

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**PAPİLLER TİROİD KANSERLERİNDE BRAF V600E
MUTASYONU VE CYP2D6 POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI VE HİSTOPATOLOJİK
İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

AYNUR DAĞLAR ADAY

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. OĞUZ ÖZTÜRK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER TIP Anabilim Dalı DOKTORA Programında AYNUR DAĞLAR ADAY tarafından hazırlanan Papiller tiroid kanserlerinde Braf V600E mutasyonu ve CYP2D6 polimorfizminin araştırılması ve histopatolojik ilişkilerin değerlendirilmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

28 / 01 / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.PROF.DR.TURGAY İSBİR, YEDİTEPE ÜNV. TIP FAK. TIBBİ BİYOLOJİ AD

2.PROF.DR.İLHAN YAYLIM ERALTAN, İ.Ü. DETAE MOLEKÜLERTIP AD

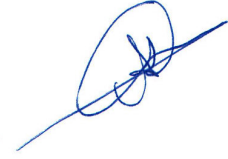
3.PROF.DR.FİGEN AKSOY, İ.Ü. CERRAHPAŞA TIP FAK. PATOLOJİ AD

4.DOÇ.DR.OĞUZ ÖZTÜRK, İ.Ü. DETAE MOLEKÜLERTIP AD

5.DOÇ.DR.EBRU EMEKLİ ALTURFAN, M.Ü. DİŞ HEK. FAK. BİYOKİMYA AD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

AYNUR DAĞLAR ADAY

İTHAF

Tezimi oğlum Alp Tuna'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım Eraltan'a,

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda bana destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Oğuz Öztürk'e,

Doktora eğitimim süresince bana olan katkılarından dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Tezim için gerekli hasta örnekleri ve verilerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Figen Aksoy'a,

Tez çalışmam süresince yardımları ve destekleri için Doç. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan, Doç. Dr. Bedia Ağaçhan, Doç. Dr. Ş. Ümit Zeybek, Doç. Dr. H. Arzu Ergen, Msc. Bio. Özlem Timirci-Kahraman, Msc. Bio. Özlem Küçükhüseyin, Msc. Bio. Bahar Toptaş, Msc. Bio. Canan Cacına, Msc. Bio. Ayşegül Başak Teker'e olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2686

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. TİROİD KARSİNOMLARI.....	4
2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	4
2.1.2. Dünya Sağlık Örgütü Tarafından Önerilen Tiroid Karsinomlarının Histolojik Olarak Sınıflandırılması (WHO 2004)	5
2.1.3. Dünya Sağlık Örgütü Tarafından Önerilen Tiroid Karsinomalarının TNM Sınıflandırılması (WHO 2004).....	5
2.1.4. Papiller Tiroid Karsinomu Alt Tipleri.....	7
2.1.5. Papiller Tiroid Karsinomu Patogenezi	9
2.1.6. Tiroid Karsinomu Gelişiminde Etkili Moleküler Faktörler.....	10
2.1.7. Papiller Tiroid Karsinomunda Prognostik Parametreler	11
2.1.8. Papiller Tiroid Karsinomunda Prognozu Etkilemeyen Faktörler	11
2.2. Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) Sinyal İletim Yolağı	12
2.2.1. Ras Proteini.....	14
2.2.2. Raf kinaz.....	14
2.2.2.1. BRAF.....	15
2.3. Sitokrom P450 Enzimleri	16
2.3.1. CYP2D6 Enzimi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	18
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.3. Kullanılan Gereçler.....	18
3.4. Kullanılan Çözeltiler	19
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	19
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	19
3.4.1.2. 0,5 M Disodyum etilentetraasetat (EDTA) Çözeltisi (pH 8,0).....	19
3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl).....	19
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Lysis Buffer-WBL) ..	19
3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (stok).....	19
3.4.1.6. 9,5 M Amonyum Asetat	20
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	20
3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)	20
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılacak Çözeltiler	20
3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	20
3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)	20
3.4.2.3. Tris-Borikasit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	20
3.5. Kullanılan Yöntemler	21
3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	21
3.5.2. Parafin Bloğa Gömülü Dokuların DNA İzolasyonu Öncesi Hazırlanması.....	21
3.5.3. Parafin Bloğa Gömülü Dokulardan DNA İzolasyonu	22
3.5.4. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	22
3.5.5. MASA-PZR Yöntemyle BRAF V600E Mutasyonu Saptanması	23
3.5.5.1. PZR'de Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.5.5.2. 7'inci Kromozomda BRAF Geni Ekzon 15 Bölgesinin MASA-PZR Yöntemiyle Çoğaltılması	23
3.5.5.3. PZR Şartları	24
3.5.5.4. MASA-PZR Ürünlerinin Kontrolü.....	25
3.5.5.5. MASA-PZR Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi.....	25
3.5.5.6. CYP2D6 Enziminin Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	26
3.5.5.7. PZR Şartları	26
3.5.5.8. PZR Ürünlerinin Kontrolü	26

3.5.5.9. PZR ile çoğaltılan CYP2D6 Geni İtron 3 ve Ekzon 4 Birleşme Yerinin RFLP Yöntemi ile Kesilmesi	27
3.5.5.10. Kesim Ürünlerinin Kontrolü	27
3.5.5.11. RFLP-PZR Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi.....	28
3.5.5.12. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA	36
KAYNAKLAR	43
HAM VERİLER.....	58
ETİK KURUL KARARI.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Papiller Tiroid Karsinomu Alt Tipleri.....	8
Tablo 3-1: BRAF geninin 15. ekzonunun çoğaltılmasında kullanılan PZR şartları	24
Tablo 3-2: CYP2D6 geninin intron 3 ve intron 4'ün birleşme yerinin çoğaltılması amacıyla kullanılan PZR şartları.....	26
Tablo 4-1: CYP2D6*4 polimorfizminin kontrol ve hasta grubundaki frekansları	30
Tablo 4-2: Tümör varyantlarında hastalara ait histopatolojik verilerin dağılımı.....	30
Tablo 4-3: Tümör varyantlarında BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6*4 genotip dağılımı.....	32
Tablo 4-4: Histopatolojik özelliklerin BRAF V600E mutasyonu taşıyan ve taşımayan vakalarda dağılımı.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tiroid karsinomu alt tiplerinin görülme sıklıkları	5
Şekil 2-2: Papiller tiroid karsinomu.....	7
Şekil 2-3: MAPK Yolağı.....	12
Şekil 2-4: MAPK sinyal iletim yolağı.....	13
Şekil 3-1: 128 bç'lik normal tip BRAF PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	25
Şekil 3-2: 126 bç'lik mutant tip (BRAF V600E) PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	25
Şekil 3-3: 354 bç'lik CYP2D6 genine ait PZR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü.....	27
Şekil 3-4: CYP2D6 kesim ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	28
Şekil 4-1: Klasik Tip ve Foliküler Varyant PTK'larda BRAF V600E mutasyonu dağılımı.....	32
Şekil 4-2: Klasik Tip ve Foliküler Varyant PTK'larda CYP2D6 genotip dağılımı.....	34
Şekil 4-3: BRAF V600E mutasyonu taşıyan ve taşımayan vakalarda CYP2D6 genotip dağılımı.....	35

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PTK: Papiller Tiroid Karsinomu

FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu

FVPTK: Foliküler Varyant Papiller Tiroid Karsinomu

MTK: Medüller Tiroid Karsinomu

HK: Hurtle Hücresi Karsinomu

ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu

MAPK: Mitojenle Aktiflenen Protein Kinaz

RAS: RAt Sarkoma

BRAF: v-Raf mürin sarkoma viral onkogen homologu B1

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MASA: Mutant Allel Spesifik Amplifikasyon

RFLP: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

RET: Rearranged during Transfection (Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş)

IAP: İnhibitör Apoptotik Protein

MMP: Matriks Metalloproteinaz

ÖZET

Dağlar (Aday) A. (2011). Tezin Adı. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Dağlar (Aday) A. (2011) Papiller Tiroid Kanserlerinde Braf V600e Mutasyonu Ve Cyp2d6 Polimorfizminin Araştırılması ve Histopatolojik İlişkilerinin Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bir serin-treonin kinaz olan BRAF'ın Papiller Tiroid Karsinomu (PTK) için önemli bir transforme edici faktör olduğu belirtilmiştir. PTK'da görülen BRAF V600E somatik nokta mutasyonu, bu kanserin patogenezinde çok önemli rolü olduğu düşünülen MAPK yolağının sürekli aktif kalmasına yol açmaktadır. CYP2D6*4 yavaş metabolize edici enzim polimorfizminin, enzim aktivitesinde azalmayla sonuçlandığı ve PTK dahil çeşitli kanserlere karşı yatkınlıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu tez projesinde Türk toplumunda BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6 yavaş metabolize edici enzim genotipi ile PTK'ne ait histopatolojik risk faktörleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. BRAF V600E mutasyonu MASA-PZR (Mutant Allel Spesifik Amplifikasyon- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle, CYP2D6 polimorfizmi PZR-RFLP (PZR- Restriksiyon Fragment Length Polimorfizmi) yöntemiyle araştırıldı. Tümör dokularının %52,8'sinde; tümör çevre dokularının %7,4'inde BRAF V600E mutasyonu saptandı. BRAF V600E mutasyonu klasik tip PTK vakalarında, foliküler varyant PTK'lara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ($X^2=10,700$, $p=0,001$, $OR=0,249$, %95 $CI=0,106-0,586$). Tümör dışı çevre dokuda ise PTK varyantları arasında bu mutasyonun varlığı yönünde anlamlı fark gözlenmedi. CYP2D6 genotipleri karşılaştırıldığında hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı. Histopatolojik özelliklerle BRAF V600E mutasyonu arasında ilişki görülmedi. CYP2D6*4 polimorfizmiyle PTK gelişimi arasında ilişki bulunmamıştır. BRAF V600E mutasyonunun PTK için önemli bir marker olduğunu ve bunun yanında yeni geliştirilecek ilaçlar için önemli bir hedef molekül olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : Papiller tiroid karsinomu, MAP Kinaz yolağı, BRAF, CYP2D6, histopatoloji

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2686

ABSTRACT

Dağlar (Aday) A. (2011). İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine Department. Thesis of Doctorate. İstanbul.

Dağlar (Aday) A. (2011). Investigation of BRAF V600E Mutation and CYP2D6 Polymorphism in Papillary Thyroid Cancer and Evaluation of Their Histopathological Associations. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine Department. İstanbul.

Recently, a serine/threonine kinase, BRAF, has been identified as an important transforming factor in PTC (Papillary Thyroid Cancer). The BRAF V600E somatic point mutation results in constitutive activation of the MEK-MAPK pathway, which seems to play a very central role in the pathogenesis of this tumour. A common polymorphism of CYP2D6 results in lack of enzyme activity and has been associated with an altered susceptibility to several cancers including PTC. The aim of this thesis project was to investigate the association between BRAF V600E mutation status and the CYP2D6*4 poor metaboliser genotype with histopathological risk factors for PTC on Turkish population. BRAF V600E mutation status was studied with MASA-PCR method and CYP2D6*4 polymorphism was studied with RFLP-PCR method. 52,8% of the tumour tissues and 7,4% of tumor surrounding normal tissues showed BRAF V600E mutation. BRAF V600E mutation was significantly higher in the tumour tissues of the classical type PTC cases than the follicular variant PTC cases ($X^2=10,700$, $p=0,001$, $OR=0,249$, $95\% CI=0,106-0,586$). There wasn't any significance for BRAF V600E mutation status between tumour variants in tumour surrounding tissues. There was no significance between CYP2D6 genotypes of the patient and the control group. Also there wasn't any relation between histopathological features and BRAF V600E mutation. We could not find any relation between CYP2D6*4 polymorphism and PTC development. We suggest that BRAF V600E mutation is an important marker for PTC and in addition to this it is an important target molecule for new drug development.

Key Words: Papillary thyroid carcinoma, MAP Kinase pathway, BRAF, CYP2D6, histopathology.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 2686

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid karsinomu en yaygın endokrin malignitedir (75). Genç yaşta radyasyona maruz kalma, başlıca papiller tip olmak üzere tüm tiroid karsinomlarında artışa neden olduğu bilinen tek çevresel faktördür. Chernobil nükleer kazasından sonra tiroid kanseri insidansında artış olduğu bildirilmiştir (95). Yüksek teknolojiyi diagnostik testlerin kullanımının artması ile küçük tümörlerin saptanabilmesi de bu insidans artışından sorumlu tutulmaktadır (59).

Papiller mikrokarsinomlar iyi prognoz göstermelerine rağmen kanserle ilişkili mortalite, uzak metastaz ve lenf nodu metastazı oranları sırasıyla; % 1, % 2,5 ve % 5'e kadar yükselebilir (8,69). Bu durum bazı klasik papiller tiroid kanseri vakalarının daha agresif seyirli olabileceğini düşündürmektedir (16,69).

Tirozin kinaz reseptörü/ RAS/ RAF/ MEK/ ERK (MAPK (Mitojenle Aktiflenen Protein Kinaz)) sinyal yolu zinciri tüm ökaryotik hücrelerde hücre büyümesi için anahtar bir düzenleyicidir. Aktive olan ERK, sitoplazmik hedef moleküllerini fosforile eder ve ardından nükleusa göç ederek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini uyarıp hücre döngüsünü aktive eder (76). Evrim boyunca büyük oranda korunmuş olan protein kinazları içeren yolak sinyal iletiminde merkezi rol üstlenmektedir (10).

BRAF, MAPK sinyal iletim yolağında rol alan bir serin-treonin kinazdır. BRAF; ARAF ve CRAF ile birlikte Raf ailesinin izoformlarından. Lokalizasyonu 7. kromozom üzerinde olan BRAF diğer izoformlar içinde MAPK yolağının en güçlü aktivatörüdür. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozda önemlidir (16). BRAF'ı aktive eden mutasyonların 11. ve 15. ekzonlarda yer aldığı gösterilmiştir (82). Tüm insan kanserlerinin sadece % 7'sinde var olan BRAF mutasyonları; malign melanomda % 70, seröz over kanserlerinde % 30, kolorektal kanserlerde % 5-22 oranında bulunur (55). Yine PTK'larda görülen en yaygın genetik değişiklik BRAF genindeki somatik nokta mutasyonudur (yaklaşık % 45) (9,44,86).

Bu mutasyon gen bölgesinin 1799. nükleotidinde timin-adenin transversiyonu sonucu 600. kalıntıda valin yerine glutamatın geçmesiyle gerçekleşmektedir (V600E) ve papiller tiroid karsinomlarının % 29-83'ünde görülmektedir (9,44,61,67,84). Ancak

tiroidin benign tümörlerinde ve foliküler neoplazmlarında görülmemektedir (9,44,61,67,86).

Bu mutasyon BRAF kinazın aktif bölgesinin konformasyonunu etkileyerek katalitik aktivitesinin 500 kat artmasına yol açmaktadır (30,84,86). Bunun sonucunda BRAF kinaz sürekli aktif kalır ve MAPK yolağının da aktif kalmasına neden olur (95). Bu yolağın sürekli aktif kalması sonucunda artan hücre bölünmesi ve proliferasyonun insan tiroid papiller kanserlerinin oluşumu ve ilerlemesinde yaygın ve önemli bir süreç olduğu düşünülmektedir (69). BRAF geninde nadir olarak rastlanan bir başka mutasyon ise foliküler varyant PTK vakalarında görülen BRAF V601E (G1801A transversiyonu) mutasyonudur (30,84,86).

Her hastanın tümör tekrarlama riski, tümör agresifliği, I¹³¹ tedavisine yanıtta direnç göstermesi gibi tümör özelliklerine göre tedavi seçiminin yapılması ideal olduğundan; papiller tiroid kanserli hastalarda doğru tedavi kararının verilebilmesi için operasyon öncesi BRAF varlığının araştırılmasının çok faydalı olacağı bildirilmiştir (45). Yine iyi diferansiye tiroid kanserlerinde lokal ve uzak metastaz varlığının tespit edilmesinden önce gerçekleştirilen cerrahi müdahale, tedavi edici özellikte olabilmektedir (86).

Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler çevresel karsinojenlere karşı savunmada önemlidir (61). Alınan ilaçların ve ksenobiotiklerin çoğunun karaciğerde ve az miktarda ince barsakta lokalize olan mikrozomal enzimler ile metabolize edildiği bilinmektedir. Pek çok ilacın ve ksenobiyotiğin aktivitesi sitokrom p450 (CYP450) enzim sistemi ile etkileşimlerine bağlıdır (35).

Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler yaygın olarak polimorfiktir ve karsinojenleri detoksifiye etme veya prokarsinojenleri aktive etme yetenekleri kişiler arasında değişkenlik göstermektedir. Tanımlanan 50'den fazla insan CYP450 izoenzimi bulunmaktadır. CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 VE CYP2D6 da dahil olmak üzere bu izoenzimlerin 20'den fazlası fonksiyonel olarak polimorfiktir. CYP bağımlı ilaç metabolizmasının yaklaşık % 40'ı polimorfik enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Bu polimorfik CYP izoenzimleri içerisinde CYP2D6 (debrizokuin 4-hidroksilaz) şimdiye kadar tanımlanmış 75'ten fazla allelik varyanta sahiptir. Bu varyantlar nokta mutasyonları, delesyonlar, adisyonlar, gen yeniden düzenlenmeleri, tüm genin delesyonu veya duplikasyonu sonucu meydana gelebilir ve enzim aktivitesinin

artmasına, azalmasına veya aktivitenin tamamen kaybolmasına neden olabilir. Tüm hepatik CYP izoenzimlerinin yalnızca % 2-5 kadarını oluşturmalarına rağmen; bazı sitotoksikler, tamoksifen, antiaritmikler, antiemetikler, antidepresanlar, antipsikotikler ve analjezikleri de kapsayan ilaçların yaklaşık % 20'sinin metabolizmasından sorumludurlar (4).

Epidemiyolojik çalışmalarda genotoksik metabolize edici enzimlere ait polimorfizmlerin bazı tümörlerin gelişim riskiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Akciğer, baş ve boyun, sindirim sistemi, meme, mesane, prostat, deri, tiroid ve hematolojik kanserleri içeren pek çok tip kanser bu polimorfizmlerle ilişkili bulunmuştur (29). CYP2D6 genindeki ortak mutasyonun enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu ve papiller tiroid kanseri dahil çeşitli kanserlere olan yatkınlığı değiştirdiği bildirilmiştir (51). Ancak çalışmalardan elde edilen sonuçlar etnik ve coğrafik değişikliklere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (29).

Farklı etnik gruplarda PTK vakalarında BRAF mutasyon prevalansı sonuçları bildirilmesine rağmen (26); henüz ülkemize ait bir bildiri mevcut değildir. Çalışmamızda Türk toplumunda PTK vakalarında daha önce araştırılmamış olan BRAF V600E mutasyonu ve 22. kromozomun q13.1 pozisyonunda lokalize olan gende (32). CYP2D6*4 yavaş metabolize edici enzim polimorfizmi ile PTK gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

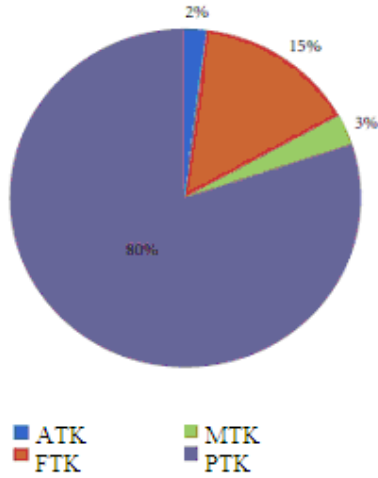
2.1. TİROİD KARSİNOMLARI

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Tiroid karsinomları insanlardaki tüm malignitelerinin sadece %1'ini oluşturmalarına rağmen; tüm endokrin kanserlerin %90'dan fazlasından sorumludur (77). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda ~25700 yeni vaka (~19200 kadın ve ~6500 erkek) teşhis edilmektedir (37). ABD'de tiroid karsinomu insidansı 1973-2002 yılları arasında 2,4 kat artarak 100000'de 3,6'dan 8,7'ye yükselmiştir. Bu artışın başlıca nedeni olarak PTK insidansındaki artış görülmektedir. 1973-2002 arasında PTK insidansı 2,9 kat artarak 100000'de 2.7'den 7.7'ye yükselmiştir (17). ABD'de 15700 hastayı kapsayan, yaş ve cinsiyet için düzeltilmiş olan raporda hayatta kalma oranlarının PTK için %98, foliküler tiroid karsinomu (FTK) için %92, medüller tiroid karsinomu (MDK) için %80 ve anaplastik tiroid karsinomu (ATK) için %13 olduğu bildirilmiştir (31).

Parafoliküler C hücrelerinden kaynaklanan MTK'lar, tiroid lenfoması ve nadir intratiroidal sarkomaların dışında kalan diğer tiroid karsinomlarından olan PTK, foliküler varyant PTK (FVPTK), foliküler karsinom (FK) ve onun onkositik varyantı, Hurtle hücre karsinomu (HK) ve anaplastik karsinoma (ATK) foliküler hücre epitelinden köken alırlar (22).

Tiroid karsinomu başlıca genç ve orta yaşlı yetişkinlerde görülür; çocuklarda nadirdir. Kadınlarda erkeklere göre 2-4 kat sıklıkla görülen tiroid kanseri için çocuklar ve yaşlılarda aynı sıklıktan bahsedilememektedir. Bu bilgi cinsiyet hormon reseptör elemanlarıyla ilgili spesifik bir genin tiroid kanseri patogenezinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Tiroid karsinomunun başlıca 4 alt tipi vardır. Bunlar PTK, FTK, MTK ve ATK'dur (62) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Tiroid karsinomu alt tiplerinin görülme sıklıkları

2.1.2. Dünya Sağlık Örgütü Tarafından Önerilen Tiroid Karsinomlarının Histolojik Olarak Sınıflandırılması (WHO 2004)

Papiller karsinom

Foliküler karsinom

Az diferansiye karsinom

İndiferansiye karsinom

Skvamöz hücreli karsinom

Mukoepidermoid karsinom

Eozinofilili sklerozan mukoepidermoid karsinom

Müsinöz karsinom

Medüller karsinom

Mikst medüller ve folliküler hücre karsinomu

Timüs benzeri diferansiasyon gösteren iğsi hücre tümörü

Timüs benzeri diferansiasyon gösteren karsinom

2.1.3. Dünya Sağlık Örgütü Tarafından Önerilen Tiroid Karsinomlarının TNM Sınıflandırılması (WHO 2004)

T-Primer Tümör*

TX Primer tümör değerlendirmesi yapılamaz.

T0 Primer tümörle ilgili delil yoktur.

- T1 Tümör çapı 2cm veya daha küçüktür ve tiroid sınırları içindedir.
- T2 Tümör çapı 2-4cm arasındadır ve tiroid sınırları içindedir.
- T3 Tümör çapı 4cm'nin üzerindedir; tiroid veya minimal ekstratiroidal genişleme yapan bir tümör (örn. Sternohyoid kasa veya peritiroid yumuşak dokuya doğru genişlemiş) sınırları içindedir.
- T4a Tiroid kapsülünün ötesinde genişleyerek subkutenöz yumuşak dokulara, larinkse, trakeye, özofagusa veya rekürrent laringeal sinire invaze olan tümör.
- T4b Prevertebral fasyaya invaze olan veya karotid arteri, mediastinal damarları saran tümör.
- *Multifokal tümörler (m) olarak belirtilmektedir. En büyüğünün çapı sınıflandırmayı belirler.

Bütün anaplastik (farklılaşmamış) tümörler T4 olarak düşünülür.

- T4a İntratiroid anaplastik karsinom- cerrahi olarak rezekte edilebilir.
- T4b Ekstra-tiroidal anaplastik karsinom- cerrahi olarak rezekte edilemez.

Bölgesel lenf nodları (N)

Bölgesel lenf nodları santral kompartman, lateral servikal ve üst mediastinal lenf nodlarıdır.

- NX Bölgesel nod değerlendirmesi yapılamaz.
- N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.
- N1 Bölgesel lenf nodu metastazı.
- N1a VI. Düzey lenf nodlarına (pretrakeal, paratrakeal ve prelaringeal/delphian) metastaz.
- N1b Unilateral, bilateral, kontralateral servikal veya süperior mediastinal lenf nodlarına metastaz.

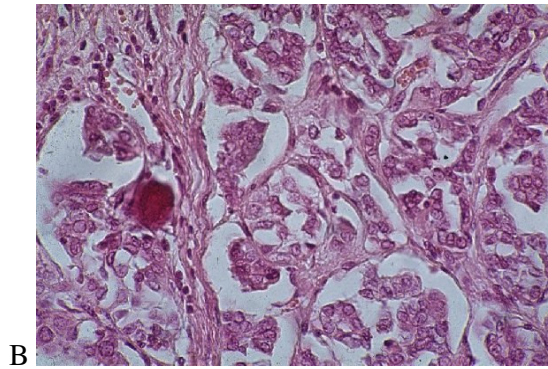
Uzak Metastazlar (M)

- MX Uzak metastaz değerlendirilmesi yapılamaz.
- M0 Uzak metastaz yoktur.
- M1 Uzak metastaz.

2.1.4. Papiller Tiroid Karsinomu Alt Tipleri

PTK en yaygın tiroid kanseridir. ABD’de tiroid karsinomu vakalarının %90’ını oluşturur. Sıklıkla 20-50 yaşları arasında ve kadınlarda erkeklere göre 3 kat fazla görülmektedir. Çocuklar dahil her yaşta ortaya çıkabilmektedir ve çocuklarda ve ergenlerde en sık görülen tiroid tümörü tipidir. İleri yaşta erkeklerde prognozu kötüdür (98).

PTK bir dizi ayırt edici nükleer özelliklerle karakterize, foliküler hücre farklılaşması gösteren bir malign epitelyal tümör olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2-2). Diagnostik olarak nükleer genişleme ve düzensizlik, üst üste binme, berraklık (cam zemin veya Orphan Annie görüntüsü), oluklar, ve pseudo-inklüzyonları içermektedir (52).



Şekil 2-2: Papiller tiroid karsinomu.

A) Soluk renkli, belirgin sınırlı olmayan kitlesel lezyon.

B) Solda kalsifiye olan psammoma cismi vardır. Pek çok nükleusun berrak görünümü ve nükleer groove izlenmektedir.

Çok sayıda PTK varyantı tanımlanmıştır (99). Klasik tipten farklı morfolojik özelliklere sahip olan alt tipler Tablo 2-1’de gösterilmiştir.

Yaygın ve aynı zamanda teşhisi zor olan foliküler varyant (FV) PTK tümörler kapsüllü veya kapsülsüz olabilmekte ve PTK'nın karakteristik nükleer özelliklerine sahip foliküllerden oluşmaktadır. Özellikle kapsülsüz tipte nükleer özellikler fokal veya az farklılaşmış olabileceğinden bu tümörlerin teşhisi gözlemciler arasında yüksek oranda farklılık göstermektedir (53). Lenf nodu metastazları foliküler varyantta klasik tipe göre daha az yaygındır. Mikrofoliküler, onkositik, Warthin-benzeri ve berrak hücreli varyantların prognozu klasik tipe benzerdir. Radyasyona maruz kalan çocuklarda daha yaygın olarak rastlanan solid varyant sporadik PTK'ların yaklaşık %8'ini meydana getirir. Uzak metastaz oranı biraz daha yüksektir ve klasik tip PTK'lara göre prognozu daha kötüdür (65,66) . Çocuklarda yetişkinlere oranla daha yaygın olan diffüz sklerozan varyantla klasik tip PTK'a göre daha sık akciğer metastazı gözlenmesine rağmen yaşam süreleri arasında pek farklılık yoktur. Tall cell ve kolumnar cell varyantların klasik tipe göre daha kötü prognoz göstermelerine karşın histolojik alt tiplerden ziyade evre ve grade daha önemli olabilmektedir (1). PTK'ların prognozu az diferansiye, indiferansiye veya skuamöz komponentlerin oranına göre değişmektedir. Çapı 1 cm'nin altında olan tümörler olarak tanımlanan papiller mikrokarsinomlar oldukça yaygındır.

Tablo 2-1: Papiller Tiroid Karsinomu Alt Tipleri

- 1-) Papiller Mikrokarsinom (Okkült Papiller Karsinom)
- 2-) Foliküler Varyant - Diffüz Foliküler Varyant
 - Kapsülsüz Foliküler Varyant
 - Kapsüllü Foliküler Varyant
- 3-) Diffüz Sklerozan Varyant
- 4-) Tall Cell Varyant
- 5-) Kolumnar Hücreli Varyant
- 6-) Solid Varyant
- 7-) Warthin Benzeri Varyant
- 8-) Diğerleri - Onkositik (Oksifilik) Varyant
 - Berrak Hücreli Varyant
 - İğsi Hücreli Varyant
 - Lipomatoz Stromalı Varyant

- Fasiitis Benzeri Stroma Gösteren Varyant
- Kribriiform Varyant
- Miksoid Varyant

2.1.5. Papiller Tiroid Karsinomu Patogenezi

PTK'nın etyolojisi tamamen aydınlatılamamış olmasına rağmen bir takım ilişkili faktör tanımlanmıştır.

- Aşırı iyot alınması: Hayvanlarda PTK gelişimine neden olduğu görülmüştür. Endemik guatr bölgelerinde diete iyot eklenmesi sonucu folliküler tiroid kanserine kıyasla PTK'da artışa neden olmuştur.
- Radyasyon: Çocuk ve yetişkinlerin boyun bölgesinin eksternal radyasyona maruz kalması ilerde PTK gelişim insidansını arttırmaktadır. Japonya'da atom bombasına maruz kalanlarda PTK insidansı artmıştır. Ukrayna'da 1986 yılında yaşanan Chernobyl nükleer reaktöründeki kazası sonrasında bölgede yaşayan çocuklarda yüksek insidansla PTK gelişmiştir. Diğer yandan radyoaktif işaretli iyot tedavisi tümör gelişimi riskinde artışa yol açmamaktadır.
- Genetik faktörler: Epidemiyolojik çalışmalarda tümörü taşıyanların birinci derece yakınlarında PTK gelişimi riskinin 4-10 kat fazla olduğu görülmüştür. Monozigotik ikizlerde de bununla uyumlu sonuçlar görülmüştür. Tüm vakaların %5'inden PTK'nın ailesel bir formu sorumlu tutulmakla birlikte ilgili genler henüz tanımlanmamıştır.
- Somatik mutasyonlar: Ailesel adenomatöz polipozisli hastalarda PTK gelişimi riski yüksektir. 10. kromozom üzerindeki (10q11.2) RET onkogeninde yeniden düzenlenmeler PTK'da yaygındır. Chernobyl kazası sırasında radyasyona maruz kalan çocuklarda görülen tümörlerin %60'ında bu mutasyon görülmüştür. Aynı mutasyon tiroidin eksternal radyasyona maruz kalması sonrası da oluşur. Bu yeniden düzenlenmeler RET'in tirozin kinaz bölgesinin çeşitli genlerle füzyona uğramasına ve RET/PTK füzyon onkogenlerin oluşumuna neden olur. İlginç olarak PTK'larda RET/PTK yeniden düzenlenmelerinin sıklığı coğrafik olarak değişmektedir. Kore'de hiç görülmez iken, Suudi Arabistan'da %2, ABD ve İngiltere'de %60 sıklıkla görülmektedir. Birinci kromozom üzerindeki NTRK1 geninin aynı kromozomdaki TPM3 geniyle rekombinasyonu da PTK'larda gösterilmiştir.

- Benign tiroid hastalığı öyküsü: Benign tiroid nodülü olanlarda ve daha az sıklıkla guatr hastalarında tiroid kanseri gelişiminin daha sık olduğu görülmüştür (98).

2.1.6. Tiroid Karsinomu Gelişiminde Etkili Moleküler Faktörler

İnsan genom projesinin tamamlanması ve moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler, karsinogeneze neden olan genetik değişikliklerin daha iyi anlaşılmasına ve hastalığın biyolojik işaretlerinin belirlenmesine olanak sağlamıştır (84).

Normal tiroid dokusundan benign adenomlara ve ardından iyi farklılaşmış anaplastik tiroid kanserine dönüşümle ilişkili bir dizi moleküler faktör bildirilmiştir (18,23,24,25,70,78,79,87,88).

Tiroid kanserinde bir kısmı sadece bu kanserde görülen çeşitli genetik değişimlere sıklıkla rastlanmaktadır. Tiroid kanserinde görülen en yaygın genetik değişiklikler Ras mutasyonları, RET/PTK yeniden düzenlenmeleri (27), RET/PTK yeniden düzenlenmeleri (64) ve PAX8-peroksizom proliferatörle-aktive olan reseptör gamma (PPAR γ) füzyon onkogeni (48) oluşumudur. Diğer kanserlerde de yaygın olan aktive edici Ras mutasyonlarına özellikle FTK ve FVPTK'da sık rastlanır (85). RET/PTK yeniden düzenlenmeleri bir partner genin promotor ve N-terminal bölgelerinin RET geninin C-terminal bölgesiyle rekombine olması ile meydana gelir. Ortaya çıkan kimerik onkogen sürekli aktif olan RET tirozin kinaz proteinini kodlamaktadır. En az 10 tip RET/PTK yeniden düzenlenmesi tanımlanmıştır. En yaygınları olan RET/PTK1, RET/PTK2 ve RET/PTK3 başlıca PTK ve bazı benign tiroid adenomlarında bulunur. PAX8-PPAR γ FTK ve tiroid adenomlarında yer alır (13).

Bu tezin de konusu olan aktive edici BRAF mutasyonu tiroid kanserinde en sık rastlanan genetik değişikliktir. Tiroid kanserindeki genetik değişikliklerin çoğu onkojenik etkilerini kısmen dahi olsa RET/PTK-Ras-Raf-MAP kinaz yoluyla üzerinden gösterir. Bu yolğun aktivasyonu sonucu hücre bölünmesi ve çoğalmasının artması insan kanserlerinin başlangıç ve ilerleme dönemlerinde ortak ve önemli bir mekanizmadır. Sürekli aktive olduğunda MAP kinaz yoluyla tümör oluşumuna neden olur (67). Aktive edici BRAF gen mutasyonlarının bulunmasıyla MAP kinaz yolğunu aktive ettiği bilinen genetik değişiklik dizinini genişletti ve insan kanserlerinde bu yolğun öneminin artmasına neden oldu (16).

2.1.7. Papiller Tiroid Karsinomunda Prognostik Parametreler

- 1-) Yaş: En önemli prognostik faktörlerden biridir. 50 yaş üzerindeki olgularda, daha genç olanlara göre prognoz daha kötüdür. Papiller karsinomaya bağlı ölümlerin hemen hemen çoğu 40 yaşından sonra görülmektedir.
- 2-) Cinsiyet: Kadınlarda prognozun erkeklere göre daha iyi olduğunu bildiren yayınlar vardır. Buna karşın bazı çalışmalarda belirgin fark görülmemiştir.
- 3-) Tiroid Dışı Yayılım: Prognozu kötü yönde etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Makroskopik olarak tiroid dışı yayılım tespit edilen olgularda, prognoz daha kötü seyretmektedir.
- 4-) Mikroskopik Alt Tipler: Papiller mikrokarsinomlar, klasik tip, foliküler varyant ve enkapsüle varyantın prognozları daha iyidir. Diğer varyantlarda prognoz kötüdür.
- 5-) Tümör Çapı: Tümör çapı ile prognoz arasında ters bir orantı vardır. Yani tümör çapı büyüdükçe prognoz kötüleşir.
- 6-) Kapsül ve Sınırlar: Kapsüllü ve / veya ekspansif büyüme paterni gösteren tümörlerde prognoz diğerlerine oranla daha iyi seyretmektedir.
- 7-) Multisentrisite: Birden fazla tümör odağı içeren vakalarda, metastaz insidansının yüksek ve yaşam süresinin daha kısa olduğu belirtilmektedir.
- 8-) Uzak Metastaz: En sık akciğer ve iskelet sistemi metastazı görülmektedir. Uzak metastazın varlığı prognozu kötüleştirir.
- 9-) Az Diferansiye, Skuamöz veya Anaplastik Alanlar: Vakaların % 5'inden daha azında görülmektedir. Bu komponentlerin olması prognozu kötü yönde etkilemektedir.
- 10-) Radyasyon: Daha önce radyasyon hikayesi olanlar ile radyasyon hikayesi olmayan vakalar arasında prognoz açısından fark görülmemiştir.
- 11-) DNA ploidi: Papiller tiroid karsinomunda vakaların büyük bir kısmı DNA diploid, %20'si anaploid veya az bir kısmı nondiploiddir. Papiller tiroid karsinomunun agresif davranışı ile anaploidi arasında korelasyon olduğu belirtilmektedir (56).

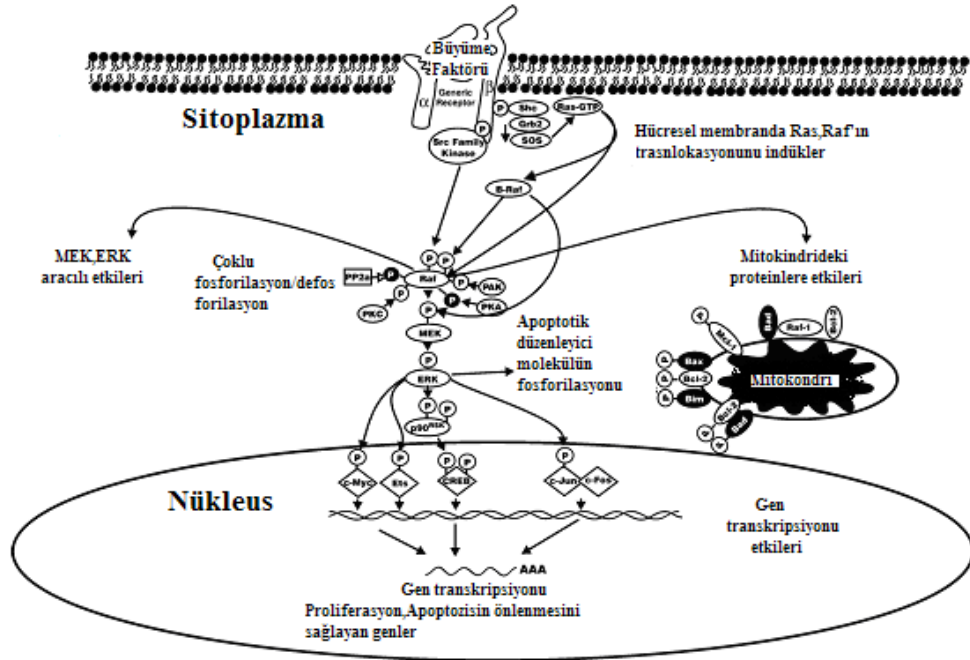
2.1.8. Papiller Tiroid Karsinomunda Prognozu Etkilemeyen Faktörler

Papiller ve foliküler yapıların nisbi oranları, fibrozisin varlığı veya yokluğu, solid alanların varlığı veya yaygınlığı, skuamöz metaplazinin olması, psammoma cisimciklerinin varlığı prognozu etkilememektedir (56).

2.2. Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) Sinyal İletim Yolağı

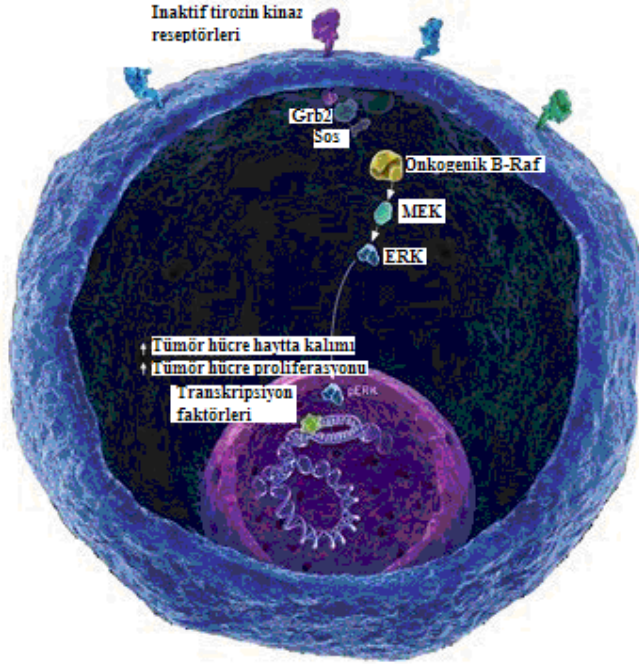
1989-1991 yılları arasında mayalarda feromon yanıtında görevli bir takım proteinler ile memelilerdeki ERK1, ERK2 ve ERK3 enzimlerinin yeni tanımlanan bir protein kinaz ailesine ait olduğu gösterilmiştir. (12,5,6,19,81). Tirozin kinaz substratları üzerine yapılan bir çalışmada, mitojenle uyarılan tirozin fosfoproteinleri olduklarının anlaşılması sonucunda mitojenle aktiflenen protein kinaz olarak isimlendirildiler ve MAPK ismi kalıcı oldu (71).

MAPK mitojenle aktiflenen protein kinazlar süper ailesinde yer alırlar (49). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önemlidir. Bu sinyal iletim yolları embriyogenez, hücrenin yaşaması, çoğalması, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde rol almaktadır (Şekil 2-3) (14).



Şekil 2-3: MAPK Yolağı. MAPK yolağı Raf üzerindeki S/T ve Y kalıntıları fosforile eden Ras gibi çeşitli kinazlarla düzenlenir. Bu fosforilasyon olaylarının bir kısmı Raf aktivitesini yükseltirken (beyaz halka içinde siyah P); bir kısmı inhibe eder (siyah halka içinde beyaz P). PP2A gibi fosfatazlar belirli düzenleyici bölgelerdeki fosfatları uzaklaştırır. Transkripsiyon faktörleri eşkenar dörtgenler içinde gösterilmiştir (57).

Pek çok büyüme faktörü ve hormonu gibi hücre dışı sinyal proteini hücre içine sinyali reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla iletir (EGF, PDGF, IGF-1). Bir sinyal proteininin ligand bağlanma bölgesine bağlanmasıyla hücre içi tirozin kinaz bölgesi otofosforilasyonla aktiflenmekte (7) ve Grb-2, sos gibi adaptör proteinler aracılığı ile monomerik GTPaz ailesinden olan RAS proteinini aktifleştirmektedir.



Şekil 2-4: MAPK sinyal iletim yolağı (100).

MAPK yolağı hücre yüzey reseptörlerinden aldığı sinyalleri gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerine iletir. Aynı zamanda apoptoza katılan pek çok proteinin aktivitesini de düzenler. Şekil 2-4'te MAPK yolağı genel olarak gösterilmiştir. BCR-ABL gibi translokasyonlarla, Flt-3, Kit, Fms gibi sitokin reseptörlerindeki mutasyonlarla, veya EGFR gibi normal tip veya mutant tip reseptörlerin aşırı eksprese edilmesi sonucu çeşitli tümörlerde MAPK yolağı sıklıkla aktive olur. Bad, Bim, Mcl-1, kaspaz 9 ve tartışmalı olarak Bcl-2 gibi apoptotik düzenleyici moleküllerin post-translasyonel fosforilasyonu ile apoptozun düzenlenmesinde de önemli rolü vardır. Bu yolak hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz ve farklılaşmayı düzenleyen çeşitli etkilere sahiptir (50). Proteinlerin fosforillenmesi ile aktive veya inaktive edilen pek çok kinaz, transkripsiyon faktörleri, apoptotik düzenleyici ve kaspaz yıkıcı aileleri içeren bu

karmaşık yolak çok fazla çalışmaya konu olmaktadır. Ayrıca bu yolak bazı genlerin transkripsiyonunu arttırabilir. Raf; MEK ve ERK üzerinden veya onlardan bağımsız olarak apoptozu kontrol eden proteinlerin fosforilasyonunu arttırabilir. İlave sinyal iletim yolları da MAPK yolağıyla pozitif veya negatif etkileşime girerek aktivitesini düzenler. Bu yolağın üst kademelerinde yer alan membran reseptörleri, Ras ve BRAF genlerindeki veya Raf aktivitesini düzenleyen diğer yollardaki (örn. PI3K, PTEN, Akt) mutasyonlar sonucu insan kanserlerinde MAP kinaz yolağı anormal biçimde aktif olur. Raf, meme kanseri hücrelerinde doxorubicin ve paclitexal'e direnci arttırdığından kemoterapötik ilaç direnci de bu yoldan etkilenir (55). Dolayısıyla MAP kinaz yolağı terapötik buluşlar açısından çok önemli bir yere sahiptir. Ras, Raf, MEK ve alt kademelerdeki diğer hedef moleküllerin inhibitörleri geliştirilmiştir ve klinik çalışmalar devam etmektedir. Doğal olarak bazı inhibitörler diğerlerinden daha iyidir ve spesifik inhibitörler aynı anda birden fazla kinazı inhibe edebilmektedir (57).

2.2.1. Ras Proteini

Membrana kovalent olarak bağlı bulunan RAS, GDP bağlı iken inaktif; GTP bağlı iken aktiftir. RAS proteini gen ekspresyonunun değiştirilmesiyle hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol almaktadır (46). Mutant RAS geninin hiperaktif ürünü sürekli GTP bağlı formda kalmakta ve tümör gelişimine neden olmaktadır. İnsan tümörlerinin yaklaşık % 30'unda RAS mutasyonu bulunmaktadır (47). GTP bağlayıp aktif hale geçen RAS proteini RAF proteinini sitozolden plazma membranına çıkarmakta ve hem protein-tirozin hem de protein-serin/treonin kinazları fosforilleyerek aktive etmektedir, bununla birlikte aşağı doğru bir seri serin-treonin kinazın fosforilasyonunu başlatmaktadır (46).

2.2.2. Raf kinaz

Ras'ın ilk ve en iyi tanımlanan alt kademe efektörü Raf'tır. Raf serin/treonin kinaz ailesinin Raf-1 (C-Raf), A-Raf ve B-Raf olmak üzere 3 izoformu vardır. Her bir izoform korunmuş olan CR1, CR2, CR3 ortak bölgelerini ve çeşitli düzenleyici fosforilasyon bölgeleri içerirler. CR1 Ras'a bağlanma bölgesidir. CR2, S259 (serin) kalıntısından Akt veya protein kinaz A ile fosforillenerek Raf aktivitesinin negatif olarak düzenlendiği bölgedir. CR3, S338, Y340, Y341 kalıntılarından fosforillendiğinde Raf aktivitesinin pozitif yönde düzenlendiği kinaz bölgesidir. Raf izoformları hücreye

spesifik ekspresyonlarına, kinaz aktivitesinin kuvvetine göre farklılıklar gösterirler ve hem tek başlarına hem de birlikte düzenleyici fonksiyonlar gösterirler (11,34,20,89).

Raf kinaz pek çok yolla aktive olmaktadır: (a) Ras'la etkileşim sonucu plazma membranına çıkması ile; (b) Raf proteinlerinin dimerizasyonu ile (c) farklı domenlerin fosforilasyonu/defosforilasyonu ile (d) Raf kinaz inhibitör proteinden (RKIP) ayrılması ile (e) iskelet oluşturucu (scaffolding) komplekslerle (örn. Ras'ın kinaz supresörü, (KSR)) birleşmesi ile (f) Bunlardan başka Raf aktivitesi Bag1, 14-3-3 gibi şaperon proteinlerle ve ısı şok protein 90 (Hsp90) ile de düzenlenmektedir (2,21,38,40,41,90,91,96,97).

2.2.2.1. BRAF

Bir proto-onkogen olan Braf veya diğer ismiyle v-Raf mürin sarkoma viral onkogen homoloğu B1 insanlarda Braf geni tarafından kodlanan bir proteindir. Tüm Raf kinazların içinde MAP kinaz yolağının en güçlü aktivatörü BRAF'tır.

Kinaz domendeki BRAF aktive edici yanlış anlamalı nokta mutasyonları 11. ve 15. ekzonlarında yer alır ve T1799A transversiyon mutasyonu BRAF mutasyonlarının %80'den fazlasından sorumludur (16). T1799A mutasyonu protein ürününde V600E (önceki ismi V599E) amino asit değişimine ve dolayısı ile BRAF kinazın sürekli aktif kalmasına neden olur. V600E mutasyonunun Ser-599'da aktive edici fosforilasyon bölgesine bitişik negatif yüklü bir kalıntı ekleyerek BRAF'ın aktivasyon segmentinde fosforilasyonu taklit ettiği düşünülmektedir (16). Bu mutasyonun normalde BRAF'ı inaktif konformasyonda tutan aktivasyon segmentinin ATP- bağlayıcı P loopuyla olan etkileşimini bozarak BRAF'ı katalitik olarak aktif forma dönüştürdüğü sanılmaktadır (15). BRAF V600E mutasyonunun onkojenik ve transforme edici etkisi gösterilmiştir (16). İlk keşfinden bu yana BRAF mutasyonlarının çeşitli insan kanserlerinde değişik sıklıklarda bulunduğu bildirilmiştir (28). BRAF mutasyonlarının melanomdan sonra ikinci en yüksek sıklıkla tiroid kanserlerinde bulunduğu bildirilmiştir(84).

Tiroide spesifik BRAF V600E ekspresyonu gösteren transgenik farelerde gerçekleştirilen deneyler tümör inisiyasyonu ve farklılaşmasında rol alan mutant BRAF'ın daha agresif tümör davranışıyla uyumlu olduğunu göstermiştir (42). Lupi ve ark. çalışmalarında klinikopatolojik parametrelerle BRAF V600E mutasyon arasındaki ilişkiler incelendiğinde yaş ve cinsiyet ile bu mutasyon arasında bir ilişki görülmemiş; ancak ekstratiroidal invazyon ($p<0.0001$), multisentrisite ($p=0.0026$), nodal metastaz

varlığı ($p=0.0009$) ve tümör kapsüllü olmaması ($p<0.0001$) ile ilişkili bulunmuştur (54). PTK'lı vakalarda ileri yaşla birlikte BRAF V600E mutasyon sıklığının yükseldiğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir (43,63,82).

Namba ve ark. ile Nikiforova ve ark. çalışmalarında ilerlemiş evre ve ekstrasitroidal yayılma gibi özellikleriyle de benzer sonuçlar elde etmişlerdir (60,63,). BRAF PTK'lerden türeyen az diferansiye ve anaplastik karsinomlarda da bulunmaktadır (68,94). Palona ve ark. çalışmalarında tiroid hücrelerinde BRAF V600E ekspresyonunun, NF- κ B'ye bağımlı ve MEK-ERK'den bağımsız olarak c-IAP-1, c-IAP-2 ve X-IAP gibi inhibitör apoptotik protein (IAP) ailesi protein ekspresyonunu uyarak apoptoza karşı direnci artırdığını; diğer taraftan matriks metalloproteinaz 1 (MMP1) ve matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) ekspresyonlarını artırarak hücre invazyonunu artırdığını bildirmişlerdir (68). BRAF V600E ekspresyonunun tiroid bezinde sodyum-iyot simporter ekspresyonunu ve membrana hedeflenmesini bozarak tedavi amacıyla kullanılacak olan İyot-131 tutulumunda azalmaya neden olduğu ve bu nedenle papiller tiroid kanserlerinin yüksek tekrarlama riski ile uyumlu bir tanı faktörü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (74).

2.3. Sitokrom P450 Enzimleri

İlaçların ve diğer kimyasalların metabolizmasından sorumlu faz I enzimleri olan sitokrom P450'ler (CYP) hem içeren enzim süper ailesindendir. CYP450 ismini almalarının nedeni kimyasalların indirgenmiş hem (Fe^{2+}) enzimiyle bağlandıklarında, karbon monoksidin de bu komplekse bağlanarak spektrofotometrede 450 nm karakteristik dalga boyunda ışığı abzorbe etmelerinden dolayıdır. (58). İnsanlarda bilinen 57 aktif CYP geni ile 58 psödogen bulunmaktadır. Bu genlerin çoğu polimorfiktir. Bilinen 434'ten fazla CYP450 alleli vardır. (3,72).

İlaçların ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında, steroid hormonların biyosentezinde, doymamış yağ asitlerinin hücre içi habercilere oksidasyonunda ve yağda çözünen vitaminlerin metabolizmasında bazı reaksiyonların katalizlenmesinde kritik rol oynamaktadırlar (33). P450'ler oksijenaz enzim sınıfına mensupturlar ve özellikle monooksijenaz aktivitesi gösterirler. Yaklaşık 16 farklı ailesi olan P450'lerin bir çok da alt aile grupları bulunmaktadır (73).

Genetik polimorfizmler, çevresel faktörler, fizyolojik durum ve hastalık durumu gibi faktörler CYP450 aktivitesinde varyasyonlara yol açmaktadır. Bu da bireyler arasında ilaç metabolizması açısından büyük farklar olmasına neden olmaktadır (35).

2.3.1. CYP2D6 Enzimi

Hepatik ksenobiyotik metabolize eden diğer CYP450 enzimlerinin aksine CYP2D6 enzim ekspresyonu, bilinen diğer çevresel faktörlerle regüle edilmezler ve hormonlarla indüklenmezler. Enzimin bilinen bir endojen fonksiyonu yoktur ama bazı nörotransmitterlerin metabolizmasında rolü olduğu düşünülmektedir. Yakın zamanda enzimin spesifik bir 5-metoksiindolamin O-demetilaz olduğu (93) ve 5-metoksitriptaminin de enzim için bir substrat olduğu gösterilmiştir (92). Bu substratların yanında özellikle alkaloidler olmak üzere gıda içeriklerinin metabolizmasında da major rolü olabilir.

CYP2D6 polimorfizmleri ortaya çıkan aktivite düzeylerine göre yavaş, orta, hızlı ve çok hızlı metabolize ediciler olarak 4 sınıfa ayrılabilir (39). G1934A mutasyonu taşıyan, yavaş metabolize edici CYP2D6*4'ün allel frekansı beyazlarda % 12-21, Asyalı'larda % 1, siyahlarda % 2, Etiyopyalı'larda ve Arap'larda % 1-4'tür (36). Yavaş metabolize ediciler iki hatalı CYP2D6 alleleline sahiptir ve ilaçları metabolize etme yetenekleri çok yavaştır. Bunun sonucunda enzimin substratı olan ilaçlar büyük oranda metabolize edilemeden birikirler; yan etki gelişimi, ilaç-ilâç etkileşimi riski artar ve CYP2D6 aktivasyonuna gereksinim duyan ilaçların etkinliği azalır. Dolayısıyla onkolojide, hastaya en az beş ilacın birlikte verildiği kemoterapi uygulamalarında ilaçların doğru seçilmesi tedavinin başarısı açısından önemlidir (4).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji ABD'na başvuran papiller tiroid karsinomu nedeniyle ameliyat olmuş 105 hastanın cerrahi rezeksiyon materyallerinden hazırlanmış ve 3 adet hazır blok olmak üzere 108 adet parafin blok içinde saklanan tümör doku örneği kullanılmıştır (72 adet klasik tip PTK; 36 adet folliküler varyant PTK). BRAF V600E mutasyonu araştırılmasında kontrol grubu olarak bu hastalara ait tümör çevre dokuları kullanılmıştır. CYP2D6*4 polimorfizmi araştırılmasında kontrol grubu olarak tiroid karsinomu, hipertiroidi veya hipotroidi hikayesi olmayan 114 adet sağlıklı gönüllüden alınan periferik kan örnekleri kullanıldı. Gönüllüler karaciğer transplant donör adaylarıydı.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz, Amonyum asetat, Amonyum klorür, Asetik asit, Borik asit, Hidroklorik asit, Bromfenol mavisi, dNTP seti, EDTA, Etanol (%99), Etidyum Bromid, Potasyum bikarbonat, Sodyum dodesil (lauryl) sülfat, Sodyum hidroksit, Taq polimeraz, Ksilen, Proteinaz K, Potasyum hidroksit, DNA markeri (50 bç ve 100 bç'lik), BstN1 (Mva1) restriksiyon enzimi.

3.3. Kullanılan Gereçler

Bioer XPCycler PZR cihazı, Otoklav, Etüv, Hot plate, Dijital Görüntüleme sistemi, Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation), Hassas terazi (Scaltec), Gel Logic 100 görüntüleme sistemi, Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hettich), Spektrofotometre (Biochrom-S2100 diode array spectrophotometer), Su banyosu (Elektromag), Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL).

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

Amonyum klorürden 8,74 gram, Potasyum bikarbonattan 1 gram, 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetattan (EDTA) 200 µl ölçülü kap içine alındı. ddH₂O'dan 900 ml eklenerek çözeltinin pH'sı 1 normal NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra +4°C'de saklandı.

3.4.1.2. 0,5 M Disodyum etilentetraasetat (EDTA) Çözeltisi (pH 8,0)

Etilen diamin tetra asetattan 186,1 gram tartılarak beher içine alındı ve 800 mililitre ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı sodyum hidroksit çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)

Sodyum klorürden 233,6 gram tartılarak ölçülü kaba alındı ve üzerine 800 ml ddH₂O ilave edildi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözdürüldükten sonra ölçülü balon jojeye aktarılarak 1 l'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Lysis Buffer-WBL)

Balon jojeye 25 ml 4 M sodyum klorür ve 50 ml 0,5 M etilen diamin tetra asetat (EDTA) aktarılarak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (stok)

Tris bazdan 121,1 gr tartılarak ölçülü kaba alındı. Üzerine 42µl hidroklorik asit ile yaklaşık 800 ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.6. 9,5 M Amonyum Asetat

Amonyum asetattan 73,22 gr tartılarak ölçülü kap içine alındı. Üzerine 80 ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

Sodyum dodesil sülfattan 10 gram tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek ölçülü kap içine alındı ve üzerine 80 ml ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7,2'ye ayarlandı. 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

Proteinaz K'dan 20 mg tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 ml'ye tamamlandı ve -20°C'de saklandı.

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılacak Çözeltiler

3.4.2.1. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

Etidyum bromür'den 10 gr tartılarak steril ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

Yükleme tamponu için 20 gr Ficoll 400, 1 gram SDS, 1,2 ml 0,5 M'lık EDTA, 1 ml 1 M'lık Tris (pH 8.0), 200 mg Bromo fenol mavisi, 200 mg Ksilen siyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.4.2.3. Tris-Borik asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

TBE hazırlamak için 54 gr Tris baz ve 27,5 gr Borik asit, 20 ml 0,5 M'lık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH₂O manyetik karıştırıcıda çözündürüldükten sonra balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemle gerçekleştirildi. EDTA'lı tüplere alınan 10 ml'lik kan örnekleri çalışma için falkon tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 1:3 oranında lizis çözeltisi eklenerek +4°C'de 15 dk bekletildi. Daha sonra 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısımları atılarak peletler tamamen süspansiyon durumuna getirildi ve üzerlerine tekrar 15-20 ml lizis çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dk bekletildikten sonra 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldı ve süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K ve lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1 ml Örnek başına 0,37 ml 9,5 M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA mikropipet ucuyla alındı. Alınan DNA %70'lik alkolde yıkandı ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek +4°C'de saklandı.

3.5.2. Parafin Bloğa Gömülü Dokuların DNA İzolasyonu Öncesi Hazırlanması

Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde tiroid dokusu cerrahi rezeksiyonla çıkartılmış; okült olmayan, Klasik Tip ve Foliküler Varyant Papiller Tiroid Karsinomu tanısı almış olan 108 hasta (56 klasik tip PTK; 53 foliküler varyant PTK) patoloji rapor arşivinden tespit edildi. Bu hastaların cerrahi rezeksiyon materyallerinden hazırlanmış parafin blokları ve bu bloklardan kesitler alınarak hazırlanmış olan cam preparatlar Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji ABD arşivinden çıkartıldı. Patolog eşliğinde mikroskopla incelenmeleri sonucunda hastaların tümör ve çevre dokularına ait bölgeler cam preparatlar ve parafin bloklar üzerinde işaretlendi ve ardından steril iğne uçları kullanılarak steril 1,5 ml'lik tüplere alındı.

3.5.3. Parafin Bloğa Gömülü Dokulardan DNA İzolasyonu

Ticari bir firmaya ait kit (Purelink™ Genomik DNA İzolasyon Kiti, Invitrogen) kullanılarak parafin bloğa gömülü tümör ve çevre dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. Isı blokları 37°C ve 50°C'ye ayarlandı.
2. Yaklaşık 20'şer mg'lık doku parçalarının üzerine 1'er ml ksilen eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 30 dk oda ısısında bekletildi.
3. 3 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
4. 1 ml %99'luk absolü etanol eklendi. Vorteksle karıştırıldı.
5. 3 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
6. 4 ve 5. basamaklar tekrar edildi.
7. 37°C'de 10 dk ve 50°C'de 10 dk tutularak alkol buharlaştırıldı.
8. 180 µl digesyon buffer eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldı.
9. 20 µl proteinaz K eklendi. Hafifçe vortekslendi.
10. Gece boyunca 50°C'de inkübe edildi.
11. 3 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe aktarıldı.
12. 20 µl RNaz eklenmesinin ardından 2 dk oda ısısında inkübe edildi.
13. 200 µl binding buffer eklendi ve kısaca vortekslendi.
14. 200 µl %99'luk etanol eklendi ve iyice vortekslendi. Lizat filtreli tüpe alındı.
15. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alt tüp değiştirildi.
16. 500 µl wash buffer I eklendi. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alt tüp boşaltıldı.
17. 500 µl wash buffer II eklendi. 13000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
18. Filtre temiz kapaklı tüpe alındı. 50 µl önceden 60°C'ye ısıtılmış ddH₂O eklendi. Bir dk bekletildi.
19. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmenin ardından filtre atıldı.

3.5.4. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Elde edilen DNA örneklerinde konsantrasyon ve miktar tayini yapmadan önce her örnekten 20 µl alınarak üzeri 380 µl 0,5X TE tamponu ile tamamlandı ve bu şekilde 1/20 dilüsyonu sağlandı. Bu dilüsyon örneklerinin daha sonra spektrofotometrede 260nm ve 280 nm dalga boylarında OD ölçümleri yapıldı.

Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. DNA'nın 50 µg/ml çift iplikçikli içeriğinin 260 nm dalga boyunda bir optik dansite verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Sulandırma oranı}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1,8'dir. ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelmektedir.

3.5.5. MASA-PZR Yöntemiyle BRAF V600E Mutasyonu Saptanması

3.5.5.1. PZR'de Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/µl) (Fermentas EPO402)

PZR reaksiyonundaki konsantrasyonu 2,5 U olacak şekilde 50 µl'lik PZR karışımına 0,5 µl eklendi.

10 X Taq PZR Tamponu (NH_4) SO_4 'lü (Fermentas EPO402)

Tris-HCl'den 100 mM (pH 8,8, 25°C'de), 500 mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 50 µl'lik PZR karışımına 5 µl eklendi.

MgCl_2 (25 mM/ml, Fermentas EPO402)

50 µl'lik PZR karışımına 1,6 µl MgCl_2 eklendi.

dNTP'ler (100 µmol/ml)(Fermentas R0171)

dNTP'lerden (dATP, dGTP, dCTP, DTTP) 10'ar µl alınıp (toplam 40 µl) 1 ml'lik tüpe konuldu ve üzerine 960 µl distile su eklenerek (dH_2O) 1000 µl 1 mM'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20°C'de saklandı. 50 µl'lik PZR karışımına 3 µl eklendi.

3.5.5.2. 7'inci Kromozomda BRAF Geni Ekzon 15 Bölgesinin MASA-PZR Yöntemiyle Çoğaltılması

BRAF geninin 15. ekzonunda ortaya çıkan BRAF V600E mutasyonunun belirlenmesi için gen bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler insan genom databaseleri kullanılarak doğrulanmış

primer dizileridir. Primerler kullanılmadan önce sulandırılarak 100 pmol/μl'lik stoklar hazırlanmıştır. PZR'de kullanılmadan önce 12,5 pmol/μl olacak şekilde sulandırılmıştır.

İleri Primer 1: 5' - TAG GTG ATT TTG GTC TAG CTA CAG T-3'

İleri Primer 2: 5' - GGT GAT TTT GGT CTA GCT ACA AA-3'

Geri Primer: 5' GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'

BRAF geninin 15. ekzonunun çoğaltılması için PZR karışımı aşağıdaki gibidir:

50 μl'lik karışım; dH₂O 33μl, dNTP 3 μl, PZR tamponu 5 μl, MgCl₂ 1,6 μl, her bir primerden 0,5 μl, Taq polimeraz 0,4 μl.

Normal tip ve mutant tip ekzon 15'i çoğaltmak üzere her örnek için ikişer tüp hazırlandı. Normal tip için ileri primer 1; mutant tip için ileri primer 2 kullanıldı. İkisinde de aynı geri primer kullanıldı.

Taq polimeraz eklendikten sonra tüp içindeki bileşenler pipetleme işlemi ile karıştırıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 44 μl PZR karışımı konuldu. Daha sonra her tüpe 6 μl DNA (30-100 ng) eklendi. Tüpler PZR cihazına yerleştirildi.

3.5.5.3. PZR Şartları

BRAF geninin 15. ekzonunun çoğaltılmasında kullanılan primerler için bağlanma ısı 58°C olarak saptanmıştır. Optimize edilmiş PZR şartları Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: BRAF geninin 15. ekzonunun çoğaltılmasında kullanılan PZR şartları

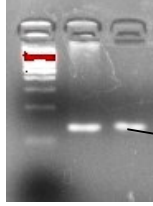
94°C	2 dk	
94°C	30 sn	
58°C	30 sn	45 döngü
72°C	30 sn	
72°C	5 dk	

3.5.5.4. MASA-PZR Ürünlerinin Kontrolü

PZR ürünlerinin kontrolü için %3'lük agaroz jel hazırlandı. 10 µl PZR ürünü, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Ürünler 100 bp'lik DNA markeri (Fermentas 100 bp marker) ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bandlar UV ışık altında incelendi.

DNA marker

100 bç 1 2

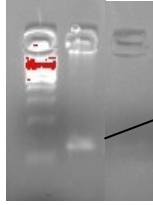


128 bç

Şekil 3-1: 128 bç'lik normal tip BRAF PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

DNA marker

100 bç 1 2



126 bç

Şekil 3-2: 126 bç'lik mutant tip (BRAF V600E) PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1 no'lu örnek BRAF V600E mutasyonlu, 2 no'lu örnek normal tiptedir.

3.5.5.5. MASA-PZR Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

İleri primer 1 kullanılarak yapılan birinci PZR normal tip ekzon 15'in çoğalmasını; ileri primer 2 kullanılarak yapılan PZR ise mutant tipin (BRAF V600E) çoğalmasını sağlamaktadır. Normal tipte 128 bç'lik, mutant tipte 126 bç'lik band oluşmaktadır. Örneğin normal tipi için yapılan PZR sonucu 128 bç'lik band görülmüş; mutant için yapılan PZR sonucu band görülmemiş ise hastada BRAF V600E mutasyonu yoktur. Eğer her iki PZR ürünü yürütüldüğünde de band görülmüş ise BRAF V600E mutasyonu vardır şeklinde değerlendirildi.

3.5.5.6. CYP2D6 Enziminin Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

Kromozom 22 üzerinde yer alan CYP2D6 gen bölgesinin intron 3 ve intron 4'ün birleşme yerinin çoğaltılması amacıyla aşağıdaki primerler kullanıldı.

İleri Primer: 5' CCT TCG CCA ACC ACT CCG- 3'

Geri Primer: 5' AAA TCC TGC TCT TCC CAG GC- 3'

Gen bölgesinin çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı aşağıdaki gibidir:

50 µl'lik karışım; dH₂O 31 µl, dNTP 3 µl, PZR tamponu 6 µl, MgCl₂ 2,4 µl, her bir primerden 0,6 µl, Taq polimeraz 0,4 µl.

Taq polimeraz eklendikten sonra tüp içindeki bileşenler pipetleme işlemi ile karıştırıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 44 µl PZR karışımı konuldu. Daha sonra her tüpe 6 µl DNA (30-100 ng) eklendi. Tüpler PZR cihazına yerleştirildi.

3.5.5.7. PZR Şartları

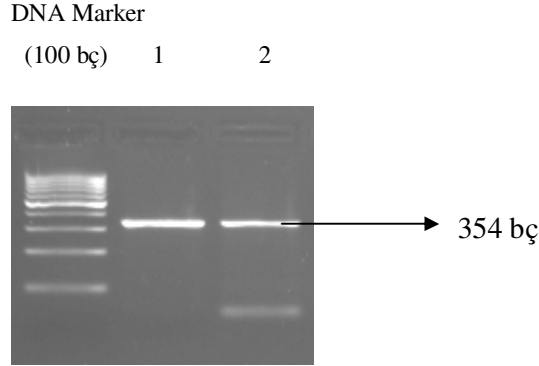
CYP2D6 geninin intron 3 ve intron 4'ün birleşme yerinin çoğaltılması amacıyla kullanılan primerler için bağlanma ısı 63°C olarak saptanmıştır. Optimize edilmiş PZR şartları Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: CYP2D6 geninin intron 3 ve intron 4'ün birleşme yerinin çoğaltılması amacıyla kullanılan PZR şartları

<u>94°C</u>	<u>5 dk</u>	
94°C	45 sn	
63°C	45 sn	45 döngü
<u>72°C</u>	<u>60 sn</u>	
72°C	7 dk	

3.5.5.8. PZR Ürünlerinin Kontrolü

Çoğaltılan bölgeye ait PZR ürünlerinin kontrolü için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 10 µl PZR ürünü, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Ürünler 100 bç'lik DNA markeri (Fermentas 100 bç marker) ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bandlar UV ışık altında incelendi. Çoğalma ürünlerinin göstergesi 354 bç'lik bandların görülmesi idi.



Şekil 3-3: 354 bç'lik CYP2D6 genine ait PZR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü

3.5.5.9. PZR ile Çoğaltılan CYP2D6 Geni İntron 3 ve Ekzon 4 Birleşme Yerinin RFLP Yöntemi ile Kesilmesi

Çoğaltılan 354 bç'lik PZR ürünlerinin kesilmesi amacıyla BstN1 (Mva1) enzimi kullanıldı. Bu amaçla kesim miski hazırlandı. Her örnek için 0,2 µl BstN1 kesim enzimi, 2 µl R tamponu, 7,8 µl su kullanılarak miks hazırlandı. 0,2'lik tüpe alındı. Üzerine 10 µl PZR ürünü eklendi. PZR cihazında 37°C'de 2 saat inkübe edildi. BstN1 enziminin DNA dizisinde kestiği yer aşağıda görülmektedir.

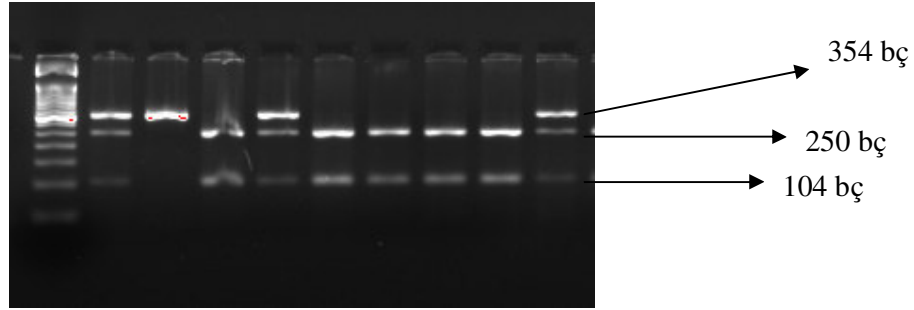
5'...CC/WGG...3'

3'...GGW/CC...5'

3.5.5.10. Kesim Ürünlerinin Kontrolü

Kesim ürünlerinin kontrolü için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 10 µl kesim ürünü, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. Jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Ürünler 50 bç'lik DNA markeri (Fermentas 50 bç marker) ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bandlar UV ışık altında incelendi.

DNA Marker
(50 bç)



Şekil 3-4: CYP2D6 kesim ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

3.5.5.11. RFLP-PZR Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Kesim ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucunda bandlar üç farklı büyüklükte görüldü. Eğer çoğaltılan dizi BstN1 kesim enzimiyle kesiliyorsa genotip normal (GG) demektir. Normal tipte 250 ve 104 bç'lik iki band gözlemlendi. Çoğaltılan dizi enzimle kesilmiyorsa 354 bç'lik tek band görülmekteydi. Bu band homozigot CYP2D6*4 polimorfizmi olduğunu gösteriyordu. Örnekte eğer her üç band da varsa (354 bç, 250 bç ve 104 bç) bu örneğin polimorfizm yönünden heterozigot olduğunu gösteriyordu.

3.5.5.12. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 15,0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

PTK vakalarında BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6*4 polimorfizmi genotipleri ile histolojik varyantlar ve histopatolojik parametreler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde Pearson χ^2 Testi ve T-Testi kullanıldı.

İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Tez projemizde 2000-2006 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji ABD'na cerrahi materyalleri gelmiş 105 adet rezeksiyonla alınmış parafin blok ve 3 adet hazır blok olmak üzere toplam 108 adet parafin blok içinde saklanan tümör ve normal çevre doku örneği kullanılmıştır. Hastaların yaş ortalaması $50,56 \pm 16,68$ 'dir. CYP2D6*4 polimorfizmi araştırılmasında kontrol grubu olarak tiroid hastalığı öyküsü olmayan 114 sağlıklı gönüllüden alınan kontrol kanı kullanılmıştır. Kontrollerin yaş ortalaması $32,99 \pm 10,46$ 'dır. Hasta grubu okült olmayan örneklerden randomize seçilmiştir.

Bu hastaların 72'si (%66,7) klasik tip, 36'sı (%33,3) foliküler varyant PTK tanısı almıştır.

Hastaların 28'i (%25,9) multifokalite gösteriyordu.

Tümör sınırlarına göre 27(%25)'si ekspansif, 64(%59,3)'ü infiltratif, 13(%12)'ü miks karakterdeydi.

Tümör dışı çevre dokunun 76(%70,4)'sı adenomatöz hiperplazi, 6(%5,6)'sı diffüz hiperplazi, 15(%13,9)'i lenfositik tiroidit, 2(%1,9)'si Hashimoto tiroidit, 2(%1,9)'si tümör ve 3(%2,8)'i normal dokudan oluşmaktaydı.

Vakaların 74(68,5)'ünün uzak çevre dokusu yoktu. Geriye kalan 7(6,5)'sinde adenomatöz hiperplazi, 1(%0,9)'inde diffüz hiperplazi, 9(%8,3)'ünde lenfositik tiroidit, 5(%4,6)'inde adenom, 1(%0,9)'inde hurtle hücreli adenom, 2(%1,9)'sinde lokal fibröz, 4(%3,7)'ünde hurtle metaplazi ve 1(%3,7)'inde normal doku vardı.

Çalışmamızda BRAF V600E mutasyonu saptanan tüm örnekler heterozigottu. Tümör dokularının 57(%52,8)'sinde BRAF V600E mutasyonu saptandı. Tümörlerin çevre normal dokularının 8(%7,4)'inde BRAF V600E mutasyonu saptandı. Yine elimizdeki doku örneklerinden 42'si randomize seçilerek bunlara ait farklı parafin bloklardan yeniden DNA izolasyonu yapıldı ve mutasyon durumu araştırıldı. Örneklerin iki tanesi hariç tümü önceden izole edilenlerin sonuçlarıyla aynı sonuçlara sahipti.

CYP2D6*4 polimorfizmi çalışması sonucu, hasta grubundan 54(%50) vaka homozigot normal genotipte (hızlı metabolize edici), 15(%13,9) vaka heterozigot mutant ve 7(%6,5) vaka homozigot mutant (yavaş metabolize edici) bulunmuştur. Hastaların 32'sine ait genotiplendirme yapılamamıştır. Kontrol grubunda 92(%80) vaka

homozigot normal genotipte, 19(%16) vaka heterozigot mutant ve 3(%2,6) vaka homozigot mutant bulunmuştur (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: CYP2D6*4 polimorfizminin kontrol ve hasta grubundaki frekansları

	KONTROL	HASTA
GENOTİP	<i>N=114 (N%)</i>	<i>N=76 (N%)</i>
HME (GG)	92(%80)	54(71,1)
HeME (GA)	19(%16)	15(19,7)
YME (AA)	3(%2,6)	7(9,2)

HME: Hızlı Metabolize Edici

HeME: Heterozigot Metabolize Edici

YME: Yavaş Metabolize Edici

Hasta grubunda ‘A’ allel frekansı %19, ‘G’ allel frekansı %81 iken; kontrol grubunda ‘A’ allel frekansı %11, ‘G’ allel frekansı %89 bulunmuştur.

Çalışma grubumuzdaki tümör varyantları olan klasik tip ve foliküler varyant PTC vakaları yaş, cinsiyet ve histopatolojik özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Klasik tip varyantlı vakaların yaş ortalaması $52,88 \pm 17,11$; foliküler varyantlıların ise $44,94 \pm 15,216$ idi. İki grup arasında kadın erkek dağılımı aynı bulunmuştur ($X^2=0$, $p=1$). Tümör varyantları tümör sınırları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($X^2=16,993$, $p=0,000$). Multifokalite açısından aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ($X^2=0,424$, $p=0,515$, $OR=1,346$, %95 $CI=0,549-3,297$). Tümör dışı çevre dokuları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($X^2=9,313$, $p=0,097$). Tümör dışı uzak çevre dokuları arasında da anlamlı fark gözlenmemiştir ($X^2=5,253$, $p=0,730$). Tümör varyantlarının histopatolojik özelliklerinin dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-2)

Tablo 4-2:Tümör varyantlarında hastalara ait histopatolojik verilerin dağılımı

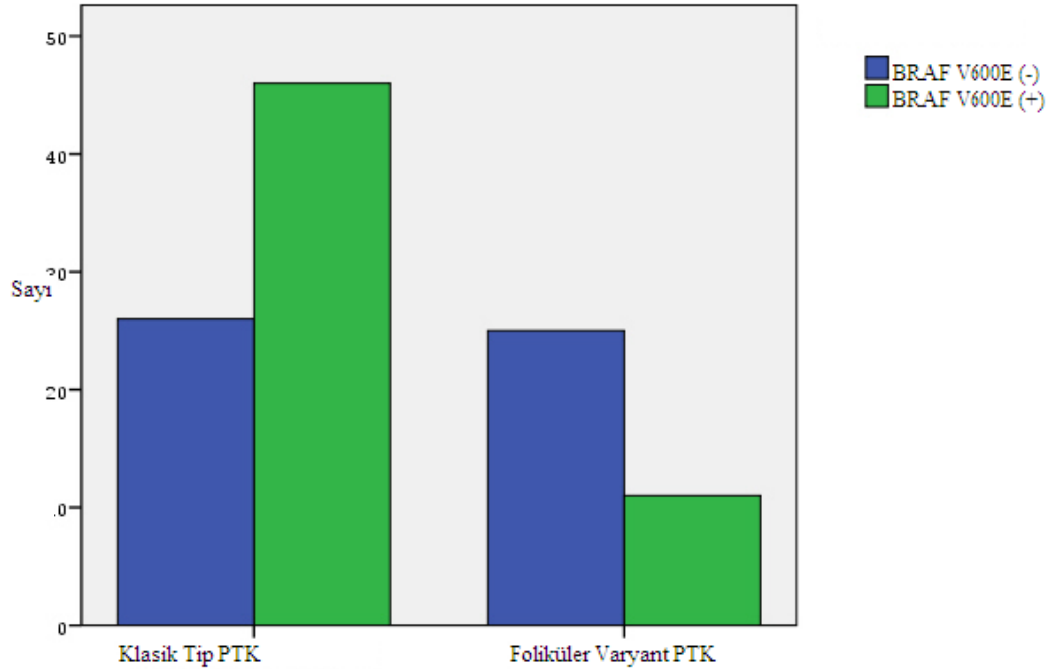
		Klasik Tip PTK	FVPTK
Yaş		$52,88 \pm 17,11$	$44,94 \pm 15,21$

Cinsiyet	Kadın	52(%72,2)	26(%72,2)
	Erkek	20(%27,8)	10(%27,8)
Tümör sınırı	Ekspansif	9(%13,2)	18(%50)
	İnfiltratif	48(%70,6)	16(%44,4)
	Miks	11(%16,2)	2(%5,6)
Multifokalite	Var	17(%24,6)	11(%30,6)
	Yok	52(%75,4)	25(%60,4)
Tümör dışı çevre doku	Adenomatöz hiperplazi	55(%80,9)	21(%58,3)
	Diffüz hiperplazi	2(%2,9)	4(%11,1)
	Lenfositik tiroidit	7(%10,3)	8(%22,2)
	Hashimoto	1(%1,5)	1(%2,8)
	Tümör	2(%2,9)	0
	Normal	1(%1,5)	2(%5,6)
Tümör dışı uzak çevre doku	Yok	47(%69,1)	27(%75)
	Adenomatöz hiperplazi	5(%7,4)	2(%5,6)
	Diffüz hiperplazi	1(%1,5)	0
	Lenfositik tiroidit	5(%7,4)	4(%11,1)
	Adenom	4(%5,9)	1(%2,8)
	Hurtle hücreli adenom	1(%1,5)	0
	Fokal fibroz	2(%2,9)	0
	Normal	0	1(%2,8)
	Hurtle metaplazi	3(%4,4)	1(%2,8)

BRAF V600E mutasyonu klasik tip PTK'larda FVPTK'lara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($X^2=10,700$, $p=0,001$, $OR=0,249$, %95 $CI=0,106-0,586$)(Şekil 4-1). Tümör dışı çevre normal dokuda bu mutasyonun varlığı yönünden PTK varyantları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($X^2=0,334$, $p=0,563$, $OR=0,616$, %95 $CI=0,118-3,226$). CYP2D6 genotiplerine göre klasik ve foliküler varyant PTK vakalarında anlamlı fark saptanmamıştır ($X^2=0,475$, $p=0,788$) (Şekil 4-2). Klasik tip ve Foliküler Varyant PTK'larda BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6 genotip dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Tümör varyantlarında BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6*4 genotip dağılımı

		Klasik Tip PTK	Foliküler Varyant PTK
Tümörde BRAF V600E mutasyonu	Var	46(%63,9)	11(%30,6)
	Yok	26(%36,1)	25(%69,4)
Tümör dışı çevre dokuda BRAF V600E mutasyonu	Var	6(%9)	2(%5,7)
	Yok	61(%91)	33(%94,3)
CYP2D6*4 polimorfizmi	GG	40(%70,2)	14(%73,7)
	GA	11(%19,3)	4(%21,1)
	AA	6(%10,5)	1(%5,3)



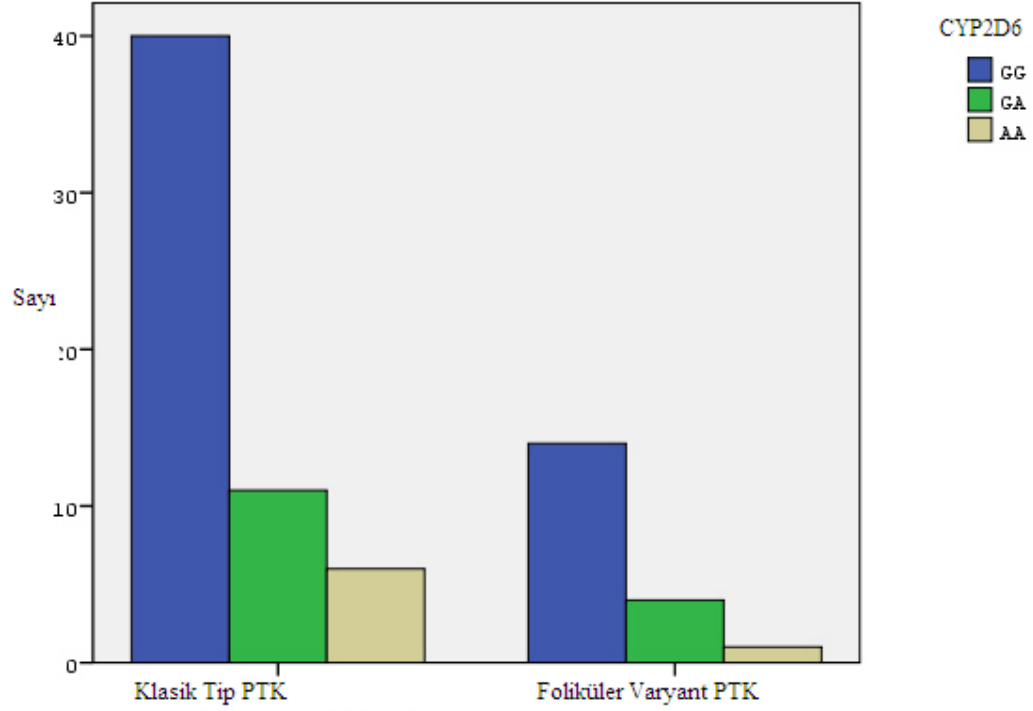
Şekil 4-1: Klasik Tip ve Foliküler Varyant PTK'larda BRAF V600E mutasyonu dağılımı

BRAF V600E mutasyon varlığı pozitif ve negatif olan vakaların cinsiyetleri bakımından aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ($X^2=2,721$, $p=0,099$, $OR=0,489$, %95 $CI=0,207-1,152$). Tümör sınırı özellikleri yönünden de aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ($X^2=3,417$, $p=0,181$). Multifokalite yönünden aralarında anlamlı fark gözlenmemiştir ($X^2=0,070$, $p=0,791$, $OR=1,124$, %95 $CI=0,473-2,675$). Tümör dışı çevre doku özellikleri ile iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($X^2=7,947$, $p=0,159$). Tümör dışı uzak çevre doku bakımından iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($X^2=11,935$, $p=0,154$). Dokuların histopatolojik özelliklerinin BRAF V600E mutasyonu taşıyan ve taşımayan vakalar arasında dağılımları tabloda verilmiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Histopatolojik özelliklerin BRAF V600E mutasyonu taşıyan ve taşımayan vakalarda dağılımı

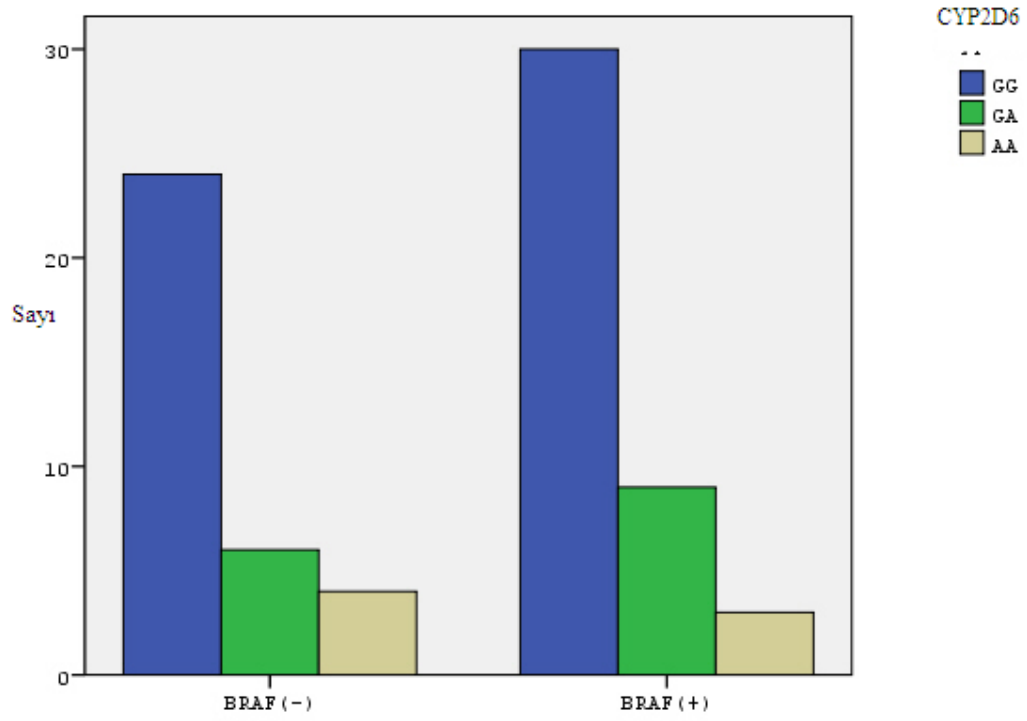
		BRAF V600E Pozitif	BRAF V600E Negatif
Yaş		54,63±16,63	45,31±15,86
Cinsiyet	Kadın Erkek	45(%78,9) 12(%21,1)	33(%64,7) 18(%35,3)
Tümör sınırı	Ekspansif İnfiltratif Miks	10(%18,9) 37(%69,8) 6(%11,3)	17(%33,3) 27(%52,9) 7(%13,7)
Multifokalite	Var Yok	15(%27,8) 39(%72,2)	13(%25,5) 38(%74,5)
Tümör dışı çevre doku	Adenomatöz hiperplazi Diffüz hiperplazi Lenfositik tiroidit Hashimoto Tümör Normal	43(%81,1) 4(%7,5) 5(%9,4) 0 0 1(%1,9)	33(%64,7) 2(%3,9) 10(%19,6) 2(%3,9) 2(%3,9) 2(%3,9)
Tümör dışı uzak çevre doku	Adenomatöz hiperplazi Diffüz hiperplazi Lenfositik tiroidit	1(%1,9) 1(%1,9) 4(%7,5)	6(%11,8) 0 5(%9,8)

	Adenom	4(%7,5)	1(%2,0)
	Hurtle hücreli adenom	0	1(%2,0)
	Fokal fibroz	2(%3,8)	0
	Normal	0	1(%2,0)
	Hurtle metaplazi	1(%1,9)	3(%5,9)



Şekil 4-2: Klasik Tip ve Foliküler Varyant PTK'larda CYP2D6 genotip dağılımı

Son olarak tümör dokularında BRAF V600E mutasyonu varlığı ile CYP2D6 genotipleri arasındaki ilişki araştırılmış ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($X^2=0,574$, $p=0,751$) (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: BRAF V600E mutasyonu taşıyan ve taşımayan vakalarda CYP2D6 genotip dağılımı.

5. TARTIŞMA

Papiller Tiroid Karsinomu yılda 100000’de 2-4 yeni vaka görülen en yaygın endokrin tümördür. Başlıca RET onkogeni (101,111) ve son zamanlarda önemi anlaşılan BRAF (9,60,63,112) genindeki mutasyonlar PTK’lerde sıklıkla artmaktadır. Her iki gen de MAP kinaz sinyal yolağı üzerinden etki etmekte ve bu tümörün patogenezinde merkezi rol üstlenmektedir (16,86). MAP kinaz yolağı reseptör aracılı sinyalin hücre membranından alınarak hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışmaktadır. MAP kinaz sinyal yolağı hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozu içeren fizyolojik süreçlerde rol almaktadır hormonlar, büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri bu yolağı kullanmaktadır. Sinyal Ras aktivasyonu ile başlar. Aktive olan Ras Raf’ı; Raf da aşağı doğru diğer kinazları aktive ederek sinyalin nükleusa ulaşması sağlanır. İnsan tümörlerinin %30’unda Ras-Raf-MAP kinaz yolağının aşırı aktivasyonu söz konusudur, bu sıklık tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığıyla uyumludur (46).

Aktive edici BRAF mutasyonları sıklıkla kinaz domenin glisinden zengin ilmiği ve aktivasyon segmentinde gerçekleşir. BRAF geni 15’inci ekzonunun 1799’uncu nükleotidinde timin/adenin (T/A) transversiyonu gerçekleşmesi sonucunda 600’üncü amino asid kalıntısındaki valin, glutamata dönüşür. Bu değişim ile BRAF’ın kinaz aktivitesi sürekli açık kalır. Sonuçta ortaya çıkan protein NIH3T3 hücrelerini transforme edebilen yüksek kinaz aktivitesi göstermektedir (16,86). BRAF V600E mutasyonunun transgenik farelerde tiroid karsinomasını indüklediği gösterilmiştir (42).

BRAF V600E mutasyonunun sporadik tiroid kanserlerinde somatik bir mutasyon olduğu bildirilmiştir (44,116). BRAF mutasyonlarının en sık malign melanomlarda (%70), daha sonra kolon, over, akciğer kanserlerinde ve sarkomalarda (%10-20) görüldüğü bildirilmiştir. (16). Çeşitli yayınlarda tezimizin de konusu olan papiller tiroid kanserlerinin % 29-83’ünde BRAF V600E mutasyonu varlığı bildirilmiştir (44,63,102,114). Tiroid tümörlerinde nadir olduğu bildirilen bir mutasyon olan BRAF K601 E mutasyonunu Soares ve ark. (2003) çalışmalarında iki benign tiroid adenomunda, Trovisco ve ark. (2004) çalışmalarında sadece 3 foliküler varyant PTK’da saptamışlardır (112,113). BRAF K601’e göre daha yaygın olmakla birlikte, diğer nadir

görülen BRAF gen mutasyonu olan AKAP9-BRAF yeni düzenlenmesi önceden radyasyona maruz kalmayla ilişkilendirilmiştir (113).

PTK'larda BRAF V600E mutasyonu klinik özelliklerle birlikte değerlendirildiğinde cinsiyet, evre, grade, TNM, multisentrisite ve rekürrens açısından normal genotiptekilerle mutasyonu taşıyan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (26,107,109). BRAF V600E'nin kötü evre ve/veya lokal, uzak metastazla ve rekürrenslle ilişkili bulunduğu çalışmalar da vardır (60,63,84,117).

Kimura ve ark. (2003) çalışmalarında 114 vakada BRAF V600E mutasyonu çalışmışlardır. PTK'ların %36'sında BRAF mutasyonu saptamışlardır. Buna karşın foliküler tiroid karsinoması ve benign neoplazmlarda bu mutasyona rastlanmamıştır (44).

Cohen ve ark. (2003) yılında yaptıkları çalışmada; 35 PTK vakasının 24'ünde (%69) BRAF V600E mutasyonu bulmuşlardır (9). 2004 yılındaki çalışmalarında tümör varyantları açısından mutasyon sıklığını araştırmışlar ve klasik tip PTK'lı 42 hastanın 28'i, (%67) foliküler varyant PTK'lardan da 51 hastanın 6'sında (%12) BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır (102).

Xu ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada 56 PTK vakasının 21'inde (%38) BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır. Erkeklerde kadınlara göre mutasyon sıklığını istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek bulmuşlardır ($p<0,05$). Yaş artışıyla mutasyon sıklığının arttığını ancak bu artışın anlamlı olmadığını bildirmişlerdir ($p>0,05$). BRAF mutasyonu taşıyan 21 hastanın 8'inin aynı zamanda RET/PTK yeni düzenlenmesine sahip olduğunu saptamışlar ve daha geniş bir PTK çalışma grubunda BRAF mutasyonu ve RET/PTK yeni düzenlenmesinin üst üste çıkışacağını öne sürmüşlerdir. Aynı vakalarda NRAS ve BRAF mutasyonunun ikisini birlikte saptamamışlardır (116).

Soares ve ark. (2003) Portekiz'de yaptıkları çalışmada; 50 PTK vakasının 23'ünde (%46) BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır (112).

Fukushima ve ark. (2003) Japonya'da yaptıkları çalışmalarında 76 PTK vakasının 40'ünde (%53) BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır. Bu mutasyonun PTK'yı diğer tiroid karsinoma tiplerinden ayıran bir marker olduğunu ve PTK karsinogenezinde önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir (104).

Namba ve ark. (2003) Japonya'da yaptıkları çalışmada, 170 PTK vakasının 49'unda (%29) BRAF V600E mutasyonu bulmuşlardır (60).

Nikofova ve ark. (2003) Amerika’da çalışmada 119 PTK vakasının 45’inde (%38) BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır. Bunlardan 53 klasik tip PTK’nın 28’i (%53) 30 foliküler varyant PTK’nın 2’si (%7) 6 Tall-cell varyant PTK’nın 6’sı (%100) BRAF V600E mutasyonu taşımaktaydı (63).

Xing ve ark. (2005) Amerika’da yaptıkları çalışmada 30 PTK hastasının 18’inde (%60) BRAF V600E mutasyonu bulmuşlardır (115).

Trovisco ve ark. (2004) Portekiz’de yaptıkları çalışmada 124 PTK vakasının 45’inde (%36) 53 klasik tip varyantın 28’i (%53) 32 foliküler varyantın hiçbirisi 3 tall-cell varyantın 1’i (%33) BRAF V600E mutasyonu taşıyıcısıydı (113).

Kim ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada 70 klasik tip PTK’nın 58’inde (%83) BRAF V600E mutasyonu bulmuşlardır(106).

BRAF V600E mutasyonu benign tiroid neoplazmlarında bulunmayıp özellikle PTK’da yüksek prevalansta bulunduğundan diagnostik değeri vardır (84).

Kim ve ark. (2006) vakalarının tümü klasik tip PTK olarak seçilen çalışmalarında BRAF V600E sıklığını %73,4 bulmuşlardır. Erkek cinsiyet, tümörün büyük olmasıyla bu mutasyon arasında ilişki olduğunu ancak; yaş, tümör sınırı, multifokalite, lenf nodu metastazı ve tümör evresi ile bu mutasyon varlığı arasında ilişki olmadığını gözlemlemişlerdir (108).

Chung ve ark. (2006) Kore’de 107 PTK hastasının iğne aspirasyon biyopsi materyallerinde BRAF V600E mutasyonunu araştırmışlardır. Hastaların 92’sinde (%86) mutasyon saptamışlardır. Çalışmalarında BRAF mutasyonu ile yaş, cinsiyet, tümör büyüklüğü, tümör yayılımı, lenf nodu metastazı ve multisentrisite arasında ilişki bulmamışlardır (103).

Rowe ve ark. (2007) Amerika’da 42 PTK vakası ile yaptıkları çalışmalarında klasik tip PTK’larda BRAF V600E mutasyon sıklığını %77,8, foliküler varyantlarda %33,3; tüm PTK vakalarında da %62,2 bulmuşlardır (110).

Giannini ve ark. (2007) 50 PTK hastası ile yaptıkları çalışmada hastaların 31’inde (%62) (klasik tip PTK’lı 18 hastadan 10’u (%55,5); foliküler varyant PTK’larda 17 hastanın 9’u (%52,9); tall cell varyant PTK’larda 15 hastanın 12’sinde (%80) BRAF V600E mutasyonu bulmuşlardır. Foliküler varyant için literatüre göre yüksek olan bu sıklığı tüm vakaların multifokal ve metastatik olması ile yorumlamışlardır (105).

Lupi ve ark. (2007) İtalya’da 500 PTK hastası ile çalışmalarında BRAF V600E sıklığının %43,8 olduğunu saptamışlardır. Tiroid dışına invazyon ($p=0,0001$),

multisentrisite ($p=0,0026$), nodal metastaz varlığı ($p=0,00000006$), ileri evre ($0,00001$) ile mutasyon arasında önemli derecede ilişki bulurken; yaş ve cinsiyetle mutasyon arasında ilişki bulmamışlardır (54).

Riesco-Eizoguirre ve ark. (2006) İspanya'da 67 PTK vakasında yaptıkları çalışmalarında 28'inde (%41,7) BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır. Bu mutasyon ile tümör dışına yayılım arasında önemli ilişki bulmuşlardır. Hastanın cinsiyeti, yaşı, metastaz durumu, hastalık teşhis yaşında ise BRAF V600E ile ilişki bulmamışlardır. Klasik tip PTK'da foliküler varyanta göre daha yüksek frekansta bulmalarına rağmen mutasyon açısından iki tümör varyantı arasında anlamlı fark olmadığını gözlemlemişlerdir. BRAF V600E ekspresyonunun tiroid bezinde sodyum-iyot simporter ekspresyonunu ve membrana hedeflenmesini bozarak tedavi amacıyla kullanılacak olan İyot-131 tutulumunda azalmaya neden olduğu ve bu nedenle PTK'ların yüksek tekrarlama riski ile uyumlu bir tanı faktörü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (74).

Palona ve ark. (2006) Japonya'da hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmalarında tiroid hücrelerinde BRAF V600E ekspresyonunun, NF- κ B'ye bağımlı ve MEK-ERK'den bağımsız olarak c-IAP-1, c-IAP-2 ve X-IAP gibi inhibitör apoptotik protein (IAP) ailesi protein ekspresyonunu uyarak apoptoza karşı direnci artırdığını; diğer taraftan matriks metalloproteinaz 1 (MMP1) ve matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) ekspresyonlarını artırarak hücre invazyonunu artırdığını bildirmişlerdir (68).

Xing ve ark. (2009) PTK nedeniyle cerrahi olarak opere edilecek 190 vakanın iğne aspirasyon biyopsi materyalinde BRAF V600E sıklığını %38 saptamışlardır. Mutasyon sıklığı varyantlar arasında klasik tip PTK için %45, foliküler varyant için %12, tall cell varyant için %47 bulunmuştur. Tiroid dışına yayılım ($p=0,039$) ve kapsüler invazyon ($p=0,45$) ile anlamlı bir ilişki bulmazlarken, lenf nodu metastazı ($p=0,002$) ile anlamlı ilişki bulmuşlardır. Hastaların yaş ve cinsiyetiyle BRAF mutasyonu arasında ilişki bulunmamıştır. Operasyon öncesi risk belirlenmesinde çok faydalı olacağını bildirmişlerdir (118).

Basolo ve ark. (2010) İtalya'da tümör çapı 20 mm'nin altında olan 1060 PTK vakasında yaptıkları çalışmalarında 473 (%44,6) vakada BRAF V600E mutasyonu saptamışlardır. PTK varyantlarında mutasyon frekanslarını mikro PTK'larda % 39,4, klasik tipte % 69,4, foliküler varyantta % 21,3 ve tall cell varyantta %79,7 bulmuşlardır. Beklenmedikleri biçimde BRAF V600E mutasyonu frekansı teşhis yaşı 45 altı olan vakalarda (%49,4), 45 yaş üstü vakalara göre (%40,8) anlamlı derecede yüksek bulundu

($p=0,006$). BRAF mutasyonu tümör büyüklüğü ($p=0,0001$), multifokalite ($p=0,0001$), kapsül olmaması ($p=0,0001$), tiroid dışına yayılım ($p=0,0001$) ve lenf nodu metastazı ve ileri evre ile önemli derecede ilişkili bulunmuştur. Cinsiyetle BRAF mutasyonu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (119).

Xu. ve arkadaşları (2003) BRAF V600E mutasyonunun araştırılmasında bizim de kendi çalışmamızda kullanmış olduğumuz MASA- PZR yöntemini kullanmışlar ve daha sonra spesifikliğini ve güvenilirliğini test etmek amacıyla 21 mutasyon taşıyıcısı vakanın 9'unu randomize seçerek dizileme yapmışlardır. MASA-PZR sonuçlarını dizileme sonuçlarıyla %100 uyumlu bulmuşlar ve yöntemin spesifik ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir (116).

Çalışmamızda PTK'lar Dünya Sağlık Örgütünün 2004 sınıflandırmasına göre belirlenmiştir. Ancak özellikle 2004 öncesi çalışmalarda aynı sınıflandırma kullanılmadığından muhtemelen vakalar sonraki çalışmalardakilere göre daha heterojen dağılmıştır.

Biz 108 PTK vakasında yaptığımız çalışmamızda vakaların 57'sinde (52,8) BRAF V600E mutasyonu olduğunu tespit ettik. Bu bulgu yapılan çalışmaların çoğunun sonuçlarına çok (Fukushima ve ark. 2003; Xing ve ark. 2005) benzerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar BRAF V600E sıklığını %69 bulan Cohen ve ark. (2003), %83 bulan Trovisco ve ark. %73 bulan Kim ve ark. (%2006), %86 bulan Chung ve ark. (2006) çalışmalarına göre düşük bulunmuştur. Buna karşın Namba ve ark. (2004); Kimura ve ark. (2003) çalışmalarına göre de yüksektir. Önceki çalışmalarda bu kadar farklı sonuçlar elde edilmesinin nedeni vaka sayılarının kimi çalışmalarda çok düşük tutulmasından ve laboratuvarlar arası farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda BRAF V600E'nin klasik tip PTK'deki sıklığı %63,9, foliküler varyantlardaki sıklığı ise %30,6 bulunmuştur. Önceki çalışmaların neredeyse tümünde bu mutasyon dominant olarak klasik tip PTK'da bulunmaktaydı. Elde ettiğimiz sonuç literatürle uyumludur.

Tümör dışı çevre dokuların 8'inde (%7,4) BRAF V600E mutasyonu tespit edilmiştir. Fenotipik olarak henüz o bölgede PTK özelliklerinin ortaya çıkmamasına karşın moleküler düzeyde transformasyonun gerçekleşmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda tümör sınırları açısından BRAF V600E mutasyonu taşıyan vakalarda infiltratiflerin sıklığı daha yüksek bulunmuştur. Ancak mutasyonu taşıyanlarla taşımayanlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Basolo ve ark. (2010)), Xing ve ark.

(2009), Riesco-Eizoguirre ve ark. (2006), Lupi ve ark. (2007) tiroid dışına yayılımı iki grup arasında önemli düzeyde anlamlı fark bulmuştur. Buna karşın Chung ve ark. (2006) Kim ve ark. (2006) tümör sınırları açısından fark bulamamıştır. Palona ve ark. (2006) da hücre kültürlerinde BRAF V600E mutasyonu taşıyan hücrelerde hücre invazyonunun yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda BRAF V600E pozitif kadınların sıklığı erkeklere göre daha yüksek olmasına rağmen cinsiyetle bu mutasyon arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Basolo ve ark. (2010), Xing ve ark. (2009), Lupi ve ark. (2007), Riesco-Eizoguirre ve ark. (2006), Chung ve ark. (2006) da bizimle aynı şekilde cinsiyetle mutasyon arasında ilişki bulmamışlardır. Kim ve ark. (2006) ise erkek cinsiyetle ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Basolo ve ark. (2010), Lupi ve ark. (2007) çalışmalarında multifokalite ile BRAF V600E mutasyonu arasında ilişki bulmuşlardır. Chung ve ark. (2006) ise ilişki bulamamıştır. Çalışmamızda Chung ve ark. gibi multifokalite ile BRAF V600E mutasyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler yaygın olarak polimorfiktir ve karsinojenleri detoksifiye etme veya prokarsinojenleri aktive etme yetenekleri kişiler arasında değişkenlik göstermektedir. Tanımlanan 50'den fazla insan CYP izoenzimi bulunmaktadır. Bu polimorfik CYP izoenzimleri içerisinde CYP2D6 (debrizokuin 4-hidroksilaz) şimdiye kadar tanımlanmış 75'ten fazla allelik varyanta sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalarda genotoksik metabolize edici enzimlere ait polimorfizmlerin bazı tümörlerin gelişim riskiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Akciğer, baş ve boyun, sindirim sistemi, meme, mesane, prostat, deri, tiroid ve hematolojik kanserleri içeren pek çok tip kanser bu polimorfizmlerle ilişkili bulunmuştur (29). CYP2D6 yavaş metabolize edici enzim gen polimorfizminin PTK dahil çeşitli kanserlere olan yatkınlığı değiştirdiği bildirilmiştir (51). Ancak çalışmalardan elde edilen sonuçlar etnik ve coğrafik değişikliklere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (29).

London ve ark. (1997) çalışmalarında beyazlarda akciğer kanseri ile CYP2D6 polimorfizmi arasında ilişki bildirmemişlerdir (120).

Topic ve ark (2000) CYP2D6*4 allel frekansını meme kanseri vakalarında %18,4; baş ve boyun kanserli vakalarda %14,3 bulmuşlardır. Bu allelli taşımak ile kanser arasında anlamlı ilişki bulmamışlardır (121).

Sobti ve ark (2006) CYP2D6*4 allel sıklığını prostat kanseri vakalarında kontrole göre yüksek bulmuşlar ancak istatistiksel bir anlamlılık bildirmemişlerdir (122).

Lemos ve ark. (2007) çalışmalarında 187 PTK vakasında CYP2D6*4 yavaş metabolize edici enzim polimorfizmini araştırmışlardır. Yavaş metabolize edici genotipin PTK'ya karşı koruyucu etkisinin olduğu gözlenmiştir. CYP2D6'nın bu etkisini çevresel kimyasal tiroid karsinojenlerinin metabolik aktivasyonu veya kansere neden olan diğer genlerle birlikte olası etkileşimiyle açıklamışlardır (51).

Çalışmamızda 108 PTK vakasının 76'sına ait CYP2D6*4 polimorfizmi genotiplerini saptadık. 32 vakanın sonucunu elde edemedik. Bunun nedeni olarak kullandığımız parafine gömülü arşiv dokularının DNA kalitesinin çok iyi olmaması ve CYP2D6 gen bölgesinin yıllar içinde degrade olmuş olabileceğini düşünmekteyiz. 76 PTK vakası sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında CYP2D6*4 yavaş metabolize edici allel bulundurma ile PTK arasında ilişki saptanmamıştır. Klasik tip ve foliküler varyant PTK vakaları arasında da CYP2D6*4 polimorfizmi açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak,

Tez çalışmamız Türk toplumunda PTK vakalarında BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6*4 yavaş metabolize edici enzim polimorfizminin incelendiği ilk çalışmadır.

BRAF V600E mutasyonu Klasik Tip PTK varyantlarda foliküler varyantlara göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

Histopatolojik özelliklerle BRAF V600E mutasyonu arasında ilişki gözlenmemiştir.

BRAF V600E mutasyonunun PTK için önemli bir marker olarak kullanılabileceğini ve yeni geliştirilecek ilaçlar için önemli bir hedef molekül olabileceğini düşünmekteyiz.

CYP2D6*4 yavaş metabolize edici enzim polimorfizmi ile PTK gelişimi arasında ilişki bulunmamıştır.

Yaptığımız çalışmayla BRAF V600E mutasyonu ve CYP2D6*4 yavaş metabolize edici enzim polimorfizmi birlikte değerlendirilmiş ve aralarında ilişki olmadığı gözlenmiştir. Bulunan sonuçların desteklenmesi için daha büyük hasta kontrol gruplarıyla çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1-Asklen LA, LiVolsi VA. (2000). Prognostic significance of histological grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. *Cancer*; 88: 1902-1908.

- 2- A.S. Dhillon, S. Meikle, Z. Yazici, M. Eulitz, W. Kolch. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signaling by dephosphorylation, *EMBO J.* 21 64–71.

- 3- Amal Al Omari and Daryl J. Murry. (2007). Pharmacogenetics of the Cytochrome P450 Enzyme System: Review of Current Knowledge and Clinical Significance. *Journal of Pharmacy Practice*; 20: 206.

- 4-Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, Flochart DA (2006). Interethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. Population: Clinical Implications. *Oncologist*; 11; 126-135.

- 5-Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64–67.

- 6-Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663–675.

- 7-Blume-Jensen P, Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signaling. *Nature*; 411: 355-64.
- D.R. Fabian, I.O. Daar, D.K. Morrison. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase, *Mol. Cell. Biol.* 13 7170–7179.

- 8-Chow SM, Law SC, Chan JK, Au SK, Yau S, Lau WH. (2003). Papillary microcarcinoma of the thyroid–prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality. *Cancer*; 98: 31-40.

9-Cohen Y, Xing M, Mambo E et al. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J. Natl Cancer Inst*; 95: 625–627.

10-Cooper GM, Hausman RE. (2004). *The Cell: A Molecular Approach*, Third Edition; 541-586.

11-Chang F, Steelman LS, Lee JT, et al. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*; 17:1263–93.

12-Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J (1989). A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58:1107–1119.

13-Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wendworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG (2003). Detection of the PAX-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:354-357.

14-Platanias LC. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*; 101: 4667-79.

15-Dhillon AS & Kolch W (2004). Oncogenic BRAF mutations : crystal clear at last. *Cancer Cell* 5:303-304.

16-Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et.al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*; 417: 949–954.

17-Davies L, Welch HG. (2006). Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA*; 295: 2164-7.

- 18-Dumont JE, et al. (1991) Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*;5(4):727–54.
- 19-Elion EA, Grisafi PL, Fink GR. (1990). FUS3 encodes a cdc21/ CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60:649–664.
- 20-Franklin RA, McCubrey JA. (2000). Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia*;14:2019–34.
- 21-F. Chang, L.S. Steelman, J.T. Lee, J.G. Shelton, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R.A. Franklin, J.A. McCubrey. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, *Leukemia* 17 ;1263–1293.
- 22-Figge JT, Jennings T, Gerasimov G. (2000) Radiation and thyroid cancer. In: Wartofsky L, editor. *Thyroid cancer*. Human Press: Totowa, NJ; .p.515.
- 23-Fagin JA. (1994) Molecular genetics of human thyroid neoplasms. *Annual Review of Medicine*;45(1):45–52.
- 24-Farid NR, Shi Y, Zou M. (1994) Molecular basis of thyroid cancer. *Endocrine Reviews*;15(2):202–32.
- 25-Frauman AG, Moses AC. (1990) Oncogenes and growth factors in thyroid carcinogenesis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*;19(3):479–93.
- 26-Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N. (2006). Correlation between B-RAF V600E mutation and clinico–pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocrine-Related Cancer*; 13: 455–464.

- 27-Fagin JA. (2002). Minireview: branded from the start-distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. *Molecular endocrinology* 16: 903-911.
- 28-Garnett MJ, Marais R (2004). Guilty as charged: BRAF as a human oncogene. *Cancer cell* 6: 313-319.
- 29-Gomes L, Lemos MC, Paiva I, Riberio C, Carneiro M, Regateiro FJ. (2005). Cyp2d6 Genetic Polymorphisms Are Associated With Susceptibility To Pituitary Tumors. *Acta Med Port*; 18: 339-344.
- 30-Groussin L, Fagin JA. (2006). Significance of BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Nat Clin Pract EndocrMetab*; 2:180–181.
- 31-Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, et al. (1997). Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer*; 79:564-73.
- 32-Heim MH, Meyer UA. (1992). Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics*; 14: 49–58.
- 33-Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J ve ark. (1999). Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med*, 20, 1-137.
- 34-Hagemann C, Rapp UR. (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res*;253:34–46.
- 35-Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*; 20: 342–349.

- 36-Ingelman-Sundberg M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal*; 5: 6–13.
- 37-Jemal A, Murray T, Ward E, et al. (2005). Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*; 55: 10-30.
- 38-J.T. Lee Jr., J.A. McCubrey. (2002). The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention, *Leukemia* 16; 486–507.
- 39-Jann MW, Cohen LJ. (2006).The influence of ethnicity and antidepressant pharmacogenetics in the treatment of depression. *Drug Metabol Drug Interact* 2000;16:39–67.-Related Cancer; 13: 257–269.
- 40-J. Yan, S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, J.F. (1998). Hancock, Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase, *J. Biol. Chem.* 273 24052–24056).
- 41-K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K.D. Katsanakis, D.W. Rose, H. Mischak, J.M. Sedivy, W. Kolch. (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signaling by RKIP, *Nature* 401 173–177.
- 42-Knauf, J.A., Ma, X., Smith, E.P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X., Refetoff, S., Nikiforov, Y.E. & Fagin, J.A. (2005) Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Research*, 65, 4238–4245.
- 43-Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh Q-Y, Shibru D, Bastian B, Griffin A. (2007). The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Ann Surg*; 246: 466–471.
- 44-Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z et al. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the

RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*; 63: 1454–1457.

45-Kumagai A, Namba H, Akanov Z, Saenko VA, Meirmanov S, Ohtsuru A, et. al. (2007). Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer. *Endocrine J*; 54(3): 399-405.

46-Kolch W. Meaningful relationships: (2000). The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.*; 351: 289-305.

47-Karp JE, Lancet JE, Kaukman SH, et al. (2001). Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical-laboratory correlative trial. *Blood*; 97: 3361-9.

48- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA (2000). Pax8-PPAR gamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 289: 1357-1360.

49-Liem AA, Chamberlain MP, Wolf CR, Thompson AM. (2002). The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *EJSO*; 28:679-84.

50-L.S. Steelman, S.C. Pohnert, J.G. Shelton, R.A. Franklin, F.E. Bertrand, J.A. McCubrey. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis, *Leukemia* 18 189–218.

51-Lemos MC, Carrilho F, Rodriguest F, Coutinho E, Gomes L, Carvalheiro M, Regateiro. (2007). Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer. *Clinical Endocrinology* ; 67: 180-183.

52-LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL, et al. (2004) : Papillary carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. Editors. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press. p 57-66.

- 53-Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, et al. (2004) Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol*; 28:1336-1340.
- 54-Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F. BRAF and Outcomes in Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(11):4085–4090
- 55-Garnett MJ, Marais R (2004). Guilty as charged. B-Raf is a human oncogene, *Cancer Cell* 6 313–319.
- 56-Mills S.E. (2004). Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4th ed. Vol I, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins; 564-572.
- 57-McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1773, 1263–1284.
- 58-Markey SP. (2001). Pathways of drug metabolism. In: Atkinson AJ Jr, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, eds. *Principles of Clinical Pharmacology*. San Diego, CA: Academic Press;123-142.
- 59-Mazzaferri EL.(2006). Managing small thyroid cancers. *JAMA*; 295: 2179-82.
- 60-Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. (2003). Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endoc and Metab*; 88: 4393–4397.
- 61-Nebert DW. (1997). Polymorphisms in drug-metabolising enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet*; 60: 265-271.

62-Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S et. al. (1999). A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control* 10: 143-155.

63-Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A et al. (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endoc Metab* ; 88: 5399–5404.

64-Nikiforova YE (2002). RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocrine pathology* 13: 3-6

65-Nikiforov Y, Gnepp DR. (1994) : Pediatric thyroid cancer following the Chernobyl disaster. Pathomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the republic of Belarus. *Cancer*; 74: 748-766.

66-Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, et al. (2001) Solid variant of papillary thyroid carcinoma: Incidence, clinical-pathological characteristics, molecular analysis and biological behavior. *Am J Surg Pathol*; 25: 1478-1484.

67-Peyssonnaud C, Eychene A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*; 93: 53-62.

68-Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, Ohtsuru A, Saenko V, Nagayama Y, Umezawa K, Yamashita S. (2006). BRAFV600E Promotes Invasiveness of Thyroid Cancer Cells through Nuclear Factor κ B Activation *Endocrinology*; 147(12): 5699–5707.

69-Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. (1992) Tumors of the thyroid gland: Third series, Fascicle 5, Atlas of tumor pathology. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.

70-Ringel MD. (2000) Molecular diagnostic tests in the diagnosis and management of thyroid carcinoma. *Reviews of Endocrine Metabolic Disorders*;1(3):173–81.

71-Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6940–6943.

72-Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundburg M. (2006). Cytochrome P450 and cancer. *Oncogene*;25:1679-1691.

73-Ryan K.J. (1959). Biological aromatization of steroids. *J. Biol. Chem.*, 234, 268-272.

74-Riesco-Eizaguirre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. (2006). The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocrine-Related Cancer*; 13: 257–269.

75-Sarlis NJ. (2000). Expression patterns of cellular growth-controlling genes in non-medullary thyroid cancer: basic aspects. *Reviews in Endocrine Metabolic Disorders*; 1(3):183–96.

76-Sturgill TW, Ray LB, Erikson E & Maller JL. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*; 334: 715–718.

77-Sherman SI. (2003). Thyroid carcinoma. *Lancet*; 361: 501-11.

78-Said S, Schlumberger M, Suarez HG. (1994) Oncogenes and antioncogenes in human epithelial thyroid tumors. *Journal of Endocrinological Investigation*;17(5):371–9.

79-Suarez HG. (1998) Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clinical Endocrinology (Oxford)*;48(5):531–46.

80-Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. (2005). Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*;4(4): 677-685.

81-Toda T, Shimanuki M, Yanagida M. (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5:60–73. Platanias LC. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*; 101: 4667-79.

82-Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simoes M. (2006). B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum Pathol*; 37: 781–786.

83- Zablotska LB, Bogdanova TI, Ron E ve ark. (2008) A Cohort Study of Thyroid Cancer and Other Thyroid Diseases after the Chornobyl Accident: Dose-Response Analysis of Thyroid Follicular Adenomas Detected during First Screening in Ukraine (1998–2000). *Am J Epidemiol*; 167: 305–312.

84-Xing M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer*; 12: 245–262.

85-Vasko V, Ferrant M, Di Cristofora J, Carayon P, Henry JF, de Micco C (2003). Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumours. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 2745-2752.

86-Wan PT, Garnett MJ, Roe SM et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*; 116: 855–867.

87-Wright PA, et al. (1991) Mutation of the p53 gene in a differentiated human thyroid carcinoma cell line, but not in primary thyroid tumours. *Oncogene*;6(9):1693–7.

88-Wynford-Thomas D. (1997) Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms. *Hormone Research*;47(4–6):145–57.

89-White MK, McCubrey JA. (2001). Suppression of apoptosis: role in cell growth and neoplasia. *Leukemia*;15:1011–21.

90-Balock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, Hoyle PE, Wang XY, Algate PA ve ark. (1999). Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs, *Leukemia* 13; 1109–1166.

91-Fant WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT. (2002). Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins, *Nature* 371 (1994) 612–614) ve 181 şok protein 90 (Hsp90)(M.V. Blagosklonny, Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs, *Leukemia* 16 ; 455–462.

92-Yu AM, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Kupfer A, Gonzalez FJ. (2003). Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics*; 13: 173–181.

93-Yu AM, Idle JR, Herraiz T, Kupfer A, Gonzalez FJ. (2003).Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase. *Pharmacogenetics*; 13: 307–319.

94-Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA, Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 2005; 103: 2261–2268.

95-Zablotska LB, Bogdanova TI, Ron E ve ark. (2008) A Cohort Study of Thyroid Cancer and Other Thyroid Diseases after the Chornobyl Accident: Dose-Response Analysis of Thyroid Follicular Adenomas Detected during First Screening in Ukraine (1998–2000). *Am J Epidemiol*; 167: 305–312.

96-Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383 181–185.

97- Fabian DR, Daar IO, Morrison DK (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase, *Mol. Cell. Biol.* 13 7170–7179.

98- Rubin R, Strayer DS (2008). Rubin's Pathology : Clinicopathologic Foundations of Medicine. The Endocrine System. Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) Is the Most Common Thyroid Cancer 21:951-952.

99- Mills S.E. (2004) Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4th ed. Vol I, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins; 564-572

100- <http://www.biooncology.com/bioonc/images/b-raf-main.jpg>

101-Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S & Pierotti MA (1998). RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clinical Cancer Research* 4 223–228.

102-Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, Sidransky D, Westra WH (2004). Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clinical Cancer Research* 10 2761-2765.

103-Chung K, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH et al. (2006). Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalant area. *Clinical Endocrinology* 65: 660-666.

104-Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, Sekikawa K, Hagiwara K, Takenoshita S. (2003). BRAF mutations in Papillary Carcinomas of the thyroid. *Onkogene* 22:6455-6457.

105-Giannini R, Ugolini C, Lupi C, Proietti A, Elisei R, Salvatore G, Berti P, Materazzi G, Miccoli P, Santoro M, Basolo F. (2007). The Heterogeneous Distribution of BRAF Mutation Supports the Independent Clonal Origin of Distinct Tumor Foci in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3511–3516.

106-Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY (2004). Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei medical journal* 45:818-821.

107-Kim KH, Suh KS, Kang DW & Kang DY. (2005). Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis. *Pathology International* 55 540–545.

108-Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, Lee S, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK. (2006). The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology* 65, 364-368.

109-Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Wu WL, Tsai PC, Huang CC & Cheng JT. (2005) No correlation between BRAF V600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clinical Endocrinology* 63 461–466.

110-Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. (2007). Detection of BRAF V600E activating mutation in papillary thyroid carcinoma using PCR with allele-specific fluorescent probe melting curve analysis. *J Clin Pathol*; 60: 1211-1215.

111-Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Della Porta G, Berger N et al. (1992). Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *Journal of Clinical Investigation* 89 1517–1522.

112-Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R & Sobrinho-Simoes M (2003). BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22 4578–4580.

113-Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M. (2004). Braf mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *Journal of Pathology* 202: 247-251.

114-Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Maximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM et al. (2005). Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Archives* 446 589–595.

115-Xing M, Cohen Y, Mambo E, Talini G, Udelsman R, Ladenson PW, Sidransky D. (2005). Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumor genesis. *Cancer Research* 64:1664-1668).

116-Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. (2003). High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Research* 63: 4561-4567.

117-Xing M, Westra W, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Thoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G et al. (2005). BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 6373–6379.

118-Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, Kim M, Tufano A, Ladenson P, Zeiger M, Tufano R (2009). Preoperative Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *J Clin Oncol* 27:2977-2982.

119-Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E et al. (2010). Correlation between the BRAF V600E Mutation and Tumor Invasiveness in Papillary Thyroid Carcinomas Smaller than 20 Millimeters: Analysis of 1060 Cases. *J Clin Endocrinol Metab*, September 2010, 95(9):0000–0000.

120- London SJ, Daly AK, Leathart JB, Nawidi WC, Carpenter CC, Idle JR (1997) Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Carcinogenesis* 18(6): 1203-1214.

121-Topic E, Sfenovic M, Ivanisevic AM, Petrinovic R, Curcic I (2000) The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene polymorphism among breast and head and neck cancer patients. *Clinica Chimica Acta* 296: 101-109.

122- Sobti RC, Onsory K, Al-Badran AI, Kaur P, Watanabe M, Krishan A, Mohan H (2006) CYP17, SRD5A2, CYP1B1, and CYP2D6 Gene Polymorphisms with Prostate Cancer Risk in North Indian Population. *DNA and Cell Biology* 25(5): 287-294.

HAM VERİLER

Frequency Table					
alınışşekli					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	rezeksiyon	105	97,2	97,2	97,2
	hazır blok	3	2,8	2,8	100,0
	Total	108	100,0	100,0	

tümör					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	papiller	108	100,0	100,0	100,0

okkült					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	YOK	108	100,0	100,0	100,0

Tumorvariants					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Classic papillar var.	72	66,7	66,7	66,7
	Follicular variant	36	33,3	33,3	100,0
	Total	108	100,0	100,0	

multifokalite					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	yok	77	71,3	73,3	73,3
	var	28	25,9	26,7	100,0
	Total	105	97,2	100,0	
Missing	System	3	2,8		
Total		108	100,0		

tmsınır					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	ekspansif	27	25,0	26,0	26,0
	infiltratif	64	59,3	61,5	87,5
	miks	13	12,0	12,5	100,0
	Total	104	96,3	100,0	
Missing	System	4	3,7		
Total		108	100,0		

tmdışıdoku					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	adenomatöz hiperplazi	76	70,4	73,1	73,1
	diffüz hiperplazi	6	5,6	5,8	78,8
	lenfositik tiroidit	15	13,9	14,4	93,3
	hashimato	2	1,9	1,9	95,2
	TUMOR	2	1,9	1,9	97,1
	NORMAL	3	2,8	2,9	100,0
	Total	104	96,3	100,0	
Missing	System	4	3,7		
Total		108	100,0		

tmdışı2					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	yok	74	68,5	71,2	71,2
	adenomatöz hiperplazi	7	6,5	6,7	77,9
	diffüz hiperplazi	1	,9	1,0	78,8
	lenfositik tiroidit	9	8,3	8,7	87,5
	adenom	5	4,6	4,8	92,3
	hurtle hücreli adenom	1	,9	1,0	93,3
	fokal fibroz	2	1,9	1,9	95,2
	NORMAL	1	,9	1,0	96,2
	hurtle metaplazi	4	3,7	3,8	100,0
	Total	104	96,3	100,0	
Missing	System	4	3,7		
Total		108	100,0		

tümörbrafv600e					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	BRAF(-)	51	47,2	47,2	47,2
	BRAF(+)	57	52,8	52,8	100,0
	Total	108	100,0	100,0	

çevrebrafv600e					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	BRAF(-)	94	87,0	92,2	92,2
	BRAF(+)	8	7,4	7,8	100,0
	Total	102	94,4	100,0	
Missing	System	6	5,6		
Total		108	100,0		

cyp2d6					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	GG	54	50,0	71,1	71,1
	GA	15	13,9	19,7	90,8
	AA	7	6,5	9,2	100,0
	Total	76	70,4	100,0	
Missing	System	32	29,6		
Total		108	100,0		

Tumourvariants*tmsınır

Crosstab						
			tmsınır			Total
			ekspansif	infiltratif	miks	ekspansif
Tumorvariants	Classic papillar var.	Count	9	48	11	68
		% within Tumorvariants	13,2%	70,6%	16,2%	100,0%
		% within tmsınır	33,3%	75,0%	84,6%	65,4%
		% of Total	8,7%	46,2%	10,6%	65,4%
	Follicular variant	Count	18	16	2	36
		% within Tumorvariants	50,0%	44,4%	5,6%	100,0%
		% within tmsınır	66,7%	25,0%	15,4%	34,6%
		% of Total	17,3%	15,4%	1,9%	34,6%
Total		Count	27	64	13	104

	% within Tumorvariants	26,0%	61,5%	12,5%	100,0%
	% within tmsmr	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total	26,0%	61,5%	12,5%	100,0%

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	16,993(a)	2	,000
Likelihood Ratio	16,654	2	,000
Linear-by-Linear Association	14,283	1	,000
N of Valid Cases	104		
a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,50.			

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,372	,089	-4,052	,000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,382	,090	-4,169	,000(c)
N of Valid Cases		104			
a. Not assuming the null hypothesis.					
b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c. Based on normal approximation.					

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

Tumourvariants*Sex

Crosstab

			Sex		Total
			Women	Men	Women
Tumorvariants	Classic papillar var.	Count	52	20	72
		% within Tumorvariants	72,2%	27,8%	100,0%
		% within Sex	66,7%	66,7%	66,7%
		% of Total	48,1%	18,5%	66,7%
	Follicular variant	Count	26	10	36
		% within Tumorvariants	72,2%	27,8%	100,0%
		% within Sex	33,3%	33,3%	33,3%
		% of Total	24,1%	9,3%	33,3%

Total	Count	78	30	108
	% within Tumorvariants	72,2%	27,8%	100,0%
	% within Sex	100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total	72,2%	27,8%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,000(b)	1	1,000		
Continuity Correction(a)	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,000	1	1,000		
Fisher's Exact Test				1,000	,594
Linear-by-Linear Association	,000	1	1,000		
N of Valid Cases	108				
a Computed only for a 2x2 table					
b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,00.					

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,000	,096	,000	1,000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,000	,096	,000	1,000(c)
N of Valid Cases		108			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	1,000	,409	2,443
For cohort Sex = Women	1,000	,780	1,282
For cohort Sex = Men	1,000	,525	1,906
N of Valid Cases	108		

Tumourvariants*multifokalite

Crosstab					
			multifokalite		Total
			yok	var	yok
Tumorvariants	Classic papillar var.	Count	52	17	69
		% within Tumorvariants	75,4%	24,6%	100,0%

		% within mulifokalite	67,5%	60,7%	65,7%
		% of Total	49,5%	16,2%	65,7%
	Follicular variant	Count	25	11	36
		% within Tumorvariants	69,4%	30,6%	100,0%
		% within mulifokalite	32,5%	39,3%	34,3%
		% of Total	23,8%	10,5%	34,3%
Total	Count		77	28	105
	% within Tumorvariants		73,3%	26,7%	100,0%
	% within mulifokalite		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		73,3%	26,7%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,424(b)	1	,515		
Continuity Correction(a)	,175	1	,676		
Likelihood Ratio	,418	1	,518		
Fisher's Exact Test				,642	,335
Linear-by-Linear Association	,420	1	,517		
N of Valid Cases	105				
a Computed only for a 2x2 table					
b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,60.					

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,064	,099	,646	,520(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,064	,099	,646	,520(c)
N of Valid Cases		105			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	1,346	,549	3,297
For cohort mulifokalite = yok	1,085	,841	1,401
For cohort mulifokalite = var	,806	,424	1,533
N of Valid Cases	105		

Tumourvariants*tmđışıdoku

Crosstab										
			tmđışıdoku						Total	
			adenomatöz hiperplazi	diffüz hiperplazi	lenfositik tiroidit	hashimato	TUMOR	NORMAL	adenomatöz hiperplazi	
Tumourvariants	Classic papillar var.	Count	55	2	7	1	2	1	68	
		% within Tumourvariants	80,9%	2,9%	10,3%	1,5%	2,9%	1,5%	100,0%	
		% within tmđışıdoku	72,4%	33,3%	46,7%	50,0%	100,0%	33,3%	65,4%	
		% of Total	52,9%	1,9%	6,7%	1,0%	1,9%	1,0%	65,4%	
	Follicular variant	Count	21	4	8	1	0	2	36	
		% within Tumourvariants	58,3%	11,1%	22,2%	2,8%	,0%	5,6%	100,0%	
		% within tmđışıdoku	27,6%	66,7%	53,3%	50,0%	,0%	66,7%	34,6%	
		% of Total	20,2%	3,8%	7,7%	1,0%	,0%	1,9%	34,6%	
Total		Count	76	6	15	2	2	3	104	
		% within Tumourvariants	73,1%	5,8%	14,4%	1,9%	1,9%	2,9%	100,0%	
		% within tmđışıdoku	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
		% of Total	73,1%	5,8%	14,4%	1,9%	1,9%	2,9%	100,0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	9,313(a)	5	,097
Likelihood Ratio	9,614	5	,087
Linear-by-Linear Association	2,142	1	,143
N of Valid Cases	104		
a 8 cells (66,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,69.			
Symmetric Measures			

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for Tumourvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

Tumorvariants*tmdışı2

Crosstab													
			tmdışı2									Total	
			Yok	adenomatöz hiperplazi	diffüz hiperplazi	lenfositik tiroidit	adenom	hurtle hücreli adenom	fokal fibroz	NORMAL	hurtle metaplazi	yok	
Tumorvariants	Classic papillar var.	Count	47	5	1	5	4	1	2	0	3	68	
		% within Tumorvariants	69,1%	7,4%	1,5%	7,4%	5,9%	1,5%	2,9%	,0%	4,4%	100,0%	
		% within tmdışı2	63,5%	71,4%	100,0%	55,6%	80,0%	100,0%	100,0%	,0%	75,0%	65,4%	
		% of Total	45,2%	4,8%	1,0%	4,8%	3,8%	1,0%	1,9%	,0%	2,9%	65,4%	
	Follicular variant	Count	27	2	0	4	1	0	0	1	1	36	
		% within Tumorvariants	75,0%	5,6%	,0%	11,1%	2,8%	,0%	,0%	2,8%	2,8%	100,0%	
		% within tmdışı2	36,5%	28,6%	,0%	44,4%	20,0%	,0%	,0%	100,0%	25,0%	34,6%	
		% of Total	26,0%	1,9%	,0%	3,8%	1,0%	,0%	,0%	1,0%	1,0%	34,6%	
Total		Count	74	7	1	9	5	1	2	1	4	104	
		% within Tumorvariants	71,2%	6,7%	1,0%	8,7%	4,8%	1,0%	1,9%	1,0%	3,8%	100,0%	
		% within tmdışı2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
		% of Total	71,2%	6,7%	1,0%	8,7%	4,8%	1,0%	1,9%	1,0%	3,8%	100,0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,253(a)	8	,730
Likelihood Ratio	6,811	8	,557
Linear-by-Linear Association	,393	1	,531
N of Valid Cases	104		
a 15 cells (83,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,35.			

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,062	,094	-,625	,533(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,065	,095	-,656	,513(c)
N of Valid Cases		104			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					

c Based on normal approximation.

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

Tumorvariants*tümörbrafv600e

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	10,700(b)	1	,001		
Continuity Correction(a)	9,404	1	,002		
Likelihood Ratio	10,887	1	,001		
Fisher's Exact Test				,002	,001
Linear-by-Linear Association	10,601	1	,001		
N of Valid Cases	108				
a Computed only for a 2x2 table					
b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 17,00.					
Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.

Interval by Interval	Pearson's R	-,315	,091	-3,414	,001(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,315	,091	-3,414	,001(c)
N of Valid Cases		108			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					
Risk Estimate					
		Value	95 % Confidence Interval		
		Lower	Upper	Lower	
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)		,249	,106	,586	
For cohort tümörbrafv600e = BRAF(-)		,520	,357	,757	
For cohort tümörbrafv600e = BRAF(+)		2,091	1,240	3,525	
N of Valid Cases		108			

Tumorvariants*çevrebrafv600e

Crosstab						
			çevrebrafv600e		Total	
			BRAF(-)	BRAF(+)	BRAF(-)	
Tumorvariants	Classic papillar var.	Count	61	6	67	
		% within Tumorvariants	91,0%	9,0%	100,0%	
		% within çevrebrafv600e	64,9%	75,0%	65,7%	
		% of Total	59,8%	5,9%	65,7%	
	Follicular variant	Count	33	2	35	
		% within Tumorvariants	94,3%	5,7%	100,0%	
		% within çevrebrafv600e	35,1%	25,0%	34,3%	
		% of Total	32,4%	2,0%	34,3%	
Total		Count	94	8	102	
		% within Tumorvariants	92,2%	7,8%	100,0%	
		% within çevrebrafv600e	100,0%	100,0%	100,0%	
		% of Total	92,2%	7,8%	100,0%	

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,334(b)	1	,563		
Continuity Correction(a)	,036	1	,849		
Likelihood Ratio	,351	1	,554		
Fisher's Exact Test				,712	,439
Linear-by-Linear Association	,331	1	,565		
N of Valid Cases	102				

a Computed only for a 2x2 table
b 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,75.

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,057	,091	-,573	,568(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,057	,091	-,573	,568(c)
N of Valid Cases		102			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	,616	,118	3,226
For cohort çevrebrafv600e = BRAF(-)	,966	,864	1,079
For cohort çevrebrafv600e = BRAF(+)	1,567	,334	7,363
N of Valid Cases	102		

Tumorvariants*cyp2d6

Crosstab							
			cyp2d6			Total	
			GG	GA	AA	GG	
Tumorvariants	Classic papillar var.	Count	40	11	6	57	
		% within Tumorvariants	70,2%	19,3%	10,5%	100,0%	
		% within cyp2d6	74,1%	73,3%	85,7%	75,0%	
		% of Total	52,6%	14,5%	7,9%	75,0%	
	Follicular variant	Count	14	4	1	19	
		% within Tumorvariants	73,7%	21,1%	5,3%	100,0%	
		% within cyp2d6	25,9%	26,7%	14,3%	25,0%	
		% of Total	18,4%	5,3%	1,3%	25,0%	
Total		Count	54	15	7	76	
		% within Tumorvariants	71,1%	19,7%	9,2%	100,0%	
		% within cyp2d6	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
		% of Total	71,1%	19,7%	9,2%	100,0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)

Pearson Chi-Square	,475(a)	2	,788
Likelihood Ratio	,530	2	,767
Linear-by-Linear Association	,258	1	,612
N of Valid Cases	76		
a 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,75.			

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,059	,104	-,505	,615(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,044	,110	-,382	,703(c)
N of Valid Cases		76			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for Tumorvariants (Classic papillar var. / Follicular variant)	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

T-Test

Notes		
Output Created		04-JAN-2011 15:21:32
Comments		
Input	Data	C:\Documents and Settings\acer\Desktop\tez yazım\tülin sıralı2.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	108
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST GROUPS = Tumorvariants(1 2) /MISSING = ANALYSIS /VARIABLES = yaş /CRITERIA = CI(.95) .	
Resources	Elapsed Time	0:00:00,08

	Processor Time	0:00:00,06
--	----------------	------------

Group Statistics					
	Tumorvariants	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
yaş	Classic papillar var.	72	52,88	17,113	2,017
	Follicular variant	36	44,94	15,216	2,536

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
yaş	Equal variances assumed	,439	,509	2,353	106	,020	7,931	3,370	1,249	14,613
	Equal variances not assumed			2,448	77,909	,017	7,931	3,240	1,480	14,382

T-Test

Group Statistics					
	tümörbrafv600e	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
yaş	BRAF(-)	51	45,31	15,861	2,221
	BRAF(+)	57	54,63	16,632	2,203

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
yaş	Equal variances assumed	,014	,907	-2,971	106	,004	-9,318	3,137	-15,536	-3,099
	Equal variances not assumed			-2,979	105,556	,004	-9,318	3,128	-15,520	-3,115

Tumorbrafv600e*tmsınır

Crosstab							
			tmsınır			Total	
			ekspansif	infiltratif	miks	ekspansif	
tümörbrafv600e	BRAF(-)	Count	17	27	7	51	
		% within tümörbrafv600e	33,3%	52,9%	13,7%	100,0%	
		% within tmsınır	63,0%	42,2%	53,8%	49,0%	
		% of Total	16,3%	26,0%	6,7%	49,0%	
	BRAF(+)	Count	10	37	6	53	
		% within tümörbrafv600e	18,9%	69,8%	11,3%	100,0%	
		% within tmsınır	37,0%	57,8%	46,2%	51,0%	
		% of Total	9,6%	35,6%	5,8%	51,0%	
Total		Count	27	64	13	104	
		% within tümörbrafv600e	26,0%	61,5%	12,5%	100,0%	
		% within tmsınır	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
		% of Total	26,0%	61,5%	12,5%	100,0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,417(a)	2	,181
Likelihood Ratio	3,443	2	,179
Linear-by-Linear Association	1,022	1	,312
N of Valid Cases	104		
a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,38.			

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,100	,098	1,011	,314(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,109	,099	1,107	,271(c)
N of Valid Cases		104			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for tümörbrafv600e (BRAF(-) / BRAF(+))	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

Tümörbrafv600e*Sex

Crosstab						
			Sex		Total	
			Women	Men	Women	
tümörbrafv600e	BRAF(-)	Count	33	18	51	
		% within tümörbrafv600e	64,7%	35,3%	100,0%	
		% within Sex	42,3%	60,0%	47,2%	
		% of Total	30,6%	16,7%	47,2%	
	BRAF(+)	Count	45	12	57	
		% within tümörbrafv600e	78,9%	21,1%	100,0%	
		% within Sex	57,7%	40,0%	52,8%	
		% of Total	41,7%	11,1%	52,8%	
Total		Count	78	30	108	
		% within tümörbrafv600e	72,2%	27,8%	100,0%	
		% within Sex	100,0%	100,0%	100,0%	
		% of Total	72,2%	27,8%	100,0%	

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,721(b)	1	,099		
Continuity Correction(a)	2,058	1	,151		
Likelihood Ratio	2,728	1	,099		
Fisher's Exact Test				,132	,076
Linear-by-Linear Association	2,696	1	,101		
N of Valid Cases	108				
a Computed only for a 2x2 table					
b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14,17.					

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,159	,095	-1,655	,101(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,159	,095	-1,655	,101(c)
N of Valid Cases		108			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval

	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for tümörbrafv600e (BRAF(-) / BRAF(+))	,489	,207	1,152
For cohort Sex = Women	,820	,643	1,045
For cohort Sex = Men	1,676	,897	3,133
N of Valid Cases	108		

Tümörbrafv600e*multifokalite

Crosstab					
			multifokalite		Total
			yok	var	yok
tümörbrafv600e	BRAF(-)	Count	38	13	51
		% within tümörbrafv600e	74,5%	25,5%	100,0%
		% within multifokalite	49,4%	46,4%	48,6%
		% of Total	36,2%	12,4%	48,6%
	BRAF(+)	Count	39	15	54
		% within tümörbrafv600e	72,2%	27,8%	100,0%
		% within multifokalite	50,6%	53,6%	51,4%
		% of Total	37,1%	14,3%	51,4%
Total	Count		77	28	105
	% within tümörbrafv600e		73,3%	26,7%	100,0%
	% within multifokalite		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		73,3%	26,7%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,070(b)	1	,791		
Continuity Correction(a)	,002	1	,965		
Likelihood Ratio	,070	1	,791		
Fisher's Exact Test				,828	,483
Linear-by-Linear Association	,070	1	,792		
N of Valid Cases	105				
a Computed only for a 2x2 table					
b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13,60.					

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,026	,097	,262	,793(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,026	,097	,262	,793(c)

N of Valid Cases	105			
a Not assuming the null hypothesis.				
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.				
c Based on normal approximation.				

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for tümörbrafv600e (BRAf(-) / BRAf(+))	1,124	,473	2,675
For cohort mulifokalite = yok	1,032	,819	1,299
For cohort mulifokalite = var	,918	,486	1,734
N of Valid Cases	105		

Tümörbrafv600e*tmđışıdoku

Crosstab									
			tmđışıdoku						Total
			adenomatöz hiperplazi	diffüz hiperplazi	lenfositik tiroidit	hashimato	TUMOR	NORMAL	adenomatöz hiperplazi
tümörbrafv600e	BRAf(-)	Count	33	2	10	2	2	2	51
		% within tümörbrafv600e	64,7%	3,9%	19,6%	3,9%	3,9%	3,9%	100,0%
		% within tmđışıdoku	43,4%	33,3%	66,7%	100,0%	100,0%	66,7%	49,0%
		% of Total	31,7%	1,9%	9,6%	1,9%	1,9%	1,9%	49,0%
	BRAf(+)	Count	43	4	5	0	0	1	53
		% within tümörbrafv600e	81,1%	7,5%	9,4%	,0%	,0%	1,9%	100,0%
		% within tmđışıdoku	56,6%	66,7%	33,3%	,0%	,0%	33,3%	51,0%
		% of Total	41,3%	3,8%	4,8%	,0%	,0%	1,0%	51,0%
Total	Count		76	6	15	2	2	3	104
	% within tümörbrafv600e		73,1%	5,8%	14,4%	1,9%	1,9%	2,9%	100,0%
	% within tmđışıdoku		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		73,1%	5,8%	14,4%	1,9%	1,9%	2,9%	100,0%

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7,947(a)	5	,159
Likelihood Ratio	9,545	5	,089

	% of Total	71,2%	6,7%	1,0%	8,7%	4,8%	1,0%	1,9%	1,0%	3,8%	100,0%
--	------------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	11,935(a)	8	,154
Likelihood Ratio	14,428	8	,071
Linear-by-Linear Association	,219	1	,640
N of Valid Cases	104		
a 16 cells (88,9%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,49.			

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,046	,097	-,466	,642(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,079	,098	-,804	,423(c)
N of Valid Cases		104			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for tümörbrafv600e (BRAF(-) / BRAF(+))	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

Tümörbrafv600e*cyp2d6

			cyp2d6			Total	
			GG	GA	AA	GG	
tümörbrafv600e	BRAF(-)	Count	24	6	4	34	
		% within tümörbrafv600e	70,6%	17,6%	11,8%	100,0%	
		% within cyp2d6	44,4%	40,0%	57,1%	44,7%	
		% of Total	31,6%	7,9%	5,3%	44,7%	
	BRAF(+)	Count	30	9	3	42	
		% within tümörbrafv600e	71,4%	21,4%	7,1%	100,0%	
		% within cyp2d6	55,6%	60,0%	42,9%	55,3%	
		% of Total	39,5%	11,8%	3,9%	55,3%	
Total		Count	54	15	7	76	
		% within tümörbrafv600e	71,1%	19,7%	9,2%	100,0%	
		% within cyp2d6	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

	% of Total	71,1%	19,7%	9,2%	100,0%
--	-------------------	-------	-------	------	--------

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,574(a)	2	,751
Likelihood Ratio	,572	2	,751
Linear-by-Linear Association	,132	1	,717
N of Valid Cases	76		
a 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,13.			

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	-,042	,115	-,361	,719(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-,023	,115	-,196	,845(c)
N of Valid Cases		76			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Risk Estimate	
	Value
Odds Ratio for tümörbrafv600e (BRAF(-) / BRAF(+))	(a)
a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.	

ETİK KURUL KARARI



Sayı : 30875
Konu :

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



İstanbul / /
23 Ekim 2008

İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü
Personel Daire Başkanlığına

İLGİ: 26.08.2008 tarihli, 41077 sayılı yazınıza:

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.OĞUZ ÖZTÜRK'ün danışmanlığında Tıbbi Biyolog AYNUR DAĞLAR'ın yürütücülüğünde "Papiller Tiroid Kanselerinde BRAH V600E Mutasyonu ve CYP2D6 Polimorfizminin Araştırılması ve Histopataolojik İlişkilerinin Değerlendirilmesi" konulu doktora tezinde sehven bildirilen BRAH kelimesinin BRAF olarak değiştirilmesi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 15 Ekim 2008 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, saygılarımla arz ederim.

EKİ:

3 yazı fotokopisi

İST. Ü. REKTÖRLÜĞÜ	
Personel D. Başkanlığına	Yazı İşleri ve Genel Evrak Md. Gelen Evrak
24.10.2008	Sayı 48683

Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

Not: Yanıtlarda yazınızın gün-sayısını belirtilmesi rica olunur. Tel : (0212) 4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	AYNUR	Soyadı	DAĞLAR ADAY
Doğ.Yeri	EDİRNE	Doğ.Tar.	17/12/1978
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	24799669798
Email	daglaraynur@yahoo.com	Tel	05557355541

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	T.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOKİMYA ABD.	2004
Lisans	İ.Ü. CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ	2001
Lise	EDİRNE ANADOLU LİSESİ	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	BİYOLOG	İ.Ü. İ.T.F. İÇ HASTALIKLARI HEMATOLOJİ BD.	2008-
2.	BİYOLOG	İ.Ü. İ.T.F. NÜKLEER TIP ABD.	2004-2008
3.	ARAŞIRMA GÖREVLİSİ	T.Ü.T.F. BİYOKİMYA ABD.	2002-2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	ÜDS 75	

--	--	--	--	--	--

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	60	60	60
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
OFFİCE	İYİ

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Erbaş. H, **Dağlar A**, Öner N. Serum tirozin ve fenilalanin düzeylerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile ölçülmesi: fenilketonüri tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem. İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi 2003; 41 (2): 129-134.
2. Erbaş H, Erten O, **Dağlar A**, İrfanoğlu ME. Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. Turk J Biochem 2006; 31 (3); 129-134.
3. Şanlı Y, Türkmen C, Türkmen A, **Dağlar A**, Aday S, Cantez S, Mudun A. Renal transplant verici adaylarında Tc-99m DTPA ile hesaplanan glomerüler filtrasyon hızının renal fonksiyon testleri ile ilişkisi. Turk J Nucl Med 2006,15: 85-93.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):