

EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI BİLİM DALI

RESVERATROL'ÜN B-CPAP İNSAN PAPİLLER TİROİD KARSİNOMU
HÜCRELERİ ÜZERİNDE BRAF, ERK VE NIS MRNA EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİLERİ

UZM. DR. GÖKÇEN ÜNAL KOCABAŞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. AHMET GÖKHAN ÖZGEN

2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Gökhan Özgen'e, bu çalışmanın her aşamasındaki eşsiz katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yan dal eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Endokrinoloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden; rektörümüz Sayın Prof. Dr. Candeğer Yılmaz'a, Sayın Prof. Dr. Füsün Saygılı'ya , Sayın Doç. Dr. Şevki Çetinkalp'e ve Sayın Doç. Dr. Mehmet Erdoğan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesi için Hematoloji Bilimsel Araştırma Laboratuvarı'nda çalışmamıza olanak sağlayan Sayın Prof. Dr. Güray Saydam 'a ve Sayın Doç. Dr. Fahri Şahin'e ve Moleküler Tıp Laboratuvarını kullanmamıza olanak sağlayan Prof. Dr. Afig Berdeli'ye gösterdikleri maddi, manevi ve bilimsel destek ve ilgileri için en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmanın yapılmasında büyük emekleri olan, deneyimlerinden faydalandığım, güzel bir ekip çalışması sergileyen moleküler biyolog Sayın Aslı Kısım'a ve İlkay Demirel'e ve Doç .Dr. Burçak Karaca'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Proje desteği nedeniyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Proje birimine çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım arkadaşlarıma ve tüm servis ve poliklinik çalışanlarımıza teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Resveratrol'ün B-CPAP insan papiller tiroid karsinomu hücreleri üzerinde BRAF, ERK ve NIS mRNA ekspresyonu üzerine etkileri.

Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin neoplazilerdir. İnsidansı her iki cinste de hızla artmaktadır. Genellikle iyi prognozlu olmasına rağmen küçük bir grup hastada hızlı seyir, invazyon ve radyoaktif iyot tedavisine direnç görülebilmektedir. BRAF papiller tiroid kanseri oluşumunda ve malignitenin sürdürülmesinde önemli olan, tüm papiller tiroid karsinomlarında ortalama %40 sıklıkla görülen bir mutasyondur. BRAF pozitifliği erken invazyon, metastaz ve iyot yakalama kapasitesinde azalma ile ilişkilidir. Resveratrol bitkisel kökenli bir fitoalexindir. Çeşitli tümör hücrelerinde büyüme inhibisyonu, apoptoz indüklenmesi, invazyonun engellenmesi gibi etkileri gösterilmiştir. Tiroid kanser hücreleri üzerinde de apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız resveratrol'ün tiroid papiller kanser hücrelerinde BRAF, ERK ve NIS mRNA ekspresyonları üzerine etkisinin belirlenmesidir. İnsan B-CPAP papiller tiroid karsinom hücreleri resveratrol'ün 10-100 µM konsantrasyonlarında 24-48-72 saat süreyle muamele edildi. Hücre canlılığı XTT Cell Proliferation Assay" ile değerlendirildi. BRAF, ERK ve NIS mRNA ekspresyonları rt-PCR metoduyla değerlendirildi. Resveratrolün B-CPAP hücrelerinde zaman ve doza bağımlı bir şekilde hücre proliferasyonunu engellediği görüldü. Resveratrol'ün IC50 değeri 48 saatte 18,7 µM, 72 saatte 56,8µM olarak ölçüldü. 48 saatte 20 µM resveratrol ile BRAF mRNA ekspresyonunda 1,5 kat; 72 saatte 50 µM ile 0,5 kat azalma gözlemlendi. ERK mRNA düzeyinde 48 saatte 20 µM ile 5,5 kat azalma;72 saatte 50 µM ile 5 kat azalma meydana geldi. NIS mRNA ekspresyonunda ise 48 saatte 20 µM ile 3 kat azalma meydana gelirken 72 saatte 50 µM ile 1,5 kat artış meydana geldi. Bu çalışmayla resveratrolün tiroid papiller karsinom hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve kötü prognostik BRAF ve ERK mRNA ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamız Resveratrolün dirençli papiller tiroid kanseri hastalığında yeni bir tedavi edici ajan olarak ileri çalışmalarla değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

ABSTRACT

Effects of Resveratrol on BRAF, ERK and NIS mRNA expressions in BCPAP human papillary thyroid carcinoma cell line.

Thyroid carcinomas represent the most prevalent endocrine neoplasias. Its incidence is rising in both sexes. Although the prognosis is generally good, there is a aggressive clinical course, invasion and resistance to radioactive iodine treatment in a small subset of patients. BRAF mutation has a significant role in tumorigenesis and maintenance of malignant state, and its prevalence is about 40% in papillary thyroid cancer. BRAF mutation is associated with invasion, metastasis and reduced iodine uptake. Resveratrol is a plant derived phytoalexin. It is shown to inhibit growth, induce apoptosis and prevent invasion in several cancer cells. It is also shown to induce apoptosis in thyroid cancer cells. Our aim in this study is to determine effects of resveratrol on BRAF, ERK and NIS mRNA expressions in thyroid cancer cells. Human B-CPAP papillary thyroid carcinoma cells were treated with resveratrol at 10-100 μM concentrations. Cell viability was determined by XTT Cell Proliferation Assay. BRAF, ERK and NIS mRNA expressions were determined by rt-PCR. Resveratrol inhibited cell proliferation in B-CPAP cells in a time and dose dependent manner. IC₅₀ value of resveratrol at 48 hours was 18,7 μM and 56,8 μM at 72 hours. BRAF mRNA expression decreased 1,5 fold with 20 μM , at 48 hours and decreased 0,5 fold with 50 μM at 72 hours. ERK mRNA expression decreased 5,5 fold with 20 μM , at 48 hours and decreased 5 fold with 50 μM at 72 hours. NIS mRNA expression decreased 3 fold with 20 μM , at 48 hours and increased 1,5 fold with 50 μM at 72 hours. In this study we demonstrate that resveratrol inhibits cell proliferation, and decreases worse prognostic BRAF and ERK mRNA expressions and increases NIS mRNA expression in a dose and time dependent manner. We propose that resveratrol can be further studied as a novel therapeutic agent management of resistant papillary thyroid carcinomas.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER ve TABLOLAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tiroid kanserleri epidemiyolojisi ve sınıflandırması	3
2.2 Papiller Tiroid Karsinomu.....	5
2.2.1 Papiller tiroid karsinomunda klinik.....	6
2.2.2 Papiller tiroid karsinomunda cerrahi yaklaşım	7
2.2.3 Papiller tiroid karsinomunda postoperatif yaklaşım	8
2.2.3.1 Tiroid Kanserinde Evreleme	8
2.2.3.2 Radyoaktif İyot Tedavisi.....	10
2.2.4 Takip	12
2.2.4.1 Erken Dönem	12
2.2.4.2 Uzun Dönemde Takip	14
2.2.5 Tekrarlayan ve Metastatik Hastalığı Olanlar	15
2.3 Moleküler Patogenez.....	17
2.4 Tiroid Kanserinde Braf	19
2.4.1 MAPK yolağı ve aktive edici genetik değişiklikleri.....	19
2.4.2 Tiroid kanserinde BRAF mutasyonu	20
2.5 Diferansiye Tiroid Kanserinde Yeni Tedaviler.....	23
2.6 Resveratrol	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 BCPAP Hücre Hattı Ve Özellikleri	33
3.2 Hücre Hattının Temini ve Kültüre Edilmesi	33

3.3	BCPAP Hücrelerinin Sayımı.....	34
3.4	Resveratrol Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	34
3.5	Canlılık (viabilite), Sitotoksosite Parametreleri ve Ölçümü	34
3.6	XTT Canlılık Ölçüm Testi	35
3.7	BRAF, ERK ve NIS mRNA ekspresyonları	36
3.7.1	Real-time PCR	36
3.7.2	TaqMan prob	37
3.7.3	RT-PCR Çalışma Prensipleri	37
3.7.4	mRNA Kantitasyonunun Önemi	38
3.7.5	Real-Time PCR Avantajları	39
3.7.6	RNA Miktarının Ölçülmesi.....	39
3.7.7	cDNA Sentezi.....	39
3.7.8	cDNA PCR.....	40
3.7.9	cDNA Kalitasyonu	40
3.7.10	Değerlendirme.....	41
4.	SONUÇLAR	42
4.1	BCPAP Hücre Hattında resveratrolün IC50 Değeri	42
4.2	Resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi	43
4.3	BRAF mRNA ekspresyonuna etkileri.....	45
4.4	ERK mRNA ekspresyonuna etkileri	45
4.5	NIS mRNA ekspresyonuna etkileri.....	46
5.	TARTIŞMA	47
	KAYNAKLAR	54

KISALTMALAR

Akt1	v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog-1(Protein kinase B gamma)
AP-1	aktive edici protein 1 activator protein 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR ATM	Rad3-related)
APAF1	apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 apoptotic protease activating factor-1
BAK	Bcl2 antagonist öldürücü Bcl2 antagonist/killer
BAX	Bcl2 ilişkili X proteini Bcl2 associated X protein
BID	BH3 interacting domain death agonist
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma-2
BIM	Bcl2 ile etkileşen protein Bcl2-interacting protein
COX	cyclooxygenase
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DTC	diferansiye tiroid karsinomu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR	epidermal büyüme faktörü reseptörü epidermal growth factor receptor
ERK1/2	ekstrasellüler sinyallerle düzenlenen kinaz extracellular signal-regulated kinase 1/2
FADD	Fas Aracılı Ölüm Bileşiği Proteini- Fas-associated Death Domain Protein
FAM	6-karboksifloresin
FDG	fluoro deoksi glukoz
FLICE	FADD-like ice
FLIP	FLICE-inhibitory protein
GADPH	glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GTP	guanozin trifosfat

HUVEC	insan umbilikal ven endotelial hücresi human umbilical vein endothelial cell
IAP	Apoptoz Proteinlerin İnhibitörleri- Inhibitors of Apoptosis Proteins
IC	İnhibitör Konsantrasyon-Inhibitory Concentration
JNK	c-Jun NH2-terminal kinaz
MAPK	Mitojen Aracılığıyla Aktive Edilmiş Protein Kinaz -Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	mitojen ekstrasellüler kinaz MMP1 matrix metalloproteinaz-1
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NAG-1	non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) drug-activated gene-1
NF- $\kappa\beta$	Nükleer faktör kapa-beta
NIS	sodyum iyodür symporter
Noxa1	NADPH oxidase activator 1
p53AIP1	p53 ile düzenlenen apoptoz uyarıcı protein p53-regulated apoptosis-inducing Protein-1
PET	pozitron emisyon tomografi
PI3K	fosfotidil inozitol 3 kinaz
PLC-gamma	fosfolipaz-C Gamma
PMA	phorbol myristate acetate
PPAR- γ	Peroksizom Proliferator Aktive Olmuş Reseptör gama- Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome-10
PTC	papiller tiroid karsinomu
PTM	papiller tiroid mikrokarsinomu
PTU	propiltiourasil
PUMA	p53 ile artırılan apoptoz düzenleyicisi p53-upregulated modulator of apoptosis
RAI	radyoaktif iyot
Rb	retinoblastoma protein
ROS	reaktif oksijen türleri
RT-PCR	gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu real time polymerase chain reaction

RV	resveratrol
siRNA	small interfering RNA
Smac	İkinci Mitokondriden Türemiş Aktivatör- Second Mitochondria-derived Activator
STAT	transkripsiyonun sinyal ileticileri ve aktifleştiricileri signal transducers and activators of transcription
TAMRA	6-karboksitetrametil-rodamin
Tg	tiroglobulin
TGF- α	Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa- Transforming Growth Factor-alpha
TNM	tümör nod metastaz
TPA	tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPO	tiroid peroksidaz
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAILR	TNF ilişkili apoptozu uyaran ligand reseptörü TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TSH	tiroid stimulan hormon
TVT	tüm vücut taraması
USG	ultrasonografi
UV	ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü- Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP	X-bağımlı apoptoz proteini inhibitörü X-linked inhibitor of apoptosis protein

ŞEKİLLER ve TABLOLAR

Tablo 1	: Tiroid neoplazmlarının sınıflandırılması	4
Tablo 2	: Tiroid kanserinde TNM sınıflaması.....	8
Tablo 3	: Resveratrolün kanser çalışmalarında hücre üzerine etkileri	27
Şekil 1	: Tiroid kanser oluşumunda genetik olaylar.....	18
Şekil 2	: MAPK yolağının şematik görünümü.....	19
Şekil 3	: Resveratrol'ün moleküler yapısı	25
Şekil 4	: Resveratrolün 48. saatteki sitotoksik etki eğrisi	42
Şekil 5	: Resveratrolün 72. saatteki sitotoksik etki Eğrisi.....	42
Şekil 6	: 24 saatte resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi.....	43
Şekil 7	: 48 saatte resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi.....	44
Şekil 8	: 72. saatte resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi.....	44
Şekil 9	: Resveratrolün BRAF mRNA ekspresyonuna etkisi.....	45
Şekil 10	: Resveratrolün ERK mRNA ekspresyonuna etkisi.....	46
Şekil 11	: Resveratrolün NIS m RNA ekspresyonuna etkileri.....	46

1. GİRİŞ

Tiroid kanseri en sık görülen endokrin kanserdir ve genellikle prognozu iyidir. PTC'da overall 10 yıllık sağkalım %85-90'dır. %10-15'i nüks etse de nüksler boyun ve lenf nodlarına sınırlıdır.

Fakat özellikle dediferansiye olduğunda başka bir deyişle tiroid dokusuna ait I yakalama gibi özelliklerini yitirdiğinde takip ve tedavisi güçleşmektedir. İşte bu noktada toksisitesi az, etkili seçeneklere ihtiyaç duyulmaktadır.

BRAF kinaz (BRAF) hücre membranından mitojenik sinyalleri nükleus'a ileten ve hücre bölünmesi ve çoğalmasının uyarıcı RET/PTC → Ras→RAF→MEK→ERK yolağının (MAPK yolağı) anahtar bileşenidir. Bu yolağın uygunsuz aktivasyonu insan kanserlerinde tümörleşmede önemli rol oynar. T 1799 A transversiyon mutasyonu BRAF proteininde V600E aminoasit değişimine yol açarak kinazın sürekli aktivasyonuna neden olur. BRAF mutasyonu PTC'de (%29-83) ortalama %45 prevalansla görülür. Çeşitli çalışmalar BRAF mutasyonunun ekstrasitrodal yayılım, lenf nodu metastazı, ileri tümör evresi ve klinik nüks ile ilişkisini göstermiştir. Transgenik fare modellerinde V600E BRAF'ın ekspresyonunun hedeflenmesi PTC gelişmesi ve diferansiye olmayan tiroid kanserine ilerlemesiyle sonuçlanmıştır. Bu veriler BRAF'ın PTC oluşumunu başlatma ve ilerletebilmesini göstermiştir. Ayrıca hücre proliferasyonunun ve transforme durumun devamını sağlamada da gereklidir. Ayrıca BRAF V600E pozitifliğinin erken takipte daha sık nükslerle ilişkili olduğu ve nükslerin çoğunun radyoaktif iyot tutmayan yani daha az diferansiye nüksler olduğu gösterilmiştir.

Resveratrol (trans-3, 4', 5-trihydroxystilbene, C₁₄H₁₂O₃) iklim değişiklikleri, ozon, güneş ışığı ve ağır metal maruziyeti, patojenik mikroorganizmalarla enfeksiyon gibi çevresel faktörlere yanıt olarak stilbene synthase enzimi tarafından sentezlenen bitkisel türevli bir polifenolik fitoaleksin'dir. Üzüm kabuğunun yanı sıra frambuaz, yabanmersini, karadut 'ta bulunur.

İnflamasyon, viral enfeksiyon, oksidatif stress ve trombosit agregasyonunu ve çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Çeşitli çalışmalarda resveratrol'ün tümörleşmede önemli olan yolların hepsini değilse de çoğunu değiştirebildiği ve kanser büyümesini suprese edebildiği ve/veya apoptozu indükleyebildiği, sitokinlerin, kemoterapotiklerin ve radyasyonun apoptotik etkilerini güçlendirebildiği gösterilmiştir.

İn vitro çalışmalarda resveratrolün MAPK yolağına etkiyle tiroid papiller ve folliküler karsinom hücre hatlarında apoptozu indüklediği ve fare sağlıklı tiroid hücrelerinde NIS protein ekspresyonunu ve I yakalamayı artırdığı gösterilmiştir.

Buradan hareketle resveratrolle insan tiroid papiller karsinomu hücre hatlarında NIS, BRAF ve ERK mRNA düzeylerinin araştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tiroid kanserleri epidemiyolojisi ve sınıflandırması

Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin neoplazilerdir. Kadınlarda sıklığı en hızlı artan, erkeklerde ise ikinci hızlı artan kanserdir. ABD’de 2007 de ortalama 33.00 yeni diferansiye tiroid kanseri tanısı konmuştur ve bunların yaklaşık 28.000’i papiller karsinomlardır.

Yaygın iyot profilaksisi sonucu guatr prevalansının azalmasına karşın tiroid neoplazilerinde artış dikkat çekicidir. Ultrasonun tiroid kliniğinde yoğun olarak devreye girmesi, ultrasonda risk ağırlıklı nodüllerin belirlenmesindeki bilgi ve deneyimin artması, ince iğne biopsilerinin ultrason eşliğinde yapılarak kalitesinin artmasının tiroid kanserlerinin tanısındaki önemli katkısını göz ardı etmemek gerekir.(1) Diferansiye tiroid karsinomları her yaşta görülebilirse de pik insidansı kadınlarda 50-54 erkeklerde 65-69 yaş arasındadır. 15-24 yaş arası kişilerin tanı alan maligniteleri arasında %7,5-10’unu oluşturur.

Olguların %95’inden fazlasını folliküler hücre kökenli olgular oluşturur. Primer maligniteler papiller kanser, folliküler kanser, medüller kanser, kötü diferansiye tümörler ve anaplastik kanserlerdir. Bunların dışında non-epitelyal tümörler, malign lenfomalar, sekonder tümörler, sınıflandırılmayan tümörler ve tümöre benzeyen lezyonlar bulunmaktadır.

Tiroid tümörlerinin histolojik olarak sınıflaması Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Tiroid neoplazmlarının sınıflandırılması

Tiroid neoplazmlarının sınıflandırılması

Primer Epitelyal Tümörler

Foliküler Hücre kökenli tümörler

Benign: Foliküler adenom

Malign: Karsinom

Diferansiye

Papiller

Foliküler

Kötü Diferansiye

Diferansiye olmayan (anaplastik)

C hücre kökenli

Medüller karsinoma

Foliküler ve C hücre kökenli

Mikst medüller foliküler

Primer non-epitelyal tümörler

Malign lenfomalar

Sarkomlar

Diğerleri

Sekonder tümörler

Kaynak: Williams Textbook of Endocrinology Table 14-5'ten uyarlanmıştır.

Tiroid kanserlerinin prevalansı ve tipler arası oranı bölgede iyot eksikliği olup olmamasına, guatr sıklığına, yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir. (1) Klinik olarak tanı alan PTC için insidans 100.000de bir, >1 cm çaplı tümörler için 100.000de 5'tir. Otopsi serilerinde %4'ten %36'ya varan oranlar bildirilmiştir. Bulgular son yıllarda artan insidanstan daha yaygın taramanın sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. (2) Türkiye'den 1996 yılında yayınlanan bir çalışmada 2071 tiroidektomide %3,77 tiroid karsinomu bulunmuştur. %49'u papiller, %24'ü foliküler, %10 indiferansiye, %10 metastatik ve %6 medüller karsinom olarak bildirilmiştir. (3)

Türkiyede Ege Bölgesinden yapılan bir çalışmada 351 tiroid kanser hastasının retrospektif değerlendirmesinde %81,8'inin papiller tiroid kanseri, %8,8'inin folliküler tiroid kanseri, %1,7'sinin Hurthle hücreli neoplazi,%3,1'inin medüller tiroid kanseri, %3,4'ünün anaplastik karsinom ve %1,2'sinin diğer maligniteler olarak bulunmuştur. Yıllara göre gruplandırıldığında folliküler karsinom oranında yıllar içinde anlamlı azalma meydana gelirken diğer kanser tiplerinde azalma görülmemiş, bu da 1999'da başlatılan zorunlu iyotlama programıyla ilişkilendirilmiştir. (4)

Türkiyeden yakın tarihli bir otopsi çalışmasında da 108 otopside tiroid bezleri 2 mm'lik kalınlıklarla incelendiğinde okült PTC oranı %3,7 olarak bulunmuştur. (5)

2.2 Papiller Tiroid Karsinomu

En sık görülen tiroid malignitesidir ve diferansiye tiroid karsinomunun %50-90'ını oluşturur.

Papiller tiroid mikrokarsinomu (PTM) Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1,0 cm veya küçük çaptaki papiller tiroid kanseri olarak tanımlanmıştır.

PTC'ları sert, kapsülsüz veya kısmi kapsüllü tümörler olarak görünürler. Kısmi nekrotik veya bazıları kistik olabilir.(2) Mikroskopik olarak ince fibrovasküler sapa sahip papiller yapılar, berrak oval nükleuslara sahip tek ya da çok sıralı hücrelerle döşelidir. Nükleuslar normal follikül hücresine oranla daha iri, hipodens kromatinli ve ovaldır. (1)

Psammoma cisimcikleri papillanın merkezinde veya tümör stromasında yer alır, kalsifiye katmanlardan oluşan mikroskopik yapılardır.

Papiller karsinomların çeşitli alt tipleri vardır ve tüm PTC'lerin %20'sini oluştururlar. Folliküler varyant: neoplastik follikülleri döşeyen hücreler tipik PTC ile aynı nükleer bulgulara sahipse ve papillalarda folliküler baskınlık tamsa tanınır.

Diffüz sklerozan varyant: Bir veya her iki lobun diffüz tutulumu, yaygın lenfatik yayılım, belirgin fibrozis ve lenfoid infiltrasyonla tanınır.

Tall cell: Boyu eninden 2 kat fazla olan hücrelerle kaplı papillalar tanısaldır.

Columnar cell: Elonge hücrelerin belirgin nükleer katmanlanması tipiktir.

Tall cell ve columnar cell daha agresiftir, diffüz sklerozan varyant için sonuçlar tartışmalıdır.(2)

Kötü prognoz göstergesi olan alt gruplar, papiller kanser için yüksek silindirik hücreli, kolumnar hücreli, insüler, solid, difüz sklerozan tiptir.(6)

2.2.1 Papiller tiroid karsinomunda klinik

Klinik başvuru bulgusu genellikle tiroid nodülü şeklinde olur. Tiroid kanseri kadınlarda daha sık görülür.

İnce iğne aspirasyon biyopsisi sonucu malignite ile uyumlu bulunan, ya da “Bethesda 2007” klasifikasyonuna göre, foliküler neoplazi için kuşkulu, Hurtle hücreli neoplazi için kuşkulu ya da malignite açısından kuşkulu bulunan hastalarda operasyon seçilmelidir.

Ekstratiroidal invazyon ortalama %15 (%5-%34) olarak bildirilmiştir. Olguların üçte birinde prezentasyonda klinik olarak aşikar lenfadenopati vardır. Operatif olarak çıkarılan lenf nodlarının %35-50'sinde tutulum vardır. Tanıda yalnızca %1-7'sinde uzak metastaz bulunur.

PTC için olgu spesifik mortalite 5 yılda %2, 10 yılda %4 ve 20 yılda %5 olarak bulunmuştur.

İleri yaş ve ekstratiroidal invazyon tüm çalışmalarda kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Başlangıçta uzak metastaz varlığı ve primer tümör boyutu çoğu

çalışmada anlamlı değişkenler olarak bulunmuş, bazı gruplar histolojik dereceyi (diferansiyasyon derecesini) de bağımsız bir değişken olarak bildirmişlerdir. Başlangıçta boyun nodal metastazları gelecekte nodal metastazla ilişkiliyse de mortaliteyi etkilemez.

2.2.2 Papiller tiroid karsinomunda cerrahi yaklaşım

Cerrahinin optimal yaygınlığını belirleyen faktörler histolojik tanı, orijinal lezyonun boyutu, lenf nodu ve uzak metastaz varlığı, hastanın yaşı ve risk grubudur. Elbette ki cerrah tecrübeli olmalı, ve cerrahinin amacı boyundaki tüm malign neoplastik dokuyu çıkarmak olmalıdır.

Diferansiye tiroid karsinomu varlığında totale yakın(1 gramdan daha az tiroid dokusu bırakılması) veya total tiroidektomi tüm hastalara önerilmektedir. Total tiroidektomi çoğu PTC'ler multifokal ve bilateral olduğundan daha sınırlı cerrahiye göre nüks oranını düşürür. Ayrıca tiroid dokusunun tamamı değilse bile çoğunun çıkarılması postoperatif I131 ile remnant ablasyonunu kolaylaştırır. Aşırı derecede düşük riskli hastalar (örneğin unifokal intratiroidal papiller mikrokarsinoma) da lobektomi yeterli olabilir.

Malignite kuşkusu olmadan opere edilip lobektomi uygulanmış kişilerde düşük riskli (unifokal, kötü prognoza işaret eden histolojik alt grup tanısı olmayan, metastazı olmayan, baş-boyuna yönelik radyoterapi öyküsü olmayan, intratiroidal ve <1 cm boyutlu papiller tiroid Ca) olanlarda tamamlayıcı tiroidektomiye gerek yoktur.

Kuşkulu bir nodül için lobektomi uygulanan ve histopatolojik değerlendirmede foliküler tiroid kanseri tespit edilen hastalarda, tamamlayıcı tiroidektomi önerilir. Subtotal tiroidektomi uygulanan hastalarda, büyük tümör kitlesi (> 10 mm), multifokal tümör, tiroid dışı yayılım, vasküler invazyon, lenf ganglionu metastazı, uzak metastaz, baş-boyuna yönelik radyoterapi anamnezi, olumsuz prognoza işaret eden histolojik alt gruplar söz konusu ise, tamamlayıcı tiroidektomi,

gereken vakalarda lenf ganglionu disseksiyonu ile yapılmalıdır. Cerrahi sırasında, santral ya da lateral boyun kompartmanlarında operasyon öncesi kanıtlanmış metastatik tutulum varlığında, kompartmanlara yönelik, terapötik kompartman disseksiyonu önerilmektedir. Preoperatif gösterilebilir metastatik lenf ganglionu yoksa, T3-T4 tümörlerde, profilaktik santral (6. seviye) kompartman disseksiyon önerilmektedir. Fakat profilaktik santral disseksiyon yaklaşımı hala tartışmalıdır. Tiroid kanseri cerrahisinde, metastatik lenf ganglionlarını tek tek çıkarmak değil, fonksiyonel kompartman disseksiyonu yapmak seçilecek cerrahi yaklaşım olmalıdır.

2.2.3 Papiller tiroid karsinomunda postoperatif yaklaşım

Tablo 2. Tiroid kanserinde TNM sınıflaması

Tiroid kanserinde TNM sınıflaması

T1	tümör < 2 cm (tiroide sınırlı)
T2	> 2 cm < 4 cm (tiroide sınırlı)
T3	> 4 cm (tiroide sınırlı) /minimal tiroid dışı yayılım)
T4a	tiroid kapsülü dışına, larinks, trakea, özofagusu uzanım
T4b	prevertebral fasya, karotis, mediastene uzanım
Nx	bilinmiyor
N0	bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1a	“seviye VI” a metastaz
N1b	unilateral, bilateral, kontralateral servikal/mediastinal metastaz
Mx	bilinmiyor
M0	uzak metastaz yok
M1	uzak metastaz var

2.2.3.1 Tiroid Kanserinde Evreleme

TNM- 2002

Papiller ve foliküler < 45 yaş

Evre I T1-4 N0-1 M0

Evre II T1-4 N0-1 M1

Papiller veya foliküler > 45 yaş

Evre I T1 N0 M0

Evre II T2 N0 M0

Evre III T3 N0 M0

T1 N1a M0

T2 N1a M0

T3 N1a M0

Evre IVa T4a N0 M0

T4a N1a M0

T1 N1b M0

T2 N1b M0

T3 N1b M0

T4a N1b M0

Evre IVb T4b N1ab M0

Evre IVc T1-4 N1ab M1

Düşük riskli :

- Cerrahi tam rezeksiyon ,
- İyi prognoza işaret eden histolojik alt grup
- T < 1 cm N0M0 (unifokal/multifokal), tiroid dışına mikroskopik ya da makroskopik yayılım yok (tiroid kapsül invazyonu yüksek riske işaret etmez)
- Ailevi tiroid kanseri olmayan

Yüksek riskli :

- T1 > 1 cm
- Uzak metastaz,
- İnkomplet tümör rezeksiyonu (makroskopik ve mikroskopik (yumuşak doku, vasküler invazyon) olarak cerrahi sınırlar dışında tümör varlığı), T3-T4 tümörler (komplet tümör rezeksiyonu yapılsa da)

- Lenf ganglionu metastazı/ kötü prognozlu histolojik alt grupların varlığı (Papiller: yüksek silendirik, kolumnar, difüz sklerozan; foliküler: yaygın invazif)
- Ailevi tiroid kanseri öyküsü

2.2.3.2 Radyoaktif İyot Tedavisi

¹³¹I vücudun diğer bölgeleri etkilenmeden tiroid dokusuna yüksek radyasyon dozları vermenin etkin bir yoludur. Tiroid dokusu iyotu ancak TSH uyarısı altında konsantre edebilir, fakat optimal TSH uyarısından sonra bile neoplastik dokuda I alımı her zaman normal dokudakinden düşüktür, hatta üçte bir olguda olmayabilir.

Cerrahi sonrasında,

- 1) Kalıntı dokunun ablasyonu amaçlı,
- 2) adjuvan tedavi (nüksü/mortaliteyi azaltmak için)
- 3) tedavi (süregen hastalığı olanlarda) amaçlı radyoaktif iyot tedavisi yapılır.

Bu tedavi öncesinde hastanın TSH düzeyinin > 30 mIU/L olması önerilmektedir. Bu durum total ya da totale yakın tiroidektomi yapılan hastalarda, endojen hipotiroidi ya da endojen hipotiroidinin riskli olduğu hastalarda rekombinant TSH (rhTSH) uyarısı ile sağlanabilir.

Endojen hipotiroidi oluşturmak için farklı metodlar mevcuttur:

- 1) Levotiroksin tedavisinin 3-4 hafta kesilmesi
- 2) 2-4 hafta T3 kullanımı, ardından 2 hafta T3 ün kesilmesi rhTSH ile I-131 tedavisi için iki gün ardı ardına 0.9 mg rTSH uygulanması, son injeksiyondan 24 saat sonra radyoaktif iyot verilmesi önerilmektedir. Rekombinant TSH ile hazırlanan hastalarda 72. saate uyarılmış Tg ölçülmelidir.

Endojen hipotiroidi ile hazırlanan hastalarda radyoaktif iyot tedavisi öncesinde, TSH, Tg ve anti Tg ölçülmelidir. Cerrahiden sonra RAI tedavisi ilk kez uygulanacak hastalarda tedavi öncesi, 10-100 μ Ci I131 ile iyot “uptake” incelemesi,

tiroid yatağındaki tutulum derecesini belirlemek amacıyla yapılabilir. İyot “uptake” yapılamayan durumlarda post op 1. aydan sonra yapılan boyun USG değerlidir.

Total ya da totale yakın tiroidektomi uygulananlarda, tiroid lojunda RAI tedavisi öncesi “uptake”in < %5 olması beklenir. Radyoaktif iyot tedavisinden 1-2 hafta önce düşük iyot içeren (< 50 µg/gün) diyet uygulamasına geçilmelidir

Tedavi dozunda RAI tedavisi sonrasında, 5-8. günler arasında tüm vücut taraması (TVT) yapılmalıdır.

Levotiroksin, RAI tedavisinden 24 saat sonra, genellikle 2. ya da 3. gününden itibaren endojen hipotiroidi ile hazırlanan hastalarda başlanmalıdır.

Remnant ablasyonu amacıyla önerilen doz 30-100 mCi dir. Rezidüel tümör varlığında ise önerilen dozlar 100-200 mCi dir. Genellikle lenf ganglionu metastazı varlığında 150 mCi, organ metastazı varlığında 200 mCi dozlar seçilmektedir. Daha kötü prognoza sahip histolojik altgrupların varlığında ya da tiroid dışına invazyon/vasküler invazyon varlığında da >100mCi

dozlar seçilebilir.

Multifokal 1 cm'den küçük tümörlerin uzun dönemde, unifokal tümörler ile kıyaslandığında metastaz, nüks ve mortaliteye olumsuz etkisi bilinmektedir. Fakat RAI tedavisi ile bu risklerin azaldığına dair yeterli veri yoktur. Bu durumda yeni kanıtlar elde edilene dek, multifokal tiroid kanseri vakalarında RAI tedavisi için risk değerlendirmesi ayrıntılı yapıp hastaya göre karar verilmelidir. Uzun dönemde nüks ve mortaliteye RAI etkisi belirli olmadığından RAI tedavisi kararı hasta ve hekime bırakılmalıdır. Seçilmiş vakalara RAI tedavisi verilmesi önerilir.

2.2.4 Takip

2.2.4.1 Erken Dönem:

Cerrahi ve radyoaktif iyot sonrasında L-tiroksin dozu supresyon yapacak şekilde ayarlanmalıdır. Başlangıç tedavisi sonrasında levotiroksin dozunu ayarlama ilk yıl için hedef, TSH düzeyini $<0,1$ mIU/L tutmaktır.

Supresyon tedavisinde hedef değerler, T3 normal sınırlarda, serbest T4 normalin üst sınırında ya da hafifçe yüksek iken, TSH konsantrasyonunun $<0,1$ mIU/L bulunmasıdır. Başlangıç tedavisinden sonra yapılan değerlendirme sonucu, remisyonda olduğu tespit edilen hastalarda daha yüksek TSH değerleri hedef olarak seçilebilir.

Başlangıç için önerilen TSH supresyonunun amacı, tümörde TSH artışına bağlı büyüme potansiyelini baskılamaktır.

Farklılaşmış tiroid kanserinde serum Tg konsantrasyonu, tümör belirteci olarak kullanılmaktadır. Dolaşımında anti-Tg antikorlarının varlığında, ölçüm yöntemiyle etkileşim nedeniyle, yanlış negatif ya da yanlış pozitif sonuçlar alınabilir. Cerrahi ya da cerrahi +RAI sonrasında total tiroid ablasyonu gerçekleştiğinde serum Tg konsantrasyonlarının ölçülemeyecek kadar düşük olması beklenir. TSH uyarısı altında Tg düzeylerinin ölçümünün duyarlılığı daha yüksektir. Takip sırasında TSH uyarısı altında ya da TSH baskılı iken Tg düzeylerinin ölçülebilir hale gelmesi nüks göstergesidir. Başlangıç tedavisi sonrasında serum Tg düzeyleri bir süre ölçülebilir halde kalabilir. O nedenle başlangıç tedavisinden 3 ay sonra ölçülmesi önerilmektedir. Başlangıçta anti-Tg antikoru pozitif olan hastalarda, takip sırasında tiroid dokusu ablasyonu ile antikor düzeylerinin azalması ve kaybolması beklenir. Süregelen anti-Tg antikor pozitifliği, devam eden hastalık ya da nüks işareti olarak yorumlanmalıdır. Anti-Tg antikoru pozitif olan hastalar, periodik olarak I 131 TVT ve boyun USG ile değerlendirilmelidirler. Metastaz kuşkusunda, FDG-PET, bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans görüntüleme yöntemleri

kullanılabilir. Takip sırasında hastanın risk derecesine göre Tg düzeyleri, anti-Tg ile birlikte 6-12 ay aralıklarla ölçülmelidir.

Takip sırasında endojen hipotiroidi ya da rekombinant TSH stimülasyonu ile başlangıç radyoaktif iyot tedavisinden sonra en erken 9. ayda, sıklıkla 9,12. aylarda 2-5 mCi ile gerçekleştirilen I 131TVT yapılır. Bu işlem sırasında TSH > 30 mIU/L iken ölçülen Tg konsantrasyonları (uyarılmış tg) tiroid ablasyonunu değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır.

TSH 30 mIU/L iken Tg düzeyleri ölçülebilir (>2 ng/mL) bulunan, fakat I131TVT de tutulum tespit edilmeyen hastalar, daha ileri görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmelidirler. Bu yöntemler arasında FDG-PET, bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans görüntüleme sayılabilir. Bahsedilen görüntüleme yöntemleri ile patolojik bulgu tespit edilmesi, tümörün iyot alımından sorumlu sodyum-iyodür simporter sentezini yapamadığı ya da lezyonun boyutlarının küçük olması ve lokalizasyonu nedeniyle I 131 taramasının duyarlı olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

İleri görüntüleme yöntemleri ile de odak bulunmaması durumunda ampirik olarak yüksek dozda (100 mCi) RAI verilip, tedavi dozu sonrası taramada patolojik RAI tutulumu olup olmadığı değerlendirilebilir. Bu, daha sonraki tedavi seçeneklerini belirlemesi açısından önemlidir. Yüksek dozda RAI sonrasında da tutulum olmayan hastaların, bundan sonra RAI tedavisinden yararlanmayacağı düşünülmelidir. Uyarılmış Tg düzeyleri 1-2 ng/mL arasında bulunan, fakat TVT da tutulum tespit edilmeyen, boyun USG normal sınırlarda olan hastaların, Tg düzeyleri ile takip edilebileceği bildirilmektedir. Bu hastalarda takip sırasında uyarılmış ya da TSH baskılı iken ölçülen Tg düzeylerinde artış, aktif hastalık varlığına işaret eder.

Primer RAI tedavisi sonrasında total ablasyonu tanımlamada, TSH stimülasyonu ile tiroglobulin düzeylerinin tespit edilemeyecek kadar düşük (< 1 ng/mL), boyun USG nin normal bulunması ve TVT de tutulum olmaması gereklidir. Başlangıç tedavisinden sonra 3- 6. ayda, ardından yıllık boyun USG, özellikle yüksek riskli hastaların takibinde gereklidir.

2.2.4.2 Uzun Dönemde Takip

Diferansiye tiroid kanserinin uzun dönem takibi, yıllık, fizik muayene, levotiroksin tedavisi altında TSH, Tg ve anti-Tg ölçümleri ve boyun USG ile yapılır. Bu parametrelerde, lokal nüks ya da uzak metastaza işaret edecek değişikliklerin varlığında, ileri görüntüleme yöntemlerinin (131 TVT tekrarı, BT/MR, PET) verilerine göre, cerrahi, RAI, radyoterapi gibi tedavi seçenekleri hastaya göre değerlendirilir.

Yüksek riskli grupta fakat, ilk tedaviden sonra, 9-12 ay arasında yapılan I131TVT ve bu sırada değerlendirilen uyarılmış (endojen hipotiroidi ile TSH >30 mIU/L iken ya da rekombinant TSH uyarısı ile) Tg düzeyine göre remisyonda olduğu kabul edilen hastalarda, supresyon tedavisinin 3-5 yıl süre ile sürdürülmesi önerilmektedir (“European Thyroid Association”-(ETA) önerisi). Düşük riskli grupta ise, başlangıç tedavisinden sonra yapılan değerlendirme ile remisyona doğrulanmış ise, nüks oranının <1 olduğu dikkate alınarak L-tiroksin dozunun TSH konsantrasyonunu alt sınırdaki (0.5-1.0 mIU/L) tutacak şekilde azaltılması önerilmektedir.

“American Thyroid Association”-(ATA) 2009 kılavuzu ise düşük riskli grupta ilk yıl için remnant ablasyonu yapılmıyorsa da TSH düzeyinin 0.1-0.5 mIU/L arasında tutulmasını önermektedir. Yüksek ya da orta riskli grupta ilk yıl için önerilen TSH düzeyi <0.1 mIU/L ‘dir.

Devam eden hastalığı olanlarda TSH düzeyinin <0.1 mIU/L tutulması gerektiği açıktır. Fakat 2009 kılavuzu, başlangıçta yüksek risk grubunda olan, tedavi ile remisyonda olduğu belirlenen hastalarda, TSH düzeyinin 5-10 sene için, 0.1-0.5 mIU/L arasında tutulmasını; düşük risk grubunda olup tedavi sonrası remisyonda olanlarda TSH düzeyinin 0.3-2.0 mIU/L arasında tutulmasını; remnant ablasyonu uygulanmayan fakat klinik bulgular, USG ve tedavi altında ölçülemeyecek kadar düşük Tg düzeyleri ile remisyonda olanlarda TSH düzeyinin 0.3-2.0 mIU/L arasında tutulmasını önermektedir.

Tiroid kanseri tedavisinde subklinik tirotoksikoz oluşturacak dozlarda L-tiroksin kullanılması, kardiyak komplikasyonları (supraventriküler aritmiler, sol ventrikül hipertrofisi, iskemik kalp hastalığının alevlenmesi), protrombotik süreci ve kemik kaybını tetikleyebilir. Hastalar, bu komplikasyonlar açısından takip edilmeli; levotiroksin dozunun azaltılmadığı durumlarda, soruna yönelik β -bloker, bisfosfonat gibi tedaviler seçilmelidir.

Hastaların uzun dönem takibinde, boyun USG süregelen ya da nüks eden hastalığı değerlendirmede en duyarlı görüntüleme yöntemidir. Metastatik lenf ganglionlarının değerlendirilmesi, boyutları çok küçük olsa bile bu yöntemle mümkün olabilmektedir.

Ultrasonografi rehberliğinde yapılan ince iğne aspirasyon biyopsisi ve aspirasyon sıvısında Tg ölçümü, patolojik görünümlü lenf ganglionunun veya boyun kitlesinin değerlendirmesinde yol göstericidir.

2.2.5 Tekrarlayan ve Metastatik Hastalığı Olanlar

Boyun bölgesindeki nüksün tedavisinde cerrahi ve I131 RAI tedavi seçenekleri kullanılabilir.

Cerrahi eksizyonun mümkün olamadığı hastalarda, tümör dokusunda RAI “uptake” i düşükse- özellikle 45 yaş üzerinde- eksternal radyoterapi uygulanabilir.

Akciğer metastazları varlığında, I 131 “uptake”i olduğu sürece RAI vermek önerilmektedir.

Seçilecek dozlar 200 mCi ya da “dozimetri” ye göre hesaplanan daha yüksek ve güvenli dozlar olabilir. İyot “uptake”i devam ettiği sürece, yeni dozların ilk 2 yıl için 6 aydan önce verilmemesi önerilmektedir. Ardından daha seyrek (bir yıl) aralıklarla verilebilir. Yüksek doz sonrası TVT, takip sırasında Tg ölçümleri, makrometastazı olanlarda diğer görüntüleme yöntemleri ile metastaz boyutlarının

takibi, tedaviye cevabı belirlemede ve RAI tedavisinin devamına karar vermede önemlidirler. Bu hastalarda tanı amaçlı I131 TVT nin anlamı yoktur. Çünkü tedavi endikasyonunda değişiklik oluşturmayacaktır.

I131 tedavisinin toplam üst doz sınırı yoktur. Radyoaktif iyot tutulumu olduğu ve yarar tespit edildiği sürece uygulanabilir. Bazı hastalarda >1000 mCi RAI vermek gerekebilmektedir. Fakat 600 mCi sonrasında lösemi ve sekonder kanserlerin sıklığında artış olduğu bilinmelidir. Tükürük bezi hasarı ya da nazolakrimal kanal obstrüksiyonu, tekrarlayan RAI dozlarından sonra daha sıktır. Tekrarlayan dozların hipospermiye yol açabileceği dikkate alınarak, tekrarlayan tedavi öncesi erkek hastalarda sperm kadınlarda ovum örneği saklanması önerilebilir. Kadınlarda tekrarlayan dozlarda menopozun daha erken başladığı bildirilmektedir. RAI tedavisi sonrası gebelik 6 ay-1 yıl sonra planlanmalıdır.

Diffüz akciğer metastazları varlığında, kısa sürelerle tekrarlayan RAI tedavisi verilen hastalarda radyasyon fibrozisi gelişebilir.

Kemik metastazlarının tedavisinde I 131, ya da palyatif amaçla ve ağrı kontrolü için eksternal radyoterapi uygulanabilir. Kemik metastazlarında eğer lezyon cerrahi eksizyon için uygun ve izole ise cerrahi, bifosfonat injeksiyonları, embolizasyon ya da sement injeksiyonu da seçilebilir.

Beyin metastazları seyrekdir. Uygun olduğunda cerrahi eksizyon, cerrahi olarak çıkarılmayan ve RAI tutmayanlarda eksternal radyoterapi seçilebilir.

I131 tutmayan tümörler, sıklıkla yüksek Tg düzeyleri olan, diagnostik ya da terapötik amaçlı TVT'ları negatif bulunan fakat PET/BT de tutulum tespit edilen hastalardır. rTSH uyarısı altında yapılan PET/BT ile yöntemin duyarlılığı artırılabilir. Tümör farklılaşmasının kayb olduğu vakalarda, iyot "uptake"inin kaybolmasına ek olarak, Tg sentezi de azalabilir. Bu durumda kitle boyutları küçülmeden Tg seviyeleri düşer. Bu durum takip ve tedavide yanılgılara yol açabilir. Cerrahi ile kontrol edilemeyen progressif hastalığı olanlarda, I131 tutulumu negatif

ise, doksorubisin ya da doksorubisin + sis-platin kombinasyonları (cevap oranı %10-20) uygulanabilir. Günümüzde tirozin kinaz inhibitörlerini, anjiogenez inhibitörlerini, immünmodülatör ilaçlar, apoptoz tetikleyicileri kullanan deneysel çalışmalar ve gen tedavisi çalışmaları devam etmektedir.(6)

2.3 Moleküler Patogenez

Kromozomlarda yapısal anomaliler PTC'lerin %50'sinde olur ve sıklıkla 10. Kromozomun uzun kolunu içerir. RET protoonkogeni kromozom 10q11-12'de yer alır. Tirozin kinaz alanı içeren bir transmembran reseptörü kodlar.

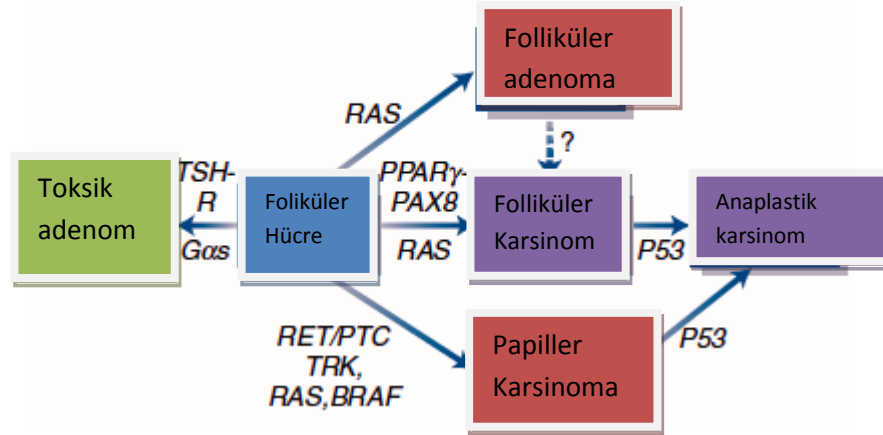
RET protoonkogeninin tüm aktive formları RET geninin tirozin kinaz bölgesi ile diğer genlerin 52 bölgesinin birleşmesiyle oluşan onkojenik yeniden düzenlenmelerin sonucudur. Yabancı gen sürekli eksprese olur ve 52 bölge promotör olarak görev yapar, RET geninin sürekli ekspresyonuyla sonuçlanır.

RET/PTC'nin 3 major formu tanımlanmıştır. Çocuklukta boyun ışınlaması olmayan erişkin PTC hastalarında RET/PTC yeniden düzenlenmesinin sıklığı %2,5-35 arası değişir. RET/PTC1 ve RET/PTC3 sıklığı benzer; RET/PTC2 daha seyrek görülür. Çocuklarda veya çocuklukta radyasyon öyküsü olanlarda herhangi bir yaşta daha sık görülür (%60-80 olgu) Çernobilden kısa zaman sonra gelişen agresif tümörlerde RET/PTC3, daha sonra gelişen daha az agresif tümörlerde RET/PTC1 daha sık görülür. Papiller mikrokarsinomlarda RET/PTC görülmesi tiroid karsinogenezinde erken bir olayı temsil ettiğini gösterir. Diğer taraftan RET/PTC pozitif tümörler kötü veya indifferansiye tümör tiplerine ilerleme göstermez. (2) Kliniğimizde yapılan bir çalışmada RET/PTC pozitifliği %66,3 bulunmuştur. RET/PTC1 %31,7, RET/PTC3 %20,8 oranında pozitif bulunmuştur. RET/PTC sıklığıyla prognoz arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır.(7)

RAS geninde aktive edici nokta mutasyonu PTC'lerinde %10 oranında; çoğunlukla folliküler varyantta bulunur. (2)

NIS (Na/I symporter) tiroid folliküler hücrelerinde tiroid hormon biyosentezinde ilk basamak olan aktif iyot transportunu düzenleyen bir plazma membran glikoproteinidir. Tiroid kanseri ve metastazlarının etkin tanı ve tedavisinde temeli oluşturur. NIS geni 15 eksondan oluşur ve kromozom 19p12-13 üzerinde 20 kilobaz çifti üzerinde uzanır. NIS geni (SLC5A5) ekspresyonu benign ve malign hipofonksiyone nodüllerde 10-1200 kat daha az eksprese edilir.(8) Malign nodüllerde ayrıca TPO, PDS ve Tg ekspresyonu da azalmış olarak bulunur. Bu anormallikler tiroid kanser hücrelerinde tipik olarak gözlenen metabolik defektleri açıklar; azalmış I konsantrasyonu, düşük I organifikasyonu, düşük hormon sentezi ve kısa intratiroidal iyot yarı ömrü.

NIS ekspresyonu tiroid hücreleri arasında heterojendir, fakat Tg hemen tüm follikül hücre kökenli tiroid kanserlerinde değişken düzeylerde eksprese edilir ve immünohistokimya ile gösterilebilir. Ayrıca TSHR'leri de çoğunda eksprese edilir ve TSH hem diferansiasyonlarını hem büyümelerini uyarır.



Şekil 1-Tiroid kanser oluşumunda genetik olaylar

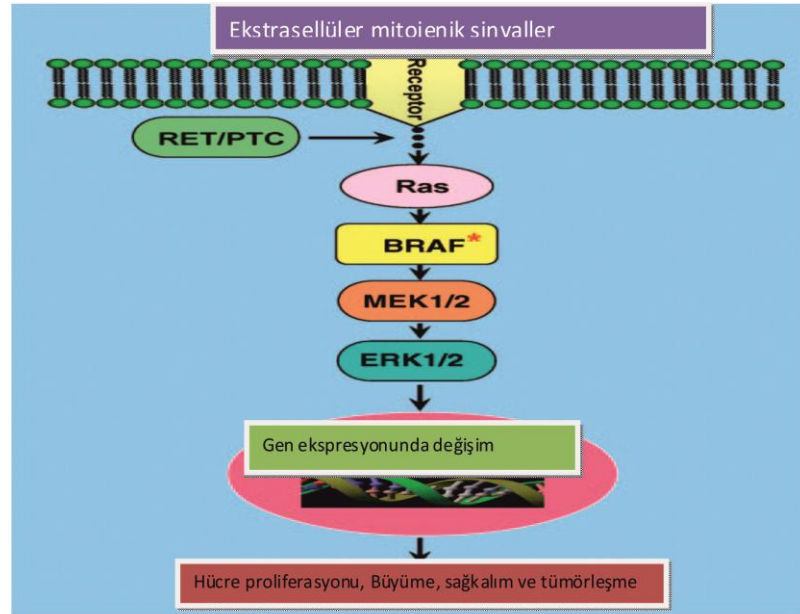
Williams textbook of Endocrinology Şekil 14-6'dan uyarlanmıştır.

2.4tiroid Kanserinde Braf

2.4.1 MAPK yolağı ve aktive edici genetik değişiklikleri

RET PTC→Ras→Raf→mitogen extracellular kinase (MEK) → MAPK/ERK yolağı (kısaca MAPK yolağı) hücrede proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve sağkalımda ve aberran olarak aktive olduğunda tümör gelişiminde temel rol oynayan bir intrasellüler sinyal yolağıdır.(9) Bu yolağın fizyolojik aktivasyonu hücre membranındaki reseptörleri sayesinde bir çok büyüme faktörü, hormon ve sitokinlerce tetiklenir. Normal hücrelerde Raf kinaz aktivasyonu, membrana bağlı küçük bir G proteini olan GTP bağlı Ras ile direkt etkileşimle olur. Bir serin/threonin protein kinaz olan aktive Raf, hemen altındaki kendisi de bir serin /threonin protein kinaz olan MEK'i fosforiller ve aktifler, o da ERK'i fosforiller ve aktifler. Aktive ERK çekirdekteki düzenleyici proteinleri fosforilleyerek gen ekspresyonunu değiştirir ve sonucunda hücrenin biyolojik aktivitelerinde değişme olur. (9)

MAPK yolağının aktifleyici genetik değişiklikler sonucunda aberan aktivasyonu uzun süredir bir çok kanserde saptanmıştır .



Şekil 2: MAPK yolağının şematik görünümü

Esas olarak tiroid kanserinde 10'dan fazla tipi olduğu bilinen RET/PTC geni RET geninin 3' kısmı ile ilişkisi bir başka genin 5' kısmının kromozomal yeniden düzenlenmesinin ürünü bir rekombinant protein ürününü temsil eder. Bu rekombinasyon RET/PTC protein ürününde bulunan tiroizin kinaz'ın liganddan bağımsız olarak aktivasyonunu sağlar. Son zamanlarda tiroid hücrelerinde RET/PTC sinyal iletiminin MAPK yolağını kolaylaştırdığı gösterilmiştir. (10-11-12)

Aktifleştirici Ras mutasyonu MAPK yolağının aberran aktivasyonun klasik ve sık bir nedenidir. (13) B tipi Raf kinaz (BRAF) mutasyonunun da MAPK yolağının aberran aktivasyonunun başka bir majör nedeni olduğu saptanmıştır. 3 tip Raf kinaz vardır: A-Raf, B-Raf (BRAF) ve C-Raf. Bunların arasında BRAF MAPK yolağının en potent aktivatörüdür. Dolayısıyla BRAF geninin aktive edici mutasyonu özellikle de bu mutasyonu yüksek sıklıkta taşıyan tiroid kanseri için önemlidir.

2.4.2 Tiroid kanserinde BRAF mutasyonu

İnsan kanserlerinde ilk kez keşfinden bu yana BRAF geninde 40'tan fazla mutasyon saptanmıştır. En sık görüleni, mutasyonların %90'ından fazlasını oluşturan T1799A nokta mutasyonudur. 1799 pozisyonunda T→A transversiyonu sonucunda 600 pozisyonunda valin yerine glutamat geçer. Bu mutasyonun tiroid kanserinde sıklıkla görüldüğü saptanmıştır. T1799A mutasyonu BRAF proteininde V600E aminoasit değişikliğine ve mutant BRAF kinaz'ın onkojenik aktivasyonuna yol açar. V600E mutasyonu BRAF'ı sürekli aktif hale getirir.

Çoğu çalışma BRAF mutasyonunu bir veya daha fazla konvansiyonel yüksek risk özelliği ile ilişkili bulmuştur. Örneğin Nikiforova ve arkadaşlarının çalışmasında ekstratiroidal invazyon ve evre 3-4 hastalıkla ilişkili bulunmuştur.(14) Japon çalışmasında Namba ve arkadaşları ileri evre hastalıkla ilişkili bulmuştur.(15) Geniş bir çok merkezli uluslararası bir çalışmada Xing ve arkadaşları da BRAF'ın ekstratiroidal invazyon, lenf nodu metastazı ve ileri evre hastalıkla ilişkisini saptamıştır. (16) Bunun dışında da bir çok başka çalışma ileri evre hastalık, lenf nodu

metastazı ve ekstratiroidal invazyon ile ilişkili bulmuştur. Tiroid kanserinde uzak metastaz seyrek görüldüğünden veriler kısıtlı olmakla beraber iki çalışmada BRAF mutasyonu uzak metastaz ile ilişkili bulunmuştur.(15,17) PTC'nin çeşitli alt tipleri arasında BRAF en sık agresif alttip olan tall cell'de, sonra konvansiyonel , en seyrek te folliküler varyantta görülür, sıklıkları sırasıyla %77, %60, %12'dir. (9) Bazı çalışma alarda ileri yaş ve erkek cinsiyet ile de ilgisi gösterilmiştir. (9)

Çeşitli çalışmalar BRAF taşıyan anaplastik tiroid kanserlerinde PTC bileşenlerinin bulunduğunu göstermiştir. Bu da BRAF mutasyonunun PTC'dan ATC'a dönüşmede de rol oynayabileceğini düşündürmüştür. (14)

Nükslerle de ilişkilidir. Erken evrede nüks olasılığı az görünen grupta dahi nüks sıklığı artmıştır. Toplamda bu çalışmaların BRAF ile ilişkili nüks için risk oranı 2,65 (%95 CI 1,77-3,96; $p < 0,0001$)(19,27,65,66) Xing ve arkadaşları nükslerin RAI yakalama oranının düşük olduğunu bulmuştur. (16)

BRAF'ın tümörijenik etkisi tiroid bezinde BRAF V600E ekspresyonu hedeflenmiş olan transgenic farelerde PTC gelişmesi ve gelişen PTC'nin kötü diferansiye, çevre dokulara invazyona meyilli tümörler olmasıyla gösterilmiştir.(18) BRAF taşıyan insan PTC'sinden türetilen hücrelerde BRAF'ı durdurmak için siRNA transfeksiyonu hücre büyümesi ve proliferasyonunu inhibe etmiştir.(19) BRAF taşıyan PTC hücrelerine stabil siRNA transfeksiyonu ise sürekli BRAF supresyonu sağlar ve hücre proliferasyonunun inhibisyonunu sürdürür, transformasyonu önler ve farede xenograft tümör büyümesini önler.(20) Bu bulguların hepsi BRAF mutasyonunun PTC tümörleşmesini başlatmakla kalmayıp PTC'nin progresyonunu uyarma ve sürdürmede gerekli olduğunu düşündürmüştür.

BRAF agresifliği ve nüksü artırırken yine MAPK yolağıyla bağlantılı RET/PTC gibi diğer genetik değişikliklerin bunu neden yapamadığı tartışma konusudur. Hücrede eşlik eden moleküler olaylar ve genetik değişikliklerin onkojenik gücüyle açıklanmaya çalışılmaktadır. Örneğin rat tiroid hücrelerinde BRAF ekspresyonunun uyarılması genetik instabiliteye yol açarken RET/PTC

uyarısı yol açmaz.(21) Ayrıca bu hücrelerde BRAF ekspresyonuyla belirgin olarak artmış matrigel invazyonu gözlenirken, RET/PTC ile gözlenmemiştir. (22)

BRAF mutasyonu ile çeşitli tümör supresör gende uygunsuz metilasyon ve inhibisyon meydana gelir iken tümör uyarıcı bazı genlerde de aşırı ekspresyon meydana gelir. Bunlar arasında VEGF, MMP3 dahil bazı MMP'lar, NF-κB sayılabilir.

Ayrıca BRAF mutasyonu primer veya rekürren tümörde iyot metabolizmasında son derece önemli olan TPO(23), NIS(24,23), Tg(23) ve pendrin (25) ekspresyonunda azalma ile ilişkilidir. Rat tiroid hücre hattında BRAF V600E ekspresyonu bu genlerin susturulmasıyla sonuçlanmıştır.(24,26) BRAF'ın ekspresyonunun durdurulması veya MAPK yolağının inhibitörler veya siRNA ile durdurulması bu genlerin ekspresyonunun geri kazanılmasını sağlayabilir (24,26) Bu tiroid spesifik moleküller tiroid hücrelerinin iyi bilinen diferansiyasyon belirteçleri olduğundan bunların kaybı dediferansiyasyona doğru ilerleyişi gösterir. RET/PTC aşırı aktivasyonu veya Ras aktive edici mutasyonları da tiroidin iyot metabolize edici genlerinin ekspresyonunu azaltabilir.(10) Bunların hepsi MAPK yolağında yer alır. Fakat BRAF mutasyonları diğerlerinden çok daha fazla iyot metabolize eden genlerde anormalliğe yol açar.

RET/PTC, Ras ve BRAF mutasyonlarının hepsi MAPK yolağında yer aldığından MAPK yolağının hedeflenmesi PTC için potansiyel olarak etkili bir tedavidir. Raf kinaz inhibitörleri AAL-881 ve LBT-613 ile BRAF pozitif hücrelerde G1 arresti ve hücre ölümünün uyarılması sağlanmıştır. (27) Toksisiteleri klinik olarak geliştirilmelerini kısıtlamakla beraber BRAF'ın hedeflenmesinin BRAF taşıyan tiroid kanserinde terapotik olabileceği izlenimi vermiştir. BRAF taşıyan insan PTC'sinden türetilen hücrelerde BRAF'ı durdurmak için siRNA transfeksiyonunun hücre büyümesi ve proliferasyonunu inhibe etmesi (19) ve BRAF taşıyan PTC hücrelerine stabil siRNA transfeksiyonu ile sürekli BRAF supresyonu sağlanarak hücre proliferasyonunun inhibisyonu(20) da bu görüşü doğrular niteliktedir. Ayrıca

stabil siRNA ile BRAF susturulması sonucunda bazı tiroid spesifik genlerin reekspresyonu sağlanmıştır. (26)

2.5 Diferansiye Tiroid Kanserinde Yeni Tedaviler

Sorafenib BRAF dahil bir çok kinazı inhibe eden potent bir multikinaz inhibitörüdür. Metastatik papiller tiroid kanserli hastaları içeren bir çalışmada(28) %15 kısmi yanıt, %56 stabil hastalık oranı gözlenmiştir. Ortalama progresyonsuz sağkalım süresi 15 ay olarak bulunmuştur. Bu hastaların %77'si BRAF pozitif olgulardır. Başka bir faz 2 çalışmada iyoda refrakter rekürren veya metastatik DTC'da RAI alımını artırması araştırıldığında RAI alımının geri dönüşü görülmemekle beraber %23 kısmi yanıt, %39 stabil hastalık sağlanmış, ve median progresyonsuz sağkalım 58 hafta olarak bulunmuştur. (29) Primer kültürde sorafenib ve MEK inhibitörü UO126 ile yapılan bir çalışmada ise (30) Sorafenib ve UO126 ile MEK/ERK inhibisyonu sağlanmakla beraber BRAF'ın yarattığı antiapoptotik etkinin önlenmesi veya yüksek glukoz alımı, artmış glikolitik aktivite geri çevirilememiştir.

Yeni geliştirilen potent bir BRAF inhibitörü olan CEP-32496 (31) oral olarak etkili bir ajandır. BRAF eksprese eden kolon kanseri ve melanoma hücre hatlarında ve hayvan xenograft modellerinde umut vaat edici sonuçlar alınmıştır.

CI-1040 potent bir MEK selektif inhibitördür hem MEK1 hem MEK2'yi inhibe eder. BRAF mutasyonu gösteren tiroid kanser hücrelerinde büyüme ve proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. (32) Daha yeni kuşak bir MEK inhibitörü olan PD0325901 ile hücre proliferasyonu inhibisyonu ve BRAF ve RAS mutasyonu taşıyan hücrelerde G0/G1 fazında hücre siklusu arresti gözlenmiştir. İnvazyon ve hücre büyümesinin inhibisyonu sağlanmıştır. (33) Aynı molekülle yapılan başka bir çalışmada BRAF taşıyan hücrelerin RET/PTC taşıyanlara göre daha duyarlı olduğu ve her iki grupta da hücre çoğalmasının inhibe olduğu görülmüştür. (34) ARRY-142886 (AZD6244) BRAF ve Ras taşıyan kanser hücrelerini selektif olarak inhibe ettiği görülmüş olan bir MEK inhibitörüdür. Tiroid kanser hücrelerinin ve xenograft tümörlerinde de BRAF mutasyonuna selektif olarak inhibisyon görülmüştür. (35)Faz

2 çalışmasında %3 kısmi yanıt, %66 stabil hastalık ve 32 haftalık median progresyonsuz sağkalım sağlanmıştır. (36)

Gefitinib oral EGFR tirozin kinaz inhibitörüdür. EGFR geninde mutasyonlar tiroid kanserinde tanımlanmıştır. Ayrıca EGFR RET aktivasyonuna katkıda bulunur. Bir faz 2 çalışmada ancak %4 hastada nitelikli bir kısmi yanıt sayılmayacak bir hastalık azalması saptanmıştır. %24 hastada en az 24 haftalık stabil hastalık sağlanmıştır. (37)

Axitinib (AG-013736) tüm VEGFR'ları bloke eden oral tirozin kinaz inhibitörüdür. Faz 2 çalışmada herhangi bir histolojide ileri evre tiroid karsinomunda %30 kısmi yanıt, 16 haftadan uzun stabil hastalık %38 hastada gözlenmiştir. Motesanib (AMG 706) VEGFR 1-3, RET ve C-KIT'i hedefleyen bir oral tirozin kinaz inhibitörüdür. Faz 2 çalışmasında ileri evre diferansiye tiroid kanserinde %14 PR, %35 ortalama 24 haftalık stabil hastalık sağlanmıştır. (38)

Sunitinib (SU11248) VEGFR1-3, RET ve RET/PTC 1 ve 3'ü hedefleyen oral tirozin kinaz inhibitörüdür. Ravaud ve arkadaşlarının faz 2 çalışmasında %8 yanıt oranı sağlanmıştır. %67 stabil hastalık sağlanmıştır. (39) Cohen ve arkadaşlarının faz 2 çalışmasında ise %13 yanıt oranı ve %68 stabil hastalık sağlanmıştır. (40)

Retinoidlerle I131 duyarlılığını artırmak için yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Bazıları I alımında artış bildirirken bazıları yanıt alamamıştır. (41,42,43)

PPAR gamma aktivasyonu PTEN aktivasyonuna yol açar, bu da PI3K'ı inhibe eder. Bazı çalışmalarda PPAR gamma agonistleriyle radyoaktif I alımında %26-40 artış saptanmıştır. (44,45)

İn vitro çalışmalarda demetile edici ajan 5-azasitidin tiroid kanser hücre hatlarında NIS ekspresyonu ve RAI uptake'ini geri getirebilmiştir. (46) Histon

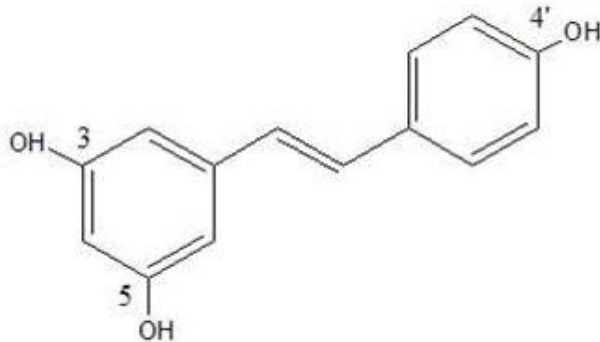
deasetilaz inhibitörleri ile RAI alımı artırılabilirse de klinik olarak anlamlı major yanıtlarla sonuçlanmamıştır.

Thalidomide ve türevi lenalidomide'in anti tümör etkilerini kısmen anjiogenez inhibisyonu ile gösterdiklerine inanılmaktadır. Uzak metastazlı hızlı ilerleyen tiroid kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada %18 kısmi yanıt, %32 stabil hastalık sağlanmıştır. En sık yan etki halsizlik olarak bildirildi, fakat 3.-4. derece enfeksiyonlar, perikardiyal effüzyon, pulmoner emboli daha seyrekti. Ayrıca teratojenite, sedasyon, kabızlık, cilt erüpsiyonları, epidermal nekroliz, hipotiroidi de görülmüştür.

Tiroid spesifik bazı proteinlerin geri kazanılması (rediferansiyasyon) tedavisinde retinoik asit deriveleriyle yapılan çalışmalarda yaklaşık üçte bir hastada radyoaktif iyotun alımı sağlanabilmiştir. PPAR gamma agonistleri tiroid kanser hücre hatlarında antiproliferatif ve rediferansiye edici etkiler gösterebilirler. (47,48)

RAI refrakter DTC'da rosiglitazon ile yapılan çalışmada %25 hastada 8 haftada RAI uptake oluşsa da objektif yanıt gösterilememiştir. (49)

2.6 Resveratrol



Resveratrol

Şekil 3: Resveratrol'ün moleküler yapısı

Resveratrol (trans-3, 4', 5-trihydroxystilbene, C₁₄H₁₂O₃) iklim değişiklikleri, ozon, güneş ışığı ve ağır metal maruziyeti, patojenik mikroorganizmalarla enfeksiyon gibi çevresel faktörlere yanıt olarak stilbene synthase enzimi tarafından sentezlenen bitkisel türevli bir polifenolik fitoalexin'dir. Üzüm kabuğunun yanısıra frambuaz, yabanmersini, karadut 'ta bulunur. (50)

İnflamasyon, viral enfeksiyon, oksidatif stress ve trombosit agregasyonunu ve çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Çeşitli moleküller ve sinyal yollarının disregülasyonunun tümörleşmeye katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu moleküllerden bazıları Ras onkogen aktivasyonu ve MYC'in mutasyon veya amplifikasyonla deregülasyonu, c-Fos ve C-jun aşırı ekspresyonu, cyclinler D/E ve Cdk 2-4 'ün amplifikasyonu, aşırı ekspresyonu veya mutasyonu, proapoptotik düzenleyiciler Fas ve Bax mutasyonu, tümör supresör p53, PTEN ve Rb'un mutasyon veya delesyonu, DNA hasarına yanıtı düzenleyen Chk1-2 ve ATM-ATR mutasyonu, sağkalım kinazı Akt'nin mutasyonu, amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, hücre siklusu inhibitörleri p21WAF1, p27KIP1, p14ARF, p16INK4A ve P15INK4B mutasyonu ve antiapoptotik Bcl-2 translokasyonu yer alır.

Çeşitli çalışmalarda resveratrol'ün hepsini değilse de çoğunu değiştirebildiği ve kanser büyümesini suprese edebildiği ve/veya apoptozu indükleyebildiği, sitokinlerin, kemoterapotiklerin ve radyasyonun apoptotik etkilerini güçlendirebildiği gösterilmiştir.

Tablo 3: Resveratrolün kanser çalışmalarında hücre üzerine etkileri

Tümör modeli	Kullanılan hücre hattı	Moleküler hedefler	Hücresel Etkiler
Meme Kanseri	T47D MDA-MB-231 MDA-MB-468 MCF-7	p53, PTEN, p27, ROS, NO, QR, p21	Apoptoz
		p70S6K, ppS6RP, Src-Stat3, pAkt, Bcl-2, NF-κB, calpain, MMP-9, cyclin D, Cdk4, ribonucleotide reductase, CYP1A1, telomerase	Büyüme arresti, Hücre göçü
Prostat Kanseri	LNCap PC-3 DU145 Colo-357 LAPC-4	Caspases 3/9, p53, p21, p27, Bax, Bak, Bid, Bad, MKP5	Apoptoz, G0/G1 arresti
		PI3K, pAKT, cyclins B/D1/E, Cdk1/4, Bcl-2, Src-Stat3, ROS	Proliferasyon hızı, hücre canlılığı
Kolon Kanseri	HT-29 DLD1 HCT116	AMPK, ROS, cathepsin D, caspase-2, cytochrome c, ATF3	Apoptoz, lizozom akışı, G2 arresti
		Cdk7, p34Cdc2	Hücre büyümesi
Pankreas kanseri	CD18 S2-013 panc-1	MIC-1, cytochrome C, caspase-3	apoptoz
		Src-Stat3, NF-κB	Hücre büyümesi
Lösemi	HL-60		Apoptoz, nükleer boyut, granülarite
		NO	Hücre büyümesi
Hepatoma	Hep G2		Apoptoz, nükleer boyut, granülarite
			Hücre büyümesi
B-hücreli lenfoma	LY1 LY8 LY18	p27, p53, CD69	Apoptoz, G0/G1-arrest
		BCL6, Myc, pAKT, pp70S6K	glikoliz
Osteosarkom	SJSA1	pERK1/2, pp53(Ser15)	apoptoz
			Hücre büyümesi
Squamoöz hücreli karsinom	A431	p21, p27	G0 G1 arresti
		Cyclins A/E/D1/D2 Cdk2/4/6, pRb, MEK1, pERK1/2, c-Jun, AP-1, HIF-1α, VEGF, Akt, E2F1-5, DP1/2	
Multipl myelom	RPMI8226 OPM-2 U266 KM3	c-fms, CD14, CD11a, 1,25(OH)2D3 nuclear receptor, Bax, Apaf-1	apoptoz
		Cathepsin K, RANK, NFATc1, NF-κB nuclear translocation, Bcl-2, Bcl-x (L), XIAP, Mcl-1, MMP-2, MMP-	
Rhabdomyosarkom		Cyclin B	S/G2 arresti
Over karsinomu	Ovcar-3 A2780/CP70 CaOV3 ES-2 TOV112D A1947	pCdc2(tyr15), ATM/ATR, chk1/2, pCdc25C, pH2A.X(ser139)	S arresti, otofajik ölüm
		Akt, HIF-1α, VEGF	
Medulloblaston	UW228-2 UW228-3	CYP1A1	Apoptoz, diferansiasyon
		CYP1B1, c-Myc	
Akut myeloid lösemi	OCIM2 OCI/AML3	IL-1β, NF-κB	S arresti ,apoptoz
Tiroid kanseri	PTC FTC	P53, p53(ser15), c-fos, c-jun, p21	apoptoz
Gastrik adenokarsinom	KATO-III RF-1		G0/G1 arresti,apoptoz
		PKC, PKCα	DNA sentezi

Resveratrol majör hücre siklusu modülatörlerini mikromolar konsantrasyonlarda düzenler ve hücreleri G1/S fazında durdurur.

Ribonükleotid redüktaz ve DNA polimeraz'ı azaltarak DNA sentezini doğrudan inhibe eder.

Resveratrol aracılı apoptoz çeşitli insan kanser hücrelerinde p53 aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Proapoptotik Bax, Bak, PUMA, Noxa ve Bim ekspresyonunu artırır ve anti apoptotik Bcl-2, Bcl XL ve Mcl-1 ekspresyonunu inhibe ederek mitokondriyal ölüm yolağını doğrudan etkiler

Matriks metalloproteinazları; özellikle tip IV kollajenazlar MMP-2 ve MMP-9 ve anjiogenez sürecinde bazal membranın önemli bir bileşeni olan tip IV kollajenin yıkımında önemli rol oynar ve kanser tedavisinde çekici hedeflerdir.(51) Resveratrolün doğrudan insan umbilikal kord endotelial hücrelerinin büyümesini MMP-2'nin jelatinolitik aktivitesini azaltarak ve bazal membran komponentleri fibronektin ve laminine endotelial hücre bağlanmasını inhibe ederek inhibe ettiği gösterilmiştir.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiogenesis ve tümör büyümesi için şarttır. VEGF/VEGFR-etkileşimi PI3K'ı hedefler, bu da Akt'yi aktifleştirirerek endotelial hücre sağkalımına yolaçar. VEGF'ten sonra PLC gamma ve Src de aktifleşir, VEGF Ras'tan bağımsız olarak Raf1→MEK1-2→ERK1-2 yolağını uyarır. Meme Ca hücrelerinde resveratrol tedavisinden sonra ekstrasellüler VEGF düzeylerinde anlamlı azalma ile apoptoz görülmüştür.

Doku inflamasyonu oksidatif hasarı başlatarak ve hücre büyümesini uyararak kanserin başlangıç ve ilerleme evrelerinde anlamlı bir epigenetik faktör olarak ortaya çıkmaktadır. siklooksijenaz-2 (COX-2) serbest araşidonik asitin prostaglandinlere dönüşümünü katalizleyen hız kısıtlayıcı enzimdir. Çoğu hücrede inflamatuvar araçlar ve mitogenler, onkogenler, tümör promoterları ve büyüme faktörleri gibi çeşitli uyarılarla indüklenir. Prostaglandinler tümör hücre proliferasyonunu, anjiogenez'i

uyarır ve apoptozu baskılar. Uygunsuz COX-2 ekspresyonu kolon, prostat, karaciğer, akciğer, meme, mesane ve cilt kanseri dahil bir çok malign ve premalign durumlarda bulunur. Bu da proinflatuar mediatörlerin karsinogenezi uyardığını düşündürür. COX-2 bağımlı reaksiyonlar araziidonik asitin prostaglandin G(2)'ye dönüşümü sırasında ROS (reaktif oksijen türleri) oluşturur ve DNA'ya doğrudan oksidatif hasara sebep olur. Resveratrol doğrudan COX-2 aktivitesini inhibe eder(51)

Nükleer factor-kappa B (NF-κB) immün ve stres yanıtları, inflamasyon, apoptoz ve hücre büyümesinin düzenlenmesi gibi bir çok olayda yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Aberran ve sürekli NF-κB aktivitesi tümörleşmenin çeşitli aşamalarında suçlanır ve birçok kanserde görülür.

Mitojenler, sitokinler, UV, iyonizan radyasyon, ve bakteriyel toksinler gibi dış uyaranlarla karşılaşmayı takiben IκB kinase (IKK) IκBα'yı fosforiller, bu da IκBα'nın yıkımıyla sonuçlanır. IκBα'nın NF-κBden ayrılması aktive serbest NF-κB dimerinin nükleer translokasyonunu sağlar, bu da COX-2 ve MMP gibi spesifik hedef genlere bağlanmasını sağlar. Ayrıca NF-κB Ras ve Bcr-Abl gibi onkogenler, büyüme faktörleri ve Akt, p38 MAPK gibi kinazlar tarafından da aktive edilir. Resveratrol IKK fosforilasyonunu baskılayarak NF-κB aktivasyonunu fare derisinde baskılayabilmiştir. Çeşitli kanser hücrelerinde NF-κB aktiflenmesinin resveratrolle bloke olabildiği görülmüştür.(52) Resveratrol IL-6, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, c-IAP, vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF), ve matrix metalloproteinaz-9 (MMP-9) gibi NF-κB ile düzenlenen genlerin ekspresyonu azaltabilir.

Transkripsiyon faktörü AP-1 tümörleşmesi başlamış hücrelerin çoğalmasında ve tümör hücrelerinin metastazında önemli rol oynar. COX-2, urokinase-type plasminogen activator, Fos, MMP-9, cyclin D1, and VEGF'i indükler. Resveratrol AP-1 aktivitesini baskılar ve sonucunda MEK1 →ERK1-2 yolağı inhibe olur.

Resveratrol P53 transkripsiyonel aktivitesini de düzenleyebilir. ERK ve MAPK; resveratrolün uyardığı p53 aktivasyonunu uyarır ve apoptoz olur. Papiller ve

tiroid folliküler karsinom hücrelerinde Ras-MAPK sinyal yolağı p53 bağımlı apoptozu düzenler. (53)

Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri normal aerobik metabolizmanın yan ürünleridir. Düşük düzeylerde hücre sinyal süreçlerinde önemli roller oynarlar. Yüksek konsantrasyonlarda apoptozu indükler. Resveratrol etkin bir şekilde süperoksit ve peroksinitrit radikallerini temizleyerek bunların oluşturacağı DNA hasarına karşı korur.

İnsan Papiller tiroid karsinomu ve folliküler tiroid karsinomu hücre hatlarında yapılan çalışmada (53) PTK ve FTK hücre hatlarına 0,1-100 µM Resveratrol eklendiğinde MAPK aktivasyonu görülmüştür. Ayrıca PTC hücre hatlarında p53 protein miktarında artış görülmüştür. 3-5 günlük tedavide de p21 (cyclin dependent protein kinase aktivitesi inhibitörü) ,c-Fos ve c-Jun proteinleri de artış göstermiştir.

P21 deki artış p53 bağımlı olarak bulunmuştur. P53 etkisinin MAPK (ERK1-2) bağımlı olduğunun gösterilmesi için spesifik MEK inhibitörü eklenerek yapılan çalışmada da p53'ün serin fosforilasyonunun MEK inhibitörüyle inhibe olduğu görülmüştür. MEK inhibitörü veya p53 inhibitörleri yapılarak yapılan çalışmada da resveratrolle indüklenen p53 bağımlı apoptozda H-Ras-MEK-MAPK yolağının esansiyel rolü olduğu desteklenmiştir.

Hücrel MAPK ve p53'teki değişiklikler apoptoz indüksiyonuyla ilişkili bulunmuştur. p53 normal hücrede düşük düzeylerde bulunan bir onkogen supresör proteindir. DNA hasarı gibi streslerde p53 düzeyi artar. Spesifik olarak çeşitli serin'lerde fosforillendiğinde apoptozu başlatır. P53 Jun N terminal kinaz(JNK) p38 kinaz ve extracellular signal-regulated kinases 1 ve 2 (ERK1-2)nin bir substratıdır. p53 tek başına veya c-Jun gibi diğer proteinlerle prostat, akciğer, meme ve tiroid kanserlerine karşı antikanser ilaçların indüklediği apoptozda rol alır.

MAPK (ERK1-2), normal hücrel sinyal ileti süreçlerinin indüklenebilir bir bileşenidir ve çeşitli kanser hücre hatlarında aktifleştiği gösterilmiştir. ERK1-2'nin

sürekli aktivitesinin aksine kinazların geçici aktivasyonu apoptozun indüklenmesine katkıda bulunabilir.

Bu çalışmalarda insan tiroid kanser hücrelerinin resveratrolle maruziyeti, indüklenebilir MAPK varlığını ve bu indüksiyonun apoptozla sonuçlandığını göstermiştir.

Resveratrolün düşük konsantrasyonlarda 1pM-10 µM insan nöroblastoma hücrelerinde MAPK'ı aktive ettiği, yüksek dozlarda ise (50-100 µM) nöroblastoma ve diğer hücre hatlarında MAPK'ı inhibe ettiği gösterilmiştir.(54,55) Papiller ve folliküler tiroid karsinom kanser hücreleri resveratrolsüz 3-5 gün inkübe edildiğinde bir miktar ERK1-2 aktivitesi var iken bu hücrelerin resveratrolle karşılaşması bu kinazların daha fazla birikmesiyle sonuçlanmıştır. Resveratrolün etkisi zaman ve doz bağımlı bulunmuştur. RV ile ERK1-2 aktivasyonu HRas antisense oligonucleotid transfeksiyonu ile de; MEK inhibitörü PD 98059 ile de bloke olmuştur, dolayısıyla Ras ve MEK bağımlı sinyal iletim kaskadı biyolojik olarak anlamlı bir MAPK aktivasyonunda gereklidir.

Sebai ve arkadaşlarının rat tiroid hücrelerinde (FRTL-5) yaptığı bir çalışmada ise (56) resveratrol ile 6-12 saatte hücre başına I yakalama %25'ten %30'a artmış; 100 µM da I yakalamanın %66'ya ulaştığı görülmüştür. 20-50µM Resveratrol ile kontrolün 3 katına ulaşan rNIS protein ekspresyonu saptanmıştır.

İyi diferansiye tiroid karsinomlarında nispeten iyi bir prognoz olsa da cerrahiden kaçan remnant hücreler I 131 aktif yakalanmasıyla yok edilir. Bu özellik kısmen NIS'e bağlıdır. NIS ekstrasellüler ortamdan I ve sodyumu intrasellüler boşluğa aktarırır. Maalesef uzun dönem takipte I yakalama bazen azalır ve RAI tedavisi etkisiz hale gelir.

Sebai ve arkadaşlarının çalışmasında çalışmada resveratrolün uyardığı I yakalamanın kısmen NIS protein ekspresyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir.

Resveratrol TSH yokluğunda dahi doz bağımlı olarak NIS'i artırır. Bu da fizyolojik iyot transportunda resveratrol ve TSH'nin aditif etkisiyle uyumlu ve farklı etki mekanizmaları olduğu tezini destekler niteliktedir. TSH cAMP yoluyla etki eder, bu çalışmada RV'nin cAMP yoluyla etki etmediği gösterilmiştir.

Bu bulgulardan yola çıkarak resveratrol'ün tiroid kanserinde NIS ,BRAF ve ERK mRNA ekspresyonlarına etkilerinin belirlenmesi planlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 BCPAP Hücre Hattı Ve Özellikleri:

BCPAP insan kökenli bir tiroid karsinoma hücre hattıdır. 76 yaşında bir kadının metastatik papiller tiroid karsinomundan 1992’de elde edilmiştir. İğsi veya yuvarlak şekillidir ve tek katmanlı olarak tutunarak çoğalırlar.

BCPAP hücreleri BRAF V600E mutasyonunu homozigot olarak taşır. (57)
NIS te endojen olarak eksprese etmektedir. (58)

3.2 Hücre Hattının Temini ve Kültüre Edilmesi

B-CPAP hücre hatları DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen-Almanya)’den satın alındı.

B-CPAP için gerekli olan bazal besiyeri RPMI 1640’dır. Bu besiyerine %10 oranında fetal sığır serumu ve %1 oranında penisilin streptomisin solusyonu eklendi. Hücre hattı 37°C ve %5 CO₂’li, nemli inkubatörde belirtilen besiyeri konularak çoğaltıldı.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Araştırma Laboratuvarı’nda yapıldı. Hücre kültür işlemleri, steril laminar hava akımlı çalışma kabininde gerçekleştirildi. –80 °C’de saklanan B-CPAP hücreleri, 37°C su banyosunda çözüldü ve 75 cm²’lik hücre kültür flasklarına aktarıldı. Kültür flasklarına 10 ml besiyeri eklendi ve inkübatöre koyulmadan önce kapakları hafifçe gevşetilerek, CO₂ girişi sağlandı. Hücreler, 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli inkubatörde (Thermo Scientific, ABD) çoğaltıldı. Kültür flasklarının tabanına tutunarak çoğalan hücreler, mikroskop yardımıyla, günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden izlendi. Flasklardaki besiyeri 3 günde bir değiştirildi ve ikilenme sürelerine uygun olacak şekilde pasajlama yapıldı.

3.3 BCPAP Hücrelerinin Sayımı

BCPAP hücrelerinin kültür flasklarının zemininde tutunarak oluşturdukları hücre tabakasının (tek katlı tabaka), 4 ml Tripsin/EDTA (%0.05) ile 5 dakika muamele edilerek flask zemininden ayrılması sağlandı. Hücreler zeminden kalkınca, besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenen hücrelerin, işlem sonrası süpernatantı atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri ile seyreltildi. Pipetajla homojenize edilen hücrelerin süspansiyonundan 50 µl alındı ve 50 µl Tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnekler, Thoma lamında sayıldı. Canlı hücreler, tripan mavisi boyasını membranlarından içeri almadıkları için parlak; ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine aldıkları için koyu mavi renkte görüldü .

3.4 Resveratrol Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Resveratrol, SIGMA (Prod No. R5010 CAS number:501-36-0) 'dan satın alındı.1 mg toz, 1 ml DMSO'da çözülerek 43,8 mM'lık stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek sterilize edildi ve 100 µl'lik küçük hacimler halinde -20°C'de saklandı. Her deney için yeni stok solüsyon kullanıldı.

3.5 Canlılık (viabilite), Sitotoksosite Parametreleri ve Ölçümü

Hücre kültürlerinde gerek deney kurarken, gerekse çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların sitotoksik etkilerini belirlemek için hücreye ait bir takım canlılık parametrelerinin ölçülmesi gerekir. Bunlar içerisinde öncelikle hücrelerin yaşadığını ifade eden canlılık testlerinin (viabilite) yapılması gerekir. Canlılık hücre zarının bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini test ederek belirlenir. Canlılık gösteren hücreler membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerdir. Örneğin tripan mavisi membran bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini belirlemede sıklıkla kullanılır. Canlı hücreler boyayı dışarı atarken, bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini kaybeden hücreler boyayı içeri alır. Bu yöntemle hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre

sayısı, dolayısıyla toplam hücre sayısı belirlenebilir. Bu şekilde hücre kültüründeki hücrelerin optimal yoğunluğa ulaşip ulaşmadıkları, pasajlama yapılıp yapılmayacağına karar verilebilir (59).

XTT testi, metabolik aktivite ölçümünde kullanılan diğer bir kolorimetrik testtir. Bu yöntem, metabolik olarak aktif hücreler tarafından yine bir tetrazolyum tuzu olan XTT'nin suda çözünebilen turuncu renkli formozan tuzuna çevrilmesine dayanır. Oluşan formozan tuzu suda çözüldüğünden ek bir çözündürme basamağına gerek yoktur. Boya yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır. Çok modlu mikropilaka okuyucu kullanılarak uygun dalga boylarında ölçülür. Ancak XTT muamelesi kültür ortamında toksik etki yaptığından, hücreler bir sonraki deney aşamalarında kullanılmaz (60).

XTT yöntemi ile sitotoksosite doğrudan ölçülemez. Hücre popülasyonunun canlılık yüzdesi ölçüldükten sonra dolaylı olarak hesaplanabilir. Sitotoksitenin yüzde canlılık üzerinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır: %sitotoksosite= 1- [(ilaçlı kuyucukların absorbans ortalaması/pozitif kontrol kuyucuklarının absorbans ortalaması)x100]

3.6 XTT Canlılık Ölçüm Testi

Canlı hücre sayısı belirlenen hücre süspansiyonundan, 100 µl'de 10.000 canlı hücre olacak şekilde seyreltme yapıldı. 96 kuyucuk içeren hücre kültürü plaklarına her kuyucuğa içinde canlı hücre bulunan seyreltiden 100 µl eklendi. 24 saat inkubatörde bekletilerek hücrelerin kuyucuklara tutunmaları sağlandı. 24 saat sonunda, hücre içeren kuyucuklara resveratrolün artan dozlardaki konsantrasyonları eklendi. Her konsantrasyon için 3 kuyucuk kullanıldı. İlaç içermeyen kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi ve bu kuyucuklar pozitif kontrol olarak kullanıldı. Hücre ve ilaç içermeyen kuyucuklara ise sadece besiyeri eklenerek negatif kontrol olarak kullanıldı. Resveratrol 10,20,40,60,80,100 µM olacak şekilde artan dozlarda uygulandı. Resveratrolün 24., 48., 72. saatlerdeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek üzere XTT Hücre Canlılık Kiti (Biological Industries) kullanıldı. XTT solüsyonu 3'-

[1-(fenil-aminokarbonil)-3, 4-tetrazolyum]- bis(4-methoksi-6-nitro) benzen sülfonik aist hidrat ile N-metil dibenzopirazin metil sülfat 50:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. XTT solüsyonu 100 µl olarak kuyucuklara konulduktan sonra hücre kültür plakları 37 °C 'de ve %5 CO2 ihtiva eden inkubatörde 24 saat bekletildi. Dört saat sonunda her kuyucuğun absorbans değeri 450-620 nm referans aralığında mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific) ölçüldü. Canlılık ölçüm testi üç tekrar şeklinde yapıldı.

B-CPAP hücre hattında yüzde canlılık değerleri elde edildi. Bu değer yüzde sitotoksosite değerlerine dönüştürüldü. Sitotoksosite değerleri CalcuSyn 2.0 (Biosoft, İngiltere) programına girildi. Böylece ilacın doz etki eğrisi oluşturularak hücrelerin IC50 değeri hesaplandı. IC50 değeri, bir ilacın hücrelerin %50'sini öldürdüğü inhibitör konsantrasyonudur.

3.7 BRAF, ERK ve NIS mRNA ekspresyonları

3.7.1 Real-time PCR

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur . Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda "kinetik Real-time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir.

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım

alanları mevcuttur. Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; ‘‘Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000’’, ‘‘Applied Biosystems 7300 ve 7500’’, ‘‘Chromo4’’, ‘‘Smart Cyclers’’, ‘‘Rotor-Gene’’, ‘‘LighCyclers’’ en fazla kullanılanlardır.

3.7.2 TaqMan prob

TaqMan prob yöntemi ‘‘double-dye oligonucleotide’’, ‘‘ dual labeled prob’’ veya ‘‘5 nuclease prob’’ olarak da tanımlanmaktadır. TaqMan prob yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5’ ucunda ‘‘ fluorophore’’ (6-karboksifloresin = 6-FAM) ve 3’ ucunda ‘‘quancher’’ (6-karboksitetrametil-rodamin = TAMRA). 3’ uçtaki basılayıcı TAMRA boyası 5’ uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektir. Prob hedef DNA’ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında ‘‘TaqMan’’ problemler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmamasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye geldiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5’→ 3’ nükleaz aktivitesi ile FAM’ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder.

3.7.3 RT-PCR Çalışma Prensipleri

RT-PCR’in gerçekleştirilmesi ve sonrasındaki analizler için şu araçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar, veri eldesi ve analiz için software; floresans eksitasyon ve emisyon koleksiyonu için optik; bir bilgisayar ve termal döngüyü sağlayan bir donanım olarak özetlenebilir. Çeşitli firmalardan temin edilen bu makineler birbirinden farklıdır. Örneğin; bazı firmaların cihazları 96 plaketlik

standart formatında iken, bazılarında ayarlanabilen filtrelili geniş spektrum ışık kullanılmaktadır.

3.7.4 mRNA Kantitasyonunun Önemi

Hayatta kalma, büyüme ve farklılaşma ile ilgili olan hücresele kararlar, gen ekspresyonu ve transkripsiyon seviyesinin belirlenmesi gen fonksiyonu ile ilgili olan çalışmalarda her zaman temel oluştururlar. Son zamanlarda moleküler tıptaki gereksinimler, klinik tanılarda RNA seviyelerinin kantitatif olarak ölçülebildiği tekniklerin kullanımlarını arttırmıştır. Bu tür uygulamaların tümör hücrelerinde ilaç markerlarının ekspresyonu ve regülasyonun belirlenmesi, kemoterapiye olan cevabın izlenmesi, terapötikleri şifreleyen genlerin transkripsiyonunun ve biyodağılımının ölçülmesi, tümör aşamasının moleküler olarak değerlendirilmesi, kanser hastalarında tümör hücrelerinin sirkülasyonunun belirlenmesi, bakteriyel, ve viral patojenlerin saptanması gibi oldukça geniş kullanım alanları vardır.

RT-PCR; belirli bir RNA dizisinin in vitro koşullarda, enzimatik olarak amplifikasyonuna dayanan ve aynı deneyde çok küçük örnek miktarlarıyla bir hücredeki farklı örneklerin analizine olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem düşük duyarlı, oldukça esnek ve en kullanışlı kantifikasyon yöntemidir ve farklı örnek popülasyonlarında mRNA seviyelerinin karşılaştırılması, mRNA ekspresyon örneklerinin karakterize edilmesi, birbirleri ile yakından ilişkili (benzer) olan mRNA'ların ayırmalarının yapılması ve RNA yapısının analizinde kullanılabilir.

RT-PCR ayrıca, zaman alan, teknik olarak iş gücü gerektiren yöntemlerde maksimum duyarlılık üzerine odaklandırılması daha kompleks prosedürlerin geliştirilmesinde olanak sağlamıştır. Semineded, nested ve 3 aşamalı nested RT-PCR teknikleri duyarlılığı arttırmışlardır fakat remisyonun spesifitesini tehlikeye sokmaktadır. Bu yöntemler, kontaminasyon ve yanlış pozitif sonuçların elde edilmesi olasılığın artırdıkları gibi gerçek, uygun olmayan, düşük seviyedeki transkripsiyonun ayırt edilmesine imkan vermemektedirler.

3.7.5 Real-Time PCR Avantajları

RT-PCR kompleks bir yöntemdir ve reaksiyona katılan bütün fiziksel ve kimyasal bileşenler birbirleriyle etkileşim içindedirler. Bunlar, reaksiyonun spesifitesi, duyarlılığı, çoğaltılabilirliği veya doğruluğu optimize edilirken göz önünde bulundurulması ve dikkatli olunması gerekmektedir. RT-PCR'ın başarılı bir performans göstermesi denemenin temel amacının iyi bir şekilde anlaşılmasına bağlıdır. Klinik tanı uygulamalarında; spesifite, duyarlılık ve üretilebilirlik en önemli kantitatif karakteristikleridir. Buna karşılık eğer çalışmanın amacı mutasyon analizi, klonlama veya ekspresyon ise doğruluk önemli kriter olacaktır.

3.7.6 RNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA molekülünün konsantrasyonu NanoDrop Spektrofotometre cihazı ile 280 nm dalga boyunda (saflaştırılmış RNA'nın oranı) ölçülmüştür. İzolasyon ve kantite edilen RNA'dan hemen cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Uzun dönemli saklama -80 ve daha kısa dönem saklama -20 C'de gerçekleştirilmiştir.

Revers Transkripsiyon PCR İle RNA'dan cDNA Sentezi

3.7.7 cDNA Sentezi

RNA elde edildikten sonra Roche Applied Biosystems Taqman Reverse Transcription Reagents kiti kullanılarak cDNA elde edildi.

BİLEŞENLER	MİKTARLAR
10×R.T Buffer	5
MgCl ₂	11
25×dNTP's	2.5
10×Random Hexamer	2.5
RNAse Inhibitor	3
Multiscribe Reverse Trans.	1.25
dH ₂ O	14.75
Kalıp RNA	10
TOPLAM	50

Yukardaki tabloya göre hazırlanan karışım aşağıdaki tabloda bulunan sıcaklık ve süre bilgilerine göre thermal cycler ayarlandı ve tüpler yerleştirildi.

SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
260C	10 dk	1
420C	60 dk	1
950C	5 dk	1
+40C	∞	

Thermal cycler'daki program bittikten sonra cDNA'lar hemen buz üzerine alındı.

3.7.8 cDNA PCR

RNA elde edildikten sonra Roche Applied Biosystems Taqman Reverse Transcription Reagents kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.7.9 cDNA Kalitasyonu

PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur

Real-Time PCR reaksiyonu için Roche Applied Biosystems Taqman Universal PCR Master Mix kullanıldı. Reaksiyonlar ABI PRISM 7000 cihazında gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe TaqMan probdan salınarak serbest kalan FAM boyasının verdiği floresans Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Amplifikasyon ABI PRISM 7000 cihazının bilgisayarından eş zamanlı olarak izlendi.

Real-Time PCR Reaksiyon Protokolü

Karışım	Miktar	Son Konsantrasyon
ABI TaqMan 2x PCR master mix	25µl	1x
Forward primer (10µM)	4 µl	800nM
Reverse Primer (10µM)	4 µl	800nM
Prob (10µM)	1 µl	200nM
RNase-free su	11 µl	
cDNA	5 µl	
Toplam	50 µl	

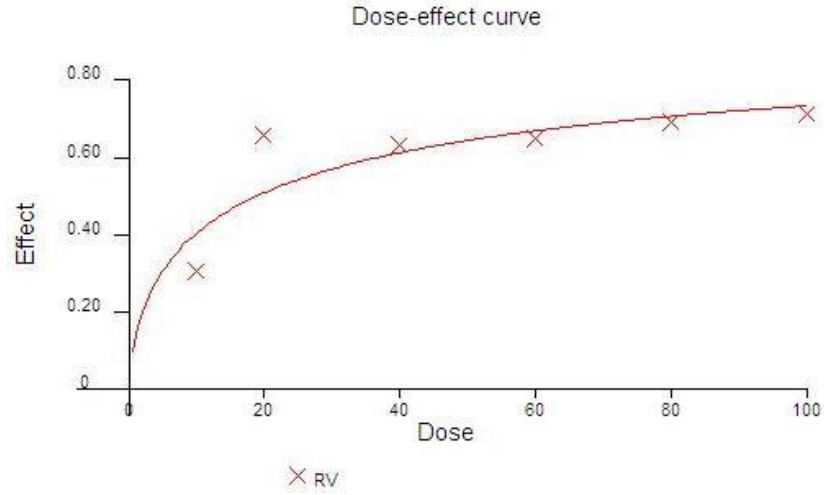
3.7.10 Değerlendirme

Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile hesaplandı. Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Ct değerleri GAPDH, BRAF, ERK, NIS ayrı ayrı hesaplandı Daha sonra BRAF, ERK, NIS ortalama değerlerinden tek tek GAPDH ortalama değerleri çıkartıldı ve bu işlem hem hasta grubuna hemde kontrol grubuna yapılarak ΔCt (delta Ct) değerleri hesaplandı. Daha sonra hesaplanan kontrol grubu ΔCt değerleri hasta grubu ΔCt değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. Bu değer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne uygulanarak hasta grubunun BRAF, ERK, NIS ekspresyonun kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğu GAPDH gen ekspresyonu internal kontrol olarak kullanılarak relatif olarak belirlendi.

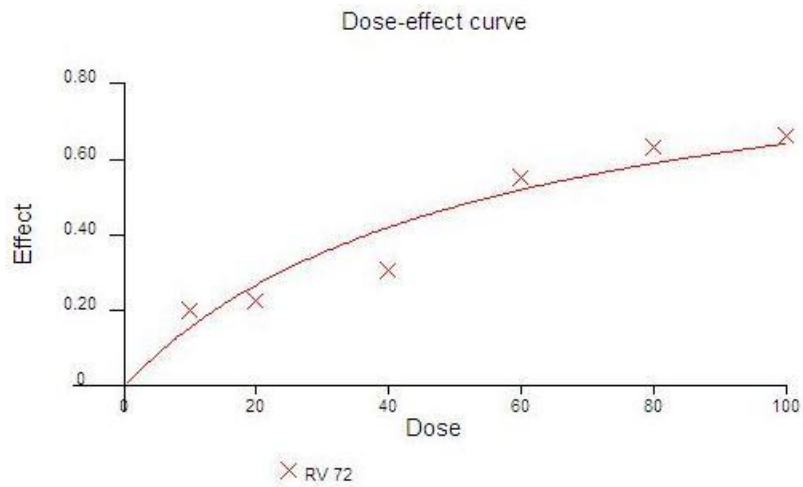
4. SONUÇLAR

4.1 BCPAP Hücre Hattında resveratrolün IC50 Değeri

BCPAP hücrelerinin resveratrol'ün değişen dozlarla (10,20,40,60,80,100 μM) muamelesi sonrası elde olunan absorbans değerlerinden sitotoksisite yüzdeleri hesaplandı. Sitotoksisite değerleri CalcuSyn 2.0 (Biosoft, İngiltere) programına girildi. Böylece ilacın doz etki eğrisi oluşturularak ilacın IC50 değeri hesaplandı. Resveratrolün 48. saatteki IC50 değeri 18,7 μM ve 72. Saatteki IC50değeri 56,8 μM olarak hesaplandı



Şekil 4: Resveratrolün 48. saatteki sitotoksik etki eğrisi

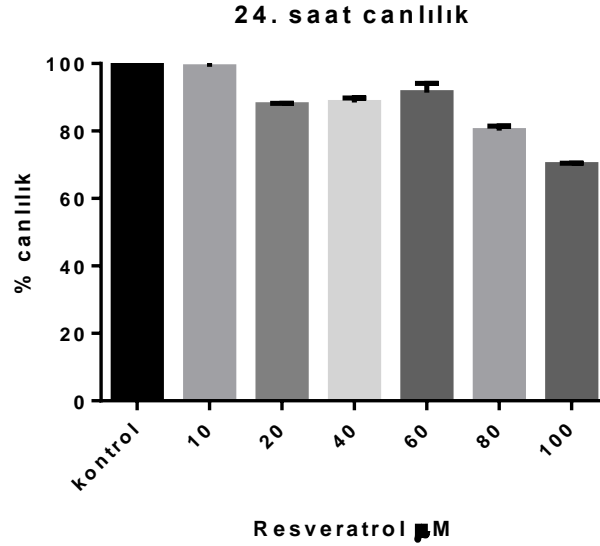


Şekil 5: Resveratrolün 72. saatteki sitotoksik etki Eğrisi

4.2 Resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi

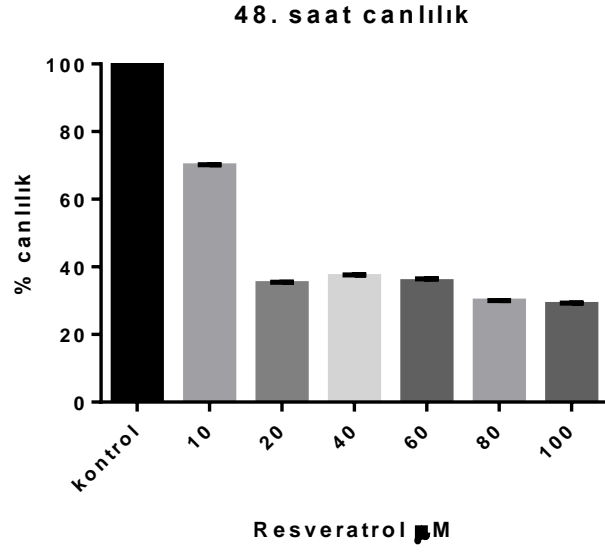
BCPAP hücre hattında Resveratrolün farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri, hem doza hem de zamana bağlı olarak çalışıldı.

BCPAP hücre hattında, 24. saatin sonunda Resveratrolün çalışılan konsantrasyonlarında (10-100 μ M); 10 μ M resveratrolün canlılık yüzdesi 98.1 iken, sırasıyla 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M dozlardaki canlılık yüzdesi sırasıyla; 88,1 ;89,4; 93,3; 81,1ve 69,7 idi .



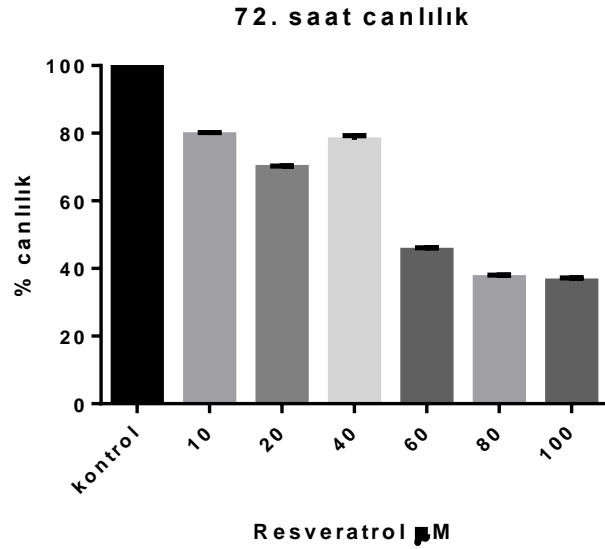
Şekil 6: 24 saatte resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi

B-CPAP hücre hattında, 48. saatin sonunda resveratrolün çalışılan konsantrasyonlarında (10-100 μ M); 10 μ M resveratrolün canlılık yüzdesi 69,1 iken, sırasıyla 20 μ M, 40 μ M,60 μ M, 80 μ M, 100 μ M, dozlardaki canlılık yüzdesi sırasıyla; 34,3; 36,7; 35,1; 30,8 ve 28,5 idi.



Şekil 7: 48 saatte resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi

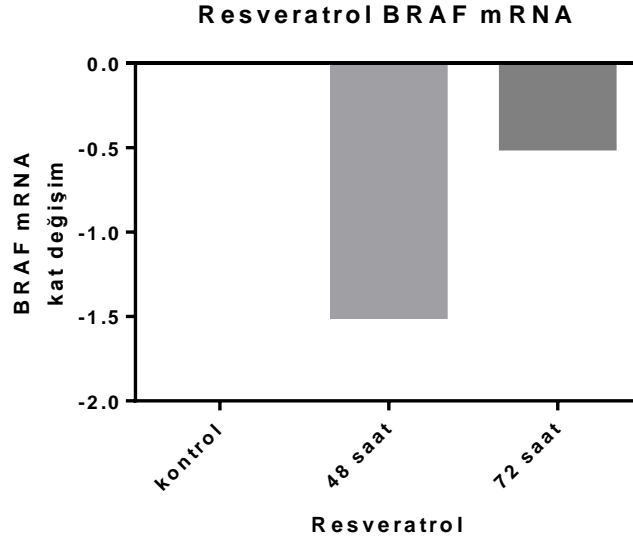
B-CPAP hücre hattında, 72. saatin sonunda resveratrolün çalışılan konsantrasyonlarında (10-100 μM); 10 μM resveratrolün canlılık yüzdesi 80,0 iken, sırasıyla 20 μM ,40 μM ,60 μM , 80 μM , 100 μM , dozlardaki canlılık yüzdesi sırasıyla; 69,2; 77,2; 44,8; 36,8 ve 33,6 idi .



Şekil 8: 72. saatte resveratrolün BCPAP hücrelerinde doz cevap eğrisi

4.3 BRAF mRNA ekspresyonuna etkileri

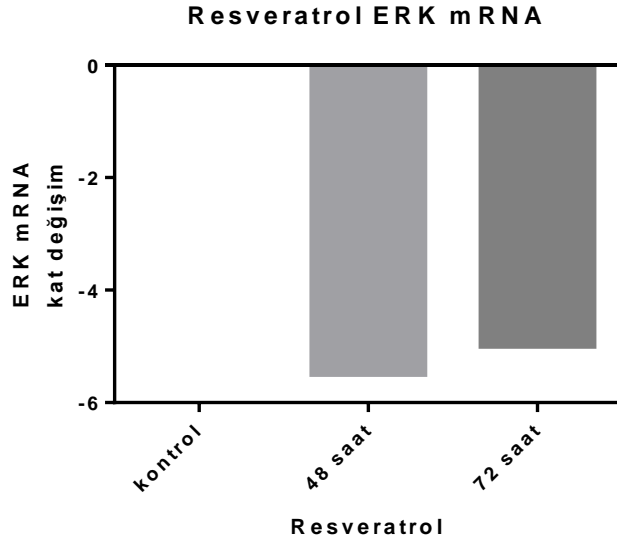
48 saatte 20 μ M resveratrol ile BRAF mRNA ekspresyonunda 1,5 kat azalma, 72 saatte 50 μ M resveratrol ile BRAF mRNA ekspresyonunda 0,5 kat azalma meydana geldi.



Şekil 9: Resveratrolün BRAF mRNA ekspresyonuna etkisi

4.4 ERK mRNA ekspresyonuna etkileri

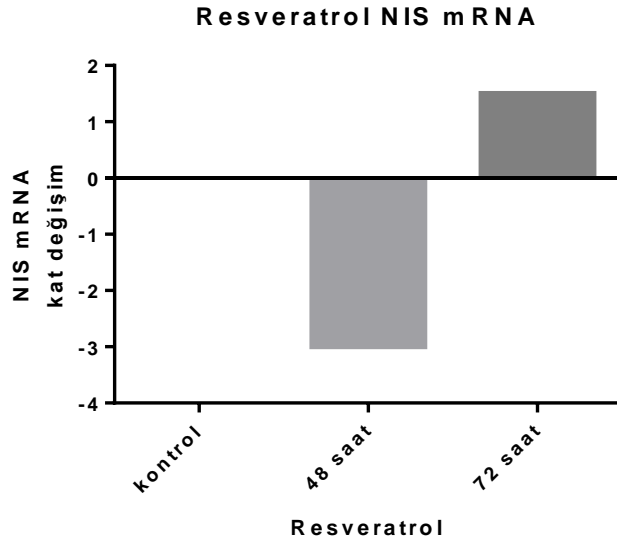
ERK mRNA ekspresyonunda 48 saatte 20 μ M resveratrol ile 5,5 kat azalma, 72 saatte 50 μ M resveratrolle 5 kat azalma meydana geldi.



şekil 10: Resveratrolün ERK mRNA ekspresyonuna etkisi

4.5 NIS mRNA ekspresyonuna etkileri

48 saatte 20 μ M resveratrol ile NIS mRNA ekspresyonunda 3 kat azalma meydana geldi, 72 saatte 50 μ M resveratrolle ise 1,5 kat artış meydana geldi.



şekil 11: Resveratrolün NIS mRNA ekspresyonuna etkileri

5. TARTIŞMA

Tiroid kanseri en sık görülen endokrin kanserdir ve genellikle prognozu iyidir. Fakat özellikle dediferansiye olduğunda başka bir deyişle tiroid dokusuna ait I yakalama gibi özelliklerini yitirdiğinde takip ve tedavisi güçleşmektedir. İşte bu noktada toksisitesi az, etkili seçeneklere ihtiyaç duyulmaktadır.

PTC'da overall 10 yıllık sağkalım %85-90'dır. %10-15'i nüks etse de nüksler boyun ve lenf nodlarına sınırlıdır.

BRAF kinaz (BRAF) hücre membranından mitojenik sinyalleri nükleus'a ileten ve hücre bölünmesi ve çoğalmasının uyarıcı RET/PTC → Ras→RAF→MEK→ERK yolağının (MAPK yolağı) anahtar bileşenidir. Bu yolağın uygunsuz aktivasyonu insan kanserlerinde tümörleşmede önemli rol oynar. T 1799 A transversiyon mutasyonu BRAF proteininde V600E aminoasit değişimine yol açarak kinazın sürekli aktivasyonuna neden olur. BRAF mutasyonu PTC'de (%29-83) ortalama %45 prevalansla görülür. Çeşitli çalışmalar BRAF mutasyonunun ekstrasitodal yayılım, lenf nodu metastazı, ileri tümör evresi ve klinik nüks ile ilişkisini göstermiştir. Transgenik fare modellerinde V600E BRAF'ın ekspresyonunun hedeflenmesi PTC gelişmesi ve diferansiye olmayan tiroid kanserine ilerlemesiyle sonuçlanmıştır. (18) Bu veriler BRAF'ın PTC oluşumunu başlatma ve ilerletebilmesini göstermiştir. Ayrıca hücre proliferasyonunun ve transforme durumun devamını sağlamada da gereklidir. Ayrıca BRAF V600E pozitifliğinin erken takipte daha sık nükslerle ilişkili olduğu ve nükslerin çoğunun radyoaktif iyot tutmayan yani daha az diferansiye nüksler olduğu gösterilmiştir.(24) PTC ve diğer insan kanserlerinde BRAF mutasyonu diğer genetik değişikliklerle çakışmaz, bu da diferansiye kanserlerde hücresel transformasyon için daha az mutasyona ihtiyaç olduğunu ve BRAF V600E'nin tümörleşmenin bir unsuru olduğunu düşündürmektedir. Aksine diferansiye olmayan tiroid karsinomunda BRAF mutasyonu ile birlikte PI3-AKT yolağında da değişiklikler oluşur. Serilerde BRAF V600E sıklığı %29-83 arasında bildirilmiştir. Folliküler varyantta %12, klasik tipte %60, tall cell'de %77'ye ulaşır.

Bizim çalışmamızda resveratrolle BRAF mRNA düzeyinde de sitotoksiste ile paralel bir şekilde 48. Saatte 1,5 kat azalma olurken 72. Saatte 0,5 kat azalma olmuştur. Erken dönemde kısa sürede ve daha düşük dozda BRAF üzerine daha etkili olmaktadır. Resveratrol'ün BRAF ekspresyonunu geriletmesi hücrelerin agresifliğinin azalmasına, rediferansiyasyonuna katkıda bulunabilir.

Yine MAPK yolağında BRAF'tan sonraki basamaklardan biri olan ERK mRNA düzeyinde çarpıcı bir şekilde tüm dozlar ve sürelerde etkin bir azalma görülmüştür. Bu da resveratrolle MAPK yolağının BRAF dahil tüm basamaklarında etkin blokaj sağlanabileceğini göstermektedir.

Shih ve arkadaşları(53) papiller ve folliküler tiroid Ca hücre hatlarına RV eklediklerinde 4 sa ve 24 saatte MAPK yolağında aktivasyon saptamışlardır. MAPK yolağının aktivasyonunun p53 aktivitesi için esansiyel olduğunu saptamışlardır. Daha önceki başka çalışmalarda da düşük doz resveratrolün MAPK yolağını aktive ederken daha yüksek dozlarda inhibe ettiği gösterilmiştir.(51) MAPK yolağının sürekli aktivasyonu malign durum için gerekli iken kısa dönem MAPK aktivasyonu hücreleri apoptoza yöneltebilir.

Ayrıca Shih ve arkadaşlarının çalışmasında resveratrol'ün p53 bağımlı apoptozu indüklediği gösterilmiştir. (53)

Bizim çalışmamızda Shih ve arkadaşlarının çalışmasına göre daha uzun süre resveratrolle maruziyet (48 ve 72 saat) sağlanmıştır. Kısa süreli maruziyette geçici aktivasyon apoptozu indükler iken uzun vadeli maruziyetle MAPK yolağının blokajı da malign özelliklerin devamlılığının durdurulması, agresifliğin geri döndürülmesi veya daha önemlisi tümörleşmenin başlamadan geri döndürülmesi açısından faydalı olabilir. Bu konuda daha kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda da resveratrol ile doz ve zaman bağımlı sitotoksiste gözlenmiştir. 24 saatte anlamlı bir sitotoksiste gözlenmezken 48 saatte daha düşük dozla daha etkili bir sitotoksiste gözlenmiş, 72. Saatte bu etkinin kısmen azaldığı

gözlenmiştir. Shih ve arkadaşlarının çalışmasında MAPK aktivasyonu 4 ve 24. saatlerde saptanmış, 24. saatte aktivasyon azalmış; bu da apoptozun başlamasıyla açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda 24. saatte anlamlı bir sitotoksiste görülmemesi, etkili sitotoksistenin ise 48. saatte görülmesi apoptozun 24. saatte başlayıp 48. saatte pik yapmasıyla ilişkili olabilir.

NIS tiroid folliküler hücrelerinde tiroid hormon biyosentezinde ilk basamak olan aktif I transportunu düzenleyen bir plazma membran glikoproteinidir. Tiroid kanseri ve metastazlarının etkin tanı ve tedavisinde temeli oluşturur. NIS geni 15 eksondan oluşur ve kromozom 19p12-13 üzerinde 20 kilobaz çifti üzerinde uzanır. Hipoaktif adenom ve karsinomlarda normal tiroid dokusuna göre 10-1200 kat daha az eksprese edilir.(8) İnsan tümör örneklerinde immünohistokimyasal çalışmalarda veya rat tiroid hücrelerinde transfeksiyon çalışmalarında BRAF'ın hem NIS ekspresyonunu hem de membrana taşınmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Riesco-Eizaguirre ve arkadaşlarının çalışmasında (24) BRAF taşıyan hücrelerin anlamlı ölçüde daha az NIS immünoaktivitesi gösterdiği ve çoğunlukla membranı hedeflemediği bildirilmiştir. MEK inhibitörü U0126 kullanılarak BRAF'ın NIS üzerindeki baskılayıcı etkisi sadece kısmen geri döndürülebilmiş, bu da MEK-ERK yolağının NIS inhibisyonunda kısmi bir rolü olduğunu düşündürmüştür. Rat PCCI3 tiroid hücrelerinin BRAF ile transfeksiyonunun ardından hızlıca membrana NIS hedeflenmesi bozulur, protein ekspresyonu progresif olarak azalır ve yüksek moleküler bantlar baskın hale geçer. Yine aynı grubun başka bir çalışmasında BRAF'ın fonksiyonel TGF β sekresyonunun uyardığı gösterilmiş ve TGF β /Smad yolağının bloke edilmesinin de BRAF'a bağlı NIS baskılanmasını geri döndürdüğü gösterilmiştir. Bu mekanizma MAPK yolağından bağımsız olsa da TGF β hücre migrasyonu, matrigel invazyonu ve EMT basamaklarında MAPK yolağı ile birleşir. TGF β ve sinyal yolağının anahtar bileşenleri PTC'de fazla miktarda eksprese olur. Ayrıca bu artan TGF β /Smad aktivitesi PTC invazyonu, nodal metastaz ve BRAF durumu ile ilişkili bulunmuştur. Yani TGF β radyoiyot direnci ve tümör invazyonunda anahtar role sahip olabilir. (61) Resveratrol TGF β 'yı inhibe edebilir (70)

Sebai ve arkadaşlarının çalışmasında (56) FRTL-5 hücrelerinde resveratrol ile 6-12 saatte hücre başına I yakalama %25'ten %30'a artmış. 100 µM da I yakalama %66'ya ulaştığı görülmüştür. 20-50µM RV ile kontrolün 3 katına ulaşan rNIS protein ekspresyonu saptanmış.

RV'ün uyardığı I yakalamanın kısmen NIS protein ekspresyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir.

Sebai ve arkadaşlarına göre resveratrol TSH yokluğunda dahi doz bağımlı olarak NIS'i artırır. Bu da fizyolojik iyot transportunda resveratrol ve TSH'in aditif etkisiyle uyumlu ve farklı etki mekanizmaları olduğu tezini destekler niteliktedir. TSH cAMP yoluyla etki eder, bu çalışmada RV'ün cAMP yoluyla etki etmediği gösterilmiştir.

Resveratrolün, I yakalama ile ilgili genlerden en önemlisi olan NIS'e olan etkilerine bakıldığında NIS mRNA'da 48 saatte önce azalma olurken 72. Saatte artış gözlenmiştir. Bunun nedeni öncesinde BRAF / MAPK yolağındaki azalmanın daha geç dönemde NIS mRNA üzerine etki ediyor olması olabilir.

Sebai ve arkadaşlarının çalışması rat normal tiroid hücrelerinde yapılmıştır ve normal hücreler kanser hücrelerinden daha fazla NIS eksprese ederler. Yine de bizim çalışmamızda da 72. saatte 50 µM ile 1,5 kat NIS ekspresyonu artması olmuştur. İlk 48 saatte azalma olup sonra artış göstermesi zamana bağlı daha geç ortaya çıkan bir etki olabileceği gibi, 72. saatte kullanılan dozun daha yüksek olmasıyla da ilişkili olabilir. Bunu ayırmak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

FRTL-5 hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada TSH'sız ortamda hücrelerin NIS mRNA düzeylerinin çok düşük olduğu saptanmıştır. 48 saatlik tedaviden sonra PTU ile anlamlı olarak NIS ekspresyonda artış gözlenmiştir. TSH varlığında PTU'nun NIS ekspresyonunu artırıcı etkisi belirgin bulunmamıştır, bu da ekspresyonun TSH ile maksimal olduğu ve PTU'nun mRNA düzeylerini daha fazla artıramadığı şeklinde yorumlanmıştır. (62)

TSH NIS transkripsiyon ve translasyonunu düzenler, ayrıca NIS aktivitesini posttranslasyonel bir mekanizmayla düzenler. NIS plazma membranını hedeflemesi veya retansiyonu TSH ile düzenlenmeyi gerektiren bir fosfoproteindir. Dolayısıyla NIS'in tiroisitlerin bazolateral membranlarına yerleşmesi ve aktifleşmesi TSH varlığında olur. (63)

BCPAP hücre hatları TSHR ve Tg negatiftir. TSH R negatif olması nedeniyle ve ayrıca ortama TSH eklenmemiş olması nedeniyle NIS mRNA miktarındaki artış sınırlı olmuş olabilir.

Bizim çalışmamızda çalıştığımız parametrelerin dışında da resveratrol ile tiroid kanseri patogenezinde yer alan mekanizmaların ilişkileri söz konusudur.

Resveratrol çeşitli mekanizmalarla antitümör, antioksidan, proapoptotik özellikleri olan bitkisel türevli bir fitoaleksindir. Resveratrol AP-1 aktivitesini baskılar ve sonucunda mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK)1 → ERK1/2 yolağı inhibe olur. Bizim çalışmamızda da bu bir kez daha doğrulanmıştır.

P53 transkripsiyonel aktivitesini de düzenleyebilir. Shih ve arkadaşlarının çalışmasında (53) resveratrol PTC ve FTC hücrelerine verildiğinde 0,1-100 µM dozlarında RV eklendiğinde MAPK yolağında aktivasyon görülmüştür. Ayrıca apoptozla ilişkili p53, p21, c-Fos ve c-Jun proteinlerinde artış olduğu gözlenmiştir. P53 ilişkili bu apoptozun MAPK yolağıyla bağlantılı olduğu saptanmıştır

Vascular endothelial growth factor (VEGF), anjiogenez ve tümör büyümesi için şarttır. VEGF/VEGFR etkileşimi PI3K'ı hedefler, o da Akt'yi aktifleyerek endotelial hücre sağkalımına neden olur. (64) Meme kanser hücrelerinde resveratrol tedavisini takiben ekstrasellüler VEGF düzeylerinde anlamlı azalma ve takiben apoptoz meydana gelmiştir. (65)

Resveratrol doğrudan COX-2 aktivitesini inhibe eder. (66) PTC'de yaş önemli bir prognostik faktördür. Yaşlı PTC hastalarında COX-2'nin ekspresyonunun artmış olduğu saptanmış. Ayrıca COX-2'nin VEGF ekspresyonunu artırabildiği ve yaşlılarda COX-2 ile paralel bir şekilde tümör dokusunda VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. (67) Yine benzer bir çalışmada immünohistokimyasal olarak COX-2 ve VEGF ekspresyonlarının adenom ve normal dokulara göre tiroid karsinomunda anlamlı olarak daha kuvvetli olduğu gösterilmiştir. (68)

Resveratrol IKK fosforilasyonunu baskılayabilir, IκBα yıkımını inhibe eder, ve böylece NF-κB aktivasyonunu inhibe eder. (50) NF-κB inhibisyonuyla tiroid kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe olduğu gösterilmiştir. (69)

Ratlarda yapılan bir diyabetik nefropati modelinde resveratrol ile TGF-β, smad 2, smad 3 ve ERK 1-2 fosforilasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir. (66) Normal ve patolojik akciğer fibroblastlarında da TGF-β'nin indüklediği hücre proliferasyonunu geriletir. TGF-β'ya bağlı hem ERK1-2 hem serin threonine kinase fosforilasyonunu inhibe eder. (70)

Kang ve arkadaşları (71) genistein, resveratrol ve quercetin'in TPC-1, FTC-133, NPA, FRO, and ARO hücre hatlarında, hücre büyümesini inhibe ettiklerini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdakinden farklı bir papiller tiroid Ca hücre hattı olan TPC-1 hücrelerinde genistein, resveratrol ve quercetin ile NIS düzeylerinde değişme olmazken folliküler tiroid kanseri hücre hattı FTC 133'te NIS düzeyinde artış gözlenmiştir. Resveratrolle anaplastik tiroid Ca hücre hatlarında da NIS ekspresyonu sağlanamamıştır.

Ayrıca resveratrol'ün PPAR γ transkripsiyonunu artırdığı bildirilmiştir, bu da tiroid kanser rediferansiasyonunu indükleyebilir. (72)

Nikiforova ve arkadaşları papiller tiroid karsinomunda folliküler varyant ta dahil PAX8-PPARγ'yı folliküler karsinomlarda %53 oranında saptamış ve invazyonla korelasyon saptamışlardır. PTC'de hiç PAX-PPAR 'a rastlanılmamıştır. (74). Başka bir çalışmada ise PTC'de %42 oranında nükleer PPAR ekspresyonu

saptanmıştır. Lenf nodu metastazı ve progresif hastalıkla korele bulunmuştur. (74)
BCPAP hücre hatları PAX -8 eksprese ederler. (57)

Bitkisel polifenollerin serum konsantrasyonları insanlarda tipik olarak 10 μM 'ı geçmez. Diyet desteğini takiben 1-10 kat doku konsantrasyonları artabilir. Bu da çalışmalarda kullanılan dozlara diyetSEL destek ile ulaşılabilceğini ve in vivo ortamda da denirse tiroid kanserinin ilk oluşumundan başlayarak patogenezinin tamamında resveratrolle olumlu etkiler elde edebileceğimizi düşündürmüştür. Fakat bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Kabalak T Tiroid El kitabı 1. Cilt Güncellenmiş 2. Basım 2012
- 2- Schlumberger MJ, Filetti S., Hay ID. Nontoxic Diffuse and Nodular Goiter and Thyroid Neoplasia . “Williams Textbook of Endocrinology” (Ed Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen RP)’de. 12. baskı, Saunders Elsevier Press, Philadelphia, (2011), s 450-470.
- 3- Ertürk E, Tuncel E., Yerci O. ve ark. A retrospective analysis of thyroid cancer. *J Environ Pathol Toxicol* 1996;15(2-4):245-9
- 4- Zengi A, Karadeniz M , Erdogan M. ve ark. Does Chernobyl accident have any effect on thyroid cancers in Turkey? A retrospective review of thyroid cancers from 1982 to 2006. *Endocrine J* 2008;55(2)325-330
- 5- Tanrıöver O, Comunoglu N, Eren B. ve ark. Occult papillary thyroid carcinoma: prevalence at autopsy in Turkish people. *Eur J Cancer Prev* 2011 Jul;20(4):308-12.
- 6- TEMD Tiroid hastalıkları kılavuzu 2012
- 7- Erdoğan M, Berdeli A, Karadeniz M. ve ark. The prevalence of RET/PTC mutations in papillary thyroid cancers in Turkish population and its relation between tumor histopathology and prognostic factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008 Apr;116(4):225-30.
- 8- Lazar V, Bidart JM, Caillou B. ve ark. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *JCEM* 1999;84:3228-3234
- 9- Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications *Endocr. Rev.* 2007 28:742-762
- 10- Knauf JA, Kuroda H, Basu S, Fagin JA RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. *Oncogene* 2003 22:4406–4412
- 11- Melillo RM, Castellone MD, Guarino V. ve ark. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 2005 115:1068–1081

- 12- Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S. ve ark. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTCRAS- BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology* 2006 147:1014–1019
- 13- Bos JL Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989 49:4682–4689
- 14- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M. ve ark. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5399–5404
- 15- Namba H, Nakashima M, Hayashi T. ve ark. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 88:4393–4397
- 16- Xing M, Westra WH, Tufano RP. ve ark. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 90:6373–6379
- 17- Kebebew E, Weng J, Bauer J. ve ark. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007 ;246:466–471
- 18- Knauf JA, Ma X, Smith EP. ve ark. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 2005 65:4238–4245
- 19- Salvatore G, Falco V, Salerno P. ve ark. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006 12:1623–1629
- 20- Liu D, Liu Z, Condouris S, Xing M. BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 92:2264–
- 21- Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S. ve ark. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res* 2005 65:2465–2473

- 22- Mesa Jr C, Mirza M, Mitsutake N. ve ark. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res* 2006 66:6521–6529
- 23- Durante C, Puxeddu E, Ferretti E. ve ark. 2007 mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* BRAF 92:2840–2843
- 24- Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA. ve ark. The oncogene BRAF V600E 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. *Endocr Relat Cancer* 2006 13:257–269
- 25- Mian C, Barollo S, Pennelli G. ve ark. Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no (131)I uptake. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Jan;68(1):108-16.
- 26- Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D. ve ark. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res* 2007 13:1341–1349
- 27- Ouyang B, Knauf JA, Smith EP. ve ark. Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2006 12:1785–1793
- 28- Kloos RT., Ringel MD, Knopp, MV. ve ark. Phase II trial of sorafenib in metastatic thyroid cancer. *Journal of Clinical oncology* 2009 ;27(10):1675-84
- 29- Hoftijzer H, Heemstra KA, Morreau H ve ark. Beneficial effects of sorafenib on tumor progression, but not on radioiodine uptake, in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2009; 161: 923–931
- 30- Lee MH, Lee SE, Kim DW. ve ark. Mitochondrial localization and regulation of BRAFV600E in thyroid cancer: a clinically used RAF inhibitor is unable to block the mitochondrial activities of BRAFV600E. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 96(1):E19-30.
- 31- James J, Ruggeri B, Armstrong RC. ve ark. CEP-32496: a novel orally active BRAF(V600E) inhibitor with selective cellular and in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 2012 ;11(4):930-41.

- 32- Liu D, Liu Z, Jiang D. ve ark. Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 ;92(12):4686-95.
- 33- Liu D, Xing M. Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its potentiation by suppression of the PI3K and NF-kappaB pathways. *Thyroid.* 2008 ;18(8):853-64.
- 34- Henderson YC, Chen Y, Frederick MJ. ve ark. MEK inhibitor PD0325901 significantly reduces the growth of papillary thyroid carcinoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(7):1968-76.
- 35- Ball DW, Jin N, Rosen DM ve ark. Selective growth inhibition in BRAF mutant thyroid cancer by the MEK 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886). *J Clin Endocrinol Metab* 2007 92:4712–4718
- 36- Lucas A, Cohen EE, Cohen RB ve ark. Phase II study and tissue correlative studies of AZD 6244 (ARRY-142886) in iodine-131 refractory papillary thyroid carcinoma (IRPTC) and papillary thyroid carcinoma (PTC) with follicular elements. *J.Clin.Oncol.* 2010; 28 (Suppl): 15s (Abstr 5536).
- 37- Pennell NA, Daniels GH, Haddad RI ve ark. A phase II study of gefitinib in patients with advanced thyroid cancer. *Thyroid* 2008; 18: 317–323.
- 38- Sherman SI, Wirth LJ, Droz JP ve ark. Motesanib diphosphate in progressive differentiated thyroid cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 31–42.
- 39- Ravaud A, de la Fouchardiere C, Courbon F. Ve ark. Sunitinib in patients with refractory advanced thyroid cancer: the THYSU phase II trial 2009.
- 40- Cohen EE, Needles BM, Cullen KJ ve ark. Phase 2 study of sunitinib in refractory thyroid cancer. *J.Clin.Oncol.* 2009; 26 (Suppl): 6025.
- 41- Short SC, Suovuori A, Cook G ve ark. A phase II study using retinoids as redifferentiation agents to increase iodine uptake in metastatic thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2004; 16: 569–574.
- 42- Simon D, Koehrl J, Reiners C ve ark. Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 1998; 22: 569–574.

- 43- Simon D, Korber C, Krausch M ve ark. Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29: 775–782.
- 44- Kebebew E, Peng M, Reiff E ve ark. A phase II trial of rosiglitazone in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative differentiated thyroid cancer. *Surgery* 2006; 140: 960–966.
- 45- Tepmongkol S, Keelawat S, Honsawek S ve ark. Rosiglitazone effect on radioiodine uptake in thyroid carcinoma patients with high thyroglobulin but negative total body scan: a correlation with the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Thyroid* 2008; 18: 697–704.
- 46- Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R ve ark. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I-symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2449–2457.
- 47- Fröhlich E, Machicao F, Wahl R Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture *Endocr Relat Cancer* 12:291-303, 2005
- 48- Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, ve ar. Inhibitory effects of peroxisome poliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4728-4735, 2002
- 49- Kebebew E, Lindsay S, Clark OH, ve ark Results of rosiglitazone therapy in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative advanced differentiated thyroid cancer. *Thyroidology* 19:953-956, 2009
- 50- Athar M, Back JH, Kopelovich L. ve ark. Multiple molecular Targets of Resveratrol: Anti-carcinogenic Mechanisms *Arch Biochem Biophys.* 2009 ; 486(2): 95–102.
- 51- Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 1997;89:1260–1270.
- 52- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000;164:6509–6519.

- 53- Shih A, Davis FB, Lin HY ve ark. Resveratrol Induces Apoptosis in Thyroid Cancer Cell Lines via a MAPK- and p53-Dependent Mechanism *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002 87: 1223-1232
- 54- Liu D, Liu Z, Condouris S, Xing M BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 92:2264–2271
- 55- Henderson YC, Fredrick MJ, Clayman GL Differential responses of human papillary thyroid cancer cell lines carrying the RET/PTC1 rearrangement or a BRAF mutation to MEK1/2 inhibitors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007 133:810–815
- 56- Sebai H., Hovse' pian S., Ristorcelli E, ve ark. Resveratrol Increases Iodide Trapping in the Rat Thyroid Cell Line FRTL-5 *Thyroid* 2010 20;2:195-203
- 57- Pilli T., Prasad KV., Jayarama S. ve ark. Potential Utility and Limitations of Thyroid Cancer Cell Lines as Models for Studying Thyroid Cancer *Thyroid* 2009 19(12) 1333-1342
- 58- Puppin C., D'Aurizio F., D'Elia AV. Ve ark. Effects of histone acetylation on sodium iodide symporter promoter and expression of thyroid-specific transcription factors. *Endocrinology* 2005 146(9):3967–3974
- 59- Nanavaty MA, Johar K, Sivasankaran AM. Ve ark. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32: 1483-1488.
- 60- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM ve ark. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 1991;142: 257-265.
- 61- Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* 2009;69(21):8317–25
- 62- Sue M, Akama T, Kawashima A ve ark., Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH. *Thyroid* 2012 22(8) 844-852

- 63- Riedel C, Levy O, Carrasco N Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem* 2001 276:21458–21463.
- 64- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T. Ve ark. VEGF-receptor signal transduction. *Trends in biochemical sciences* 2003;28:488–494.
- 65- Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer letters* 2006;231:113–122.
- 66- Chen KH, Hung CC, Hsu HH. Ve ark. Resveratrol ameliorates early diabetic nephropathy associated with suppression of augmented TGF- β /smad and ERK1/2 signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2011 15;190(1):45-53.
- 67- Siironen P, Ristimäki A, Narko K. Ve ark. VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer *Endocr Relat Cancer.* 2006 Jun;13(2):465-73.
- 68- Ji B, Liu Y, Zhang P. Ve ark. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):237-42.
- 69- Bauerle KT, Schweppe RE, Haugen BR Inhibition of nuclear factor-kappa B differentially affects thyroid cancer cell growth, apoptosis, and invasion. *Molecular Cancer* 2010;9:117
- 70- Fagone E, Conte E, Gili E. Ve ark. Resveratrol inhibits transforming growth factor- β -induced proliferation and differentiation of ex vivo human lung fibroblasts into myofibroblasts through ERK/Akt inhibition and PTEN restoration. *Exp Lung Res.* 2011 ;37(3):162-74.
- 71- Kang HJ, Youn YK, Hong MK, Kim LS Antiproliferation and Redifferentiation in Thyroid Cancer Cell Lines by Polyphenol Phytochemicals *J Korean Med Sci* 2011; 26: 893-899
- 72- Ulrich S, Loitsch SM, Rau O. Ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Res* 2006; 66: 7348-54.
- 73- Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM. ve ark. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol.* 2002 Aug;26(8):1016-23.

- 74- Galusca B, Dumollard JM, Chambonniere ML. Ve ark Peroxisome proliferator activated receptor gamma immunohistochemical expression in human papillary thyroid carcinoma tissues. Possible relationship to lymph node metastasis. *Anticancer Res.* 2004 24(3b):1993-1997.