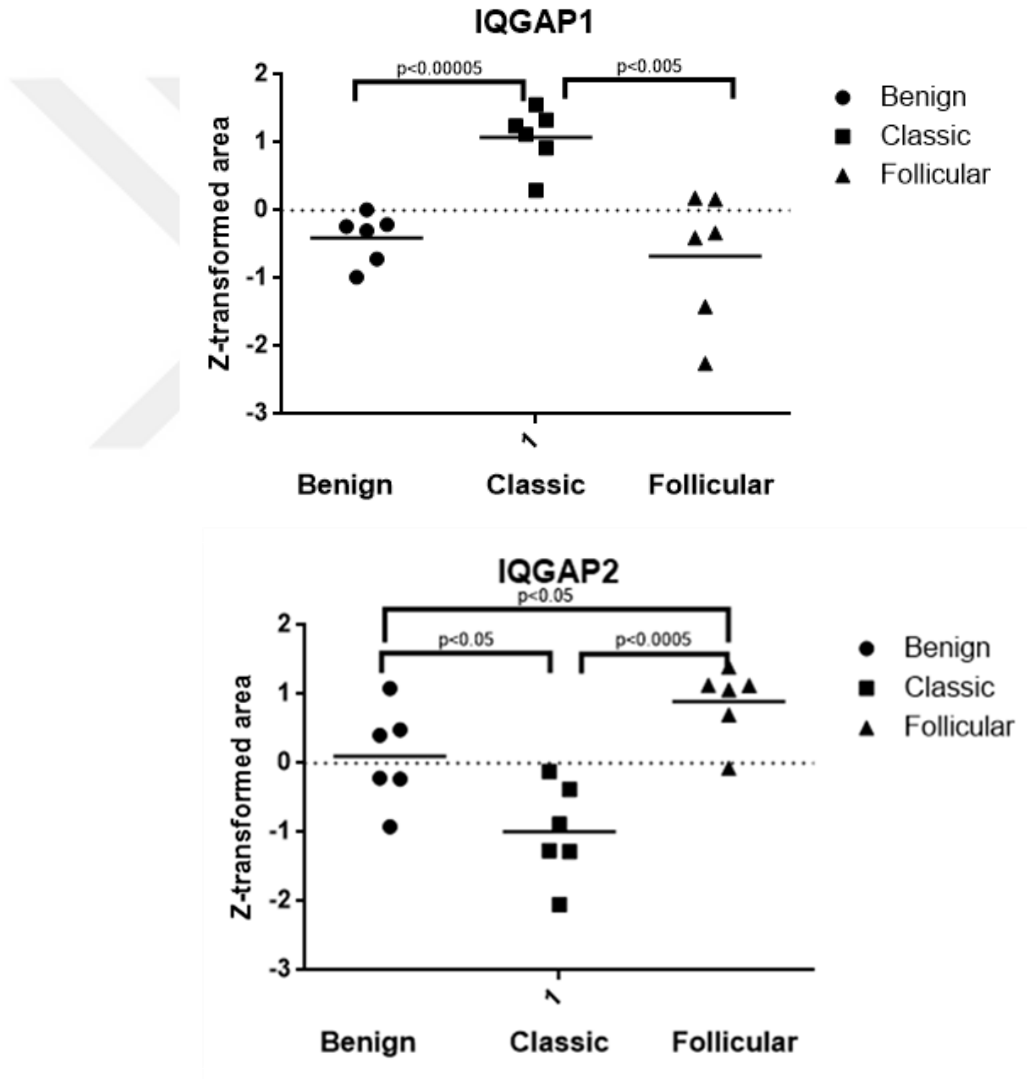
Şekil 23. Volcano grafiği ile CV-PTK ve FV-PTK'deki farklı proteinlerin gösterilmesi. Grafik, $\log_2$ 'ye (fold change) karşı $-\log_{10}$ (p değeri) kullanılarak oluşturulmuştur. Eksenel olmayan dikey çizgiler ± 1 kat değişikliği göstermektedir. Aksiyal olmayan yatay çizgiler $p=0.05$ ve $p=0.0005$ (Benjamini-Hochberg düzeltilmiş p değeri) göstermektedir.

Tablo 11. FDR düzeltmesinden sonra klasik varyant ve foliküler varyant arasında ifade değişikliği gösteren proteinler

Accession Number	Protein Name	FDR Corrected P-Value	log2 Fold Change	Trend	
				FV	CV
O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	0,00007	1,07	-	+
P04083	Annexin A1	0,0005	2,15	-	+
P23381	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic;T1-TrpRS;T2-TrpRS	0,0003	1,64	-	+
P42224	STAT 1-alpha/beta; Signal transducer and activator of transcription	0,00003	4,01	-	+
P61158	Actin-related protein 3	0,0002	1,12	-	+
P61160	Actin-related protein 2	0,000003	1,08	-	+
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	0,00002	0,82	-	+
Q14764	Major vault protein	0,0002	2,68	-	+
Q15149	Plectin	0,0003	0,76	-	+
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	0,0002	1,39	-	+
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	0,00007	0,89	-	+
P19971	Thymidine phosphorylase	0,0003	3,12	-	+
P21333	Filamin-A	0,0005	0,68	-	+
X5D2R7	Proteasome subunit beta type-8	0,0002	1,56	-	+
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	0,0005	0,73	-	+
P31146	Coronin-1A	0,0003	4,02	-	+
P46063	ATP-dependent DNA helicase Q1	0,0004	0,98	-	+
P50995	Annexin A11	0,00004	0,91	-	+
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	0,0002	1,48	-	+
P60903	Protein S100-A10	0,0005	1,76	-	+
Q13492	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	0,00007	1,40	-	+
Q86UX7	Fermitin family homolog 3	0,00008	4,95	-	+
Q8WU39	Marginal zone B- and B1-cell-specific protein	0,00008	7,09	-	+
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	0,0003	4,78	-	+
Q9Y3Z3	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	0,0001	1,70	-	+
F5H7S7	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	0,0004	1,47	+	-
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	0,0005	0,41	+	-

4.2.2 CV-PTK ve FV-PTK Dokularında IQGAP Proteinlerinin Miktar Değişiklikleri

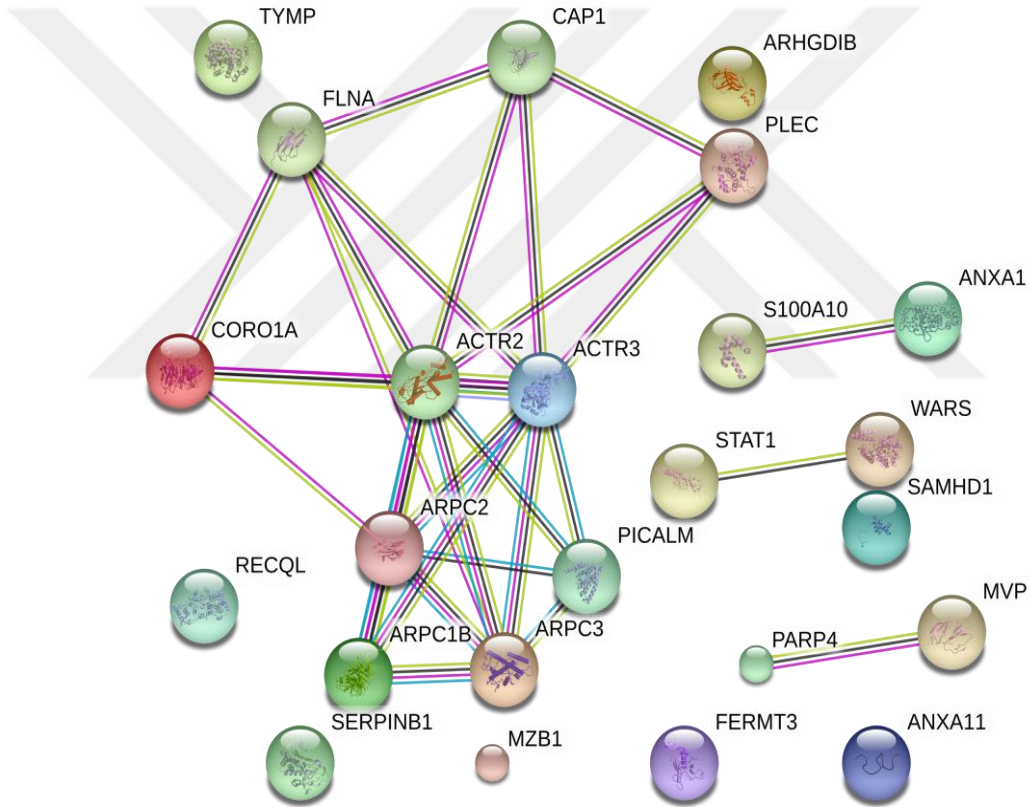
CV-PTK ve FV-PTK örneklerinde, evrimsel olarak korunmuş Ras GTPaz aktive edici benzeri proteinlerin (IQGAPs) farklılıkları bulunmuştur (Şekil 24). IQGAP1, CV-PTK ($fc \geq 2$) örneklerinde artmış bulunurken, benign ve FV-PTK örneklerinde bu proteinin miktarı farklı olarak bulunmamıştır. Öte yandan, IQGAP2 proteini, FV-PTK örneklerinde ($fc \geq 2$) artmış olarak bulunmasına rağmen, CV-PTK örneklerinde ise anlamlı azalma göstermiştir.



Şekil 24. IQGAP1 ve IQGAP2 proteinlerinin miktar değişiklikleri

4.2.3 CV-PTK örneklerinde Moleküler Yolak Analizine Bağlı Hücre İskelet Proteinlerinin Değişiklikleri

CV-PTK örneklerinde anlamlı farklılık gösteren proteinlerin (n=25, FDR p değeri<0.0005), bilinen ve öngörülen protein etkileşimlerinin oluşturulması için STRING veritabanı kullanılmıştır. Bu etkileşimlere göre aktin iskelet proteinleri ve ayrıca aktin iskelet proteinlerini düzenleyen Rho ile ilişkili proteinlerin (fc≥2) artışı gösterilmiştir. Örneğin, aktinle ilişkili protein 2/3 (Arp2/3), filamin-a, koronin-1a ve pektinin birkaç üyesinin, CV-PTK örneklerinde değiştiği gösterilmiştir (Şekil 25).



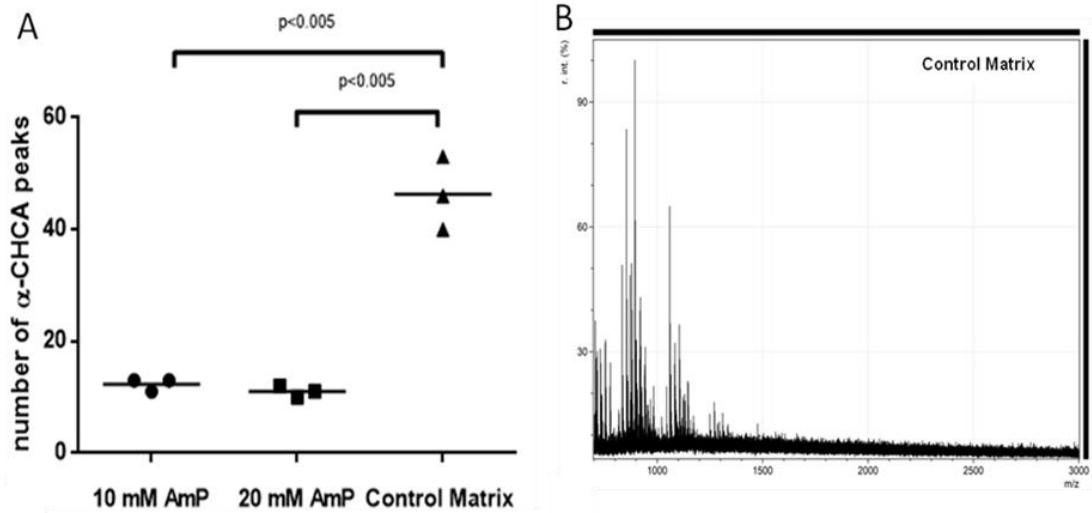
Şekil 25. Papiller tiroid kansinomunda bilinen ve ön görülen protein etkileşimleri

4.3 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi ile Peptid Analizi

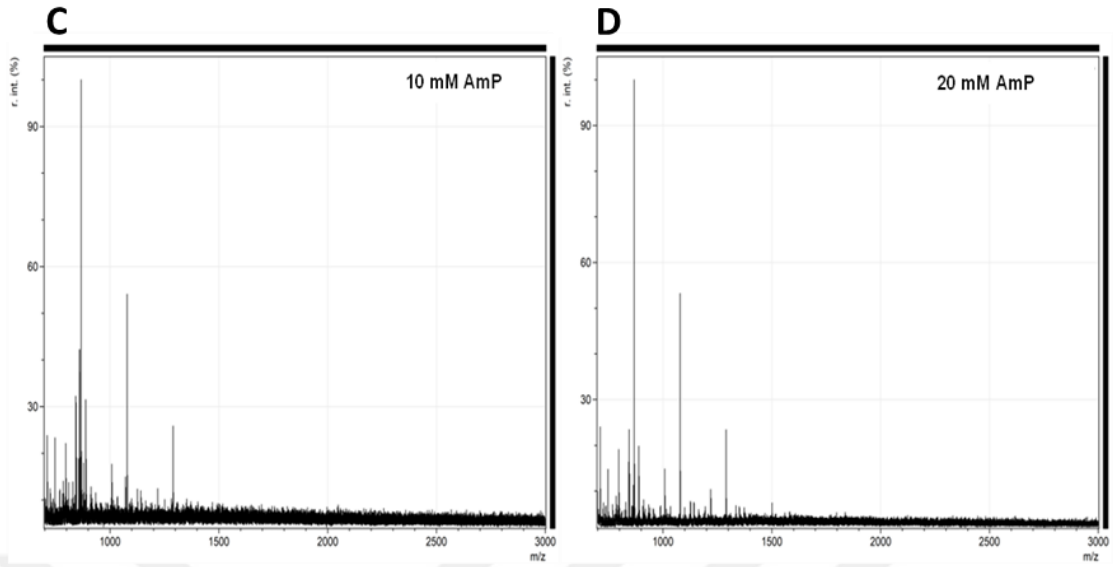
4.3.1 MALDI-Görüntüleme Çalışmalarının Tiroid Dokusu için Optimizasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmasının sonuçlarına göre, MALDI matriksinde amonyum tuzlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Matriksde kullanılan amonyum tuzları sayesinde, matriksden gelen sinyal seviyesi azaltılmış aynı zamanda dokudan gelen peptid sinyallerinin kalitesi artırılmıştır. Bu amaçla, 10 mM amonyum fosfat monobazik (AmP), 20 mM AmP ve amonyum tuzu içermeyen kontrol matriksinden gelen sinyaller karşılaştırılmıştır. 10 mM ve 20 mM AmP içeren matriksden gelen matriks sinyallerine bakıldığında, matriks sinyallerinin bu örneklerde anlamlı azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 26 A-D).

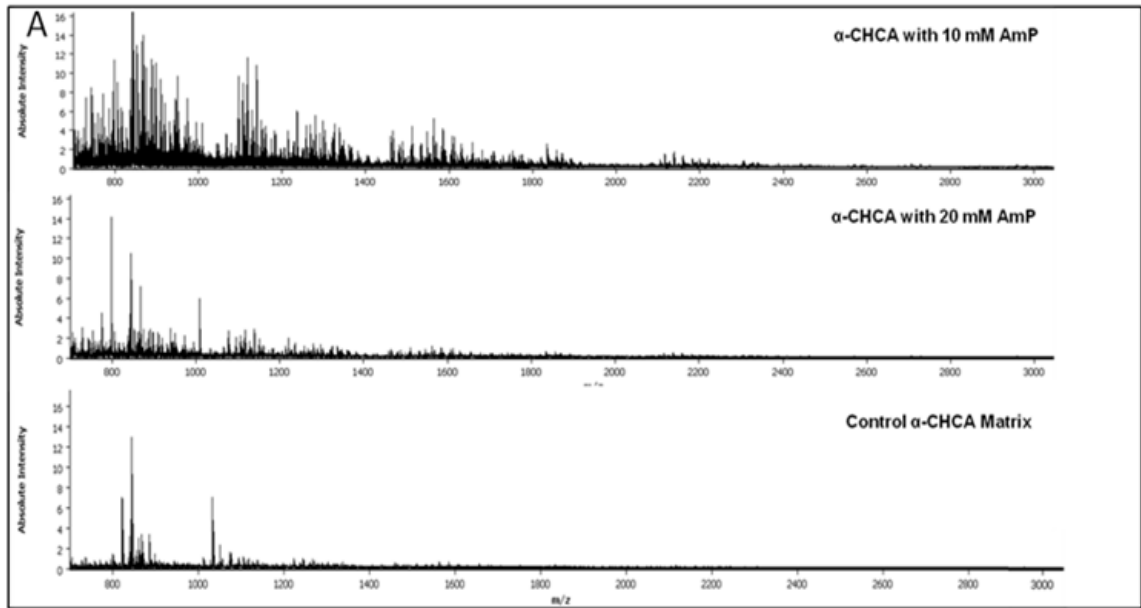
Ardından, AmP eklenen matriks ile tiroid doku örnekleri kaplanmış ve MALDI-Görüntüleme yöntemi ile analiz edilmiştir. Dokudan gelen peptid sinyalleri karşılaştırıldığında 10 mM AmP ile hazırlanan tiroid dokusundan daha fazla peptid sinyali gelmiştir. Seçilen peptidlerin görüntüleri Şekil 27 B’de verilmiştir. Analiz edilen doku örneğinin hiyerarşik sınıflandırma sonuçlarına göre, AmP içeren matriks ile kaplanan dokudan gelen sinyalin kalitesi artırıldığı için peptidlerin kümelenmesi doku histolojisi ile daha uyumlu bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 27E).



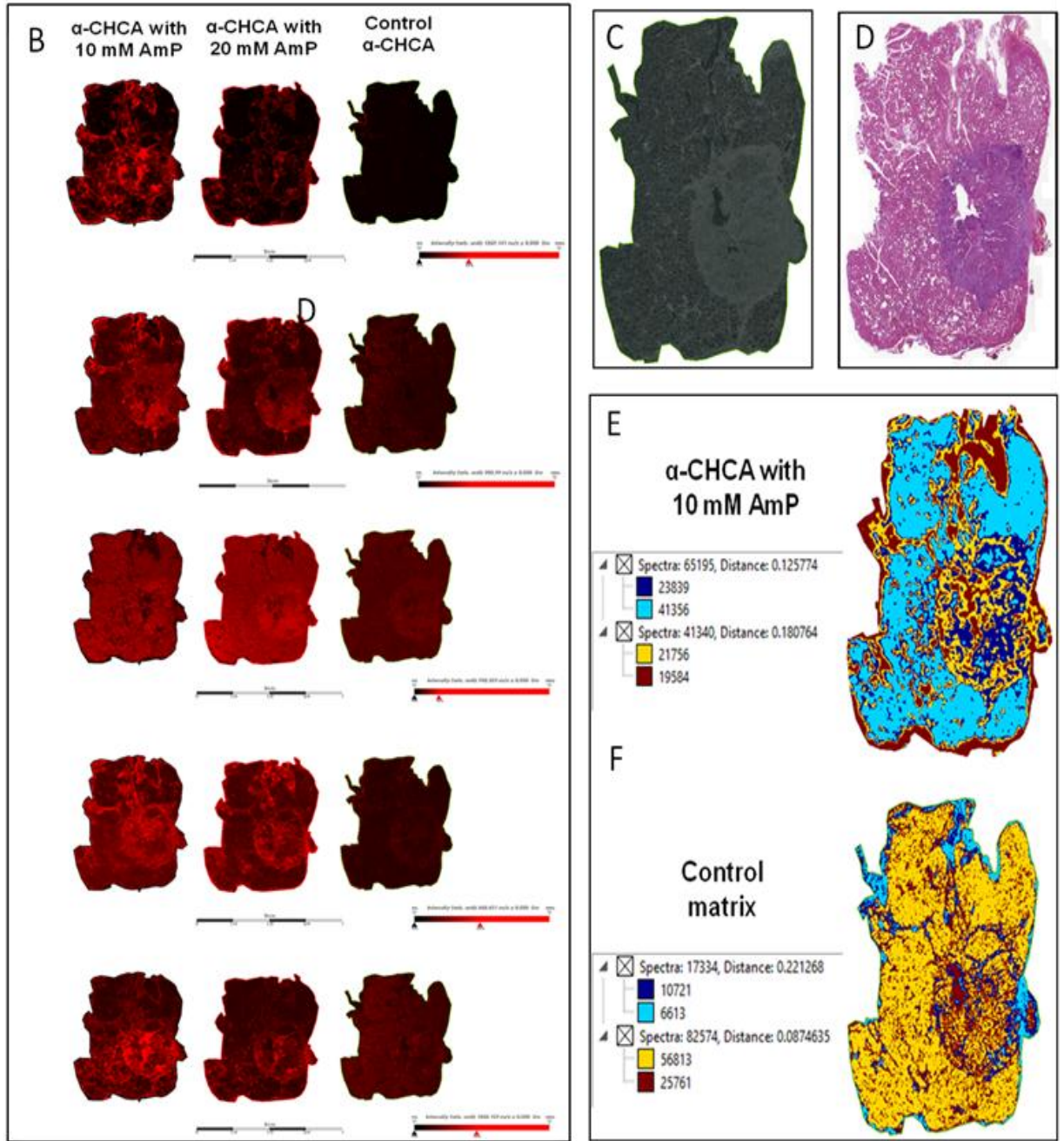
Şekil 26. Farklı konsantrasyonlarda AmP içeren matriksin spektrumunda gözlemlenen α -CHCA matriks pikleri. (A) Bir dizi α -CHCA pikleri üç bağımsız kontrol matriks deneyinde belirgin olarak artmaktadır ($p < 0.005$). (B) A-CHCA'da AmP olmadan elde edilen MALDI-TOF spektrumu. Kontrol matriksi: 10 mM ve 20 mM AmP olmadan hazırlanan α -CHCA matriksidir.



Şekil 26. Farklı konsantrasyonlarda AmP içeren matriksin spektrumunda gözlemlenen α -CHCA matriks pikleri. (C) A-CHCA içerisine 10 mM AmP eklenmesiyle elde edilen MALDI-TOF spektrumu. (D) A-CHCA içerisine 20 mM AmP eklenmesiyle elde edilen MALDI-TOF spektrumu.



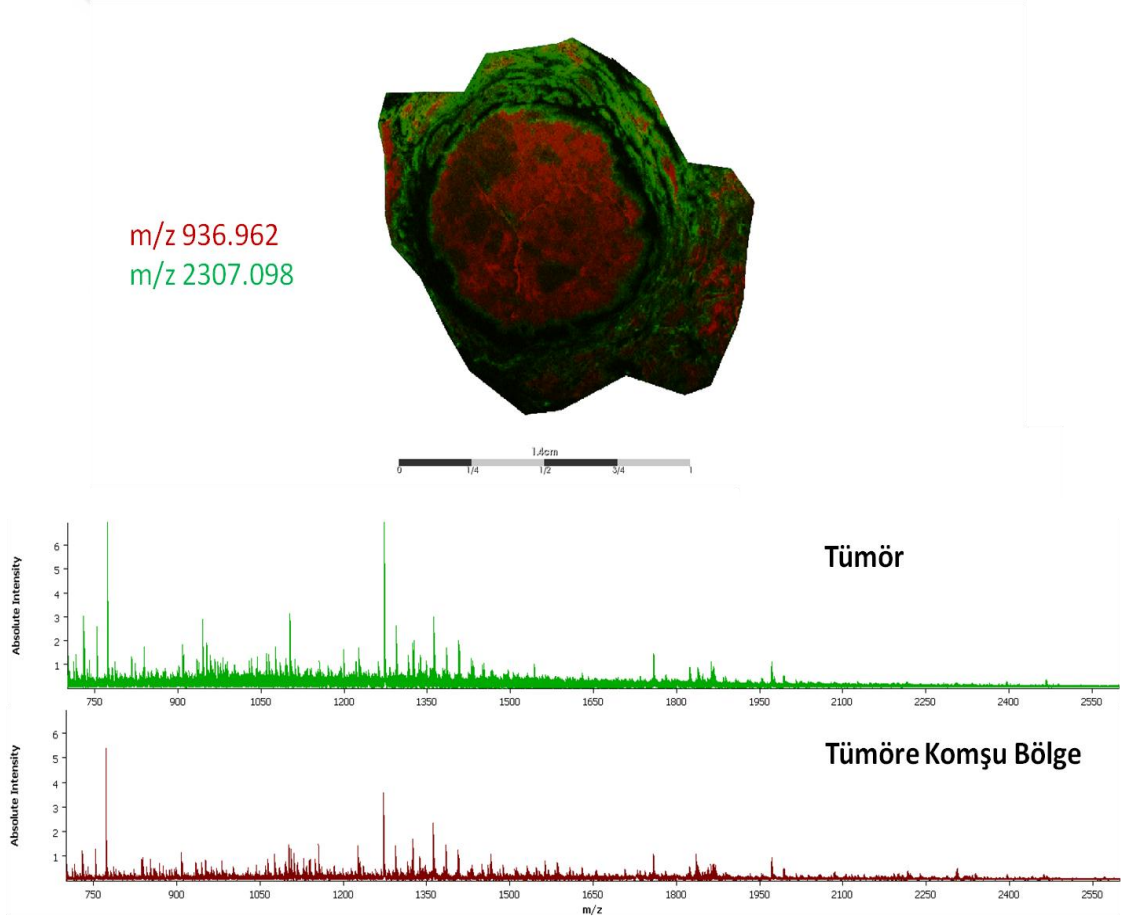
Şekil 27. FFPE tiroid kansinom dokusunda peptitlerin MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi. (A) Tek başına α -CHCA, α -CHCA+10 mM AmP veya α -CHCA+20 mM AmP ile kaplanan doku kesitlerinin MALDI-TOF kütle spektrumunun karşılaştırılması.



Şekil 27. FFPE tiroid karsinom dokusunda peptitlerin MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi. (B) ROC analizinden sonra α -CHCA ile AmP ile kaplanan dokuların tümör bölgesinde daha yüksek sinyal yoğunluğuna sahip temsili m / z görüntüleri ($AUC > 0.640$) (C) İlgili doku kesitinin optik görüntüsü. (D) H & E Boyalı doku kesiti. (E) α -CHCA'da 10 mM AmP ile kaplanan doku kesitinin hiyerarşik kümeleme analizi. (F) Sadece α -CHCA ile kaplanan doku kesitinin hiyerarşik kümeleme analizi. Her iki kümede renkler dendrogramda bulunan farklı kümelerle karşılık gelmektedir.

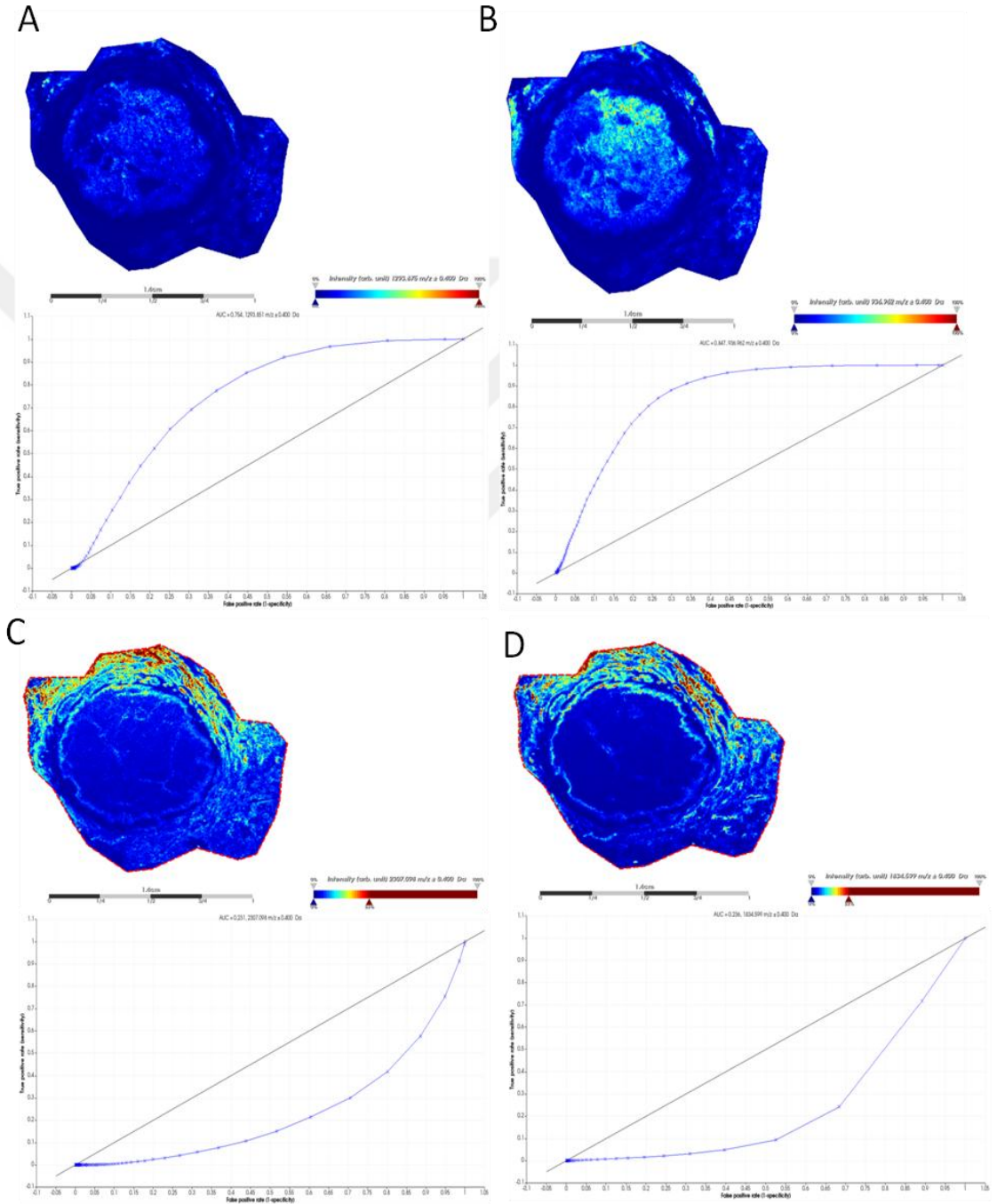
4.3.2 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Yönteminin Tiroid Dokusuna Uygulanması

Optimizasyon çalışmaları başarı ile tamamlandıktan sonra, ITO kaplı lamlara alınan tiroid dokuları MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi yöntemi ile analiz edilmiştir. Buna göre, her bir doku için tek tek segmentasyon analizi yapılmış ve tümör bölgesinde ve tümöre komşu bölgelerde lokalize olan peptidler belirlenmiştir. Analiz edilen CV-PTK dokularından bir tanesine ait tümör ve tümöre komşu bölgenin spektrumu ve bu spektrumlardan seçilen iki peptidin iyon görüntüsü Şekil 28’de verilmiştir. Daha sonra, tümör bölgesinde ve tümöre komşu bölgelerde lokalize olan peptidlerin tümör bölgesinin ayırımında kullanılıp kullanılamayacağı ROC analizi ile belirlenmiştir.



Şekil 28. CV-PTK dokusunun tümör ve tümöre komşu bölgelerine ait spektrum ve bu bölgelerdeki iyon görüntüleri (Tümör: m/z 936.962, Tümöre komşu: m/z 2307.098)

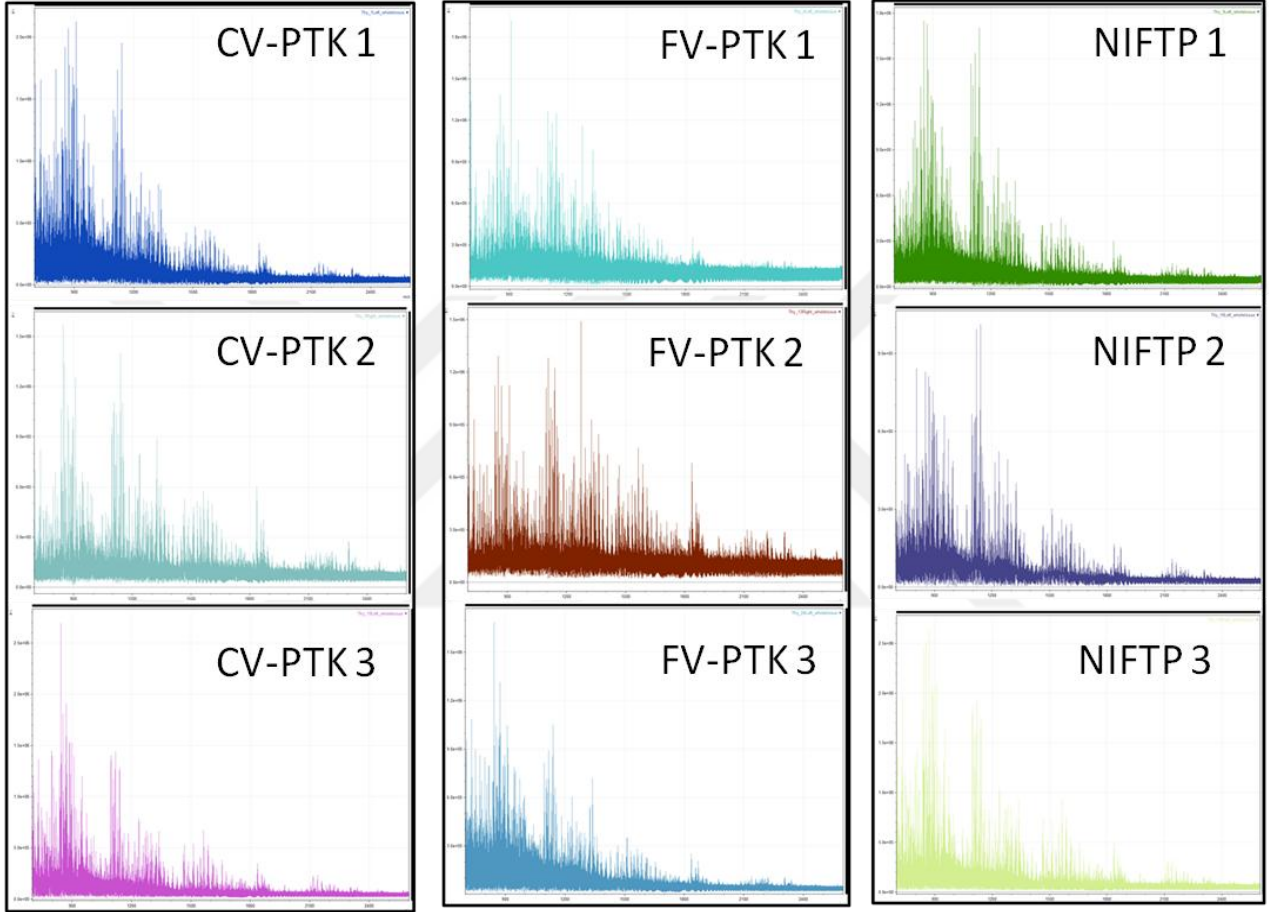
ROC analizine göre; tümör bölgesinde 15 adet peptidin (threshold >0.97), tümöre komşu bölgede ise 10 adet peptidin (threshold <0.05) duyarlılığı ve seçiciliği yüksek olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerden bazıları Şekil 29’da ROC grafikleri ve AUC değerleri ile birlikte verilmiştir.



Şekil 29. ROC analizi sonucunda tümör ve tümöre komşu bölgelerden seçilen ayırıcı peptidler. (A-B) Tümör bölgesinde yüksek olarak peptidler (m/z 1293, m/z 994) (C-D) Tümöre komşu bölgede yüksek olan peptidler (m/z 2307, m/z 1434)

4.3.3 MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi Yöntemi ile CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP Dokularının Peptid Farklılıklarının Belirlenmesi

Tüm dokular MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi ile analiz edildikten sonra elde edilen spektrumlar detaylı olarak incelenmiştir. CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP dokularına ait 3 adet örnek spektrum Şekil 30’da verilmiştir.



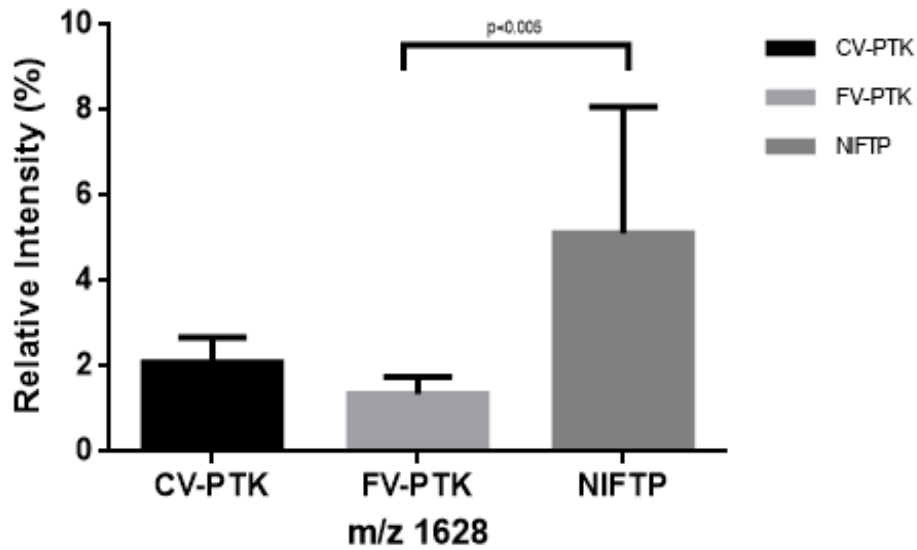
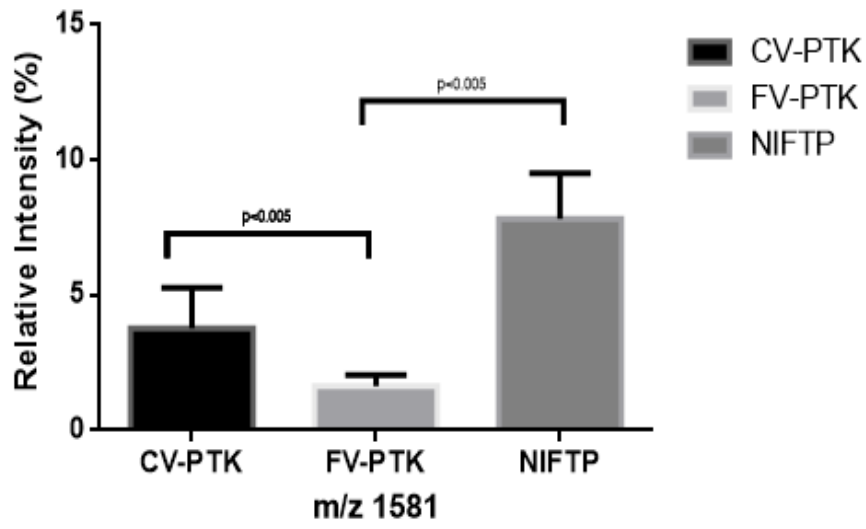
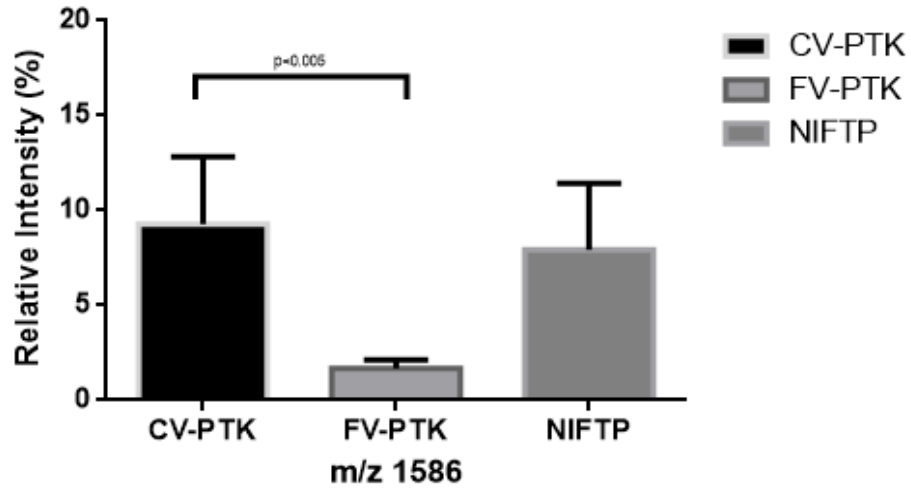
Şekil 30. CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP vakalarına ait örnek 3 adet spektrumun görüntüsü

Yapılan analiz sonucunda varyantlar arasında farklı peptidlere rastlanmamıştır, ancak tespit edilen m/z değerlerinde varyantlar arasında sinyal yoğunluklarının farklı olduğu belirlenmiştir. Aşağıdaki tabloda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan peptidler ortalama sinyal yoğunlukları ile birlikte sunulmuştur ($p < 0.005$) (Tablo 12). Ayrıca, Şekil 31’de varyantlar arasında

anlamli farklilik gosteren ornek m/z değerlerinin grafikleri gosterilmiştir. Gruplar arasındaki ortalama sinyal yoğunluğu farkının istatistiksel olarak yorumlanmasında Friedman testi ve Dunn's Multiple Comparison testi kullanılmıştır.

Tablo 12. Varyantlar arasında anlamli farklilik gosteren m/z değerleri

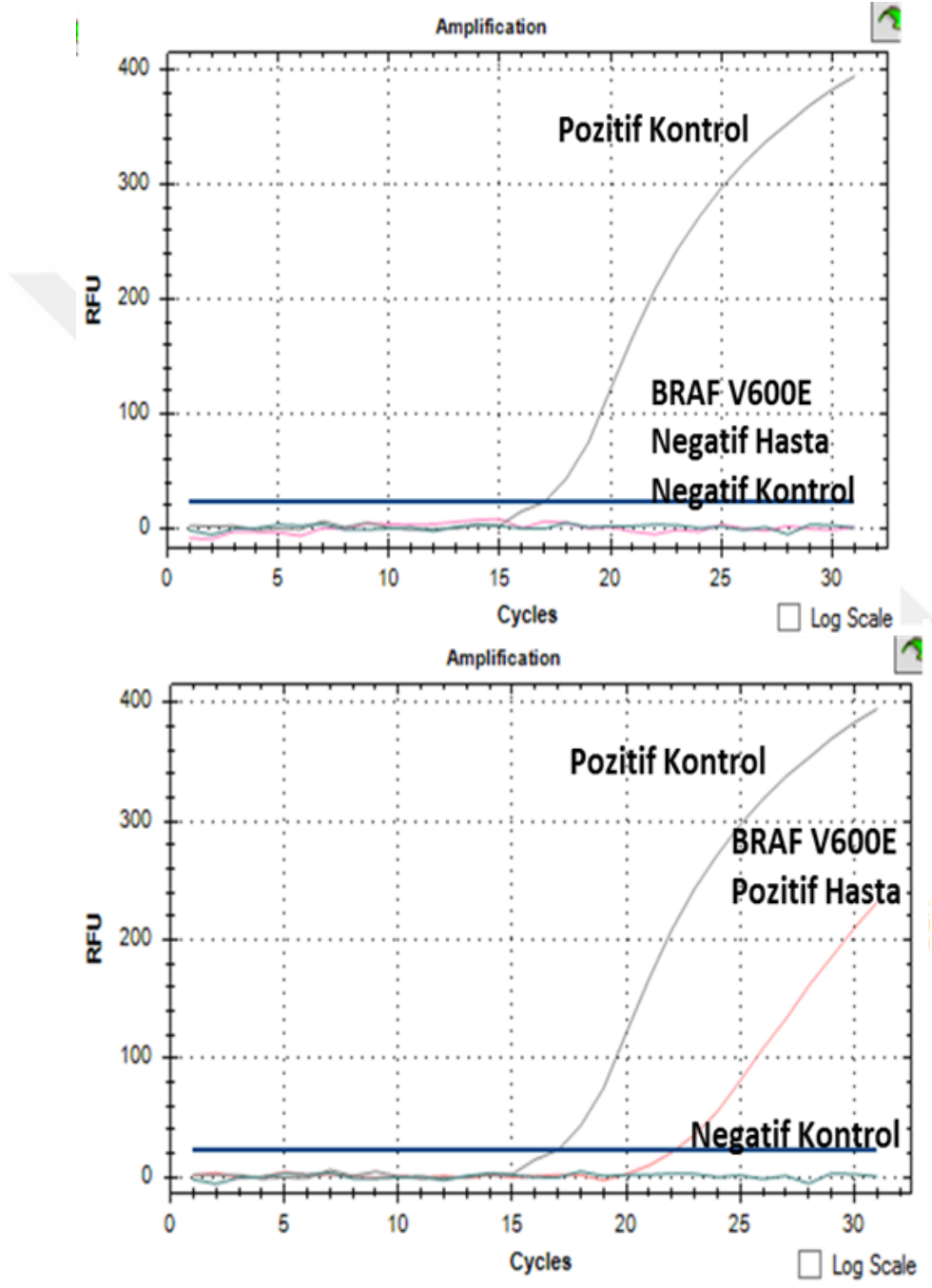
m/z ($\pm$ 500 ppm)	Average Relative Intensity CV-PTC (%)	Average Relative Intensity FV-PTC (%)	Average Relative Intensity NIFTP (%)
859	20,52	9,63	31,01
868	51,53	42,34	75,42
873	13,67	7,99	27,24
886	36,64	29,46	57,29
911	13,73	8,37	28,23
920	24,74	14,11	31,98
933	14,08	6,94	25,60
945	29,25	19,71	47,87
950	29,55	18,81	56,89
972	24,92	16,59	43,16
974	16,00	9,42	34,22
987	13,49	11,01	25,92
988	20,40	10,80	29,71
994	20,02	11,24	32,83
1094	24,19	21,41	39,40
1095	40,19	28,99	60,76
1106	36,86	23,06	50,79
1116	31,85	27,23	53,17
1125	10,00	3,23	16,03
1204	3,99	1,94	10,38
1280	18,16	6,49	21,92
1289	8,15	5,62	14,71
1297	15,06	6,90	22,01
1302	8,65	2,74	11,97
1319	7,68	1,77	11,85
1325	9,78	6,79	29,09
1512	9,68	1,21	8,51
1581	3,79	1,64	7,83
1586	9,29	1,67	7,92
1628	2,09	1,36	5,11



Şekil 31. Varyantlar arasında anlamlı farklılık gösteren m/z değerleri ($p < 0.05$).

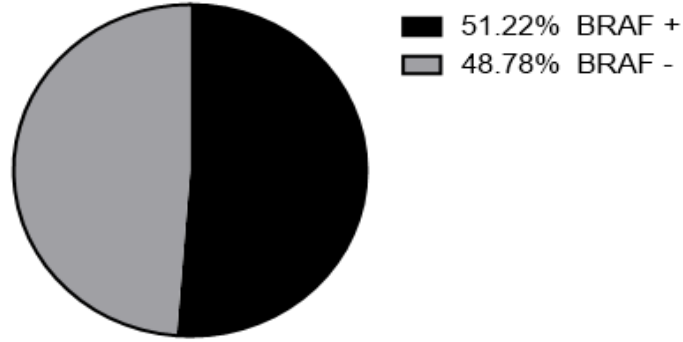
4.4 BRAF V600E Mutasyon Taraması

Örnekler, CFX Manager Software (BioRad, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Aşağıdaki figürde; BRAFV600E pozitif ve negatif iki hastaya ait amplifikasyon grafiği pozitif ve negatif kontrollerle birlikte örnek olarak verilmiştir (Şekil 32).



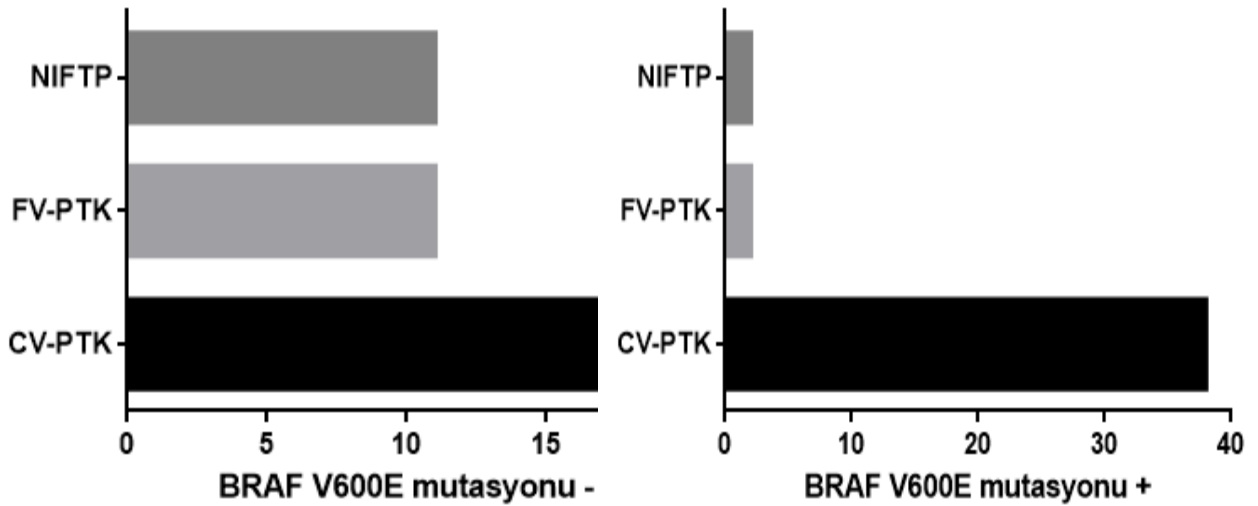
Şekil 32. BRAF V600E mutasyonu pozitif ve negatif olan iki hastaya ait amplifikasyon grafiği

Tüm hasta sonuçlarına histopatolojik karakterizasyon göz önüne alınmadan bakıldığında, çalışma popülasyonunun yaklaşık %51’inde BRAF V600E mutasyonu görülürken, %49’unda mutasyon tespit edilmemiştir (Şekil 33).



Şekil 33. Çalışma grubunda BRAF V600E mutasyon görülme sıklığı

Ayrıca; CV-PTK tanısı alan örneklerin %67,9’u BRAF V600E mutasyonu gösterirken, FV-PTK ve NIFTP tanısı alan örneklerin %15,4’ünde BRAF V600E mutasyonu tespit edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. BRAF V600E mutasyonu tespit edilen ve edilmeyen örneklerin varyantlara göre dağılımı

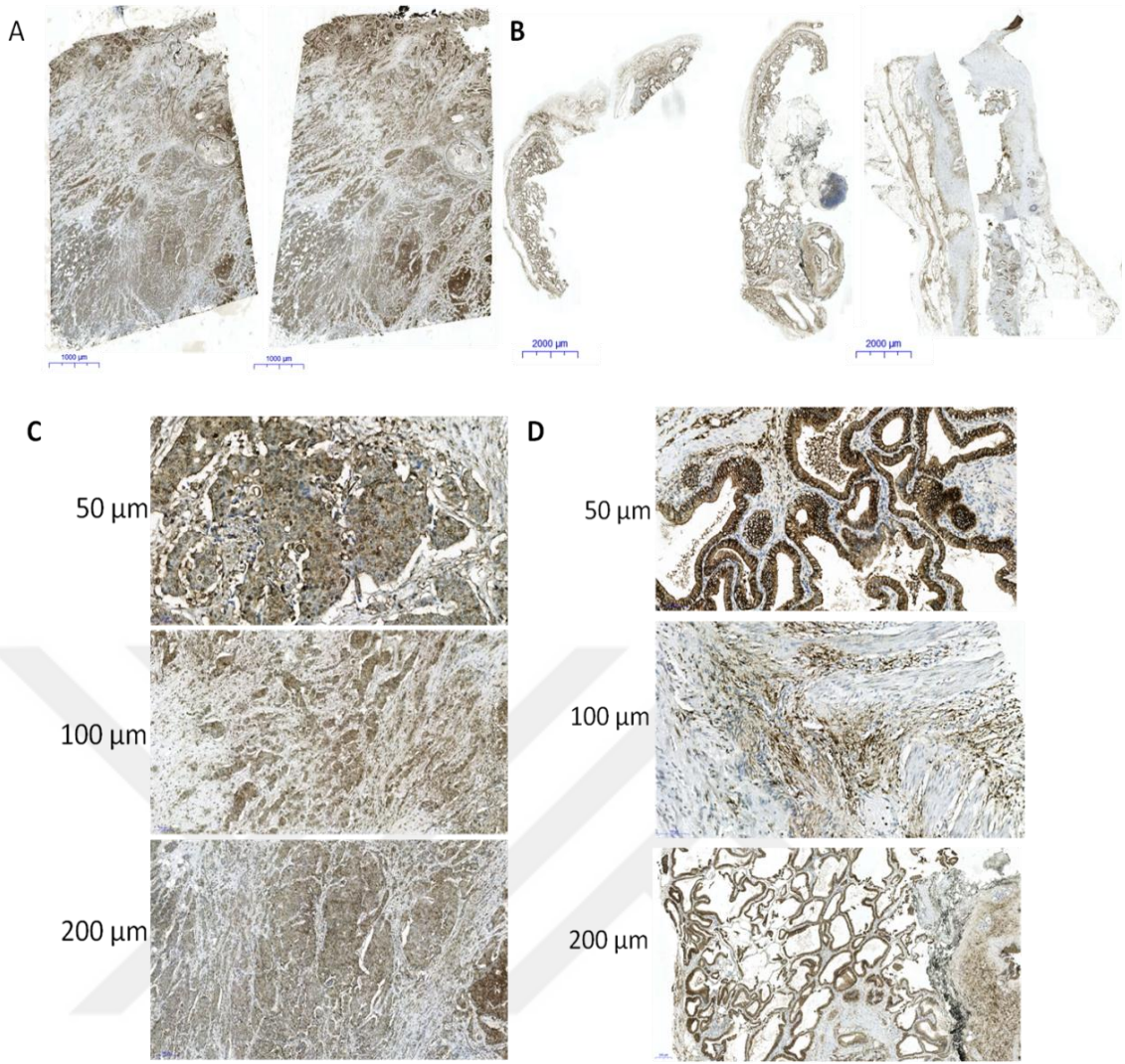
4.5 İmmünohistokimya ile Validasyon

4.5.1 IQGAP1 ve IQGAP2 Antikorlarının Optimizasyonu

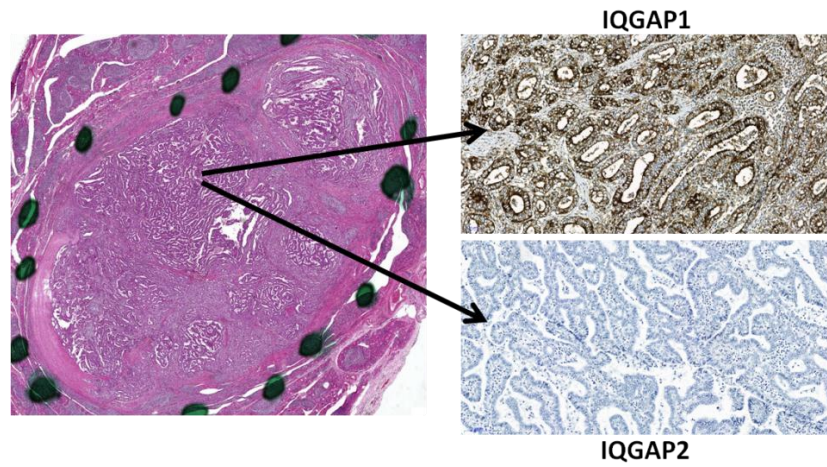
IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarını CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP dokularında incelemeden önce optimizasyon için çalışmaları yapılmıştır. Bu optimizasyon çalışmalarına göre, her iki antikor için antijen geri kazanımı süreleri, antikor dilüsyonu ve antikor ile muamele süreleri optimize edilmiştir. Optimizasyon için yöntemde belirtildiği üzere IQGAP1 antikoru için meme kanseri dokusu, IQGAP2 antikor için ise safra kesesi dokusu kullanılmıştır. Optimizasyon sonucunda IQGAP1 ve IQGAP2 antikoru optimizasyon için seçilen meme kanseri ve safra kesesi dokularını homojen bir şekilde boyamıştır (Şekil 35).

4.5.2 IQGAP1 ve IQGAP2 Antikorlarının Tiroid Dokularına Uygulanması

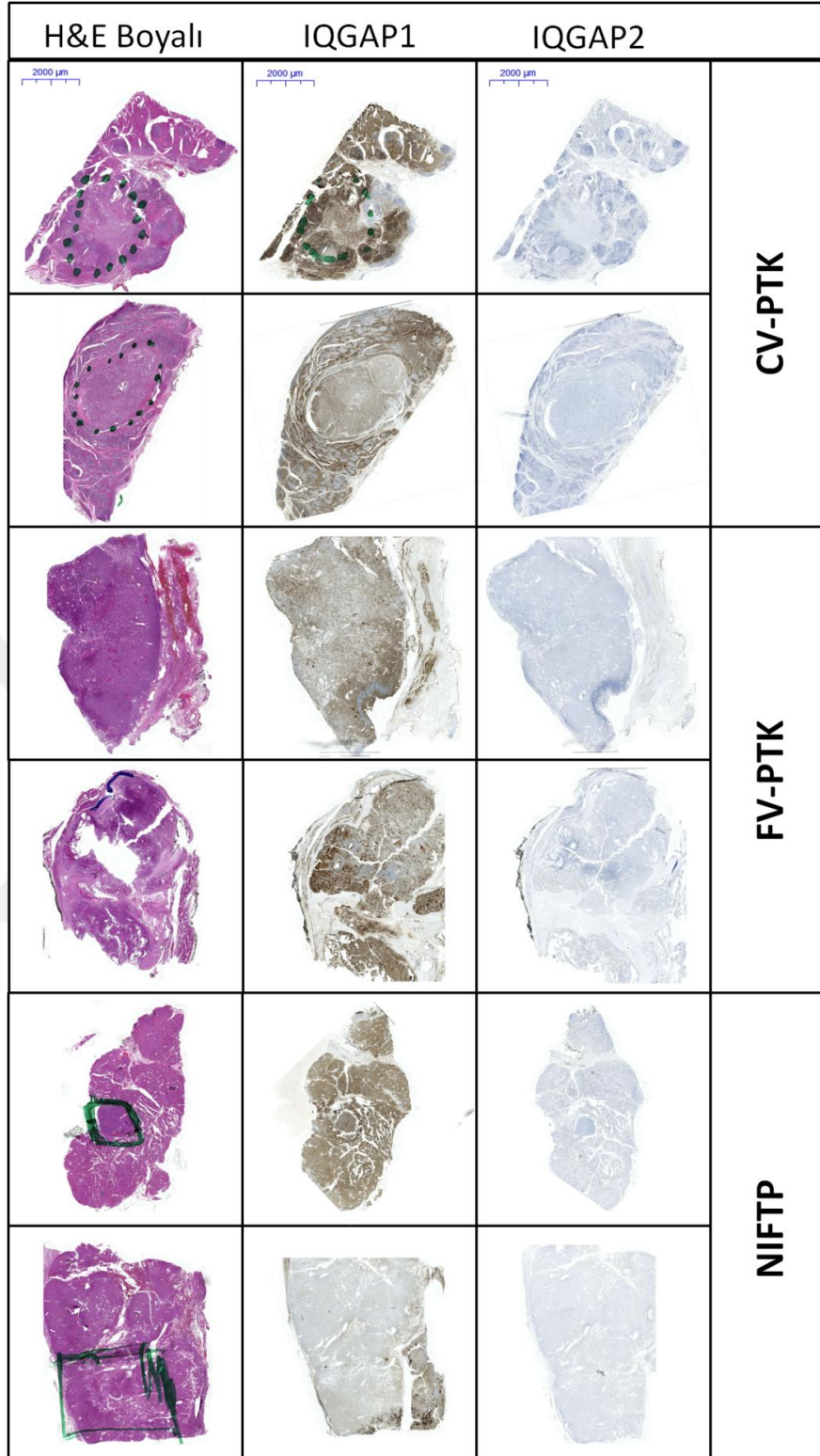
IQGAP1 ve IQGAP2 antikorları CV-PTK (n=13), FV-PTK (n=13) ve NIFTP (n=13) dokularında çalışılmıştır. IQGAP1 antikoru özellikle CV-PTK vakalarında belirgin ve homojen sitoplazmik boyama göstermiştir. IQGAP1 antikoru, FV-PTK ve NIFTP vakalarında da boyama göstermiştir. Tüm vakalarda ortak olarak ise özellikle kolloidin boyandığı gözlenmiştir. IQGAP2 antikorusunun ise CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP vakalarında boyama yapmadığı gözlenmiştir. Şekil 36'da örnek olarak seçilmiş CV-PTK dokusunda IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının boyaması detaylı olarak gösterilmiştir. Şekil 37'de CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP vakalarına ait ikişer örnek H&E boyalı görüntüleri ile birlikte verilmiştir.



Şekil 35. IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının İHK optimizasyonu (A,C) IQGAP1 antikorunun (1:300) meme kanseri dokusundaki görüntüsü (B,D) IQGAP2 antikorunun (1:300) safra kesesi dokusundaki görüntüsü



Şekil 36. CV-PTK dokusunun tümör odağında IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının immünohistokimyasal boyaması



Şekil 37. IQGAP1 ve IQGAP2 antikorlarının CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP vakalarında immünohistokimya boyaması

5. TARTIŞMA/SONUÇ

PTK, klinikte en sık rastlanan (%80) tiroid kanseridir. PTK'nın tanısında altın standard yöntem İİAB olmasına rağmen bazı alt varyantların tanısı kolaylıkla yapılamamaktadır. Özellikle, FV-PTK'nın çekirdek özellikleri diğer varyantlara kıyasla daha silik/belirsiz olduğu için tiroid patolojisinde öznel ve tartışmalı tanıya neden olmaktadır. Ancak 2016 yılında, tiroid patolojisindeki tartışmaların sonucunda Nikiforov ve arkadaşları invazif olmayan enkapsüle FV-PTK vakalarını NIFTP olarak adlandırmış ve tanı ölçütlerinde değişiklikler yapmışlardır (5). Tanıdaki bu değişiklikten sonra, toplanan tüm FV-PTK vakaları iki ayrı patalog tarafından yeni kriterlere göre yeniden değerlendirilmiş ve bazı vakalar NIFTP olarak sınıflandırılmıştır. Ancak, FV-PTK ve NIFTP ile ilgili tartışmalar halen devam etmektedir (142). FV-PTK hakkında devam eden tartışmalar ve noninvazif FV-PTK'nin "NIFTP" olarak yeniden sınıflandırılması FV-PTK'nın doğru tanısının tiroid patolojisinde ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bu çalışmada, histopatolojik olarak karakterizasyonu zor olan FV-PTK'nın ayırıcı tanısına katkı sağlayacak potansiyel protein/peptid biyobelirteçlerinin bulunması amaçlanmıştır.

Yöntemde belirtildiği üzere hem taze dondurulmuş doku, hem de aynı hastaların FFPE blokları kullanılmıştır. Çalışmada taze dondurulmuş dokulardan, 2 boyutlu jel elektroforezi ve LC-MS/MS yöntemi kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. 2 Boyutlu jel elektroforezi çalışmaları, proteomik tekniklerin en temelini oluşturmaktadır. Ancak, özellikle membran proteinleri, bazik proteinler ve organel proteinlerinin 2 boyutlu jel elektroforezi ile görüntülenmesi kolaylıkla yapılamamaktadır (138,139). Ayrıca, tiroid proteomunda bulunan ve miktarı 75 mg/ml'ye kadar çıkabilen tiroglobulin proteini, hastalıkların ayırıcı tanısında önemli olan ve daha az miktarda bulunan birçok proteini maskeleymektedir (143). Bunun dışında, tiroid hormonu sentezinin gerçekleştiği kolloid yapısının tiroid dokusunda bol bulunması ve tiroid hücrelerinin sitoplazmasının az olması özellikle 2 boyutlu jel elektroforezi çalışmaları için sorun teşkil etmektedir. İki boyutlu jel elektroforezinin

eksik kaldığı bu noktaları tamamlamak amacıyla, 'label free quantification' ile bir çalışma seti (CV-PTK (n=6), FV-PTK (n=6) ve benign (n=6)) havuz oluşturmada Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) cihazı ile analiz edilmiştir. Bu sayede, 2 boyutlu jel elektroforezi ile belirlenemeyen proteinler hakkında daha detaylı bilgi edinilmiştir. LC-MS/MS çalışmasından elde edilen ve ayırıcı tanıya katkısı olabileceği düşünülen iki proteinin, IQGAP1 ve IQGAP2, immünohistokimya ile validasyonu CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP dokularında yapılmıştır. Ayrıca, FFPE bloklar kullanılarak MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi analizi yapılmış ve varyantlar arasındaki anlamlı farklı m/z değerleri belirlenmiştir. Aynı zamanda, MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi yardımı ile tümör ve tümör çevresinden gelen farklı peptid sinyalleri belirlenmiş ve tümör, çevre dokulardan başarılı bir şekilde peptid profilleri kullanılarak ayrılmıştır. Ayrıca, FFPE dokular kullanarak çalışma dokularında BRAF V600E mutasyonunun görülme sıklığına bakılmıştır. Literatürde, CV-PTK'da BRAF V600E mutasyonu %35-%70 arasında görüldüğü, FV-PTK'da ise bu oranın yalnızca %5 ile %20 arasında olduğu belirtilmektedir (110). Projede BRAF V600E mutasyon taraması yapılarak, çalışma grubunda bu mutasyonun görülme oranını tespit etmek amaçlanmıştır.

Tiroid patolojisinde biyobelirteç arayışında ilk kullanılan yöntemlerden biri 2 boyutlu jel elektroforezidir. Ancak, tiroid dokusunda limitli sayıda 2 boyutlu jel elektroforezi çalışmaları mevcuttur. Literatürde var olan çalışmalar, genellikle benign ve malign tiroid tümörlerinin protein profillerinin az sayıda örnekleme karşılaştırıldığı çalışmalardır (132,133). Örneğin, Brown ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada 5 PTK dokusundan havuz oluşturulup 2 boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile normal tiroid dokusu ile karşılaştırılmıştır (132). Çalışma sonuçlarına göre papiller tiroid kanserinde S100 kalsiyum-bağlayan protein A6, katepsin B, galectin-3, aneksin 1 proteinlerinin daha yüksek seviyede bulunduğu gösterilmiştir. Aynı grup tarafından 2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada, FTK ve foliküler adenoma arasındaki diferansiyel protein ekspresyonuna odaklanılmıştır (133). Bu çalışmada da 5 FTK ve 6 FA dokusu analiz edilmiştir. Her bir FTK örneği, havuz oluşturulmuş FA protein ekstraktları ile karşılaştırılıp, protein disülfid izomeraz, kalretikulin, katepsin B ve aneksin A3'ün farklı şekilde düzenlendiğini belirtmişlerdir. Literatürdeki bir diğer çalışmada ise 20 soğuk nodülün protein

profilleri normal tiroid dokusu ile karşılaştırılmıştır. Soğuk nodüllerde daha bol miktarda bulunan proteinler 3 fonksiyonel gruba ayrılmıştır. Buna göre genellikle hücre proliferasyonu, tiroglobulin sentezi ve düzenlenmesi, hidrojen perkoksit-detoksifikasyon sisteminde görevli olan proteinlerin soğuk nodüllerde daha bol miktarda bulunduğu belirtilmiştir (144). Literatürde, PTK'nın histolojik varyantlarının protein profillerinin 2 boyutlu jel elektroforezi yöntemi kullanılarak karşılaştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Çalışmanın 2 Boyutlu jel elektroforezi sonucunda elde edilen jellerden yapılan spot analizinde FV-PTK, CV-PTK ve benign dokularda istatistiksel olarak anlamlı spot farklılıklarına rastlanmamıştır. Ancak, bazı spotlar bu jellerden kesilmiş ve tanımlamaları yapılmıştır. Bu tanımlamalar sonucunda, ara flamanlar (intermediate filament) ve yapısal proteinler, endoplazmik retikulum ve mitokondri ile ilişkili proteinler ve proteinlerin katlanmasında görevli şaperon proteinler tanımlanmıştır.

İki boyutlu jel elektroforezi çalışmasında varyantlar arası istatistiksel anlamlı farklı proteinler tespit edilemediği için FV-PTK, CV-PTK ve benign dokuların protein profillerinin daha detaylıca LC-MS/MS yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Literatürde, tiroid kanserinde potansiyel biyobelirteçlerin bulunmasına yönelik yapılan proteomik çalışmalar arasında LC-MS/MS yönteminin kullanıldığı pek fazla çalışma yoktur. Bu alanda yapılan tek çalışma, 2016 yılında Martinez-Aguilar ve arkadaşları tarafından veri-bağımsız kazanç modu kullanılarak foliküler adenoma, foliküler karsinoma ve papiller karsinoma dokularının protein profilleri incelendiği çalışmadır (145). Çalışmanın sonuçlarına göre papiller tiroid kanserinde aktin iskelet proteinleri, hücre kontakt proteinleri ve hücre farklılaşmasında görevli proteinlerde anlamlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Çalışma bu alanda yapılan öncü bir çalışma olmasına rağmen papiller tiroid kanserinin alt varyantlarıyla ilişkili herhangi bir bilgi sunmamaktadır.

Tez çalışmasının LC-MS/MS analiz sonuçlarına göre 2500 protein tanımlanmıştır. Bu analizin dikkat çekici bir sonucu, benign ve FV-PTK arasındaki proteom benzerliği nedeniyle hiyerarşik kümeleme sonucunda FV-PTK'nın doğru bir şekilde kümelendirilemediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, FV-PTK-Benign ve CV-PTK-benign grupları arasındaki ortak proteinler incelendiğinde; FV-PTK ve benign arasında %88 kadar ortak protein olduğu, CV-PTK ve benign arasında ise %65 kadar

ortak protein olduğu gösterilmiştir. FV-PTK ve benign dokular arasındaki ortak proteinlerin sayıca fazlalığı hiyerarşik kümeleme sonucunda FV-PTK'nın benign dokulardan ayrı olarak kümelendirilememesini destekler niteliktedir. Bu sonuç, Nikiforov ve arkadaşları tarafından yayınlanan ve noninvazif PTK'nın düşük nüks riski nedeniyle 'kansere dışı' olarak yeniden sınıflandırıldığı temel yayın ile tutarlıdır (5).

İlginç olarak, enerji metabolizmasını düzenleyen bazı proteinler benign dokuya kıyasla FV-PTK vakalarında artmıştır ($fc \geq 10$). Ancak bu proteinlerin hiçbirisi FDR düzeltilmesi yapıldıktan sonra FV-PTK ve benign arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. FDR düzeltilmesi yapıldıktan sonra, CV-PTK ve FV-PTK vakaları arasındaki proteom karşılaştırması, tüm FV-PTK örneklerinde özellikle 2 proteinin anlamlı şekilde farklılaştığını göstermiştir ($fc \geq 2$, FDR-düzeltilmiş p değeri < 0.0005). Kansere hücresi metabolizmasının ve gen transkripsiyonunun tümörigenez düzenlenmesinde ikili rol sahip olan önemli bir glikolitik enzim olan fosfoglisarat kinaz-1 (PGK1), FV-PTC örneklerinde upregüle olduğu belirlenmiştir. Literatürde, artmış PGK1 ifadesi gastrik, kolon ve pankreas kanserinde bildirilmiştir (146,147).

Yakın bir zamanda Ralhan ve arkadaşları, PGK1 de dahil olmak üzere 7 farklı proteinin tiroide kanserini benign dokudan ayırt etmedeki potansiyel rolünü incelemiştir (148). Çalışma sonuçlarına göre PGK1'in tiroide kanserinde arttığı belirtilmiştir. Ancak çalışma setlerinde 33 FV-PTK olgusu bulunsa da, PGK1 ifadesinin FV-PTK'de nasıl değiştiğine ilişkin spesifik bir bilgi bu literatürde mevcut değildir. Bununla birlikte, bu tez çalışmasında PGK1'in FV-PTK'da artması ve bu proteinin CV-PTK'de azalması Ralhan ve arkadaşlarının bulguları ile tutarlıdır (148). FV-PTK vakalarında artış gösteren bir başka protein de IQGAP2 proteindir. Literatürde, IQGAP2 ile ilgili yapısal ve işlevsel bilgiler çok sınırlıdır (149). Ancak bilindiği kadarıyla, IQGAP1 ve IQGAP3 homologları gibi IQ motif içeren GTPase-aktif edici proteinlerdendir. Genel olarak, Rho-GTPase ve Ca^{+2} /Kalmodulin sinyallerini birleştirerek hücre adezyonu ve hücre iskeleti organizasyonunu düzenlemektedir (150). FV-PTK'nin özellikleri ve noninvazif FV-PTK'nin NIFTP lezyonları olarak yeniden sınıflandırılması ile birlikte ele alındığında, bu proteinin bu örneklerde daha yüksek oranda bulunması potansiyel bir koruyucu rol işaret edebilir. Özellikle, mide kanseri hücre hatları ve primer mide kanseri dokularında

IQGAP2'nin potansiyel tümör supresör özellikler gösterdiği belirtilmiştir. Örneğin, Jin ve arkadaşları metilasyon yoluyla IQGAP2'nin susturulmasını sağlamış ve IQGAP2 ekspresyonu ile gastrik kanser progresyonu arasında ters ilişki göstermişlerdir (151).

Hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve modülasyonunda önemli rol oynayan ve spesifik molekülere bağlanarak hücre adezyonuna katılan IQGAP1'in bazı kanser türlerinde ifade edildiği iyi bilinmektedir (152,153). Ayrıca, çeşitli raporlar IQGAP1'in tiroid tümörögenezinde rol oynadığını belirtmektedir (153–155). Örneğin Liu ve arkadaşları farklı tiroid kanseri türlerinde IQGAP1 kopya sayısı kazanımını değerlendirerek, IQGAP1 kopya kazanımının tiroid tümörögenezinde önemli bir role sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (156). Çalışma bulgularımızda, IQGAP1'in CV-PTK'da artmış seviyede bulunmasına karşılık, benign ve FV-PTK örneklerinde bu proteinin miktarının değişmediği gösterilmiştir. Genel olarak; CV-PTK'da artmış IQGAP1 proteini seviyesi onkojeniteyi desteklerken, FV-PTK'daki IQGAP2 proteininin daha yüksek seviyesi tümör baskılayıcı özellikleri desteklemektedir. IQGAP1 ve IQGAP2 proteinlerinin FFPE CV-PTK, FV-PTK ve NIFTP dokularında validasyonu ise immünohistokimya yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, proteomik verileriyle uyumlu olarak IQGAP1 antikoru özellikle CV-PTK vakalarında belirgin ve homojen sitoplazmik boyama göstermiştir. Ancak, IQGAP2 antikoru tiroid dokusunda boyama yapmamıştır. Antikoru çalışmasında bir problem olmadığı safra kesesinde yapılan optimizasyon çalışmasıyla gösterilmiştir. Tiroid dokusunda yapılan immünohistokimya çalışmasındaki bir diğer önemli nokta ise, tiroid hormon sentezinin yapıldığı kolloid yapısının nonspesifik olarak antikorlarla boyandığı gösterilmiştir.

String veritabanı kullanılarak yapılan ve bilinen ve öngörülen protein etkileşimlerine göre, CV-PTK (n = 25, FDR p değeri <0.0005) örneklerindeki proteinlerin (n = 25, FDR p değeri <0.0005) özellikle aktin ve hücre iskeleti düzenleyici proteinlerden zenginleştiğini göstermiştir. Özellikle, CV-PTK'de birkaç ARP 2/3 kompleks üyesinin farklılaştığı gösterilmiştir. ARP 2/3 kompleksi aktin polimerizasyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve ARP 2/3 üyelerinin artmış ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde saptanmıştır (157). Bu bulgu, Martinez-Aguilar

ve arkadaşlarının (2016) çok yakın tarihli bir yayını tarafından desteklenmektedir (145). Yazarlar, hücre-hücre temasını düzenleyen ve hücre iskelet dinamiğini aktive eden proteinlerin—özellikle ARP 2/3 kompleksinin üyeleri—papiller tiroid kansinomasında değişime uğradığını göstermişlerdir (145).

MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi, özellikle son yıllarda biyomedikal araştırmalarda kullanılmakta ve farklı hastalık türlerinin çalışılmasında güçlü bir araç haline gelmektedir. MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresinin en önemli avantajı, moleküler ve morfolojik bilgileri bir araya getirmesidir. Bu sayede, farklı moleküler türler –proteinler, peptidler, lipidler, ilaçlar ve bunların metabolitleri- ilgili doku üzerinde görüntülenebilmektedir (158–160). Tiroid kanserinde yapılan MALDI-Görüntüleme çalışmaları özellikle son yıllarda ivme kazanmasına rağmen literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (161,162). Bu çalışmalar yöntemin uygulanabilirliğinin gösterilmesi açısından önem teşkil etse de geniş örneklem büyüklüğünde, yeteri kadar biyolojik ve teknik tekrarın olduğu histopatolojik varyantların detaylıca incelendiği bir çalışma halen mevcut değildir. Tiroid patolojisinde yapılan ilk MALDI-Görüntüleme çalışmasında lenf nodu metastazı olan ve olmayan papiller tiroid kanseri vakalarının protein profilleri incelenmiştir (161). Bu çalışma sonucunda tiredoksin ve kalsiyum kanal proteinlerinin tiroid kanserinin metastatik karakterinin belirlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise doku mikro arrayi kullanılarak benign ve malignant tiroid dokuları arasındaki protein profilleri incelenmiştir (162). Bu çalışmada özellikle yapısal proteinlerin ifadelerinin malignite ile değiştiği gösterilmiştir. Tiroid patolojisinde potansiyel biyobelirteçleri belirlemek için MALDI-Görüntüleme tekniği kullanılarak yapılan literatürdeki çalışmalar son derece değerli olmakla birlikte İİAB sonucu şüpheli olan nodüllerin belirlenmesi için yeterli değildir. Bu tez çalışmasında olduğu gibi papiller tiroid kanserinin alt varyantlarının peptid profillerinin incelendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Yapılan çalışma sonucunda, her bir tümör dokusu için tümör ve tümöre komşu bölgeler yüksek AUC değerleriyle birbirinden ayrılmıştır. MALDI-Görüntüleme kütle spektrometresi sonuçlarına göre, histopatolojik olarak birbirine yakın olan varyantların peptid profilleri karşılaştırıldığında ise, varyantlar histopatolojik olarak birbirine çok yakın olduğu için farklı m/z değerlerine rastlanmamıştır. Ancak tespit

edilen m/z değerleri arasında 30 adet anlamlı farklı sinyal yoğunluğuna sahip peptid belirlenmiştir.

Projenin son basamağında, çalışma grubundaki dokularda BRAF V600E mutasyonunun görülme sıklığı belirlenmiştir. Literatürde, CV-PTK vakalarında BRAF V600E mutasyonunun görülme sıklığı %35-%70 arasında verilmektedir (110). FV-PTK vakalarında ise bu oranın yalnızca %5-%20 arasında görüldüğü belirtilmektedir (110). Örneğin, Kebebew ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 245 CV-PTK ve 29 FV-PTK vakasındaki BRAF V600E mutasyonunun görülme sıklığı araştırılmıştır. Buna göre, CV-PTK vakalarının %51'inin bu mutasyonu taşıdığı, FV-PTK vakalarının ise %24'unun bu mutasyonu taşıdığı saptanmıştır (163). Bu tez çalışmasında ise, CV-PTK tanısı alan örneklerin %67,9'unda BRAF V600E mutasyonu saptanmıştır. 2016 yılında FV-PTK vakalarındaki tanı değişikliğinden sonra, çalışma grubumuzda tanısı NIFTP olarak değiştirilen vakaların %15,4'ünde BRAF V600E mutasyonu tespit edilmiştir. Aynı oranda (%15,4) BRAF V600E mutasyonu tanısı FV-PTK olarak kalan örneklerde de tespit edilmiştir. NIFTP tanısı ile tiroid patolojisinde başlayan süreç son derece yeni olduğu için bu vakalarda yapılan BRAF V600E mutasyon taraması önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, tiroid patolojisinde hala gri bir alan olan FV-PTK ve yeniden tanımlanarak NIFTP adını alan vakaların ayırıcı tanısına katkıda bulunmak üzere yapılan proje sonucunda özellikle aktin iskelet proteinlerinin oldukça değiştiği ve PTK'nın progresyonunda hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinin baskın bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Projedeki proteomik tekniklerin ve genomik yaklaşımın bu alanda var olan soru işaretlerinin giderilmesine destek olduğu düşünülmektedir. Tiroid bezinin doğası gereği—az sitoplazmalı küçük hücreler, tiroid hormonlarının sentezinin gerçekleştiği kolloid yapısı, bol miktarda bulunan (high abundant) tiroglobulin proteini—özellikle bazı tekniklerin uygulanmasını zorlaştırmıştır. Ancak kullanılan en ileri proteomik teknikler sayesinde hem ayırıcı tanıya katkısı olabilecek proteinler LC-MS/MS yöntemi ile detaylıca araştırılmıştır, hem de kütle spektrometresinin analitik gücü ve histoloji ile birleştirilerek uygulanan MALDI-Görüntüleme tekniği sayesinde ayırıcı tanıya katkısı olabilecek anlamlı farklı peptidler belirlenmiştir. FV-PTK vakalarında IQGAP2 antikorunun

immünohistokimya sonuçlarında istenilen hedeflere ulaşılamamış olsa da, ilerleyen çalışmalarda bu proteinin mRNA düzeyinde olası epigenetik düzenlemeler ile birlikte araştırılması düşünülmektedir.



6.KAYNAKLAR

1. Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2016 Nov;12(11):646–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.110>
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014 National [Internet]. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2016. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/
3. Ozpinar A, Kelestimur F, Songur Y, Can O, Valentin L, Caldwell K, et al. Iodine Status in Turkish Populations and Exposure to Iodide Uptake Inhibitors. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2014 Feb 5;9(2):e88206. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088206>
4. T.C. Sağlık Bakanlığı HSGMKDB. Türkiye’de Kanser Kayıtlılığı [Internet]. [cited 2017 Dec 20]. Available from: <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-turkiyede-kanser-kayitcigi.html>
5. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LDR, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol*. United States; 2016 Aug;2(8):1023–9.
6. Mito JK, Alexander EK, Angell TE, Barletta JA, Nehs MA, Cibas ES, et al. A modified reporting approach for thyroid FNA in the NIFTP era: A 1-year institutional experience. *Cancer*. United States; 2017 Nov;125(11):854–64.
7. You S-H, Lee KE, Yoo R-E, Choi HJ, Jung KC, Won J-K, et al. Prevention of total thyroidectomy in noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP) based on combined interpretation of ultrasonographic and cytopathologic results. *Clin Endocrinol (Oxf)*. England; 2017 Sep;
8. Daniels GH. Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Hybrid or Mixture? *Thyroid* [Internet]. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: Mary Ann Liebert, Inc.; 2016 Jul 1;26(7):872–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4939382/>
9. Baloch ZW, Livolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol*. England; 2002 Jan;117(1):143–50.
10. Leoutsakos V. A short history of the thyroid gland. *Hormones (Athens)*.

Greece; 2004;3(4):268–71.

11. Hamdy RC. The thyroid gland: a brief historical perspective. Vol. 95, Southern medical journal. United States; 2002. p. 471–3.
12. Lectures N. Theodor Kocher - Biographical [Internet]. Elsevier Publishing Company. 1967 [cited 2017 Dec 20]. p. 1901–21. Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1909/kocher-bio.html
13. Stathatos N. Anatomy and Physiology of the Thyroid Gland BT - Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management. In: Wartofsky L, Van Nostrand D, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2006. p. 3–7. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-59259-995-0_1
14. UK T. The Thyroid Gland - An Overview [Internet]. [cited 2017 Dec 20]. Available from: http://www.thyroiduk.org.uk/tuk/about_the_thyroid/thyroid_overview.html
15. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. J Clin Invest [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2012 Sep 4;122(9):3035–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433956/>
16. Nobel Lectures Edward C . Kendall - Biographical [Internet]. Elsevier Publishing Company. 1964 [cited 2017 Dec 20]. Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1950/kendall-bio.html
17. Tata JR. Looking for the Mechanism of Action of Thyroid Hormone. J Thyroid Res [Internet]. 2011;2011:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jtr/2011/730630/>
18. Leung AM, Avram AM, Brenner A V, Duntas LH, Ehrenkranz J, Hennessey J V, et al. Potential risks of excess iodine ingestion and exposure: statement by the american thyroid association public health committee. Vol. 25, Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. United States; 2015. p. 145–6.
19. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği TÇG. Tiroid Hastalıkları Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2015. 5. Baskı. Ankara-Türkiye: Türkiye Klinikleri Yayın; 2015.
20. Bizhanova A, Kopp P. The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid. Endocrinology [Internet]. The Endocrine Society; 2009 Mar 5;150(3):1084–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654752/>
21. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, et al. Characterization of the thyroid Na(+)/I(–) symporter with an anti-COOH terminus antibody. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. The National Academy of Sciences of the USA; 1997 May 27;94(11):5568–73. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20819/>

22. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet. United States*; 1999 Apr;21(4):440–3.
23. Molina F, Pau B, Granier C. The type-1 repeats of thyroglobulin regulate thyroglobulin degradation and T3, T4 release in thyrocytes. *FEBS Lett [Internet]*. 1996 Aug 12;391(3):229–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00708-9](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(96)00708-9)
24. Miot F, Dupuy C, Dumont JE, Rousset BA. Chapter 2 : Thyroid Hormone Synthesis and Secretion. In: *Endotext [Internet] [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDText.com; 2015. p. 1–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285550/?report=classic>
25. Rousset B, Mornex R. The thyroid hormone secretory pathway--current dogmas and alternative hypotheses. *Mol Cell Endocrinol. Ireland*; 1991 Jun;78(1–2):C89-93.
26. Delbridge TPWM and LW. Thyroid Embryology, Anatomy, and Physiology: A Review for the Surgeon. In: Hubbard JGH, Inabnet WB, Lo C-Y, editors. *Endocrine Surgery*. Springer US; 2009. p. 71–81.
27. Bassett JHD, Williams GR. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocr Rev [Internet]*. Washington, DC: Endocrine Society; 2016 Apr 10;37(2):135–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4823381/>
28. Dumitrescu AM, Liao X-H, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet. United States*; 2004 Jan;74(1):168–75.
29. Leung AM, Braverman LE. Consequences of excess iodine. *Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.*; 2013 Dec 17;10:136. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.251>
30. WOLFF J, CHAIKOFF IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem. United States*; 1948 Jun;174(2):555–64.
31. Regulation of Thyroid Hormone Production. UpToDate.
32. Kim H-Y, Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. *Bone Res [Internet]*. Sichuan University; 2013;1(2):146–61. Available from: <http://www.nature.com/articles/boneres201311>
33. Forrest D, Sjöberg M, Vennström B. Contrasting developmental and tissue-

- specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes. *EMBO J* [Internet]. 1990 May;9(5):1519–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC551844/>
34. Yamauchi K. Thyroid Hormones. Takei Y, T. *Handbook of Hormones*. Elsevier Inc.; 2013. 493-494 p.
 35. Chassande O. Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions? *J Mol Endocrinol*. England; 2003 Aug;31(1):9–20.
 36. Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. England; 2003 Jan;4(1):46–56.
 37. Bergh JJ, Lin H-Y, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*. United States; 2005 Jul;146(7):2864–71.
 38. Davis PJ, Davis FB, Cody V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab*. United States; 2005 Nov;16(9):429–35.
 39. Patel J, Landers K, Li H, Mortimer RH, Richard K. Thyroid hormones and fetal neurological development. *J Endocrinol*. England; 2011 Apr;209(1):1–8.
 40. Hage MP, Azar ST. The Link between Thyroid Function and Depression. *J Thyroid Res* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2012 Dec 14;2012:590648. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3246784/>
 41. Palacios-Romero R, Mowbray J. Evidence for the rapid direct control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine in rats. *Biochem J*. England; 1979 Dec;184(3):527–38.
 42. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol*. England; 2001 Feb;26(1):67–77.
 43. Kim B. Thyroid Hormone as a Determinant of Energy Expenditure and the Basal Metabolic Rate. *Thyroid* [Internet]. 2008;18(2):141–4. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/thy.2007.0266>
 44. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. United States; 2006 Apr;86(2):435–64.
 45. Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev* [Internet]. Bethesda, MD: American Physiological Society; 2014 Apr;94(2):355–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4044302/>
 46. Song Y, Yao X, Ying H. Thyroid hormone action in metabolic regulation. *Protein Cell* [Internet]. 2011;2(5):358–68. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1046-x>

47. Sinha RA, Singh BK, Yen PM. Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. United States; 2014 Oct;25(10):538–45.
48. Chidakel A, Mentuccia D, Celi FS. Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis. *Thyroid*. United States; 2005 Aug;15(8):899–903.
49. Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. *Int J Obes*. 2000;24:S109–12.
50. Rizos C V, Elisaf MS, Liberopoulos EN. Effects of Thyroid Dysfunction on Lipid Profile. *Open Cardiovasc Med J* [Internet]. Bentham Open; 2011 Feb 24;5:76–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109527/>
51. Blum JW, Gingins M, Vitins P, Bickel H. Thyroid hormone levels related to energy and nitrogen balance during weight loss and regain in adult sheep. *Acta Endocrinol (Copenh)*. Denmark; 1980 Apr;93(4):440–7.
52. Pitt-Rivers R, Tata JR. *The Thyroid Hormones*. 1st ed. Callow RK, Campbell PN, Datta SP, editors. Elsevier Ltd; 1959. 262 p.
53. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, et al. Guidelines for the Treatment of Hypothyroidism: Prepared by the American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. *Thyroid* [Internet]. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: Mary Ann Liebert, Inc.; 2014 Dec 1;24(12):1670–751. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267409/>
54. ID L, TF D, MJ S. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. 11th ed. *Williאלms Textbook of Endocrinology*. Elsevier; 2008. 299-332 p.
55. Koulouri O, Moran C, Halsall D, Chatterjee K, Gurnell M. Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests(). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. Elsevier; 2013 Dec;27(6):745–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857600/>
56. Biondi B. The Normal TSH Reference Range: What Has Changed in the Last Decade? *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Sep 1;98(9):3584–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-2760>
57. Wang D, Stapleton HM. ANALYSIS OF THYROID HORMONES IN SERUM BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2010 Jul 1;397(5):1831–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082288/>
58. Association AT. Thyroid Function Tests [Internet]. [cited 2017 Dec 20]. Available from: <https://www.thyroid.org/thyroid-function-tests/>
59. Smith BR, Sanders J, Furmaniak J. TSH receptor antibodies. *Thyroid*. United

States; 2007 Oct;17(10):923–38.

60. Grayson RR. Factors which influence the radioactive iodine thyroidal uptake test. *Am J Med* [Internet]. 1960;28(3):397–415. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934360901716>
61. Association AT. Radioactive Iodine [Internet]. [cited 2017 Dec 20]. Available from: <https://www.thyroid.org/radioactive-iodine/>
62. SD C, FS G, PW L. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology , Ninth Edition (LANGE Clinical Medicine) 9th Edition. In: DG G, D S, editors. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. Lange Mc Graw Hill; 2007. p. 209–80.
63. Fatourechi V. Subclinical Hypothyroidism: An Update for Primary Care Physicians. *Mayo Clin Proc* [Internet]. Mayo Foundation for Medical Education and Research; 2009 Jan;84(1):65–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2664572/>
64. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*. United States; 2002 Feb;87(2):489–99.
65. Chu JW, Crapo LM. The treatment of subclinical hypothyroidism is seldom necessary. *J Clin Endocrinol Metab*. United States; 2001 Oct;86(10):4591–9.
66. Gharib H, Tuttle RM, Baskin HJ, Fish LH, Singer PA, McDermott MT. Consensus Statement #1: Subclinical thyroid dysfunction: a joint statement on management from the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Thyroid Association, and The Endocrine Society. *Thyroid*. United States; 2005 Jan;15(1):23–4.
67. Kostoglou-Athanassiou I, Ntalles K. Hypothyroidism - new aspects of an old disease. *Hippokratia* [Internet]. LITHOGRAPHIA Antoniadis I.-Psarras Th. G.P.; 2010;14(2):82–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895281/>
68. Almandoz JP, Gharib H. Hypothyroidism: etiology, diagnosis, and management. *Med Clin North Am*. United States; 2012 Mar;96(2):203–21.
69. Santos Palacios S, Pascual-Corrales E, Galofre JC. Management of Subclinical Hyperthyroidism. *Int J Endocrinol Metab* [Internet]. Kowsar; 2012 Apr 20;10(2):490–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3693616/>
70. Diez JJ. Hyperthyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and management. *Gerontology*. Switzerland; 2003;49(5):316–23.
71. Fatourechi V. Hyperthyroidism. *Endocrinol Diabetes A Probl Approach*.

2014;9781461486:1–557.

72. Sakiyama R. Thyroiditis: a clinical review. *Am Fam Physician*. United States; 1993 Sep;48(4):615–21.
73. Li Y, Nishihara E, Kakudo K. Hashimoto's thyroiditis: Old concepts and new insights. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(1):102–7.
74. Association AT. Postpartum Thyroiditis.
75. Ozpinar A. Çevresel Guatrojenler (NIS İnhibitörleri) ve Subklinik Hipotiroidizm. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Derg*. 2010;1(4):214–9.
76. Vitti P. Iodine Deficiency Disorders [Internet]. UpToDate. 2017 [cited 2017 Dec 21]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/iodine-deficiency-disorders>
77. Unicef WS for C. World Declaration on the Survival, Protection and Development of Children [Internet]. 1990 [cited 2017 Dec 21]. p. 1–7. Available from: <https://www.unicef.org/wsc/declare.htm>
78. Leung AM, Braverman LE, Pearce EN. History of U.S. Iodine Fortification and Supplementation. *Nutrients* [Internet]. MDPI; 2012 Nov 13;4(11):1740–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509517/>
79. Srinivasan A, Viraraghavan T. Perchlorate: Health Effects and Technologies for Its Removal from Water Resources. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. Molecular Diversity Preservation International (MDPI); 2009 Apr 14;6(4):1418–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681191/>
80. Agency U. EP. Perchlorate in Drinking Water [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 21]. Available from: <https://www.epa.gov/dwstandardsregulations/perchlorate-drinking-water>
81. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. United States; 2003 Feb;24(1):48–77.
82. Dohan O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na⁺/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2007 Dec;104(51):20250–5.
83. Luepker R V, Pechacek TF, Murray DM, Johnson CA, Hund F, Jacobs DR. Saliva thiocyanate: a chemical indicator of cigarette smoking in adolescents. *Am J Public Health* [Internet]. 1981 Dec;71(12):1320–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1619960/>
84. Laurberg P, Andersen S, Knudsen N, Ovesen L, Nohr SB, Bulow Pedersen I. Thiocyanate in food and iodine in milk: from domestic animal feeding to improved understanding of cretinism. *Thyroid*. United States; 2002

Oct;12(10):897–902.

85. Registry A for TS and D. Nitrate / Nitrite Toxicity What Is the Biologic Fate of Nitrates and Nitrites in the Body ? [Internet]. 2013 [cited 2017 Dec 21]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=28&po=9>
86. Association AT. Thyroid Nodules [Internet]. [cited 2017 Dec 21]. Available from: <https://www.thyroid.org/thyroid-nodules/>
87. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* [Internet]. 2011 Sep 1;99(1):39–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldr030>
88. Barbaro D, Incensati RM, Materazzi G, Boni G, Grosso M, Panicucci E, et al. The BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer with positive or suspected pre-surgical cytological finding is not associated with advanced stages or worse prognosis. *Endocrine*. United States; 2014 Apr;45(3):462–8.
89. Fayaz S, Fard-Esfahani P, Torbati PM. Lack of CHEK2 gene mutations in differentiated thyroid carcinoma patients using high resolution melting analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. Thailand; 2014;15(12):5019–22.
90. Carling T, Udelsman R. Thyroid cancer. *Annu Rev Med*. United States; 2014;65:125–37.
91. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017;67(1):7–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21387>
92. Furukawa K, Preston D, Funamoto S, Yonehara S, Ito M, Tokuoka S, et al. Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. *Int J cancer*. United States; 2013 Mar;132(5):1222–6.
93. Nikiforov YE. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol*. United States; 2006;17(4):307–17.
94. Shah JP. Thyroid Carcinoma: Epidemiology, Histology, and Diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol* [Internet]. 2015 Apr;13(4 Suppl 4):3–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526593/>
95. Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, Bible KC, Brierley JD, Burman KD, et al. American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid* [Internet]. 2012;22(11):1104–39. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/thy.2012.0302>
96. Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. England; 2010 Aug;22(6):486–97.
97. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-

- refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res. United States*; 2009 Jun;69(11):4885–93.
98. Association AT. Anaplastic Thyroid Cancer [Internet]. American Cancer Society Inc. [cited 2017 Dec 18]. Available from: <https://www.thyroid.org/anaplastic-thyroid-cancer/>
 99. Şengöz T, Çubuk R, Kaya H, Aribal E. Tiroid Nodüllerinde Ultrason Rehberliğinde İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi. *Düzce Tıp Fakültesi Derg.* 2009;11(2):26–32.
 100. Eyibilen A, Aladag I, Guven M, Koseoglu RD. Tiroid papiller karsinomunun kapsüllü folliküler varyantında cerrahi yaklaşım : Üç olgu sunumu. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2008;18(6):384–8.
 101. Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G. Differentiated thyroid cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2009 May 1;20(suppl_4):iv143-iv146. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdp156>
 102. Roy M, Chen H, Sippel RS. Current Understanding and Management of Medullary Thyroid Cancer. *Oncologist* [Internet]. Durham, NC, USA: AlphaMed Press; 2013 Oct 13;18(10):1093–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3805151/>
 103. Podda M, Saba A, Porru F, Reccia I, Pisanu A. Follicular thyroid carcinoma: differences in clinical relevance between minimally invasive and widely invasive tumors. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2015;13(1):193. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0612-8>
 104. Fischer S, Asa SL. Application of immunohistochemistry to thyroid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med. United States*; 2008 Mar;132(3):359–72.
 105. Parente DN, Kluijfhout WP, Bongers PJ, Verzijl R, Devon KM, Rotstein LE, et al. Clinical Safety of Renaming Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Is NIFTP Truly Benign? *World J Surg. United States*; 2017 Aug;
 106. Rusinek D, Chmielik E, Krajewska J, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, Czarniecka A, et al. Current Advances in Thyroid Cancer Management. Are We Ready for the Epidemic Rise of Diagnoses? *Int J Mol Sci. Switzerland*; 2017 Aug;18(8).
 107. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;24(S2):S34–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.167>
 108. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013 Mar;13(3):184–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3791171/>

109. Grogan RH, Mitmaker EJ, Clark OH. The evolution of biomarkers in thyroid cancer-from mass screening to a personalized biosignature. *Cancers (Basel)*. Switzerland; 2010 May;2(2):885–912.
110. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. United States; 2007 Dec;28(7):742–62.
111. Lloyd R V, Buehler D, Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head Neck Pathol* [Internet]. Boston: Springer US; 2011 Mar 8;5(1):51–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037461/>
112. Krause K, Jessnitzer B, Fuhrer D. Proteomics in thyroid tumor research. *J Clin Endocrinol Metab*. United States; 2009 Aug;94(8):2717–24.
113. Bieglmayer C, Vierhapper H, Dudczak R, Niederle B. Measurement of calcitonin by immunoassay analyzers. *Clin Chem Lab Med*. Germany; 2007;45(5):662–6.
114. Makki FM, Taylor SM, Shahnava A, Leslie A, Gallant J, Douglas S, et al. Serum biomarkers of papillary thyroid cancer. *J Otolaryngol - Head Neck Surg* [Internet]. BioMed Central; 2013 Feb 7;42(1):16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3651213/>
115. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics*. 2012;2012.
116. Cash P. Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis*. Germany; 2000 Apr;21(6):1187–201.
117. Di Girolamo F, Muraca M, Mazzina O, Lante I, Dahdah L. Proteomic applications in food allergy: food allergenomics. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. United States; 2015 Jun;15(3):259–66.
118. Savaryn JP, Catherman AD, Thomas PM, Abecassis MM, Kelleher NL. The emergence of top-down proteomics in clinical research. *Genome Med* [Internet]. 2013;5(6):53. Available from: <https://doi.org/10.1186/gm457>
119. Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2008 Oct;12(5):483–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2642903/>
120. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. United States; 1975 May;250(10):4007–21.
121. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics* [Internet]. Springer; 2014 Apr 15;11(1):16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3996944/>
122. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first

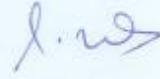
- century. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2003 Feb 1;2:140. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1011>
123. Lectures N. Nobel Prize in Chemistry 2002 [Internet]. [cited 2017 Dec 18]. Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/popular.html
 124. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem* [Internet]. 2012;2012:1–40. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/>
 125. Weickhardt C, Moritz F, Grotemeyer J. Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev. United States*; 1996;15(3):139–62.
 126. Andersen UN, Colburn AW, Makarov AA, Raptakis EN, Reynolds DJ, Derrick PJ, et al. In-series combination of a magnetic-sector mass spectrometer with a time-of-flight quadratic-field ion mirror. *Rev Sci Instrum* [Internet]. American Institute of Physics; 1998 Apr 1;69(4):1650–60. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.1148822>
 127. Douglas DJ, Frank AJ, Mao D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev. United States*; 2005;24(1):1–29.
 128. Karpievitch Y V, Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat.* 2011;4(4):1797–823.
 129. Ucal Y, Durer ZA, Atak H, Kadioglu E, Sahin B, Coskun A, et al. Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta. Netherlands*; 2017 Jul;1865(7):795–816.
 130. Eravci M, Mansmann U, Broedel O, Weist S, Buetow S, Brunkau C, et al. Strategies for a Reliable Biostatistical Analysis of Differentially Expressed Spots from Two-Dimensional Electrophoresis Gels Strategies for a Reliable Biostatistical Analysis of Differentially Expressed Spots from Two-Dimensional Electrophoresis Gels. *J Proteome Res.* 2009;
 131. Benzonase endonuclease-EMD Millipore [Internet]. [cited 2016 Oct 25]. Available from: http://www.emdmillipore.com/US/en/product/Benzonase-Nuclease,-Purity-%3E-90%25,EMD_BIO-70746
 132. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, Netea-Maier RT, Chiang SA, Heinz DE, et al. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog. United States*; 2006 Aug;45(8):613–26.
 133. Netea-Maier RT, Hunsucker SW, Hoevenaars BM, Helmke SM, Slootweg PJ, Hermus AR, et al. Discovery and validation of protein abundance differences

- between follicular thyroid neoplasms. *Cancer Res. United States*; 2008 Mar;68(5):1572–80.
134. Netea-Maier RT, Hunsucker SW, Hoevenaars BM, Helmke SM, Slootweg PJ, Hermus AR, et al. Discovery and validation of protein abundance differences between follicular thyroid neoplasms. *Cancer Res.* 2008;68(5):1572–80.
 135. Lewis M. Brown¹, Steve M. Helmke², Stephen W. Hunsucker¹, Romana T. Netea-Maier⁵, Simon A. Chiang¹, David E. Heinz³, Kenneth R. Shroyer^{3, 4}, Mark W. Duncan^{1, 2, 4} and BRH. Quantitative and Qualitative Differences in Protein Expression Between Papillary Thyroid Carcinoma and Normal Thyroid Tissue†. 2006;45(8):613–26.
 136. Kane LA, Yung CK, Agnetti G, Neverova I, Van Eyk JE. Optimization of paper bridge loading for 2-DE analysis in the basic pH region: application to the mitochondrial subproteome. *Proteomics. Germany*; 2006 Nov;6(21):5683–7.
 137. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc. England*; 2007;2(8):1896–906.
 138. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J Proteomics [Internet]*. 2011 Sep 6;74(10):1829–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911002545>
 139. Chandramouli K, Qian P-Y. Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Hum Genomics Proteomics [Internet]*. SAGE-Hindawi Access to Research; 2009 Dec 8;2009:239204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950283/>
 140. Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen J V, et al. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc. England*; 2009;4(5):698–705.
 141. Casadonte R, Caprioli RM. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2012;6(11):1695–709.
 142. Scharpf J, Kamani D, Sadow PM, Randolph GW. The follicular variant of papillary thyroid cancer and noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP). *Curr Opin Oncol. United States*; 2017 Jan;29(1):20–4.
 143. Krause K, Jeßnitz B, Fuhrer D. Proteomics in thyroid tumor research. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(8):2717–24.
 144. Krause K, Karger S, Schierhorn A, Poncin S, Many M-C, Fuhrer D. Proteomic profiling of cold thyroid nodules. *Endocrinology. United States*; 2007 Apr;148(4):1754–63.

145. Martinez-Aguilar J, Clifton-Bligh R, Molloy MP. Proteomics of thyroid tumours provides new insights into their molecular composition and changes associated with malignancy. *Sci Rep. England*; 2016 Mar;6:23660.
146. Zieker D, Buhler S, Ustundag Z, Konigsrainer I, Manncke S, Bajaeifer K, et al. Induction of tumor stem cell differentiation--novel strategy to overcome therapy resistance in gastric cancer. *Langenbeck's Arch Surg. Germany*; 2013 Apr;398(4):603–8.
147. Jung Y, Shiozawa Y, Wang J, Wang J, Wang Z, Pedersen EA, et al. Expression of PGK1 by prostate cancer cells induces bone formation. *Mol Cancer Res. United States*; 2009 Oct;7(10):1595–604.
148. Ralhan R, Veyhl J, Chaker S, Assi J, Alyass A, Jeganathan A, et al. Immunohistochemical Subcellular Localization of Protein Biomarkers Distinguishes Benign from Malignant Thyroid Nodules: Potential for Fine-Needle Aspiration Biopsy Clinical Application. *Thyroid. United States*; 2015 Nov;25(11):1224–34.
149. White CD, Brown MD, Sacks DB. IQGAPs in Cancer: A Family of Scaffold Proteins Underlying Tumorigenesis. *FEBS Lett [Internet]*. 2009 Jun 18;583(12):1817–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2743239/>
150. Schmidt VA. Watch the GAP: Emerging Roles for IQ Motif-Containing GTPase-Activating Proteins IQGAPs in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol*. 2012;2012(958673):1–8.
151. Jin S-H, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K, Akashi T, Yuasa Y. IQGAP2 inactivation through aberrant promoter methylation and promotion of invasion in gastric cancer cells. *Int J cancer. United States*; 2008 Mar;122(5):1040–6.
152. Briggs MW, Sacks DB. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep [Internet]*. 2003 Jun 13;4(6):571–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1319206/>
153. Johnson M, Sharma M, Henderson BR. IQGAP1 regulation and roles in cancer. *Cell Signal. England*; 2009 Oct;21(10):1471–8.
154. Huang J-K, Ma L, Song W-H, Lu B-Y, Huang Y-B, Dong H-M, et al. MALAT1 promotes the proliferation and invasion of thyroid cancer cells via regulating the expression of IQGAP1. *Biomed Pharmacother. France*; 2016 Oct;83:1–7.
155. Su D, Liu Y, Song T. Knockdown of IQGAP1 inhibits proliferation and epithelial–mesenchymal transition by Wnt/ β -catenin pathway in thyroid cancer. *Onco Targets Ther [Internet]*. Dove Medical Press; 2017 Mar 13;10:1549–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359122/>

156. Liu Z, Liu D, Bojdani E, El-Naggar AK, Vasko V, Xing M. IQGAP1 plays an important role in the invasiveness of thyroid cancer. *Clin Cancer Res. United States*; 2010 Dec;16(24):6009–18.
157. Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 Oct;7(10):713–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2026>
158. Seeley EH, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends Biotechnol. England*; 2011 Mar;29(3):136–43.
159. Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol Cell Proteomics. United States*; 2005 Apr;4(4):394–401.
160. Schwamborn K, Caprioli RM. MALDI Imaging Mass Spectrometry – Painting Molecular Pictures. Celis J, Moreira J, editors. *Mol Oncol* [Internet]. Hoboken: John Wiley and Sons Inc.; 2010 Dec 25;4(6):529–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2981679/>
161. Nipp M, Elsner M, Balluff B, Meding S, Sarioglu H, Ueffing M, et al. S100-A10, thioredoxin, and S100-A6 as biomarkers of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis identified by MALDI Imaging. *J Mol Med.* 2012;90(2):163–74.
162. Galli M, Pagni F, De Sio G, Smith A, Chinello C, Stella M, et al. Proteomic profiles of thyroid tumors by mass spectrometry-imaging on tissue microarrays. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;1865(7):817–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.11.020>
163. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh Q-Y, et al. The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Ann Surg* [Internet]. 2007 Sep;246(3):466–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1959359/>

EK 1 ETİK KURUL ONAYI

 ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ	
SAYI:B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/324 KONU: ATADEK 2014-621	25 Mart 2014
Sayın Prof.Dr. Aysel ÖZPINAR	
ATADEK 2014-621 kodlu, “Benign ve Malign Tiroid Nodül Dokularının Proteomik Profil Farklılıklarının MALDI-Imaging Yöntemi ile Belirlenmesi” başlıklı araştırmanız Acibadem Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu’nun 25 Mart 2014 tarihli 95. toplantısında incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur.	
ATADEK 2014-621 sayılı karar ekte dir.	
	
Prof.Dr. İsmail Hakkı ULUS Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu Başkan	
Korım Aydinlar Kampüsü Kayisdagi Caddesi 22 İcerenköy 34752 Atasehir İstanbul T 0216 500 44 44 F 0216 576 58 76 www.acibadem.edu.tr	

EK 2 AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Bilimsel Çalışma:

Benign ve Malign Tiroid Nodüllerinin Proteomik Profil Farklılıklarının Belirlenmesi

HASTA AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Sayın Hasta/ Hasta yakını,

Bu belge, Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ve Patoloji Anabilim dallarının katılımıyla yürütülmekte olan bilimsel çalışma ile ilgilidir. Çalışmanın ismi “Benign ve Malign Tiroid Nodüllerinin Proteomik Profil Farklılıklarının Belirlenmesi”dir. Bu bilimsel bir çalışmadır. Adı geçen çalışmanın amacı, İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi ile tanısı rahatlıkla konulamayan tiroid nodüllerinin ayırıcı tanısına katkı sağlamak amacıyla benign ve malign tiroid nodül dokularının protein farklılıklarını incelemektir. Bunun için ameliyat esnasında çıkarılan ve patolojik inceleme için gerekli olan tiroid nodül dokunuzun patolojik incelemenin ardından kalan küçük bir kısmı çalışmamız için incelenecektir. Çalışma için sizden herhangi başka bir tetkik istenmeyecektir.

Elde edilen sonuçlar sadece bilimsel amaçlı olarak kullanılacaktır. Dünyadaki diğer doktorları ve araştırmacıları bilgilendirmek amacıyla, çalışma sonuçlarının ulusal/uluslararası toplantılar ve bilimsel dergilerde yayınlanması planlanmaktadır.

Çalışma sırasında ya da daha sonra sonuçlar bilimsel olarak sunulurken çalışmaya dahil olan bireylerin adları hiçbir bilimsel yayın ya da sunumda kullanılmayacak, örnek alınması sonrasında bireylerin isim ya da kimliklerine dair tüm bilgiler ve kim olduğunu belli edebilecek özellikler gizlenecektir.

Bu araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayanmaktadır ve araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Onam vermiş olsanız bile araştırmanın herhangi bir safhasında araştırmadan çekilebilme hakkına sahipsiniz. Hiçbir durumda tedaviniz olumsuz etkilenmeyecektir.

Araştırmaya katılımınız size bir mali külfet getirmeyecektir. Hastalar çalışmanın sonuçlarına her zaman ulaşım hakkına sahiptir.

HASTA ONAMI

Hasta bilgilendirme formunda çalışma hakkında anlatılanları okudum ya da bizzat ilgili doktor tarafından bilgilendirildim. Tedavi kayıtlarımın ve patolojik örneklerin bu çalışmada kullanılmasını, çıkacak olan sonuçların değerlendirilmesini ve bilimsel amaçlı milletlerarası ya da ulusal yayın yapılmasını kabul ediyorum. Çalışma sonucunda elde edilen tüm bilgilere ulaşma hakkımın ve istediğim takdirde ve istediğim zamanda çalışmadan ayrılma hakkımın saklı kaldığını biliyorum.

Tarih:

Hastanın Adı Soyadı:

İmza

Hastanın Vekilinin Adı Soyadı

İmza

Bilgilendiren doktorun Adı ve soyadı:

İmza

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yasemin	Soyadı	Uçal
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	06 Ocak 1990
Uyruğu	T.C	Telefon	0535 6636187
E-mail			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans	University of Nottingham	2012
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2011
Lise	Özel Eyüboğlu Fen Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	2014- Günümüze

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #							
YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
88,75	8	97					

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78,233		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınlar

1. Vilisaar J., Kawabe K., Braitch M., Aram J., **Furtun Y.**, Fahey A.J., Chopra M., Tanasescu R., Tighe P.J., Gran B., Pothoulakis C., Constantinescu CS. Reciprocal Regulation of Substance P and IL-12/IL-23 and the Associated Cytokines, IFN-gamma/IL-17: A Perspective on the Relevance of This Interaction to Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* Feb 2015, doi: 10.1007/s11481-015-9589-x (4 adet atıf ISI, 8 adet atıf Google Scholar)
2. **Ucal Y.**, Durer Z.A., Atak H., Kadioglu E., Sahin B., Coskun A., Ahmet Tarık Baykal A.T, Ozpinar A. Clinical Applications of MALDI Imaging Technologies in Cancer and Neurodegenerative Disease. *BBA Proteins and Proteomics Special Issue in MALDI-Imaging.* Jul;1865(7):795-816 Doi: 10.1016/j.bbapap.2017.01.005 (1 adet atıf ISI, 2 adet atıf Google Scholar)
3. **Ucal Y.**, Eravci M., Tokat F., Duren M., Ince U., Ozpinar A. Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression in Variants of Papillary Thyroid Carcinoma. *EuPA Open Proteomics.* Doi: <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2017.09.001>

Bildiriler

Uluslararası Sözlü Bildiriler:

1. **Furtun Y.**, Gorzolk K., Walch A., Ozpinar A. Analysis of Peptides in FFPE Tissues by High Resolution FT-ICR Mass Spectrometry Imaging. OurCon II 2014 Imaging Mass Spectrometry Conference, November, 18-21, 2014

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler:

1. **Ucal Y.**, Serteser M., Unsal I., Ozpinar A., Serdar M. Serum vitamin B12 and folic acid reference ranges for functional vitamin B12 deficiency: A data mining study. 12th European Nutrition Conference, October, 20-23, 2015

Uluslararası Yazılı Bildiriler:

1. Serdar M., Kumru P., Eroğlu M., Muhcu M., Akın C., Yıldırım Keleş Z.Z., **Ucal Y.**, Serteser M., Turam C., Ünsal İ., Valentin L., Morel-Espinosa M., Blount B., Ozpinar A. Preliminary Information: Impact of Perchlorate Exposure on Thyroid Function. 15th International Thyroid Congress, October, 18-23, 2015
2. **Ucal Y.**, Kayhan C.K., Tokat F., Duren M., Ince U., Ozpinar A. Peptide Imaging in Follicular and Classic Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: An Application of MALDI-Imaging Mass Spectrometry. 86th Annual Meeting of the American Thyroid Association, September, 21-25, 2016
3. Atan Sahin O.,* **Ucal Y.**,* Serdar M., Blount B., Kumru P., Muhcu M., Eroglu M., Akın C., Yıldırım Keleş Z., Turam C., Valentin L., Morel-Espinosa M., Serteser M., Unsal I., Ozpinar A., Exposure to Perchlorate in Lactating Women and Its Associations with Newborn Health: Are newborns protected against NIS inhibitors in the first days of their lives?. Excellence in Pediatrics, December, 8-10, 2016,
4. **Ucal Y.**, Eravci M., Uras I., Yılmaz M.C., Kayhan C.K., Tokat F., Duren M., Ince U., Ozpinar A., Proteomic Differences in Histopathological Variants of Papillary Thyroid Carcinoma. Proteomic Forum 2017, April, 2-5, 2017, Berlin, Germany
5. **Ucal Y.**, Ozpinar A., Improved MALDI Spectra for Peptide Imaging Using Ammonium Salts in MALDI Matrix. OurCon V MALDI Imaging Mass Spectrometry Conference, September,

25-28, 2017, Doorn, Holland

6. Yılmaz M.C., **Ucal Y.**, Kiriş I., Altinoz M., Ozpinar A., Antiproliferative Effect of Progesterone in Glioblastoma Cell Lines: An Application of 2 Dimensional Gel Electrophoresis, 5th International Drug Design Congress, Bahcesehir University, 19-21 October 2017, Istanbul, Turkey

Ulusal Bildiriler Sözlü Bildiriler:

1. **Ucal Y.**, Eravci M., Tokat F., Duren M., Ince U., Ozpinar A. Papiller Tiroid Karsinomunun Farklı Histopatolojik Varyantlarının Protein Profillerinin İncelenmesi. 2. Ulusal Proteomik Kongresi, Kasım, 24-25, 2017, İstanbul, Türkiye

Ulusal Yazılı Bildiriler:

1. **Ucal Y.**, Ozpinar A. Amonyum Tuzlarının MALDI Matrisinde Kullanımı: MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Uygulaması. 2. Ulusal Proteomik Kongresi, Kasım, 24-25, 2017, İstanbul, Türkiye
2. Yılmaz M.C., **Ucal Y.**, Kiriş İ., Altınöz M., Ozpinar A. Glioblastoma Hücre Hatlarına Progesteronun Antiproliferatif Etkisi: 2-Boyutlu Jel Elektforezi Uygulaması. 2. Ulusal Proteomik Kongresi, Kasım, 24-25, 2017, İstanbul, Türkiye
3. Uras İ., **Ucal Y.**, Ozpinar A. Kolostrum Whey Fraksiyonundaki Minör Proteinlerin 2 Boyutlu Jel Elektforezi ile İncelenmesi. 2. Ulusal Proteomik Kongresi, Kasım, 24-25, 2017, İstanbul, Türkiye

Sertifikalar

1. Uygulamalı Proteomik Eğitimi, Eğitmen, Acıbadem Labmed Arge Merkezi, İstanbul-Türkiye 2017
2. MALDI-Mass Spectrometry Imaging Training on RapifleX, Bruker Daltonics, Bremen-Almanya, 2017
3. MALDI-Mass Spectrometry Imaging Eğitimi, Acıbadem Labmed Arge Merkezi, İstanbul-Türkiye 2017

Ödüller/Diğer

1. Doktora eğitimi süresince burs, Acıbadem Üniversitesi, İstanbul, Türkiye,
2. DAAD (German Academic Exchange Service), Doktora Öğrencisi ve Genç Bilim Adamları Araştırma Bursu, Münih, Almanya, Ağustos-Kasım 2014
3. COST Action BM1104, Short Term Scientific Mission (STSM) Kısa Dönem Araştırma Bursu, Münih, Almanya, Ağustos-Ekim 2015
4. EuPA 2015 Kongresi Proteomics: Back To The Future, EuPA Eğitim Programı Bursu, Milan, İtalya, 23-28 Haziran 2015
1. Yüksek Lisans Mezuniyet Ödülü, Derece ile Mezuniyet (Distinction), University of Nottingham, Nottingham, İngiltere, 2012
2. Lisans Yüksek Onur Derecesi ile Mezuniyet, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2011
3. Lise, 1.'lik ile Mezuniyet, Özel Eyüboğlu Fen Lisesi