

**T.C.**  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**GRAVES HASTALIĞI ve TOKSİK MULTİNODÜLER GUATR'DA TİROİD  
DOKUSUNUN PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN PROTEOMİK  
YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

**Dr. Duygu TEMİZ KARADAĞ**

**UZMANLIK TEZİ**

**KOCAELİ-2013**

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLO DİZİNİ	vii
1 AMAÇ ve KAPSAM	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Graves Hastalığı (GH)	2
2.1.1 Graves Hastalığının Patogenezi	3
2.1.2 Graves Hastalığının Gelişimine Neden Olan Faktörler	7
2.1.2.1 Genetik Faktörler	7
2.1.2.2 Çevresel ve Endojen Faktörler	9
2.1.3 Graves Hastalığının Klinik Bulguları	10
2.2 Graves Oftalmopatisi (GO)	12
2.2.1 Graves Oftalmopatisinin Gelişimine Neden Olan Faktörler	14
2.3 Toksik Multinoduler Guatr (TMNG)	18
2.3.1 Toksik Multinoduler Guatr Patogenezi	18
2.4 Proteomiks Yöntemine Genel Bakış	22
3 GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1 Graves Hastaları ve Toksik Multinoduler Guatr Hastalarının Protein Profillerinin Proteomiks Yöntemler Kullanılarak Karşılaştırılması	28
4 BULGULAR	32
5 TARTIŞMA	40
6 SONUÇ ve ÖNERİLER	50
7 ÖZET	51
8 SUMMARY	53
9 KAYNAKLAR	55

## TEŞEKKÜR

Tecrübesi ve bilgi birikimi ile çalıőmalarım sırasında desteğini esirgemeyen, bu bilimsel çalıőmayı tez çalışması olarak gerçekleőtirme fırsatını veren değerli hocam ve tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Berrin Çetinarslan'a; sorgulayıcı bakış açısı ile ufkumu geniőleten, bitmeyen enerjisi ile tez çalıőmasını keyifli hale getiren ve bilimsel bir araőtırmanın laboratuvar aőamasında yer almamı sağlayan Sayın Doç Dr. Murat Kasap'a; bilimsel desteği ve pozitif yaklaőımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Gürler Akpınar'a; tezimin hazırlığındaki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Zafer Cantürk, Prof. Dr. Yeőim Gürbüz'e; laboratuvar aőamasındaki yardımlarından dolayı Sinem Torol, Cansu Semiz ve Vildan Özaslan'a teşekkür ederim.

İç hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaőan, baőtta İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Baőtkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Yılmaz olmak üzere tüm değerli hocalarım, çalışma arkadaőlarım ve İç Hastalıkları ABD'nin tüm üyelerine teşekkür ederim.

Tıp eğitimimin her aőamasında zorlukları sevgi ve destekleri sayesinde aőtıęım annem, babam ve kardeőlerime; fedakarlığı ve desteği için eőime teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GH	Graves Hastalığı
GO	Graves Oftalmopatisi
TMNG	Toksik multinoduler guatr
TSH	Tiroid stimula hormon
TSHR	Tiroid stimulan hormon reseptörü
TRH	Tiroitropin releasing hormon
sT3	Serbest triiyodotironin
sT4	Serbest tiroksin
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
Tg	Tiroglobulin
TPO	Tiroid peroksidaz
TSHRAb	Tiroid stimula hormon reseptör antikor
Duox	dual oksidaz
NIS	Sodyum/iyot simportu
ATPaz	adenozin trifosfataz
EGF	Epidermal büyüme faktörü
µg	mikrogram
I <sup>-</sup>	iyodür
I <sup>o</sup>	iyot
TBG	Troksin bağlayıcı globulin
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
RAIU	radioactive iodine uptake
APC	antijen sunan hücreler
HLA-DR3	Human lökosit antijen-DR3
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit antijen
GH	Graves Hastalığı
GO	Graves Oftalmopatisi
TMNG	Toksik multinoduler guatr
TSH	Tiroid stimula hormon
TSHR	Tiroid stimulan hormon reseptörü
TRH	Tiroitropin releasing hormon
sT3	Serbest triiyodotironin
sT4	Serbest tiroksin
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
Tg	Tiroglobulin
TPO	Tiroid peroksidaz

TSHRAb	Tiroid stimula hormon reseptör antikorü
TCR- $\beta$	T hücre reseptör $\beta$
TNF- $\beta$	Tümör nekrotizan faktör- $\beta$
TGF- $\beta$	Transforming Growth Faktör $\beta$
TBII	Tirotropin bağlayıcı inhibitör immunglobulin
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IL-2/IL-2R	İnterlökin 2 ve interlökin 2 reseptörü
Ig	Immunglobulin
cAMP	siklik Adenozin monofosfat
FSH	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinize edici hormon
hCG	Human koryonik gonadotropin
MHC	Major histokompatibilite complex
PD1	Programmed cell death 1
IFN- $\gamma$	İnterfeon gamma
Th 1	yardımcı T hücresi 1
Th 2	yardımcı T hücresi 2
TCR	T hücre reseptörü
HTLV-1	human T hücreli Lenfotropik virüs 1
CRH	Kortikotropin salıcı hormon
GO	Graves oftalmopati
TSI	Tiroid uyarıcı immunglobulin
DIGE	Differential Gel Electrophoresis
RAI	Radyoaktif İyot
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
FDA	Food and Drug Administration
RNA	Ribonükleik asit
TCR- $\beta$	T hücre reseptör $\beta$
TNF- $\beta$	Tümör nekrotizan faktör- $\beta$
TGF- $\beta$	Transforming Growth Faktör $\beta$
TBII	Tirotropin bağlayıcı inhibitör immunglobulin
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IL-2/IL-2R	İnterlökin 2 ve interlökin 2 reseptörü
Ig	Immunglobulin
cAMP	Siklik Adenozin monofosfat
FSH	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinize edici hormon
hCG	human koryonik gonadotropin
BOS	Beyin omurilik sıvısı

HPLC	High-Performance Liquid Chromotography
IP	Immunopresipitasyon
CE	Kapiller elektroforez
İE	İzoelektrik Fokuslama
IPG	İmmobilize pH Gradient
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
SELDI	Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization
ESI	Electrospray Ionization
TOF	Time-of-Flight Mass Analyzers
IPA	Ingenuity Pathways Analysis



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Tiroid Nodülü Oluşum Hipotezi	20
Şekil 2.2	Proteomiks çalışmalarının adımları	23
Şekil 2.3	IPG striplerinde proteinlerin fokuslanması	25
Şekil 4.1	PDQest analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösteren spotlar	32
Şekil 4.2	GH ve TMNG gruplarının jellerinde hazırlanan ana şablonlar	32
Şekil-4.3	Ana şablonlardan elde edilen spotların tek şablonda	33
Şekil-4.4	Proteinlerin Canonical yolak analizi sonucu ilişkili oldukları	35
Şekil-4.5	IPA analizi sonucu hücre büyümesi, farklılaşması, motilitesi ile ilgili yolaklar	36
Şekil-4.6	IPA analizi sonucu enerji metabolizması ile ilgili yolaklar	37
Şekil-4.7	Her iki yolağın birleştirilmesi ile yolakların etkileşimi	38

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2. 1</b>	Tirotoksikoz sebepleri	2
<b>Tablo 2.2.</b>	Graves Hastalığı için araştırılan gen bölgeleri	8
<b>Tablo 2.3.</b>	NO SPECS Sınıflaması	13
<b>Tablo 2.4</b>	Klinik Aktivite Skorlaması	14
<b>Tablo3.1.</b>	Graves Hastalarının yaş ve cinsiyet Dağılımı	27
<b>Tablo3.2.</b>	Toksik MNG Hastalarının yaş ve cinsiyet dağılımı	27
<b>Tablo-4.1.</b>	Proteinler ve eksprese oldukları jel sayısı	33
<b>Tablo 4.2.</b>	MALDI-TOF analizi ile tanımlanan proteinlerin görev ve hücre içi lokalizasyonları	34
<b>Tablo 4.3.</b>	Proteinlerin ilişkili olduğu iki sistem: Endokrin Sistem ve GİS	39





## 1.AMAÇ ve KAPSAM

Graves Hastalığı (GH) ve Toksik Multinodüler Guatr (TMNG), fonksiyonel olarak tirotoksikozaya yol açmalarına rağmen, tiroid dokusundaki histopatolojik değişiklikler ve klinik seyirleri açısından farklılık göstermektedir.

Graves hastalığının patogenezinde Tiroid Stimulan Hormon Reseptörü'ne (TSHR) karşı gelişen vereseptörü uyaranimmün-globülin G (IgG) antikoru suçlanmaktadır. TSHR'nün vücut tarafından bir antijen olarak algılanması, hücrel immunitenin uyarılması ile başlayan otoimmün bir yanıtı açmaktadır. Tiroid dokusunun histopatolojik incelemesinde görülen yaygın lenfositik infiltrasyon otoimmunitiyi desteklemektedir. Hastaların bir kısmında orbitopati ve dermopati gibi bulguların tirotoksikozaya eşlik etmesi ve bu bulguların derecesinin hastalar arasında farklılık göstermesi nedeniyle, GH oldukça heterojen klinik bulgular sergilemektedir. TMNG'nin patogenezinde ise, tiroid hiperplazisiyle başlayan, nodül oluşumu ile devam eden ve nodülün otonom fonksiyon kazanması ile sonuçlanan ilerleyici bir sürecin rol aldığı düşünülmektedir. Otonom fonksiyon gösteren nodüllerin bir kısmında TSHR mutasyonu ve G-protein mutasyonu saptanmış olsa da, çoğunun altında yatan sebep henüz bilinmemektedir. TMNG'nin, iyot eksikliği gibi çevresel faktörlerle genetik faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığına inanılmaktadır.

Çalışmada GH ve TMNG hastalarından oluşan iki hasta grubunun tiroid doku protein profillerini karşılaştırmak amaçlanmıştır. Bu farklı proteinlerin hastalıkların patogenezi ve klinik gidişleri ile ilişkisini göstererek yeni çalışmalara zemin hazırlayabileceği düşünülmüştür.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Graves Hastalığı

Tirotoksikoz terimi, herhangi bir nedenle kanda fazla miktarda bulunan tiroid hormonuna maruz kalması sonucu ortaya çıkan fizyopatolojik durumları tanımlamak için kullanılır ve genel bir terimdir. Hipertiroidizm ise, tirotropik bir uyarıcı ya da tiroid dokusunun otonom aşırı fonksiyon göstermesi sonucunda tiroid hormonlarının fazla miktarda sentezi ve sekresyonu ile ortaya çıkan bozukluk durumudur (1). Tablo-2.1’de tirotoksikoz sebepleri gösterilmiştir.

<b>Devamlı Hormon Üretimi (Hipertiroidizm)</b>	<b>Geçici Tiroid Hormonu Fazlalığı (Tirotoksikoz)</b>
<i>Düşük TSH, Yüksek RAIU</i>	<i>Düşük TSH, Düşük RAIU</i>
Graves Hastalığı (Basedow Graves hastalığı) Toksik multinodüler guatr Toksik adenoma Koryonik gonadotropine bağlı Gestasyonel hipertiroidizm Gebeliğin fizyolojik hipertiroidizmi TSH reseptör mutasyonuna bağlı ailesel gebelik hipertiroidizmi Trofoblastik tümörler TSH reseptör veya G protein mutasyonu ile ilişkili kalıtsal oto-immün olmayan hipertiroidizm	Tiroidit Otoimmün Lenfositik tiroidit Hashimoto tiroiditinin akut alevlenmesi Viral Subakut (granülomatöz, ağrılı, postviral) tiroidit İlaça bağlı veya tiroidit ilişkili Amiodaron Lityum, alfa IFN, IL-2, GM-CSF İnfeksiyöz tiroidit
<i>Düşük TSH, Düşük RAIU</i>	<i>Eksojen tiroid hormonu</i>
İyota bağlı hipertiroidizm (Jod-Basedow etkisi) Amiodaron ilişkili hipertiroidizm	İatrojenik aşırı replasman Tirotoksikoz factitia Tiroid hormon içeren besinlerin alınması

	Hamburger tirotoksikozu
<i>Struma Ovarii</i>	
Metastatik fonksiyone tiroid karsinomu	
<i>Normalveya yüksek TSH</i>	
TSH salgılayan hipofiz tümörleri	
Tiroid hormon direnci	

Tablo-2. 1. Tirotoksikoz sebepleri (Kaynak 1'den uyarlanmıştır.)

Graves Hastalığı (GH), iyot alımı yeterli olan ülkelerde 40 yaş altındaki hastalarda tirotoksikozun en sık sebebidir. Diğer yaygın sebeplerin başında tiroiditler ve otonom tiroid nodülleri gelir. GH, oftalmopati ve dermopatinin eşlik ettiği, diffuz guatr ve hipertiroidi ile karakterize bir hastalıktır. GH tirotoksikozların % 50-80'ini oluşturur.

Robert Graves 1835 yılında toksik diffüz guatrı ilk kez tanımlamıştır (2). Bununla birlikte, az tanınmış bir İngiliz hekim olan Caleb Hillier Parr, 1825'te benzer bir sendromu yayınlamıştır (3). 1840 yılında, Almanya'da Carl A. von Basedow, "Exophthalmos durch Hypertrophie del Zellgewebes in der Augenhohle," yani orbita dokusunun hipertrofisine bağlı gelişen ekzoftalmus vakalarını bildirmiştir (4). Böylece sendromun ekzoftalmus, guatr ve çarpıntı triadını içeren tanımını yapmıştır. Von Basedow gözdeki değişikliklerin dikkat çekiciliğinden dolayı ekzoftalmusu hastalığın temel bulgularından biri olarak tanımlamıştır. Carl A. von Basedow'un tanımı zamanla yayılmış ve İngilizce konuşmayan Avrupa ülkelerinde hastalık hala Basedow hastalığı olarak anılmaktadır.

### 2.1.1.Graves Hastalığının Patogenezi

Graves hastalarının serumlarında tirotropinden farklı bir tiroid uyarıcı faktör bulunmasının ardından, bu faktörün bir immün-globülin G (Ig G) antikoru olduğu keşfedilmiştir (5). Hastaların serumlarında tiroid stimulan hormon reseptörüne (TSHR) karşı gelişmiş oto-antikorlar bulunur. TSHR, tiroid dokusundan başka adipositler, fibroblastlar, kemik dokusu ve bir çok başka dokuda da eksprese olur. TSHR yedi

transmembran alt birim içerir ve G-protein ile eşleşmiştir (6). Anti-TSHR oto-antikorlarının TSHR'ne bağlanması ve reseptörü uyarması sonucunda tiroid hormonlarının aşırı sentezi ve sekresyonu gerçekleşir (15). GH'da, uyarıcı TSHR oto-antikorları yanında, bazal adenilat siklaz aktivitesini ve tiroid stimulan hormon (TSH) aracılı siklik adenozin monofosfat (cAMP) yapımını baskılayıcı TSHR oto-antikorları da saptanmıştır (7). Nitekim, pek çok hipotiroidi vakasında yüksek düzeyde TSH baskılayıcı oto-antikor saptanmıştır. Hashimoto Hastalığı'nda görülen apoptozis veya T hücre aracılı hasardan farklı olarak, bu oto-antikorlar TSH bağlanmasını baskılayabilir, ya da TSH bağlanmasını müteakip bir basamağı etkileyerek tiroid aktivitesini önleyebilir. Erken çalışmalar uyarıcı TSHR oto-antikorlarının IgG1 sınıfına sınırlı olduğunu; baskılayıcı TSHR oto-antikorları veya diğer tiroid antijenlerine (tiroid peroksidaz gibi) karşı gelişen oto-antikorlar için böyle bir sınırlama olmadığını ve tiroid doku hasarına ikincil gelişebileceklerini göstermiştir (8-10). Bazı hastalarda uyarıcı ve baskılayıcı TSHR oto-antikorlarının her ikisi de bulunabilir. Bu durumda net biyolojik etki, her iki oto-antikorum göreceli konsantrasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkabilir. GH'da oto-antikorlar genellikle uyarıcı niteliktedir (11). Uyarıcı oto-antikor ilk kez, uzun etkili tiroid uyarıcı (LATS) olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar LATS'ın tiroidi infiltre eden lenfositlerden sentezlenen bir immunglobulin (Ig) olduğunu göstermiştir (12).

TSHR G-protein reseptör ailesinin bir üyesidir ve follikül uyarıcı hormon (FSH), insan koryonik gonodotropin (hCG), luteinize edici hormon (LH) gibi polipeptid hormon reseptörlerine yapıca çok benzer. Bu yapısal benzerliğe rağmen sadece TSHR bir oto-antijen gibi etki gösterir. Bu özellik, TSHR'nün onu otoimmün hedef haline getiren benzersiz bir özelliği olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir. TSHR'nün immun sistemin hedefi olmasına yol açan faktörler hala netlik kazanmamıştır. Ancak, TSHR dimerizasyon ve molekül içi ayrışma gibi bir dizi kompleks post-translasyonel değişime uğrayarak bölünür ve iki alt-ünite yapısına ayrışır. Bu post-translasyonel değişimlerin reseptörün antijenitesini değiştireceği ve bir oto antijen gibi algılanmasını sağlayabileceği düşünülmüştür (13). TSHR peptidlerinin "Major Histocompatibility Complex II" (MHC-II) molekülleri ile sunulması, timusta negatif seleksiyondan kaçmayı başarmış antijen spesifik CD4+ T hücrelerinin aktifleşmesine yol açar. Böyle bir aktivasyon TSHR'ne karşı immun toleransın ortadan kalkmasına ve stimulan

antikorların üretimi ile sonuçlanan oto immunitenin ortaya çıkmasına yol açar. Oto immun yanıtın ortaya çıkmasında TSHR'nün alt ünite yapılarına ayrışması yanında başka önemli immunolojik faktörler de gerekir. Çünkü self reaktif CD4+ T hücreler negatif seleksiyondan kaçmış olsalar da, dolaşımında inaktif halde tutulabilirler. Etkili bir antijen sunumu için, antijenik peptidlerin MHC molekülleri ile sunulması yetmez. Aynı zamanda inflamatuvar süreci başlatan sinyalin güçlü olması gerekir. Sinyal yeterince güçlü olduğunda inaktif T hücrelerini uyaracak ikinci bir sinyale ihtiyaç vardır. Çünkü, yardımcı T hücrelerinin fenotirik ayrışması, CTLA4 ve "Programmed Cell Death Protein 1" (PD1) üretimi gibi immun yanıtı baskılayan mekanizmalar bu süreci durdurmaya çalışacaktır.

Spesifik bir otoimmun yanıtta, gerekli olan unsur, antijene özgü T lenfositlerdir. T hücrelerinin aktivasyonu antijenik peptidlerin MHC molekülleri vasıtasıyla sunulmasını gerektirir. MHC geni, 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. Pek çoğu immün yanıtın düzenlenmesinde rol alan yüz kadar geni kodlar. MHC genleri üç ana gruba ayrılır. Sınıf I pek çok hücre yüzeyinde eksprese olan histokompatibilite genlerini içerir (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Sınıf II sadece lökosit ve immün hücreler yüzeyinde eksprese olan histokompatibilite genlerini içerir (HLA-DR). Sınıf III, bazı kompleman faktörleri, sitokinler ve lenfosit yüzey molekülleri gibi immün yanıtta rol alan molekülleri kodlayan heterojen bir grup gen içerir. Antijenik peptidlerin MHC molekülleri vasıtasıyla sunulması "Antigen Presenting Cell" (APC) denilen özelleşmiş bir grup hücre tarafından yapılır. Normalde, CD8+ T hücreler MHC sınıf I molekülüne ile, CD4+ T hücreler ise MHC sınıf II molekülüne ile kompleks oluşturur. Antijen tarafından uyarılan CD4+ yardımcı T hücreleri aktive olduklarında salgıladıkları sitokinlere göre yardımcı T hücresi 1 (Th1) ve yardımcı T hücresi 2 (Th2) olarak iki gruba ayrılır. Th1 gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunda görev alır; tümör nekrotizan faktör- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ve interlökin-2 (IL-2) salgılar. Th2 humoral immün yanıtta rol alır; interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-13 (IL-13) salgılar (14). Graves hastalarında yapılan çalışmalar, hem dolaşımında hem de tiroid dokusu içinde aktive T hücrelerinin varlığını göstermiştir. Graves hastalığında tiroid dokusundaki T hücrelerine yüzey monoklonal antikor fenotipi açısından bakıldığında, hücrelerin çoğunluğunun CD4+ T hücreler olduğu görülmüştür. Tiroid dokusu içindeki bu CD4+ T hücreler salgıladıkları sitokinler açısından değerlendirildiğinde Th1 tipi

hücrelerdir. Oysa GH gibi, tiroid uyarıcı oto-antikorların tiroid hiperfonksiyonu ve tiroid hücre hiperplazisi yaptığı bir hastalıkta, humoral immün yanıtın daha ön planda olması beklenirdi. GH'da Th1 hücrelerin interlekin-10 (IL-10) aracılığı ile B lenfositleri uyararak antikor yapımına neden olabileceği ileri sürülmüştür (15-18).

T hücreleri bir immün yanıtın başlangıcında ilk sinyali, TCR moleküllerinin antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki MHC molekülleri ile etkileştiğinde alırlar. MHC ile kompleks oluşturduktan sonra sitokin salgılamak için bir uyarana daha ihtiyaç duyarlar. T hücre yüzeylerindeki CD28 molekülünün antijen sunan hücrelerin yüzeylerindeki spesifik ligandlar olan B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) ile etkileşimi sayesinde T hücrelerin uyarılması gerçekleşir. Diğer yandan, bu etkileşimle birlikte T hücrelerin yüzeylerinde baskılayıcı özelliği olan CTLA-4 ekspresyonu artar. CTLA-4, yapısal olarak CD28'e benzer ve B7.1 ve B7.2 molekülüne 100 kat daha fazla affinite ile bağlanır. Yüksek affinite nedeniyle CTLA-4, B7.1 ve B7.2 molekülüne bağlanmak için CD28 ile yarışır. Bu durum, negatif uyarıcı varlığında ya da devam eden pozitif uyarıcının yokluğunda T hücre yanıtının azalmasına yol açar. Uyarıcı moleküllerin varlığı otoimmünitenin yönünü belirlemede kritik öneme sahiptir. Çünkü, uyarıcı moleküllerin yokluğu antijen spesifik T hücrelerin anerjisi ya da ortadan kaldırılması ile sonuçlanır. Graves hastalığında tiroid hücrelerinde B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) moleküllerinin eksprese edilmediği gösterilmiştir (19). Bu durumda, profesyonel APC'nin eksprese ettiği başka ko-stimulatör moleküller olabileceği öne sürülmüştür. Antijen sunumu üzerine yapılan bir çalışmada, B7 molekülü gibi ko-stimulatör sinyallerin yokluğunda ve profesyonel APC tarafından başlatılmış immün yanıt varlığında, MHC sınıf II eksprese eden tiroid hücrelerinin T lenfosit aktivasyonu devam ettirdiği belirtilmiştir (20-21). GH'da tiroid hücreleri antijenlerin kaynağı ve uyarıcı oto antikorların hedefidir. Aynı zamanda tiroid içindeki otoimmüniteyi değiştiren bazı moleküllerin sentez yeridir. GH'da tiroid hücrelerinin antijen sunan hücreler gibi MHC-II eksprese etmeleri, otoimmüniteyi bu olayın başlatmış olabileceği hipotezini doğurmuştur. Daha sonraki çalışmalar, bu durumun tiroid dokusunu infiltre eden T lenfositlere ikincil geliştiğini göstermiştir. MHC-II ekspresyonu otoimmünitenin devam ettirilmesi ve güçlendirilmesinde önemlidir. Tiroid hücrelerinin, antijen sunan hücre

varlığında ya da yokluğunda, T lenfositleri uyarıcı kapasiteye sahip olduğu ispatlanmıştır (22-35).

Graves hastalığında tiroid hücreleri MHC molekülü eksprese ettikleri gibi CD 40 gibi bir ko-stimülatör eksprese ediyor olabilirler (26). Makrofajlar, dendritik hücreler ve hatta B lenfositler gibi profesyonel antijen sunan hücreler, tiroid dokusundaki lenfositik infiltrat içinde görülebilir ve otoimmüniteye katkıda bulunurlar (27). İmmuniteyi uyaran sinyallerin aksine, B7 molekülü sitotoksik T lenfosit yüzeyindeki CTLA-4 ile reaksiyona girdiğinde immün reaksiyon baskılanmaktadır. Bu yüzden, CTLA-4'ün yokluğu abartılı bir immün yanıtı yol açar.

## 2.1.2 Graves Hastalığı Gelişimine Neden Olan Faktörler

Graves hastalığı tiroid antijenlerine immün toleransın ortadan kalktığı genetik, hormonal ve çevresel faktörlerin birlikteliğinde ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır.

### 2.1.2.1 .Genetik Faktörler

Graves hastalığının genetik temeli ile ilgili bilgiler ikiz çalışmaları ve aile çalışmalarından elde edilmiştir (28). Graves hastalığının monozygotik ikizlerdeki konkordans oranı yaklaşık %20 olup, dizigotik ikizlerde bu oran daha düşüktür (29). Son 20 yılda biyomedikal gelişmeler hastalığın genetik temelini ışık tutmuştur. Bu çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Lokus	Yazarlar
Kanıtlanmış	
CTLA-4	Furugaki, Ueda, Vaidya, Yanagawa
HLA Sınıf II	Ban, Chen, Simmonds, Wongsurawat
PTPN22	Heward, Smyth, Velaga

TSHR	Dechairo
Kanıtlanmayı bekleyen	
CD25	Brand
IDDM2	Taylor
LMP2	Heward, Vives
TCR- $\beta$	Pickerill, Zhang
TPO	Ludgate, Pirro
Kanıt oluşturmeyen	
CD40	Heward, Houston, Jacobson
FOXP3	Ban, Owen
Tg	Collins, Tomer
TNF $\beta$	Nakkuntod
Vitamin D reseptörü	Collins, Stefanic

**Tablo 2.2.** Graves Hastalığı için araştırılan gen bölgeleri (kaynak 21'dan uyarlanmıştır)

Farklı toplumlarda HLA gen bölgesi ile GH arasındaki ilişkiyi gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Erken çalışmalar HLA-B8'in GH ve klinik seyri ile ilişkisini belirtmiştir. Beyaz ırkta GH ile HLA-DR3 ve HLA-DQA1\*0501 arasında pozitif bir ilişki bulunurken, HLA-DRB1\*0701' in hastalığa karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (30-31).

CD40, tümör nekrozitan faktör ailesinin bir üyesidir. B hücrelerinde ve diğer antijen sunan hücrelerde eksprese edilir. B hücre aktivasyonu ve proliferasyonu, antikor sekresyonu, immunglobulin sınıfının belirlenmesi, affinite ve immun hafıza oluşumu gibi olaylarda rol alır. Çalışmalar CD40 bölgesinde bir polimorfizmin GH ile ilişkili olduğunu göstermiştir (32).

CTLA-4, immun yanıtın sonlandırılmasında rol alan bir T-hücre yüzey proteini. CTLA-4 molekülünü kodlayan gen 2. kromozomun uzun kolunda; 2q33 bandında bulunur ve immün cevabın down regülasyonunda rol oynar. Pek çok çalışma CTL-4'ün GH, otoimmün tiroidit ve tiroid antijenlerine karşı oto-antikor üretimi ile



ilişkinini göstermiştir. CTLA-4 geninin birkaç varyantı tanımlanmış olup bunlar arasında 60. pozisyondaki CTLA-4 polimorfizmi daha fazla ilişkili bulunmuştur (33-35). Ancak, bu gendeki defektin TSHR'ne özgü immun yanıtı nasıl ortaya çıkardığı henüz netlik kazanmamıştır.

PTPN22 T-hücre aktivasyonunun güçlü bir inhibitörüdür. 1. kromozomun kısa kolunda; 1p13 bandında bulunan PTPN22 geni LYP olarak bilinen proteini kodlar. Genin 620. kodonundaki tek bir nükleotid polimorfizmi GH ve otoimmün tiroidit yanında başka otoimmün hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur.

Tiroglobulin (Tg) tiroid hormonlarının prekürsörüdür ve tiroid otoimmünitesinde başlıca antijendir. Tg geninin sekans analizleri çok sayıda tek nükleotid missense (kayıp?) polimorfizmi göstermiş olup, Tg proteinindeki aminoasit varyantlarının otoimmün tiroid hastalığının patogenezinde sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

#### **2.1.2.2. Çevresel ve Endojen Faktörler**

Graves hastalığının etyopatogenezinde birçok çevresel ve endojen faktör rol oynamaktadır. Otoimmünite gelişiminde enfeksiyonun olası rolü konusunda, "birlikte otoimmünite gelişimi" ya da "moleküler taklit" gibi fikirler ortaya atılmıştır. Belirli bir enfeksiyonun Graves hastalığını başlattığına dair kanıt yoktur. Uzunca bir süre *Y. Enterocolitica* gibi enfeksiyöz etkenlerin Graves hastalığına yol açtığı söylene de, bunu kanıtlayacak yeterli kriter bulunmamıştır (36). Tiroid bezinin kendi enfeksiyonları (subakut tiroidit, konjenital rubella, hepatit C gibi) tiroidin otoimmün fenomeni ile bağlantılı olabilir. Deneysel hayvan çalışmalarında viral ajanların tiroid hastalığını tetiklediği gösterilse de Graves hastalığında enfeksiyöz ajanların rolü kanıtlanmamıştır (37-38). İnsan T hücreli lenfotrofik virus (HTLV-1) enfeksiyonu ile birlikte otoimmün tiroid hastalığı bildirilmiştir. Ancak, bunda tiroid enfeksiyonundan çok immün hücre değişikliğinin rolü olabilir.

GH genellikle büyük bir emosyonel stres veya ani bir korku sonrası ortaya çıkar. Bazı kaynaklar stresin belirsiz bazı mekanizmalar ile immun sistemi baskıladığını savunmaktadır. Bu durum, kortizolün ya da immun hücre seviyesinde kortikotropin salıcı hormon (CRH) aktivitesinin sonucu olabilir. Kontrol grupları ile kıyaslandıklarında GH hastalarının çoğunda hastalığın ortaya çıkışından önceki 12 ay içinde büyük bir stres hikayesi vardır.

GH kadınlarda daha sık görülür (K/E: 7/1-10/1) ve puberteden sonra daha aşikar hale gelir. Bu sebeplerden dolayı kadın cinsiyet hormonlarının patogeneizde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Aslında androjenler otoimmun tiroiditi baskılamaktadır (39). Ancak hastalık menapozdan sonra da ortaya çıkmaya devam eder ve pek çok erkekte de görülür. Erkeklerde ortaya çıktığında, hastalık daha ileri yaşta, daha ağır ve daha fazla oftalmopati ile birlikte görölme eğilimindedir. Bu gözlemler, östrojenden çok X kromozomunun sorumlu olabileceğini düşündürür. Kadınlar 2X kromozomu sebebiyle iki kat fazla genetik yatkınlık gösterir. Genetik çalışmalar X kromozomu üzerindeki bir lokusu tanımlasa da, geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır. Kadın hücreleri farklı X kromozomlarını farklı dokularda farklı derecelerde inaktive edebilirler. GH'da X kromozomunun inaktivasyonu farklı immun yanıtlara yol açmada önemli bir faktördür (40).

İyot eksikliği bölgelerinde iyot replasmanının GH'nı tetiklediği gösterilmiştir. Bunların yanı sıra bazı ilaçlar (lityum, retroviral tedavi, Campath 1H monklonal antikorlar) immünolojik etkileriyle GH için risk oluşturmaktadır (41).

### **2.1.3. Graves Hastalığının Semptom ve Klinik Bulguları**

Graves Hastalığı, hem tiroide özgü hem de tiroid dışı semptom ve klinik bulgulara yol açan bir hastalıktır.

Tiroide özgü semptomlar arasında sıklıkla hipertiroidinin yol açtığı sinirlilik, halsizlik, çarpıntı, dispne, kilo kaybı, sıcak intoleransı, yorgunluk, iştah artışı, oligomenore, terleme ve diyare vardır (42). Tiroid bezi genelde simetrik olarak büyümüştür. Bazen gerçek nodülleri hiperplastik gland lobullerinden ayırt etmek zor olabilir. Guatr boyutu kişiden kişiye farklılık gösterebilir. Bazı hastalarda normal

boyuttayken, bazılarında juguler venlere baskı yapacak kadar büyümüş olabilir. Bu hastalarda Pemberton işareti (kollar yukarı kaldırıldığında juguler venlerin şişmesi) pozitif saptanabilir. Artmış kan akımı sebebiyle bez üzerinde tril saptanabilir.

Tirotoksik hastaların ciltleri sıcak, nemli ve incedir. Palmar eritem görülebilir. Saçlar ince ve kırılğan olup hastaların yaklaşık %40'ında ötiroidizm sağlandıktan sonra bile aylarca devam eden diffüz alopesi görülebilir.

En sık görülen kardiyak bulgular sinus taşikardisi ve palpitasyondur. Tiroid hormonlarının kalp üzerine pozitif inotropik ve kronotropik etkileri vardır. Kardiyak out-put artışı, nabız basıncında genişleme, aortta sistolik üfürüme sebep olabilir. Kalbin artmış iş yükü oksijen gereksinimini artırarak altta yatan kalp hastalığı olanlarda veya yaşlılarda, anjina ve kalp yetmezliğine yol açabilir (43). EKG bulguları non spesifik olup; sinus taşikardisi, PR uzaması, QT kısalması, ST elevasyonu görülebilir.

Katabolizma artışı ve kilo kaybı sebebiyle halsizlik ortaya çıkabilir. Gastrointestinal motilite artışı, barsak hareketlerinde artma ve diyareye sebep olabilir. Diyare ve steatore kilo kaybına katkıda bulur.

Uykusuzluk ve iritabilite başta olmak üzere yorgunluk, ajitasyon, konsantrasyon güçlüğü görülebilir. İnce distal tremor, derin tendon reflekslerinde artma ve klonus diğer bulgular arasındadır.

Kas güçsüzlüğü, myopati, kemik rezorpsiyonu, ılımlı hiperkalsemi ve daha sık olarak hiperkalsiüri kas-iskelet sistemi bulguları arasındadır. Ağır tirotoksikoz durumunda kadınlarda oligomenore/amenore, ovulasyonun bozulması ve infertilite görülebilir. Erkekler jinekomasti, libido ve sperm sayısında azalma görülebilir.

Tiroidde özgü bulgulara bazen oftalmopati veya dermopatinin tiroid dışı bulguları eşlik edebilir. Bazı hastalarda ise, hipertiroidi semptom ve bulguları olmadan, sadece infiltratif hastalığın semptomları vardır. Bu hastalar, gözde batma ve yabancı cisim hissinden göz kürelerinde öne doğru büyümeye kadar değişen göz yakınmaları ile başvururlar. Von Basedow Graves, vakalarında pretibial bölgede gode bırakmayan, kırmızı-kahverenkte, plak/nodul ile karakterize bir cilt bulgusunu da bildirmiştir. Tiroid dermopati olarak adlandırılan bu bulgu, hemen her zaman oftalmopati ile birlikte görülmekte olup patogenezi bilinmemektedir. Genellikle tibia önünde görüle de vücudun başka bölgelerinde de olabilir. Histopatolojik incelemede subkutan dokuda hyaluronik asit birikimi ve bazen buna eşlik eden lenfosit infiltrasyonu saptanabilir.

Graves oftalmopatisinde olduğu gibi, TSHR sorumlu antijen olarak kabul edilmektedir. Hastaların serumları kullanılarak yapılan çalışmalarda pretibial fibroblastlarda TSH-bağlayıcı alanlar bulunmuştur (44). Ayrıca, pretibial bölgeden alınan fibroblastlarda TSHR mRNA ekspresyonu ve TSHR immunreaktivitesi saptanmıştır (45).

Tiroid akropaçi, ağır ve uzun zamandır varolan oftalmopati ve pretibial miksödem vakalarında görülür. El ve ayak parmaklarının distal falanklarında şişme, çomaklaşma, parmak cildinde renk değişikliği ve kalınlaşma ile karakterizedir. Cilt içinde glikozaminoglikan birikimi vardır. Görüntüleme yöntemleri ile subperiostal yeni kemik oluşumu görülebilir. Patogenezi bilinmemekle beraber, ortaya atılan hipotezler oftalmopati ve dermati ile benzerdir.

## **2.2. Graves Oftalmopatisi**

Graves oftalmopatisi (orbitopatisi), genellikle GH'na bağlı hipertiroidizmi olan hastalarda görülen bir göz hastalığıdır. Graves oftalmopatisi, aynı zamanda "tiroid ilişkili oftalmopati" veya "tiroid göz hastalığı" olarak da isimlendirilir. Çünkü, hastalık bazen kronik otoimmün tiroidite bağlı hipotiroidi vakalarında ya da ötiroid hastalarda da görülebilir.

Klinik olarak kanıtlanmış oftalmopati, göz kapağı bulguları dikkate alınmadığında, Graves hastalarında %10-25 oranında görülür. Göz kapağı bulguları tanı kriterleri olarak alınırsa, Graves hastalarının %30-45'inde görülür. Aşıkır göz hastalığı bulunmayan hastalarda bilgisayarlı tomografi veya yukarı bakışta göz içi basınç artışı tanı kriteri olarak kullanıldığında tanı oranı %70'i bulur. Fizik muyenede aşıkır bulguları olmayan hastaların %71'inde manyetik rezonans görüntüleme ile ekstraoküler kas genişlemesi saptanabilir. Graves hastalarının %5'inden azında ciddi göz hastalığı vardır (46-48).

Graves oftalmopati hastalarının yaklaşık %10'unda hipertiroidi görülmezken, hastaların çoğu anti-TSHR antikoruna veya anti-TPO antikoruna gibi otoimmün tiroid hastalığını gösteren kanıt vardır. Hipertiroidizmden bağımsız olarak, hastaların yaklaşık %85'inde 18 ay içinde Graves oftalmopatisi semptom ve bulguları aşıkır hale gelir. Graves oftalmopatili hastaların tanımladığı semptomlar gözde kum batma hissi, ışık

hassasiyeti, sulanma artışı, çift veya bulanık görme, göz arkasında basınç hissidir. Fizik muayenede ekstraöüler kas disfonksiyonu, proptosis, periorbital ve göz kapağı ödemi, konjonktival kemozis ve kızarıklık, lid lag ve retraksiyon, kuruluğa bağlı keratit görülür. Hastaların çoğunluğunda oftalmopati hafif iken, %3-5 kadar hasta ağrı ve çift görmeden tam görme kaybına kadar değişen bulgular gösterir (49)

Graves oftalmopatisini derecelendirmek için bazı sınıflama sistemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında en iyi bilineni NO SPECS sınıflamasıdır. Bu sınıflamanın dezavantajı, derecelendirme için kullanılan tanımların yetersiz ve keyfi olmasıdır. Tablo-2.3'te sınıflama gösterilmiştir.

1989 yılında Mourits ve ark. immunsupresif tedaviye yanıt verebilecek hastaları tanımlamak için yumuşak doku inflamasyonunun derecelendirmesinde bir puanlama sistemi geliştirdiler. Klinik aktivite skoru (KAS), olarak adlandırılan bu sisteme göre  $\geq 4$  olan skor, kortikosteroid tedavisine yanıt verebilecek hastaları seçmek için kullanıldı (Tablo-2.4).

Sınıf	Derecesi
0	No physical signs or symptoms (Semptom ve bulgu yok)
I	Only signs [eyelid retraction] (Sadece semptomlar var: gözkapağı retraksiyonu gibi...)
II	Soft tissue involvement (Yumuşak doku tutulumu 0: yok, a: minimum, b: orta, c: ileri)
III	Proptosis (Proptozis 0: yok, a: minimum, b: orta, c: ileri)
IV	Extraocular muscle signs (Ekstraoküler kas tutulumu 0: yok, a: uç bakış kısıtlı, b: belirgin kısıtlılık, c: göz küresinin sabitlenmesi)
V	Corneal involvement (kornea tutulumu 0: yok, a: noktalanma, b: ülserasyon, c: nekroz, perforasyon)
VI	Sight loss (görme kaybı 0: yok, a: VA: 0.63–0.5, b: VA: 0.4–0.1, c: VA < 0.1 – NLP]

Tablo-2.3. NO SPECS sınıflaması

Klinik Aktivite Skoru	
Göz küresi arkasında ağrı	Göz kapağında inflamatuvar şişme
Göz küresi hareketlerinde ağrı	Karünkül inflamasyonu
Göz kapağında kızarıklık	Son 1-3 ayda proptoziste $\geq 2$ mm artış

Konjoktivada kızarıklık	Son 1-3 ayda görme keskinliğinde azalma
Kemozis	Son 1-3 ayda göz hareketlerinde $\geq 8$ derece azalma

Tablo-2.4. Klinik Aktivite Skorlaması (Her değerlendirme kriteri için 1 puan verilerek toplam skor elde edilir)

Graves oftalmopati orbita görüntülemesi yağ doku, intraokuler ve ekstraokuler kas dokuları ile orbita içindeki yumuşak dokuda hacim artışını gösterse de, bazı hastalarda yağ doku artışı, bazılarında ise kas doku artışının daha ön planda olduğu saptanmıştır. Orbita kemikleri yumuşak dokudaki bu hacim artışına eşlik edemediğinden göz küresinin öne doğru çıkmasına yol açarak doğal bir orbital dekompresyon sağlar. Orbital septum ve ekstraoküler kasların tutucu etkisi nedeniyle proptozis derecesi sınırlanır. Proptozis derecesinin daha çok yağ doku hacmindeki artış ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Orbital doku hacminde artış, proptozis yanında, venöz ve lenfatik drenajı bozarak periorbital ve konjonktival ödeme de yol açar (50).

Ekstraoküler kasların histolojik incelemesi kas liflerinin normal yapıda olduğunu ancak, kas liflerini ayıran bağ dokusunun ödemli olduğunu göstermiştir. Bu perimisyal dokular, başlıca hyaluronan ve kondroitin sülfat gibi glukozaminoglikanları içerir. Glukozaminoglikanların artışı orbital doku hacminde artışa katkıda bulunmaktadır. Orbital hacim artışının kas liflerine kronik baskısı sonucunda, hastalığın ileri evrelerinde ekstraoküler kaslar bazen atrofik ve fibrotik bir hal alabilir.

### 2.2.1.Graves Oftalmopatisi Gelişimine Neden Olan Faktörler

Graves hastalığı genetik olarak kompleks bir otoimmün hastalıktır ve şüpheli genler ile genetik dışı faktörlerin etkileşimi sonucu geliştiği düşünülmektedir. Son on yılda yapılan çalışmalar hastalığın gelişimi açısından şüpheli birkaç geni ortaya koymuştur. Bu genler arasında MHC sınıf II allelleri (HLA-DR3, DQA1\*501, DQB1\*0201 vs), sitotoksik T lenfosit antijen (CTLA-4), T hücre reseptör  $\beta$  (TCR- $\beta$ ) zinciri, tümör nekrotizan faktör- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) ve Ig ağır zincir genleri bulunur. Ayrıca, Graves oftalmopati hastalarının orbitasında yeni yağ hücresi oluşumu (adipogenez) ve TSH reseptör ekspresyonunun artmış olması nedeniyle adipogenezle ilişkili gen

peroksizom proliferator-ilişkili reseptör  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) ve TSH reseptör genleri de araştırılmıştır (51).

Graves oftalmopatili hastalarda iki IL-23R polimorfizmi olduğu görülmüş ve oftalmopatisiz hastalarla kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur. Serum soluble CTLA-4 konsantrasyonu, ciddi oftalmopatide ılımlı oftalmopatiye göre daha yüksek seviyede bulunmuş ve bu yükseklik kısmen Jo31 ve CT60 gibi CTLA-4 gen polimorfizmlerinin varlığı ile açıklanmıştır (52). Asya popülasyonunda bu polimorfizm ve iki farklı tek nükleotid polimorfizmi (318/T ve 49A/G) Graves oftalmopatisi ile ilişkili bulunmamıştır (53). Farklı popülasyonlarda bu genlerin replikasyonunun farklı olması doğru olmadığını göstermemektedir, çünkü değerlendirme sırasında farklı ırklarda enfeksiyon ajanları farklı immun-yanıt polimorfizmlerine yol açmış olabilir. Sonuç olarak bir otoimmün hastalık farklı popülasyonlarda farklı genlerle ilişkili olabilmektedir. Pro(12)Ala peroksizom proliferator-ilişkili reseptör  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) gen polimorfizminin dağılımı Graves oftalmopatili hastalarda adipogenezin genetik predispozisyonunu belirlemek için yapılmıştır (54). Oftalmopatili ve oftalmopatisiz GH'da bu polimorfizm eşit olarak bulunmuştur, ancak Graves oftalmopati hastalarında polimorfizmin varlığı daha hafif ve daha az aktif hastalığa işaret etmektedir. Çalışmalar GH ile ilişkili pek çok genin varlığını göstermiş olsa da, Graves oftalmopatisinin fenotipini belirleyen genetik faktörler bulunmaktadır. En son yapılan tüm genom çalışmaları, farklı kromozomlar üzerindeki üç ilişkili lokusun GH açısından genetik yatkınlığa yol açabileceğini öne sürse de, Graves oftalmopati açısından ailevi faktörlerin varlığını desteklememiştir (55).

Tüm bulgular Graves Oftalmopatisinin, temelinde genetik ve genetik dışı faktörler bulunan kompleks bir hastalık olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar tanımlanmış olan polimorfizmlerin hiçbiri GH'nı önleyici veya tedavi edici genetik bir testin yapılması gerektiğini ispatlamamıştır. 114 Graves oftalmopatili hastadan oluşan bir aile çalışması, ciddi oftalmopati gelişiminde ailesel faktörlerin asıl rolü oynamadığını desteklemektedir (56). Bahsedilen genlerin transkripsiyon ve translasyonunu etkileyen postgenetik mekanizmalar Graves oftalmopati gelişiminde sorumlu olabilir.

Sigara içiciliği ile Graves oftalmopati arasındaki çarpıcı ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır. Bir grup araştırmacı GH ve oftalmopatili hastaların %64'ünün, aşikar oftalmopatili hastaların % 47.9'unun, toksik MNG hastalarının %23.6'sının, ötiroid MNG hastalarının %30.4'ünün, Hashimoto tiroiditlilerin % 33.5'inin ve normal kontrollerin %27.8'inin halen sigara içicisi olduğunu ya da sigarayı bırakmış olduğunu göstermiştir (57). RAI veya antitiroid ilaç tedavisi almakta olan yeni tanı konulmuş Graves Hastalığında sigara içmek Graves oftalmopatisi için en önemli risk faktörü olarak tesbit edilmiştir (58). GO tanılı hastalarda yapılmış bir çalışmada radyoaktif iyot ile tedavi edilmiş sigara içicilerinde GO gelişimi ve progresyonunda artış saptanmıştır. Bu çalışmada sigara, GO açısından radyoaktif iyot tedavisine ek bir risk getirmiştir. Radyoaktif iyot tedavisi steroid ile birleştirildiğinde Graves oftalmopati progresyonu sigara içmeyenlerde %63.8 ve içicilerde %14.9 oranında önlenmiştir (59). Pasif sigara içiciler veya ikinci derece sigara içicilerin GO ilişkisi Avrupa ülkelerinde çocukluk çağı GO araştıran bir ankette dolaylı olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, sigara içme prevalansı > %25 olan toplumlarda <10 yaş çocuklarda GO gelişme oranı oldukça yüksek (%52) saptanmıştır. Sigara içme prevalansı düşük olan ülkelerde (%19) bu oran düşük bulunmuştur (60).

Bu ilişkinin altında yatan neden bilinmese de, sigara içicilerinde içmeyenlere göre tiroidin daha büyük olduğu ve daha yüksek tiroglobulin seviyeleri olduğu görülmüştür. Orbital hipoksi veya sigaradaki serbest radikaller orbital fibroblastlarda proliferasyona yol açıyor olabilir (61). Buna bağlı olarak orbital dokuda glikozaminoglikan gibi hidrofilik makromoleküllerin birikimi artmaktadır (62). Sigara içicilerinde IL-1 reseptör antagonisti seviyesi içmeyenlerden daha düşüktür ve bu durum orbital inflamasyon üzerinde IL-1'in negatif etkilerinin artmasına yol açabilir (63-64). Ayrıca Graves oftalmopati ve hipertiroidizm olan hastalar sadece hipertiroidizm olanlarla kıyaslandığında IL-6 reseptör seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Ancak sigara içen ve içmeyen graves oftalmopatili hastalar arasında IL-6 reseptör seviyesi açısından fark saptanmamıştır (65). Dolayısıyla IL-6 reseptör seviyesindeki artış, sebepten çok orbital hastalık varlığını göstermektedir.

Graves hipertiroidisi ve GO arasındaki yakın klinik ilişki, her iki durumda da altta yatan sebebin tiroid ve orbitada bulunan TSH reseptörlerine karşı gelişen immunreaktivite olduğunu düşündürmektedir. Orbital adipoz dokunun TSHR içermesi



fikri, Gine domuzu retro orbital adipoz dokusuna veya orbital konnektif doku membranına TSH bağlanmasını gösteren erken çalışmalara dayanmaktadır (66-67). GO'de TSHR'nün bir otoantijen olarak düşünülmesinin sebebi etkilenen orbital dokuda eksprese olmasıdır. Bu dokularda TSHR'nün olduğunu tanımlayan çalışmalarda pek çok yöntem kullanılmıştır. Çalışmaların sonuçları GO ve normal orbital adipoz dokunun her ikisinde de TSHR mRNA ve protein olduğunu göstermiştir (68). Normal orbital adipoz dokularla karşılaştırıldığında, GO adipoz dokusunda TSHR ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca klinik aktivite skoru ile pozitif bir korelasyon saptanmıştır (69).

TSHR antikorları iki farklı metod ile ölçülebilir. "Tirotropin bağlayıcı inhibitör immunglobulin" (TBII) saflaştırılmış veya rekombinan TSHR'lerine TSH bağlanmasını inhibe eden hasta immunglobulin miktarını ölçmek için kullanılır. Böylece reseptörü hedefleyen tiroid-stimule edici immunglobulin (TSI) ve tiroid bloke edici antikor düzeylerini ölçer. İkinci metod hücre kültüründe TSHR-stimüle edici ve bloke edici antikorların cAMP üretimi üzerindeki etkilerine göre ayırmalarını sağlar. Bu yöntem nötral TSHR antikorlarını da ölçer. TSHR stimüle edici ve bloke edici antikorların tiroid fonksiyonu üzerine fizyolojik etkileri anlaşılmış olsa da, bu otoantikorların orbita ve dermal fibroblastlardaki TSHR sinyalini nasıl etkilediği hala açık değildir. Henüz ölçülebilir olmayan TSHR antikorları adenilat siklaz dışında başka yolları kullanıyor olabilir. Bu durum GO yanında tiroid dermopati ve akropaki gibi tiroid dışı bulgulara da yol açıyor olabilir.

Graves Hastalığı olan 100 hastada TBII ve TSI ile GO arasındaki ilişki Khoo ve ark. tarafından bildirilmiştir (70). Sigara içmeyen hastalarda yapılan bu çalışmada birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü TSI çeyreklerinde GO prevalansı sırası ile %20, %36, %52 ve %64 bulunmuştur. Bu hasta grubunda TBII ve GO arasında bir ilişki saptanmamıştır. Noh ve ark. (71) ile Goh ve ark.'nın (72) çalışmalarında okuler bulguları olan ve olmayan hipertiroidizmlili hastaları karşılaştırdıkları çalışmalarında GO ile TSI arasında benzer şekilde güçlü bir ilişki tesbit edilmiştir. Kung ve ark. tarafından bildirilen bir çalışmada RAI sonrası yeni gelişen GO ile TRAb arasında korelasyon olmadığı bildirilmiştir (73). Mourits ve ark. ile Gerding ve ark. tedavi edilmemiş orta derecede GO olan, ötiroidi sağlanmış ve henüz tedavi edilmemiş hastalarla yaptıkları çalışmalarında, TSI ve TBII ile oftalmopatinin klinik aktivite skoru arasında kuvvetli ve

direk bir korelasyon bulmuşlardır. Ayrıca otoantikör titreleri ile propitozis arasında da anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir. (74-75).

### **2.3. Toksik Multinoduler Guatr**

Toksik multinoduler guatrın patogenezi, onun öncülü olan ötiroid multinodüler guatrdan ayrı düşünmemek gerekir. Hastalığın iki önemli özelliği olan yapısal-fonksiyonel çeşitlilik ve fonksiyonel otonomi zaman içinde ortaya çıkar. Uzun zaman içerisinde ötiroid multinodüler guatr ilerleyerek subklinik hipertiroidizm ve sonrasında TMNG gelişir. Otonom fonksiyonunun artması hastalığın ötiroid evreden toksik evreye geçişine sebep olur. Ancak bu değişikliğin mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

#### **2.3.1. Toksik Multinoduler Guatr'ın Patogenezi**

Multinodüler guatrın prevalansı, iyot eksikliği olan bölgelerde daha fazladır. MNG'de nodüller benign olup; WHO sınıflamasına göre, histolojik açıdan enkapsüle lezyonlar (gerçek adenomlar) ya da kapsül içermeyen adenomatöz nodüller şeklinde tanımlanmaktadır (76). Nodülleri; sintigrafik incelemelerdeki iyot tutulum oranlarına göre, fonksiyonel açıdan "sıcak", "normo-aktif", "soğuk" olarak sınıflandırılabilirler. Tüm tiroid nodüllerinin yaklaşık % 50-85'i soğuk, %40'ı sintigrafik olarak tanımlanamaz ve % 10'u sıcak olup ortamdaki iyod kaynaklarının coğrafi olarak gösterdiği dağılım çeşitliliğine paralel olarak prevalansı değişebilmektedir (77-78).

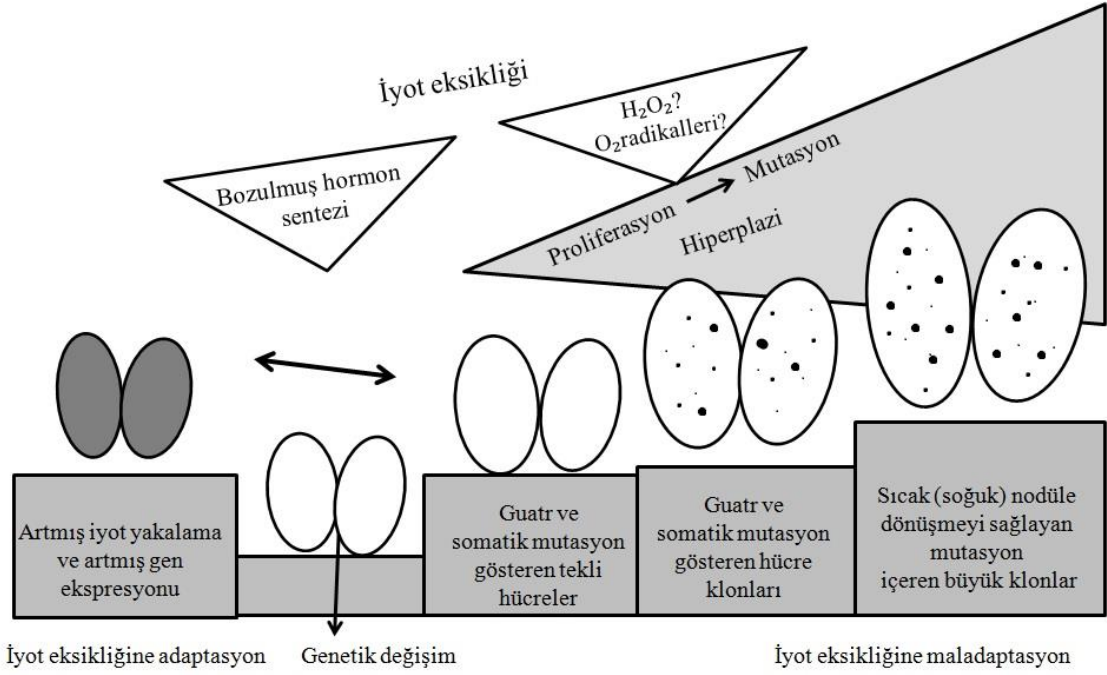
Ötiroid ve toksik multinodüler guatr klinik, patolojik ve moleküler açıdan farklı özellikler barındıran miks nodüllerden oluşan hastalıklardır. Bu yüzden aynı bezde hiper/hipo/normal fonksiyon gösteren tiroid nodülleri bulunabilir. Multinoduler guatrda her bir nodülün fonksiyonel özelliklerinin toplam dengesi hastanın tiroid fonksiyon durumunu gösterir. Bu durum ötiroidizm (normal TSH ve normal serbest

tiroid hormon düzeyleri), subklinik hipertiroidizm (düşük ya da suprese TSH ve normal serbest tiroid hormon düzeyleri), aşikar hipertiroidizm (suprese TSH ve yüksek tiroid hormon düzeyleri) tabloları ile karşımıza çıkabilmektedir. Fonksiyonel durum sabit olmamakla beraber TMNG tanılı hastaların çoğunda uzun zamandan beri MNG öyküleri vardır (79). Genelde MNG oluşumu iki aşamada gerçekleşir: guatra yol açan tiroid epitel hücre proliferasyonunun yaygın artışı ve nodüllere yol açan tiroid epitel hücre proliferasyonunun fokal artışı. Yaygın proliferasyon açısından en sık sebepler iyot eksikliği veya diğer guatrojenik uyarılar iken, fokal proliferasyon için bilinen en sık uyaran somatik bir mutasyon varlığıdır.

Ötiroid guatr gelişimi büyük olasılıkla tiroid hiperplazisi ile başlayan ve nodül oluşumuna kadar devam edebilen ilerleyici bir süreçtir. Bu yüzden tiroid fizyolojisi ve hormon sentezinde önemli rol oynayan genlerdeki defektler iyot eksikliğinde guatr gelişimine yol açabilirler. Bu defektler acil bir yanıt olarak dishormonogeneze ve dolaylı olarak dishormonogenezin geç bir neticesi olarak, bir maladaptasyon olan, nodül oluşumuna yol açar (80). Tiroid bezindeki spontan mutasyon oranı, diğer organlardan (karaciğer ile karşılaştırıldığında) yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Spontan mutasyon oranlarının fazla olması, replikasyon hızının yüksekliği; mutasyon tamirini önleyerek tiroidin mutajenik yükünü artırır. Böylece, tirosit fizyolojisinde temel rol oynayan genlerde rastlantısal değişim ve etkilenmeler ortaya çıkar. Tiroid hormon sentezinde rol alan proteinleri kodlayan genler arasında tiroglobulin (TG) geni, tiroid peroksidaz (TPO) geni, sodyum-iyod simporter (SLC5A5) geni, Pendred Sendromu (SLC26A4) geni, TSH reseptör (TSHR) geni, iyodotirozin deiyodinaz (DEHAL1) geni ve tiroid oksidaz 2 (THOX2) geni bulunur. Ötiroid guatr olan hastalarda TG geni, SLC26A4 ve SLC5A5 genlerinde mutasyonlar saptanmıştır (81-84).

Iyod eksikliğine bağlı gelişen tiroid hiperplazili hayvan modellerine göre, fonksiyonel aktivite artışının yanında tiroid hücre sayısında da önemli bir artış vardır. Bu iki olay mutasyonların ortaya çıkışını yönetmektedir (85). Tiroid hormon sentezinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve serbest radikal üretiminde artışa yol açtığı ve bu durumun DNA hasarına ve mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir (86)

Somatik mutasyonların saptanması yanında, otonom tiroid nodülleri ve soğuk tiroid nodüllerinin klonal temelinin tanımlanmasına dayanarak, tiroid nodül oluşumunun basamakları gösterilmiştir (şekil-2.1).



**Şekil-2.1.** Tiroid Nodülü Oluşum Hipotezi

İyot eksikliği, guatrojenik gıdalarla beslenme ya da otoimmün olaylar diffüz tiroid hiperplazisine neden olur. Tiroid hiperplazisinin bu basamağında hidrojen peroksit etkisine bağlı olarak oluşan DNA hasarı sonucunda artmış proliferasyon mutasyon yükünde daha fazla artışa yol açar. Bu spontan mutasyonların bazıları; cAMP kaskadının aktivasyonunu sağlayarak büyüme ve fonksiyonu stimüle eder. Sonuç olarak büyümekte olan tiroid dokusunda IGF-1, TGF- $\beta$ , epidermal büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin gen ekspresyonları artar. Büyüme faktörlerinin birlikte uyarılmasıyla hücreler bölünerek, küçük klonlar oluştururlar. Mutasyon taşıyan küçük klonlar, büyüme faktörlerinin gen ekspresyonu olmadan kendi kendilerini stimüle ederek çoğalmaya başlarlar. Daha sonra oluşan bu küçük odaklar nodül formasyonuna dönüşürler. Bu somatik mutasyonların bazıları TSH-R mutasyonlarıdır ve tiroid nodüllerinin otonom fonksiyon artışına yol açar. Hiperfonksiyone tiroid adenomlarında TSHR aktivasyonuna yol açan somatik nokta mutasyonlarının varlığı ilk olarak Parma ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (87). Farklı çalışmalarda, otonom fonksiyone tiroid nodüllerindeki Gs $\alpha$  mutasyonlarının ve TSHR' nün prevalansı sırasıyla % 8-75 ve % 8-82 olarak bildirilmiştir (88-90)

Bu mekanizmanın alternatifi olarak, iyot eksikliğine maruz kalındığında guatr gelişmeyen bireylerde tiroid dokusu hiperplazi olmaksızın adaptasyon sağlıyor olabilir (91-94). Bu adaptasyonun mekanizması tam olarak anlaşılmasa da, fare modellerinden elde edilen verilerle, iyot eksikliğine yanıt olarak TSHR mRNA, NIS ve TPO ekspresyonlarında artışın tiroid hücrelerindeki iyot döngüsünde artmaya yol açtığı sonucuna varılmıştır (95). Vasküler endotelial büyüme faktörü gibi faktörlerin artması sonucunda tiroid kanlanması artması, tiroid dokusunun iyod eksikliğine adapte olması için ek mekanizmalardır (96). Yakın zamana kadar ötiroid guatrın iyot eksikliğinin sonucu olarak ortaya çıktığı bilinmekteydi. Ötiroid guatr gelişiminde bazı guatrojenler ve sigara en önemli çevresel risk faktörleridir (97-98). Sigara etkisi, tiyosiyanatın tiroid dokusuna iyot alımını yarışmalı inhibisyon yoluyla engellemesi sonucu ortaya çıkar (99). Etiyolojik açıdan önemli olan diğer faktörler cinsiyet, yaş ve artmış vücut kitle indeksidir (100). Bir guatrojenin etkisi iyot eksikliğinin derecesine bağlıdır ve bu yüzden iyot eksikliği bölgesel ve kişisel farklılık gösterir. Çevresel faktörler ve kişisel genetik faktörlerin etkileşimi en sonunda guatrın ortaya çıkışında rol oynar. Kadınlarda ve monozigotik ikizlerde yüksek oranda görülmesi genetik yatkınlığı gösterir (101). Erken yaşlarda ötiroid guatrın ailesel yığılma göstermesi güçlü genetik bağı öne sürse de, çevresel faktörler de katkıda bulunmakta veya tetiklemektedir.

#### **2.4. Proteomiks Yöntemine Genel Bakış**

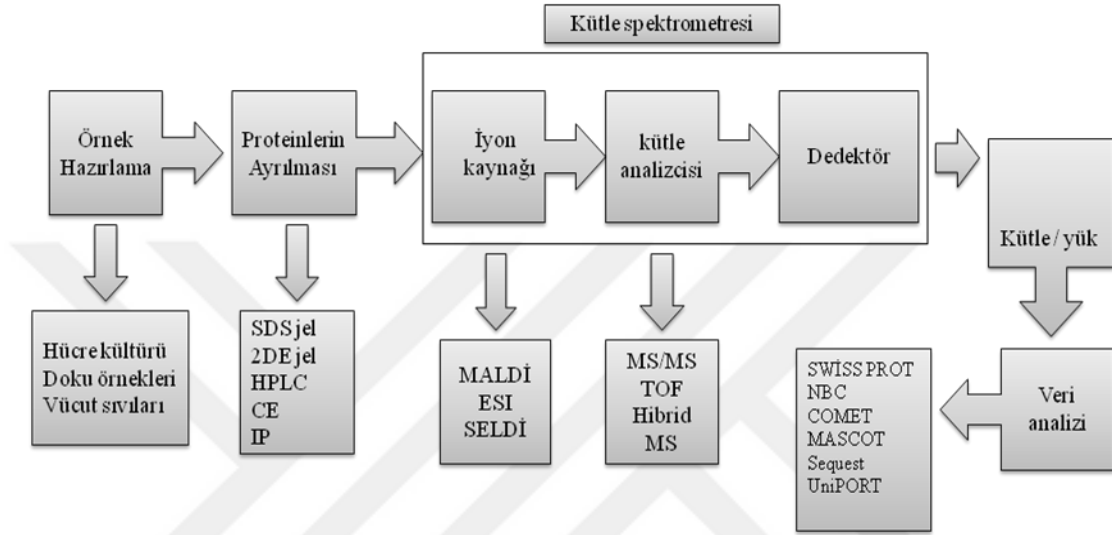
Proteomiks yöntemi, hücrelerde veya vücut sıvılarındaki proteinlerin gösterilmesi ve belirli şartlar altında biyolojik sistemde oluşan değişikliklerin protein düzeyinde incelenmesidir. Proteomiks terimi, ilk kez 1997 yılında, ‘genomiks’ ile benzeşen bir kelime bulmak amacıyla kullanılmıştır. Proteom, belirli bir zamanda bir

organizma veya sistem tarafından üretilen proteinlerin tamamını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Proteom (PROTein-genOME), ilk kez 1994'te Marc Wilkins tarafından, bir genomun ifade ettiği tüm proteinleri tanımlamak için önerilmiş ve 1995 yılında doktora tezinde kullanılmıştır (102-103). Biyolojik sistemlerin incelenmesinde, "genomiks" ve "transkriptomiks"ten sonraki basamak proteomiks'tir. Bir organizmanın genomu, ortaya çıkan proteinlerin translasyon sonrası değişimleri hakkında bilgi veremediğinden hastalıklarla ilişki kurmamıza yardımcı olmaz. İnsan genomunda yaklaşık 30.000 gen olmasına rağmen, en az 60.000 fonksiyonel polimorfizm nedeniyle ortaya çıkan proteinler inanılmaz bir çeşitlilik gösterir. Ayrıca, genomun değişmeyen yapısının tersine, proteomun içeriği bir hücreden diğerine ve ilerleyen zaman içerisinde değişir. Transkriptomiks alanındaki en son bilgiler, RNA'nın tamamının proteine dönüştürülmediğini göstermiştir. 23 farklı insan hücre dizisi içeren bir çalışmada, protein ekspresyonunun yalnızca %33'ünün RNA ile ilişkili olduğu görülmüştür. mRNA proteine dönüşmeden önce hızlıca ortadan kaldırılıyor, yetersiz translasyona uğruyor veya bu sırada değişim geçiriyor olabilir. Değişim sadece RNA'nın translasyon basamağında değil, translasyon sonrasında gerçekleşir. "Translasyon sonrası modifikasyon", "alternatif splicing" gibi değişimler sonucunda tek bir transkriptten birden fazla protein üretilir. Translasyon sonrası modifikasyon çoğu kez proteinlere karbonhidrat ve fosfat gibi grupların eklenmesi (glikozilasyon, fosforilasyon, asetilasyon vb.) ile olur. Bu modifikasyonları incelemek için "fosfoproteomiks", "glikoproteomiks" gibi metodlar kullanılır (104).

Proteomiks çalışmaları, hastalık evresi, tedavi, yaş ve cinsiyet gibi pek çok iç ve dış etken karşısında protein ekspresyonunun değişimini, hücre ve doku seviyesindeki yerini, yapı ve fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olacak bir yöntemdir. Bunların ötesinde, proteomiksi cazip bir çalışma metodu kılan sebep, yeni biyobelirteç arayışlarıdır. Patolojik durumlara bağlı olarak ekspresyonu değişen bir protein, yüksek riskli bireyleri tespit etme yanında erken evrede tanı koyma ve prognozu belirleme imkanı veren bir biyobelirteç olabilir. "Food and Drug Administration" (FDA)'a göre biyobelirteç, normal biyolojik durumun, patojenik durumun veya tedaviye yanıtın göstergesi olan, herkes tarafından ölçülebilen ve değerlendirilebilen bir özelliği tanımlar. İdeal bir biyobelirteç belirli bir hastalık için yüksek özgünlükte ve

hassasiyette, standart sonuç verebilir ve kolay kullanılabilir olmalıdır (105). Ancak günlük klinik pratiğimizde kullandığımız biyobelirteçler bu özelliklere sahip değildir.

Bir proteomiks çalışmasında izlenecek ana basamaklar Şekil-2.2'de gösterilmiştir.



Şekil-2.2. Proteomiks çalışmalarının adımları. Kısaltmalar: SDS; Sodyum Dedosil Sülfat, 2D; iki boyutlu, HPLC; High-performance Liquid Chromotography, IP; Immunoprecipitation, CE; Capillary electrophorsis, TOF; Time of Flight, MS; Mass spectrometer

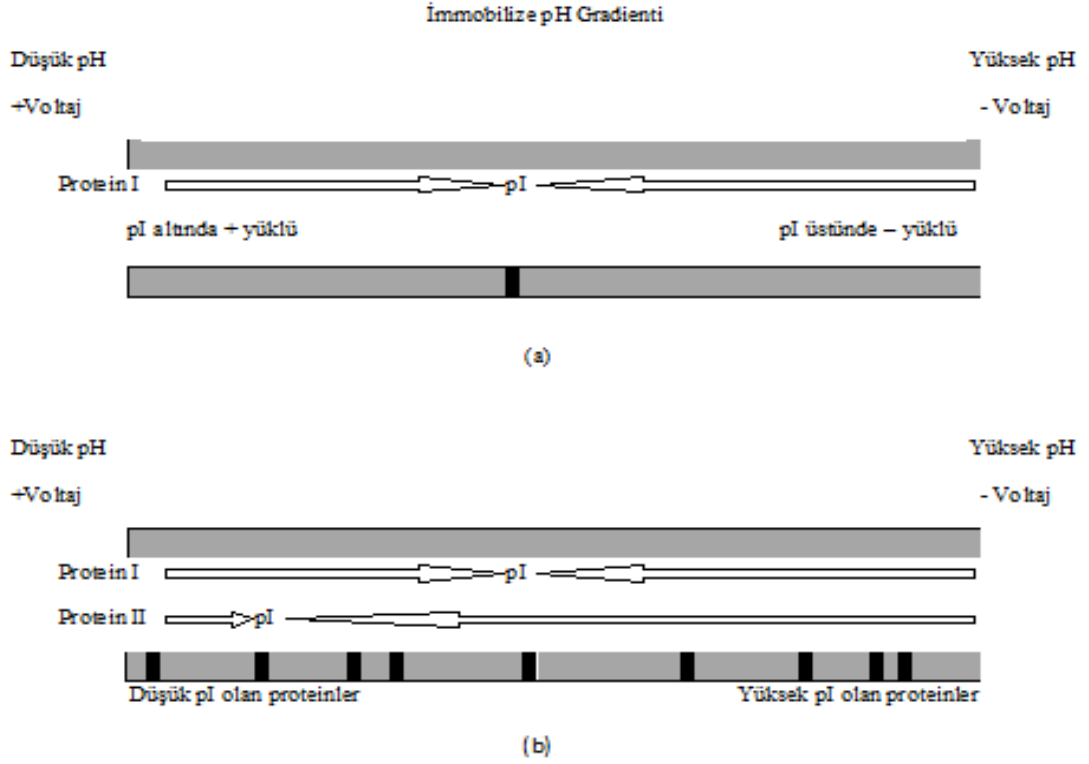
1. Örneklerin Hazırlanması: Kullanılan örnek materyaline uygun bir protokol ile protein özütleri elde edilir. Proteomiks çalışmasında uygun örnek numunesi belirlemek önemlidir. Yapılmış klinik çalışmalarda vücut sıvıları (kan, idrar, amniyon sıvısı, BOS vb.), doku örnekleri ve hücre kültürleri kullanılmıştır. Dokuların, her biri kendi proteomuna sahip, farklı safhalarda bulunan birçok farklı hücreden oluşması, proteom çalışmalarında problemler ortaya çıkmaktadır. Bu sorunu aşmak için hücre kültürüyle çalışmalar yapılmıştır.

2. Proteinlerin ayrıştırılması: Agaroz ve poliakrilamid jelde veya kromatografi ile jelsiz ortamda peptid ve proteinler ayrıştırılır. Kullanılan yöntemler arasında SDS jel elektroforezi, 2D-JE, High-Performance Liquid Chromotography (HPLC), Immunopresipitasyon (IP), kapiller elektroforez (CE) sayılabilir.

Günümüzde yaygın kullanılan 2D-JE, ilk kez 1970'lerde yüzlerce proteini aynı anda gösterebilmesinden dolayı geliştirilmiştir. Bu yöntem ile proteinler iki basamaktan oluşur. İlk basamakta İzoelektrik Fokuslama (İEF) denilen yöntemle izoelektrik noktalarına, ikinci basamakta ise poli-akrilamid jel elektroforezle molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılırlar. 1980'lerde ticari İmmobilize pH Gradient (IPG) striplerinin kullanılmaya başlanması, bu yöntemin daha kolay uygulanmasını sağlamıştır. Sabit pH gradienti altında güçlü bir elektrik akımı verilmesinin ardından proteinler stripler üzerinde hareket ederler. Pozitif yüklenen proteinler katoda doğru, negatif yüklenenler ise anoda doğru hareket ederek izoelektirik noktalarına (pI) ulaştıklarında yüklerini kaybeder ve dururlar. Böylece her bir protein kendilerine ait pI'larında odaklanmış olur (Şekil-2.3). İkinci basamakta, proteinler SDS-PAGE üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. 2D-JE'in en önemli avantajı tek jel üzerine yüzlerce ve hatta binlerce proteini aynı anda görmemizi sağlamasıdır. Proteinlerin jel üzerinde ayrılmasından sonra görünür hale gelmeleri için Commassie, gümüş veya floresan boyalarla (SyproRuby, Cy5) boyanması gerekir. Jeller arasında farklı yoğunluk gösteren spotlar seçilerek, karşılaştırılan örneklerin protein ekspresyonlarındaki farklılık tesbit edilir (106).

Günümüzde kullanılmaya başlanan yeni bir yaklaşım "differential in-gel electrophoresis" (DIGE) yöntemidir. Bu yöntemde çalışılacak örnek grupları ve bunların karışımından oluşan bir internal kontrol 2D-JE öncesi floresan boya ile boyanır. Bu yöntem ile jeller arasındaki varyasyonlar en aza düzeye indirilmiş olur.





Şekil-2.3. IPG striplerinde proteinlerin fokuslanması. (a) Tek protein, (b) Protein karışımı.

3. Kütle Spektrometresi: İyon kaynağı, analizatör ve dedektör olmak üzere üç bölümden oluşur. Analiz edilecek moleküllerin iyonize edilmesinin ardından analizör tarafından kütle/yük ( $m/z$ ) oranına göre ayrılması ve dedektör tarafından tesbit edilmesi gerekir. Çeşitli yöntemlerde kullanılan iyon kaynakları arasında MALDI ( Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization, ESI (Electrospray Ionization) bulunur. Kütle analizcileri: "Magnetic Sector Mass Spectrometers, Quadrupole Mass Spectrometers, Time-of-Flight Mass Analyzers (TOF), Trapped-Ion Mass Analizörleri, Hibrid MS"dir.

MALDI yönteminde, katı bir matrix üzerine taşınmış olan proteinler lazerle iyonlaştırılarak gaz fazına taşınır. İyonize proteinler, elektrik ortamda hareketlenir ve hız kazanır. Her bir iyonun hızı, kütle ve yüküne bağlı olarak değişir. İyonların kütle/yük oranları dedektör tarafından kaydedilir.

SELDI-TOF yönteminde proteinler 2D-JE gibi yöntemleriyle ayrılmadan direkt spektrometre tarafından saptanır. Proteinler protein biyoçipinin katı yüzeyinde yakalanır.

Bir dizi yıkama işleminden sonra elde edilen peptid veya proteinler, tıpkı MALDI'de olduğu gibi TOF/MS ile analiz edilir.

4. Verilerin değerlendirilmesi: Bu basamak biyoinformatik ile ilişkilidir. Elde edilen m/z oranları veri bankaları ve arama motorundaki yazılımlar kullanılarak tanımlanır.

Dumont ve ark.'nın 1990'larda primer köpek tiroid hücre kültürlerinde ilk kez 2D-JE yapımlarından sonra, in vitro tiroid hücre sistemleri üzerine yapılan yayınların sayısı hızla artmıştır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Endokrinoloji polikliniğinde Graves hastalığı tanısı ile takip edilmekte olan 12 hasta (n=12, grup G) ve kontrol grubu olarak TMNG tanısı ile takip edilen 12 hasta (n=12, grup T) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen Graves hastalarının yaş ortalaması  $36 \pm 9,9$ , TMNG hastalarının yaş ortalaması  $54 \pm 12,7$  yıldır. Her iki hasta grubunun cinsiyet ve yaş dağılımları Tablo1 ve Tablo2'de gösterilmiştir.

Olgulara bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak bu çalışmaya gönüllü olarak katılmaları sağlanmıştır. Çalışmamızın lokal etik kurul başvurusu ve onayı mevcuttur.

Grup G	Hasta sayısı ve yüzdesi (n ve %)	Yaş Ortalaması (yıl) $\pm$ SD
Kadın	9 ve %75	$35,8 \pm 11,3$
Erkek	3 ve %25	$37 \pm 5,1$
<b>Toplam</b>	<b>12</b>	<b><math>36 \pm 9,9</math></b>

**Tablo3. 1.** Graves Hastalarının yaş ve cinsiyet dağılımı

Grup T	Hasta sayısı/yüzdesi (n ve %)	Yaş Ortalaması (yıl) $\pm$ SD
Kadın	8 ve %66,4	$50,2 \pm 13$
Erkek	4 ve %33,6	$62 \pm 8,6$
<b>Toplam</b>	<b>12</b>	<b><math>54 \pm 12,7</math></b>

**Tablo3.2.** TMNG Hastalarının yaş ve cinsiyet dağılımı

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubunun klinik, laboratuvar bulguları ve görüntüleme tetkikleri retrospektif olarak dosyalarından elde edilmiştir. Graves hastalarının 7-36 ay (ortalama 26,3 ay), TMNG hastalarının 0-60 ay (ortalama 13 ay) antitiroid ilaç ile takip edildikleri, anti-tiroid tedavi kesildikten sonra klinik ve biyokimyasal olarak hastalık bulgularının ortaya çıkması nedeniyle tekrar değerlendirilen hastalara kalıcı tedavi olarak operasyon kararı verildiği saptanmıştır. Dosya verileri incelenerek hastaların oftalmopati varlığı, oftalmopatiye yönelik tedavi seçeneği, ek otoimmün hastalıkları ve ailede otoimmün tiroid hastalık varlığı,

kullandıkları antitiroid ilaçlar belirlenmiş; oftalmopati tanısının muayene bulgusu, hertel oftalmometre ve/veya ortiba MR incelemesi ile konulduğu, NO SPECS ve klinik aktivite skorlaması ile oftalmopati derecesinin belirlendiği saptanmıştır.

Tüm hastalar antitiroid tedavi ile ötiroidizm sağlandıktan sonra opere edilmiştir. Operasyon zamanı önceden belirlenerek, operasyon sırasında alınan taze tiroid doku örneklerinin PBS tamponu içinde klinik araştırma birimine ulaşması sağlanmıştır. Doku örnekleri sıvı nitrojen tankı içinde dondurulduktan sonra tüm örneklerin aynı zamanda incelenmesi için -80 C’de saklanmıştır.

### **3.1. Graves Hastaları ve TMNG Hastalarının Protein Profillerinin Proteomiks Yöntemler Kullanılarak Karşılaştırılması**

-80C’de saklanan dokular eş zamanlı çalışılmak üzere dondurucudan çıkarıldı ve aşağıda sıralanan basamaklar doğrultusunda proteomiks yöntemler uygulandı.

1. Tiroid örnek materyallerinden protein izolasyonu yapmak için, dokular fiziksel ve kimyasal metodlar kullanılarak parçalandı. T-Per<sup>®</sup> Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, ABD) ile kimyasal, Blut Blander (Next Advance, ABD) cihazında 0.5 mm Zirkonyum boncuklar (Glass Beads Next Advance, ABD) ile fiziksel parçalama yapıldı.

2. Tez çalışmamızdan önce rastgele seçilen tiroid doku örnekleri ile yaptığımız ön çalışmada, dokuların yüksek miktarda protein içerdiğini ve örnekler arasında protein içeriği açısından büyük farklılık olduğunu gördük. Bu yüzden 2D-JE sırasında jellere uygun miktarda protein yükleyebilmek için her bir örneğin protein konsantrasyonu ölçüldü. Ölçüm için BioRad tarafından “RC-DC protein assay” adı altında ticari olarak kullanıma sunulan *değiştirilmiş Lowry assay*(Lowry et al. 1951) yöntemi kullanıldı.

3. Ön çalışmada edindiğimiz bir başka sonuç da, örneklerin yüksek oranda tiroglobulin içerdiği ve tiroglobulin miktarının örnekler arasında varyasyon gösterdiğiydi. Tiroglobulin nedeniyle diğer proteinler jeller üzerine daha az miktarlarda yüklenmiş ve ayrıca jel üzerindeki protein spotlarının bir kısmı bu yüksek miktardaki tiroglobulin nedeniyle kapanarak okunamamıştı. Bu yüzden, her bir örneğin protein miktarı bir

düzeltilme yöntemi kullanılarak jellere yüklendi. Düzeltme için kullandığımız yöntem, Vimentin ile normalizasyondur. Vimentin hücre membran iskeletinde bulunan internal bir protein olup, hücrelerde eşit miktarda bulunur. Vimentin ile Western Blot yapıldıktan sonra, örnek miktarları hesaplanan bir düzeltme katsayısına göre ayarlandı.

4. Protein özütlerini tuzlar, nükleik asitler, iyonik deterjanlar ve lipid gibi maddelerden temizleyebilmek için ‘‘The ReadyPrep 2-D Cleanup’’ adında ticari protein çöktürme kiti (BIO-RAD) kullanıldı.

5. İki boyutlu jel elektroforezinin (2D-JE) birinci boyutunda proteinler İzoelektrik Fokuslamaya (İEF) tabi tutuldu. Bu işlem için 11 cm’lik, pH 3-10 İmmobilize pH Gradient (IPG) stripler (pH 3-10 ve pH 5-8 ReadyStrip, BioRad) kullanıldı.

6. 2D-JE’nin ikinci boyutunda proteinler % 12 SDS poliakrilamid jellere yerleştirilerek elektroforeze tabi tutuldu (35 mA 30 dk, 48 mA 5 saat + 16 °C’de).

7. 2D-JE üzerinde ayırımı ve haritalaması yapılan proteinleri görünür hale getirmek için özel bir kimyasal madde ile boyama yapıldı. Yüksek tekrarlanabilirlik, düşük jeller arası varyasyon ve spotlar için yüksek sensitivite gösteren ideal bir boya olduğundan, SyproRuby (BioRad, ABD) tercih edildi.

8. Boyama sonrası görünür hale gelen spotların jel üzerinde görüntülenmesi VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi.

9. PDQuest Advanced programı kullanılarak spotların analizi yapıldı.

10. İstatistiksel olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-kesici otomatize sistem (Exquest Spot Cutter, Bio-Rad, ABD) ile gerçekleştirildi.

11. Kesilen spotlara jel içinde Tripsin ile tekrar kesim yapılarak peptidlere ayrıldı.(in gel digestion).

12. Proteinlerin tanımlanması için MALDI-TOF kütle spektrometrisi kullanıldı. Böylece peptidlerin kütle/yük (m/z) oranları tanımlandı.

13. MASCOT yazılımı kullanılarak elde edilen m/z oranlarına göre proteinler tanımlandı.

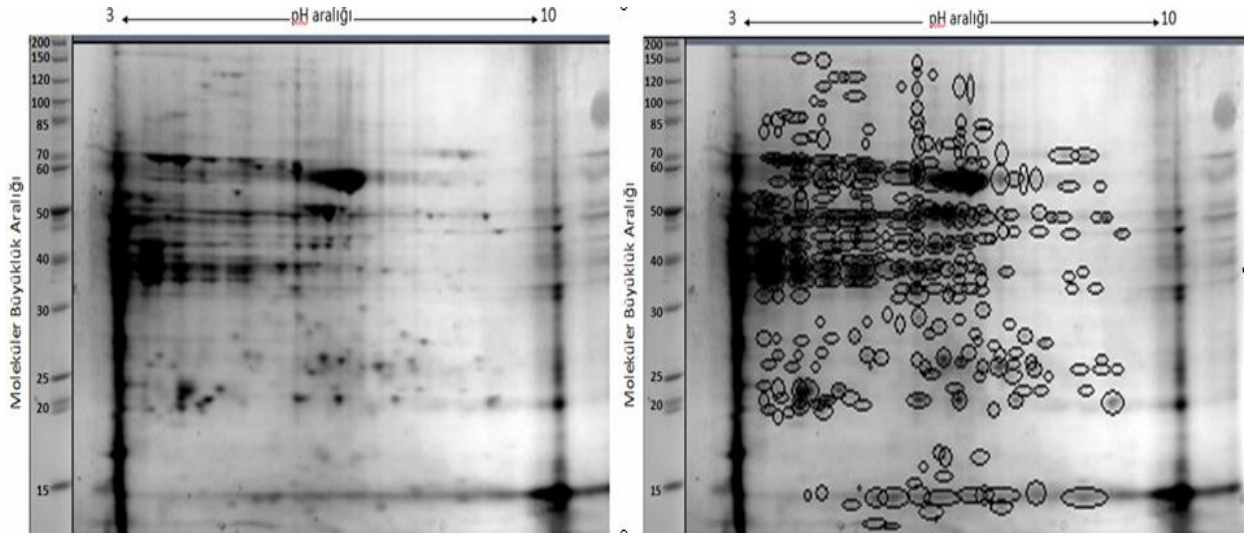
14. İnternet (<http://www.expasy.org>) üzerinden erişilen veri bankası ile proteinlerin ‘‘Swiss protein number’’ (Swiss prot no) değerleri kullanılarak hücre içindeki lokalizasyonları, görevleri, molekül ağırlıkları ile ilgili bilgiler elde edildi (Tablo 4.1).

14. Bu proteinlerin metabolik yolakları ve buldukları kompartmanların belirlenmesi için, elde edilen veriye IPA (Ingenuity Pathways Analysis) uygulandı. Bu analiz için ‘‘<http://www.ingenuity.com/products/ipa>’’ internet adresinden erişilen veri bankası kullanıldı. IPA, araştırmacılara kendi verilerine uyan biyolojik mekanizmaları, fonksiyonları ve yolakları tanımlamalarını sağlayan bir analiz yöntemidir. Böylece bilimsel literatürün kolayca taranması, verilere uygun yolak modellerinin kurulması, deneysel verilerin hızlıca analiz edilmesi, araştırmaların paylaşılması ve diğer araştırmacılarla işbirliği yapılmasını mümkün kılar. IPA yöntemi ile, tanımladığımız proteinlerin kanonik yolak analizleri (Şekil 4.2), yolaklardaki proteinlerin birbirleriyle ilişkisini gösteren 3 boyutlu resimleri (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5), proteinlerin ortak olduğu başka hastalıklar ve sistemlerle (Tablo 4.3) ilgili veriler elde edildi.

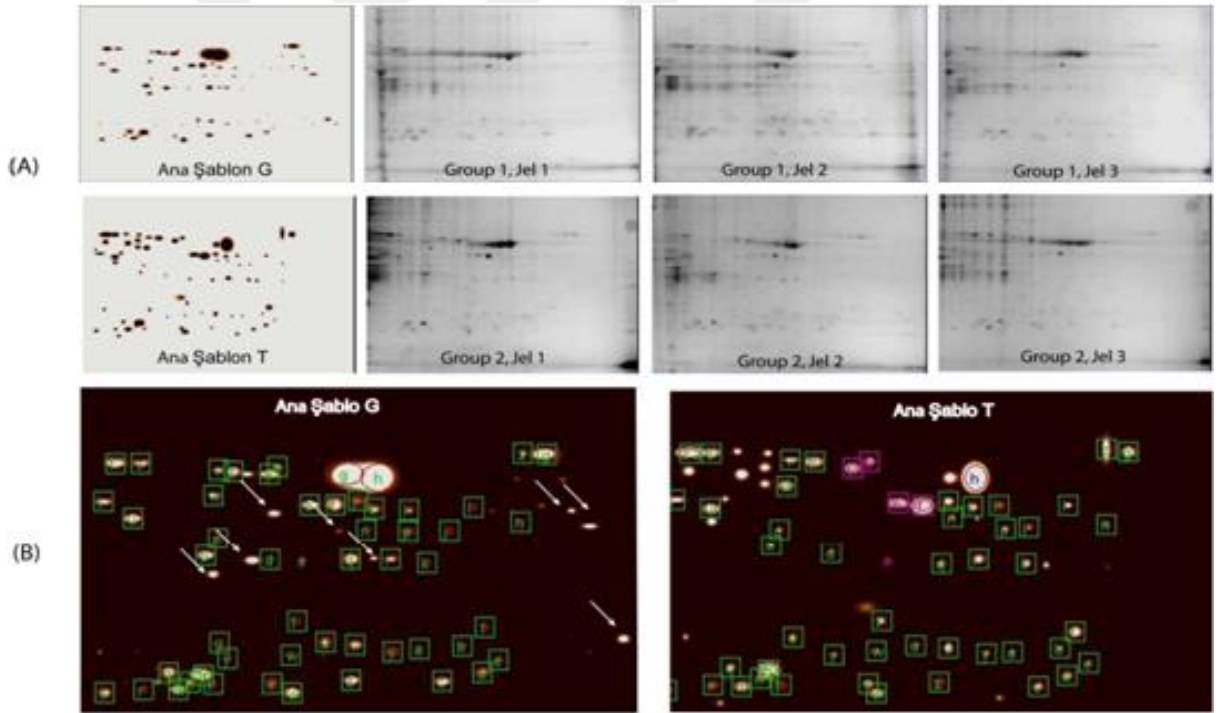
#### **4. BULGULAR**

Bu çalışmada Graves Hastalığı (G grubu) ve Toksik Multinoduler Guatr (T grubu) tanılı hastaların tiroid doku örnekleri 2 DE-Jel Elektrozefrez tekniği kullanılarak karşılaştırıldı. Her bir grupta bulunan 12 doku örneğinden elde edilen jellerin 7'ser tanesinde protein spotları analiz edilebilir görüntü kalitesinde saptandı. Her bir grup için değerlendirmeye 7 jel alındı. Görüntüler PDQuest Advance yazılımıyla analiz edildi. Jeller üzerinde yaklaşık 330 protein spotu saptandı. Manuel olarak yapılan eşleştirmeler sonucunda manalı olanlar analize alındı. G grubunda T grubundan farklı olan 23 adet protein spotu saptandı. Bu spotların bazılarının aynı proteine ait olması, bazılarının ise albümin ve sitokeratin gibi kontaminasyonu gösteren proteinlere ait olması nedeniyle 15 spot anlamlı kabul edildi. Şekil 4.1'de jellerin analizi sırasında elde edilen şablonlarda bu spotların bir kısmı görölmektedir. Ancak, şablon jeller üzerinde ekspresyonları açısından farklılık gösteren bu spotların bazılarının T grubundaki tüm jeller üzerinde görölmemesi nedeniyle regölyasyon oranları sayısal olarak hesaplanamadı ve up-regölyasyon yüzdeleri verilemedi. Bunun yerine, spotun iki gruptaki tüm jellerde bulunup bulunmadığına bakıldı ve buna göre bir regölyasyon değerü saptandı (Tablo-4.1). MALDI-TOF cihazı ile tanımlanan verilerin incelenmesi ve proteinlerin isimlendirilmesinden sonra hücre içindeki yerleşimleri ve fonksiyonları hakkında bilgiye ulaşıldı (Tablo-4.2).

Regöle olan proteinler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarabilmek için IPA analizleri yapıldı. Kanonik yolak analiziproteinlerin en fazla enerji metabolizması (Glikoliz 1, 2-ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi, dallı zincirli  $\alpha$ -ketoasid dehidrogenaz kompleksi, kreatin fosfat biyosentezi) ve tiroid hormon biyosentezi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2). IPA analizleri sonuçları ise, proteinlerin başlıca iki yolakta görev aldığını göstermiştir. Bunlardan birincisi hücre büyümesi-farklılaşması ile ilişkili olan yolaklar (Şekil 4.3), ikincisi enerji metabolizması ile ilişkili yolaklardır (Şekil 4.4). Bu iki ağın birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan protein yolakları arasındaki etkileşimler şekil Şekil 4.5'tegösterilmiştir.

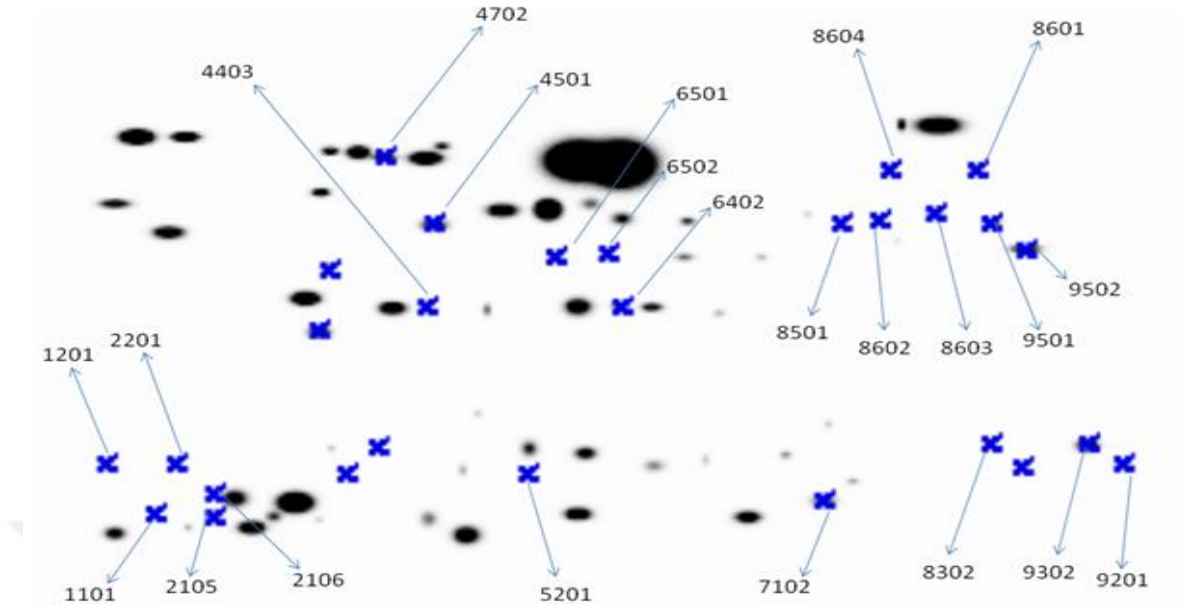


Şekil-4.1 PDQest analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösteren spotlar.



Şekil-4.2. (A) Graves Hastalığı (G) ve TMNG (T) gruplarının jellerinden hazırlanan ana şablonlar. (B) Şablonlarda farklılık gösteren protein spotları Ana Şablon G'de beyaz oklarla gösterilmiştir.





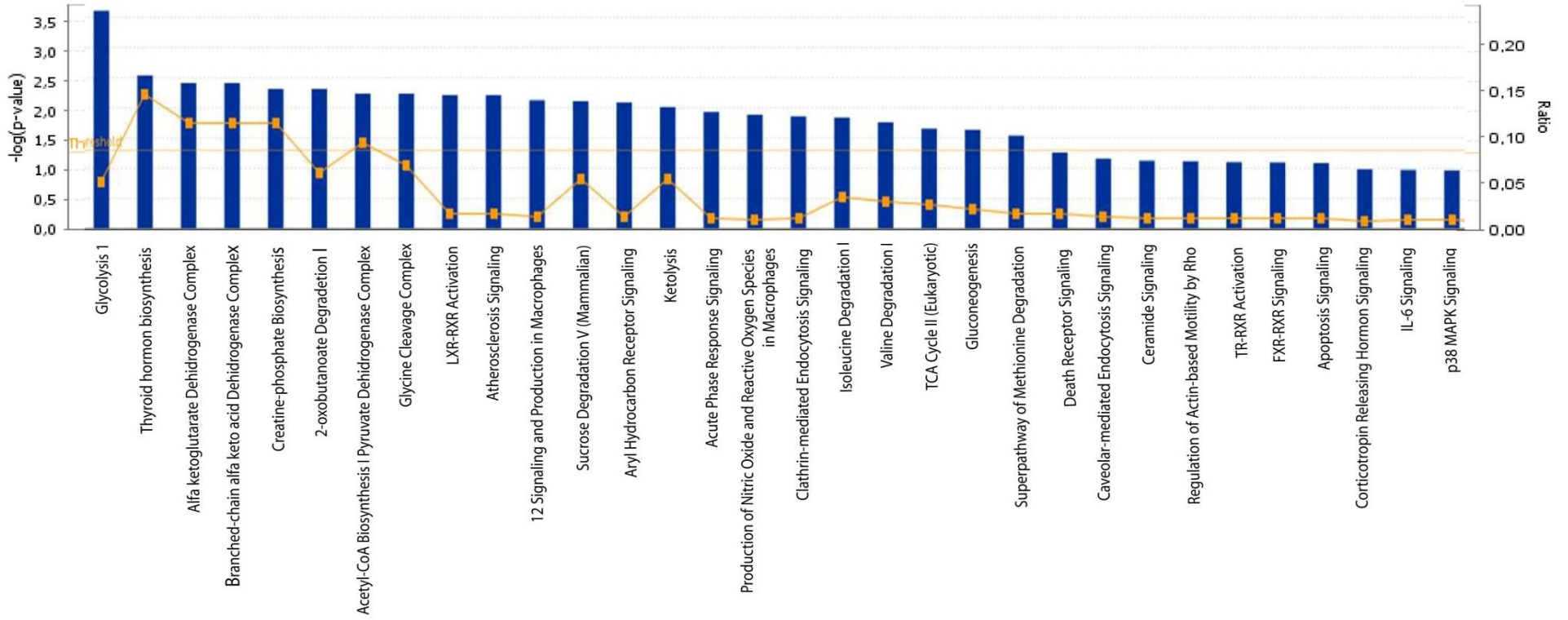
Şekil-4.3. Ana şablonlardan elde edilen spotların tek şablonda gösterilmesi

Swiss Prot no	protein adı	gen simgesi	G grubu (+) jel sayısı	T grubu (+) jel sayısı
Q13228	<b>Selenium-binding protein 1</b>	<b>SELENBP1</b>	7	1
P02545	<b>Prelamin-A/C</b>	<b>LMNA</b>	6	1
P40121	<b>Macrophage-capping protein</b>	<b>CAPG</b>	7	0
P12277	<b>Creatine kinase B-type</b>	<b>CKB</b>	4	0
P55809	<b>Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase</b>	<b>OXCT1</b>	7	0
P09622	<b>Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial</b>	<b>DLD</b>	7	0
P06733	<b>Alpha-enolase</b>	<b>ENO1</b>	5	0
P52565	<b>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</b>	<b>ARHGDI1</b>	7	3
P32119	<b>Peroxiredoxin-2</b>	<b>PRDX2</b>	8	4
P07858	<b>Cathepsin B</b>	<b>CTSB</b>	4	0
P02647	<b>Apolipoprotein A-I</b>	<b>APOA1</b>	2	0
P07339	<b>Cathepsin D</b>	<b>CTSD</b>	4	3
P04792	<b>Heat shock protein beta-1</b>	<b>HSPB1</b>	5	4
P00915	<b>Carbonic anhydrase 1</b>	<b>CA1</b>	2	2
P60174	<b>Triosephosphate isomerase</b>	<b>TPI1</b>	4	2

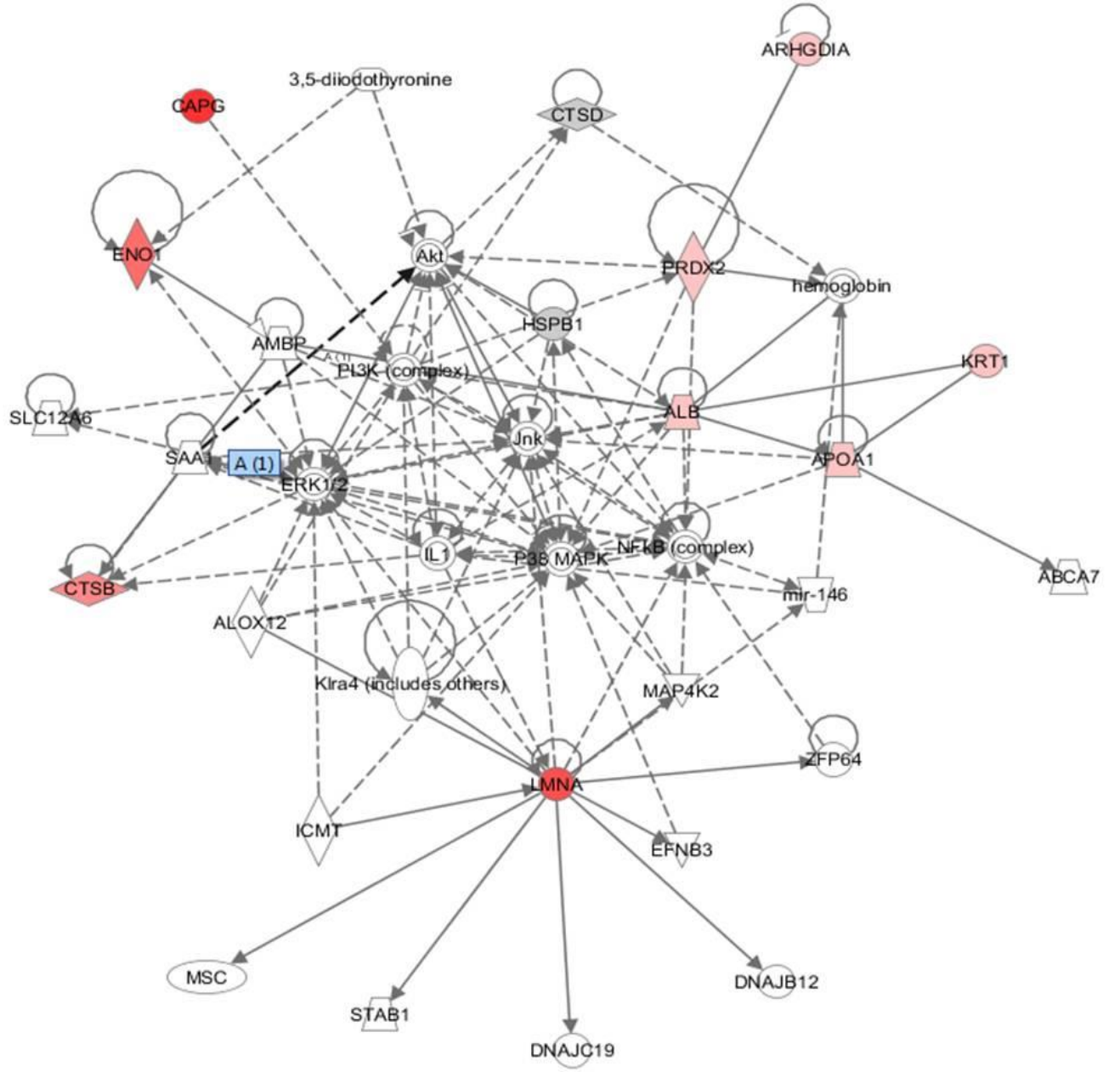
Tablo 4.1. Proteinler ve eksprese oldukları jel sayısı

Swiss Prot No	Protein adı	hücredeki yeri	MA (kDA)	gen simgesi	Görevi
Q13228	<b>Selenium-binding protein 1</b>	N/S/M	52	<b>SELENBP1</b>	Protein transportu
P02545	<b>Prelamin-A/C</b>	N	74,139	<b>LMNA</b>	Nükleer çatı, kromatin düzenlenmesi, nükleer membran ve telomer yapısında önemli rol oynar
P40121	<b>Macrophage-capping protein</b>	S/N	38,499	<b>CAPG</b>	Makrofaj fonksiyonlarında rol oynar
P12277	<b>Creatine kinase B-type</b>	S	42,644	<b>CKB</b>	İskelet kası, kalp, beyin ve spermatozoa gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokulara enerji sağlar
P55809	<b>Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferas</b>	Mit	56,158	<b>OXCT1</b>	Keton cisimciği katabolizmasında anahtar enzimdir
P09622	<b>Dihidrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial</b>	Mit	54,177	<b>DLD</b>	Dalı zincirli aminoasitlerin katabolizmasında rol alır. Spermatozoanın kapasitasyonu sırasında hiperaktivasyonda rol alır
P06733	<b>Alpha-enolase</b>	S/M	47,169	<b>ENO1</b>	Glikoliz, plaminojen aktivasyonu, transkripsiyon da rol alarak; büyümenin kontrolü, hipoksiye tolerans, alerjik yanıt ve fibrinolitik sistemde rol alır. Immunglobulin üretimini uyarır.
P52565	<b>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</b>	S	23,207	<b>ARHGDI1</b>	Hücre proliferasyonu, apoptozis, gen ekspresyonu gibi biyolojik olaylarda anahtar rolü oynayan Rho protein ailesinin fonksiyonunda düzenleyicidir.
P32119	<b>Peroxiredoxin-2</b>	S	21,892	<b>PRDX2</b>	Metabolizma sırasında üretilen peroksidleri ortadan kaldırır. Büyüme faktörlerinin ve TNF $\alpha$ 'nın sinyal kaskadında rol alır.
P07858	<b>Cathepsin B</b>	S (Liz)	37,822	<b>CTSB</b>	Protein turnoverında rol alır. Tümör invazyonu ve metastazını gösterir.
P02647	<b>Apolipoprotein A-I</b>	Sec	30,778	<b>APOA1</b>	Dokulardan karaciğere kolesterol taşınmasını sağlar
P07339	<b>Cathepsin D</b>	Liz	44,552	<b>CTSD</b>	Hücre içi protein turnoverında rol alır. Meme kanseri ve Alzheimer patogeneğinde rol oynar.
P04792	<b>Heat shock protein beta-1</b>	S/N	22,783	<b>HSPB1</b>	Stres direnci ve aktin bütünlüğünde rol alır.
P00915	<b>Carbonic anhydrase 1</b>	S	28,87	<b>CA1</b>	Karbon dioksitin hidrasyonunda rol alır.
P60174	<b>Triosephosphate isomerase</b>	S	30,791	<b>TPI1</b>	Glukoneogenez ve glikolizde rol alır.

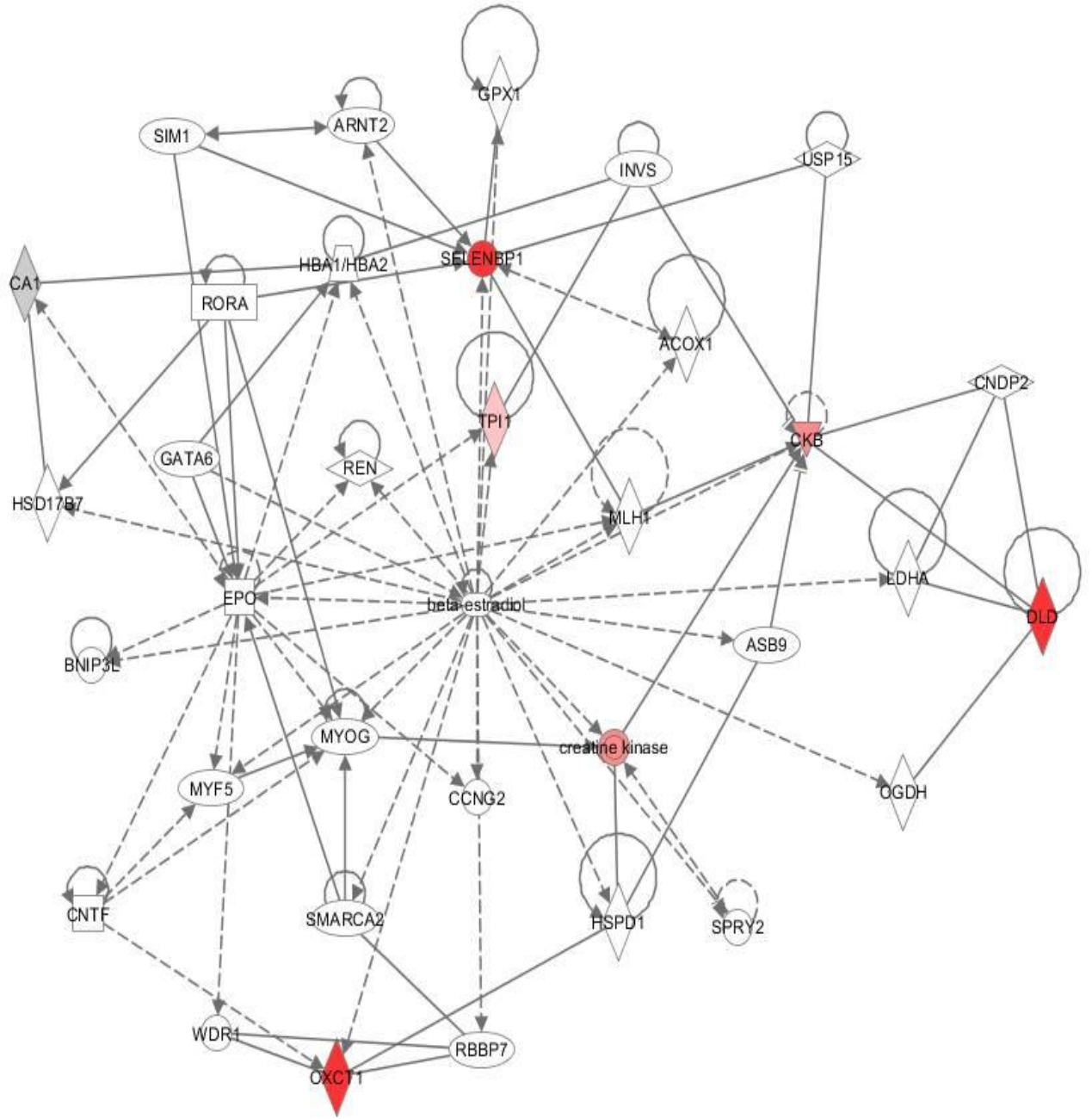
**Tablo 4.2.** MALDI-TOF analizi ile tanımlanan proteinlerin görevleri ve hücre içi lokalizasyonları. Kısaltmalar: N; Nükleus, S; Sitoplazma, M; Hücre Membranı, Mit; Mitokondri, Liz; Lizozom, Sec; Sekrete edilen.



Şekil 4.4. Proteinlerin Canonical yolak analizi sonucu ilişkili oldukları yolaklar verilmiştir.

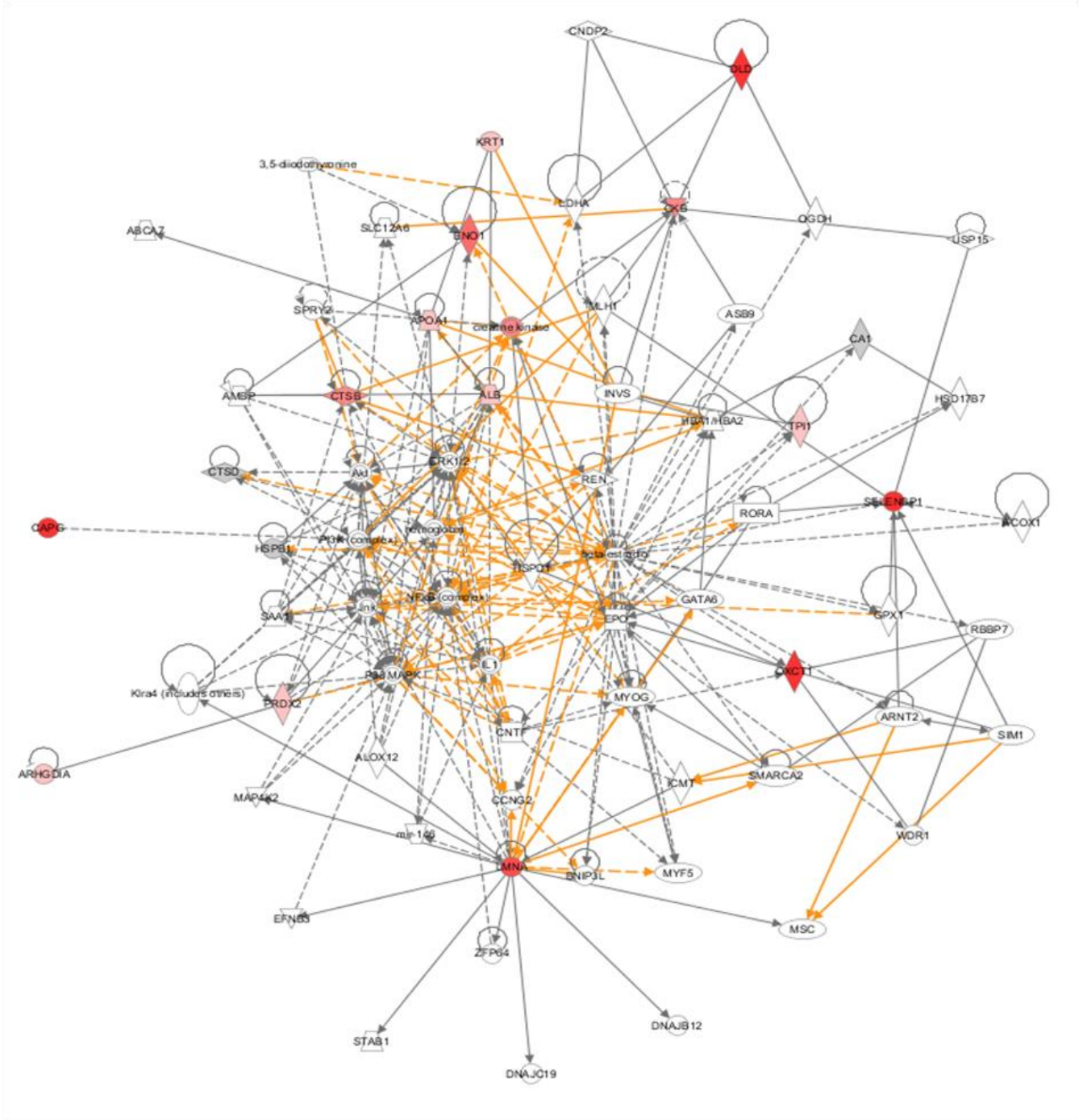


Şekil 4.5. IPA analizi sonucu hücre büyümesi, farklılaşması, motilitesi ile ilgili yollar (Kırmızı, ekspresyonu artmış proteinleri göstermektedir)



Şekil 4.6. IPA analizi sonucu enerji metabolizması başta olmak üzere çeşitli yollar (Kırmızı, ekspresyonu artmış proteinleri göstermektedir.)





Şekil 4.7. Her iki yolağın birleştirilmesi ile yolların etkileşimi

IPA sonucuna moleküler ve hücreSEL fonSiyonlar aÇısından bakıldığında, proteinlerin büyük kısmı hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması ve hareketi ile ilişkili bulundu. Ayrıca bu proteinlerin 11 tanesi Endokrin sistem bozuklukları ile, 13 tanesi gastrointestinal hastalıklarla, 12'si inflamatuvar hastalıklar ile, 10'u hematolojik hastalıklar ile, 12'si immunolojik hastalıklar ile ilişkili bulundu. Bu sistemlerden özellikle endokrin sistem ve gastrointestinal sistem hastalıklarında rol alan protein sayısının oldukça fazla olduğu görüldü. Tablo 4.3'te bu hastalıklar, ilgili proteinler, sayısı ve p-değerleri verilmiştir.

Sistem	İlgili hastalık/bozukluk	p-değeri	Protein isimleri	Protein sayısı
Endokrin/GİS	Pankreatit	1.86x10 <sup>9</sup>	ALB, APOA1, CAPG, CTSB, CTSD, PRDX2	6
Endokrin	Dilate KMP+hipergonadizm	9,91x10 <sup>4</sup>	LMNA	1
Endokrin/GİS	Tip 1DM	1.44x10 <sup>3</sup>	ALB, APOA1, CA1, CTSB, HSPB1	5
Endokrin	İnsulin direnci	1.54x10 <sup>3</sup>	ALB, APOA1, CA1, LMNA	4
Endokrin/GİS	MODY	2,97x10 <sup>3</sup>	APOA1	1
Endokrin/GİS	Tip 2 DM	3,93x10 <sup>3</sup>	ALB, APOA1, CA1	3
Endokrin	Pankreatik tumor	6,00x10 <sup>3</sup>	CTSB, CTSD, ENO1	3
Endokrin	Metabolik sendrom	7,02x10 <sup>3</sup>	APOA1, CA1	2
Endokrin	Testis hipoplazisi	1,87x10 <sup>2</sup>	ARHGDI	1
GİS	Sindirim sistemi tümörleri	8,07x10 <sup>4</sup>	ALB, ARHGDI, CAPG, CTSB, CTSD, ENO1, SELENBP1, TPI1	8
GİS	Mandibuloakral disostozis	9,91x10 <sup>4</sup>	LMNA	1
GİS	Karaciğer amiloidozu	2,97x10 <sup>3</sup>	APOA1	1
GİS	İşlet hücre tümörleri	2,97x10 <sup>3</sup>	CTSB	1
GİS	Hepatoselüler karsinom	1,09x10 <sup>3</sup>	ALB, CTSB, TPI1	3
GİS	Kolorektal karsinom	1,24x10 <sup>3</sup>	ALB, ARHGDI, CAPG, CTSB, SELENBP1	5

Tablo 4.3. Proteinlerin ilişkili olduğu iki sistem: endokrin ve GİS. İlgili proteinlerin sayısı ve p-değerleri verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Graves Hastalığı (GH) ve Toksik Multinodüler Guatr (TMNG), fonksiyonel olarak tirotoksikoza yol açmalarına rağmen, patogenezi, tiroid dokusunun histopatolojik görünümü ve klinik seyirleri açısından farklılık göstermektedir. Çalışmamızda, GH ve TMNG’de hastaların tiroid dokusunda eksprese olan proteinlerin farklı olabileceği düşüncesiyle, dokuların protein profilleri proteomiks yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın sonunda GH’nın tiroid dokularından elde edilen proteinlerin TMNG hasta grubunun tiroid dokularında ya çok düşük düzeyde ya da hiç eksprese olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızda TMNG hasta grubunun doku örnekleri, nodül ve nodül dışı alanlar dikkate alınmaksızın rastgele elde edilmiştir. Bu durum sonuçlarımızı etkilemiş olabilir ancak, yine de protein ekspresyonunun özelliği, bu iki hasta grubunun patogenezi ve klinik gidişindeki farklılığı izah edebilir. Fakat bunun normal tiroid doku örnekleri ve işaretleme yöntemi ile gösterilen fonksiyonel nodüllerden elde edilen doku örnekleri ile yapılan diğer çalışmalarla desteklenmesi gerekir.

Çalışmamızda eksprese edilen proteinler GH’nın dokularından elde edildiği için, tartışmaya bu proteinlerin GH ile ilişkisi üzerinden devam edilecektir.

İnsan tiroid dokusunun proteomiks yöntemlerle çalışılması sırasında sıkça karşılan problemler vardır. Bunlardan ilki, tiroid proteomunun oldukça geniş bir protein profilini içermesidir. Bu çeşitlilik, en yüksek miktarda bulunan Tiroglobulinin (yaklaşık 75 mg/ml) düşük miktarda bulunan interlökinlerden (<1 ng/ml) yaklaşık  $10^8$  kat fazla olmasından anlaşılabilir. İkinci problem, doku içerisindeki mikro-makrofolliküler yapıların Tiroglobulin içeriğinin farklı olması ve hücre dışından gelen yüksek miktardaki Tiroglobulin nedeniyle, her bir örneğin Tiroglobulin miktarlarının büyük oranda değişkenlik göstermesidir. Üçüncü problem, dokunun heterojen yapısının (folliküller, stroma, kan damarları, eritrositler vs) proteom paternini etkilemesi ve spesifik protein up-regülasyonu ve down-regülasyonu için uygun cut-off değerlerin belirlenmesini engellemesidir. **Krause ve ark.** dokuların tiroglobulin



içeriğinin tiroid proteomunu etkilememesini veya az düzeyde etkilemesini sağlamak için tiroglobulini dokudan uzaklaştırmak amacıyla “centrifugal ultrafiltration”, “size-exclusion chromatography” ve “laser-capture microdissection” gibi farklı yöntemler kullanmışlardır (112). Bu yöntemlerden, bir kısmının dokuya hasar vermesi, bir kısmının ise iyi sonuç vermemesi nedeniyle kullanılması uygun bulunmamıştır. Tiroid kanserli hastaları içeren çalışmalarında bu problemi aşmak için dokuların tiroglobulin içeriğini düzeltmeyi tercih etmişlerdir. **Sofiadis ve ark.**, çalışmalarında yüksek miktardaki tiroglobulinden kaynaklanan böyle bir sorun yaşamadıklarını ve bunun muhtemelen çalışmalarında kullandıkları fraksiyonlama işlemi sırasında tiroglobulin içeren vesiküllerin stoplazmik proteinlerle beraber fraksiyonlanmamasından kaynaklandığını belirtmişlerdir (113). Araştırmamızın ön çalışmalarında, jeller üzerine eşit miktarda protein yüklememize rağmen, dokuların yüksek miktarda tiroglobulin içermesi nedeniyle spot sayılarının değişkenlik gösterdiğini biz de fark ettik. Bu problemi aşmak için hücre iskeletinde eşit miktarda olduğunu bildiğimiz  $\beta$ -aktin ve Vimentin gibi proteinlerle Western Blot yaparak dokuların protein miktarını düzelttik ve düzeltme sonrası örneklerin 2D-JE deneylerini tekrarladık. Bu yöntem, spotların sayısını artırmış ve daha net görünmelerini sağlamıştır.

Yapılan 2D-JE çalışmasında anlamlı değişim gösteren 15 adet protein spotu tesbit edildi. Bu spotların bazıları GH grubunda yüksek seviyede eksprese olurken, kontrol grubunda ya düşük seviyede eksprese oldu ya da hiç ekspresyon göstermedi. Proteinlerin başlıca iki yolakta görev aldığı saptandı. Bunlardan birincisi hücre büyümesi-farklılaşması ile ilişkili olan yolaklar [Prelaminin A/C (LMNA), “Makrophage Cappin Protein” (CAPG), alfa enolaz (ENO1), “Rho GDP-dissociation inhibitor 1” (ARHGDI1), Peroxiredoxin 2 (PRDX2), Catepsin B (CTSB), Catepsin D (CTSD), Apolipoprotein A1 (APOA1), “Heat shock Protein  $\beta$ 1 (HSP  $\beta$ 1)]; ikincisi enerji metabolizması ile ilişkili yolaklardır [Selenyum bağlayıcı protein 1 (SELENBP1), Kreatin kinaz B (CKB), Suksinil-KoA:3-ketoasid Koenzime A transferaz 1(OXCT1), Dihidrolipoil dehidrogenaz (DLD), Karbonik Anhidraz (CA1), Triozfosfat izomeraz (TPI1)].

Çalışmamız dışında, literatürde benign tiroid hastalıkları ve özellikle GH’da yapılmış sadece birkaç proteomiks çalışması bildirilmiştir. Mevcut çalışmaların çoğu

malign tiroid hastalıkları ve malignite açısından riskli olan soğuk tiroid nodülleri ile ilişkilidir. Graves Hastalığı ile ilgili az sayıdaki çalışmadan biri Matheis ve ark. (114) tarafından bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, tiroid dokusu yerine Graves oftalmopatili ve normal hastalardan elde edilen gözyaşı; 2D-JE tekniği yerine SELDI-TOF tekniği kullanılmıştır. Çalışma sonucunda Graves oftalmopatili hastaların göz yaşında bazı proteinlerin ekspresyonunun azaldığını (nasopharyngeal carcinoma-associated PRP4 (NCAPRP), proline-rich protein 4 (PRP4),  $\beta$ 2-microglobulin) ve bazı proteinlerin ise arttığını (Cistatin C, Lysozyme C) göstermişlerdir. Bu çalışma ve bizim çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında ortak bir protein bulunmamaktadır. Hastalığın hedef organlarından tiroid dokusu ve göz küresinde tanımlanmış ortak antijene (TSHR) rağmen iki dokudaki protein profilleri oldukça farklılık göstermiştir. Bu durum Matheis ve ark.'nın kullandıkları örnek materyalinin (göz yaşı) protein içeriğinin farklı olmasından veya kullandıkları teknikten (SDS-JE ve SELDI-TOF yöntemi) kaynaklanıyor olabilir. SELDI-TOF yönteminin, prefraksiyonlama teknikleri kullanılmadığı takdirde fazla miktarda bulunan proteinlerin dışındakileri saptayamaması ve protein pikleri arasındaki ekspresyon farkını çok iyi ayıramaması gibi bazı dezavantajları vardır. Bizim çalışmamızda tiroid hastalıklarının proteomiks çalışmalarında yaygın kullanılan yöntem olan 2D-JE yöntemi ve protein spotlarının analizi için MALDI-TOF yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca proteinlerin ayrıştırılması çalışmamızda iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Bu durum sonuçlarımızı güçlü kılmaktadır.

Çalışmamızın sonucunda bulduğumuz hücre büyümesi-farklılaşması ile ilişkili yollarda görev alan proteinlerden “**Prelamin A/C**” (LMNA), nukleusun ana bileşenlerinden biridir. Nukleusu çevreleyen iç membrana çatı görevi yaparak şeklini ve bütünlüğünü korur. Bu yapısal rolün yanında LMNA, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve tamirinin düzenlenmesinde rol alır (115). LMNA genindeki mutasyonlar Emery-Dreifuss Muskuler Distrofisi, familial partial lipodistrofi, premature yaşlanma veya progeroid sendromlarına (Hutchinson-Gilford progeria sendromu) yol açar. “**Macrophage-capping protein**” (CAPG), aktin düzenleyici protein CAP-G olarak da bilinir. Kalsiyuma duyarlı bir protein olup aktin filamentlerinin kancalı uçlarına bağlanır, kas hücreleri dışındaki hücrelerde aktine bağlı hücre hareketini kontrol eder. Makrofaj fonksiyonlarında önemli rol oynar.

Tiroid dokularının histopatolojik incelemesi, dokularda yoğun lenfosit infiltrasyonu olduğunu göstermiştir. Graves hastalığının patogeneğinde spesifik bir immun yanıtın olduğunu bilmekteyiz. CAPG'nin hasta grubunda yüksek saptanması, dokuda artmış inflamasyonun bir sonucu olarak lenfositlere antijen sunumunda görev alan makrofajların varlığına işaret eder. Bu durum, GH'deki otoimmün yanıtta makrofajların önemini göstermektedir. Literatürdeki pek çok proteomiks çalışması, CAPG proteinini kolanjiyoselüler karsinom, hepatoselüler karsinom ve gastrik tümörler gibi malign hastalıklarda tedavi direnci, vasküler ve lenf nodu metastazı ile ilişkilendirmiştir (116-118). ‘‘**Alpha-enolase**’’ (**ENO1**), enolaz 1 olarak da bilinen ve pek çok dokuda bulunan bir glikolitik enzimdir. Büyümenin kontrolü, hipoksiye tolerans, alerjik yanıtlar, fibrinolizin aktivasyonu gibi başka fonksiyonları da vardır. Immunglobulin üretimini uyarır. Endoplazmik retikulum ve golgi taşıyıcı veziküllerinin birleşmesinde görevli olan ‘‘MBP-1-interacting protein 2A’’ (MIP-2A) ile etkileşim içindedir. İlginç olarak, Hashimoto ensefalopatisinde ENO1 tanısal bir belirteç olarak bildirilmiştir(119). Bizim çalışmamızda bu proteinin yüksek saptanması dokudaki otoimmüniteye bağlı artmış immunglobulin üretiminin; tirotoksikozaya bağlı olarak artmış protein sentez ve salgısının sonucu olabilir. Çeşitli malign hastalıklarda (meme, baş-boyun, akciğer ve karaciğer gibi) ekspresyonunun tümör progresyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (120-121). ‘‘**Rho GDP-dissociation inhibitor 1**’’ (**ARHGDI**A), hücre proliferasyonu, apoptozis, gen ekspresyonu gibi biyolojik olaylarda anahtar rolü oynayan Rho protein ailesinin fonksiyonunda düzenleyicidir. Rho proteinlerinin GDP/GTP değişimlerini düzenler. Glioma hücrelerinde hücre göçünü ve invazyonunu inhibe eder. Bu proteinin kolon ve prostat kanserinin metastazı ile ve oral skuamoz hücreli kanserlerde kötü prognoz ile ilişkisini gösteren çalışmalar vardır (122-123). **Apolipoprotein A-I (APOA1)**, HDL'ninyapısında bulunan önemli bir proteindir.HDL'nindokulardan karaciğere taşınmasında rol alır. GH'da serum APOA1 parçacıklarının nasıl değiştiğini gösteren çok fazla çalışma yoktur. Deneysel çalışmalar hipotiroidizmde karaciğer ve intestinal dokuda APOAI mRNA sentezinin azaldığını ve tiroid hormon tedavisi ile transkripsiyonun arttığını göstermiştir (124-125). Klinik çalışmaların sonuçları serum APOAI düzeyi ve tiroid hormonu arasındaki ilişkiyi ortaya koyamamıştır (126-127). Literatürde hipertiroidiye bağlı olarak HDL düzeylerinin azalmış, normal, artmış

olduğunu bildiren çalışmalar vardır (128-130). GH'da tirotoksikoz nedeniyle lipoliz, hepatik lipogenez, kolesterolün karaciğerde safra asitlerine dönüşümü ve adipositlerdeki LDL reseptör sayısı artar. Tirotoksikozun kolesterol ve trigliseridlerin turnoverının artırması ve metabolizmayı hızlandırarak kilo vermeyi sağlaması HDL dışında diğer serum kolesterol düzeylerinin değişimini büyük oranda açıklar. Çalışmamız, hipertiroidizmin insan tiroid dokusunda APOAI değişimini gösteren ilk çalışma olabilir ve sonuçlarımız, çeşitli dokularda tiroid hormonunun APOAI mRNA düzeyini artırdığını gösteren hayvan deneyleri ile uyumludur (130). ‘**Peroxiredoxin-2**’ (**PRDX2**),metabolizma sırasında üretilen peroksidleri ortadan kaldırır ve antioksidan olarak hücreleri korur. Büyüme faktörlerinin ve TNF  $\alpha$ 'nın sinyal kaskadında rol alır. Hasta grubumuzda daha yüksek düzeyde olmak üzere her iki grupta da bu proteinin artmış ekspresyonu artmış hormon sentezinin gösterir. Çünkü, tiroid hormonunun sentez basamaklarında Tiroid peroksidaz (TPO), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerektiren bir işleme, iki tane I<sup>-</sup>’u okside ederek kolloid içindeki tiroglobulin rezidülerine eklenmesini sağlar. Bu sentez basamağında gereken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tiroid Oksidaz 1 ve 2 (THOX1 ve THOX2) tarafından sağlanır. Tirotoksikoz sırasında bu sentez basamaklarının daha fazla ve daha hızlı çalışması ile oluşan oksijen radikallerinin ortadan kaldırılması **PRDX2** ekspresyonunu artırmıştır. Malign hastalıklarla (malign mezotelyoma, özefagus kanseri ve meme kanseri) ilgili çalışmaların sonuçları tümör dokularında PRDX ekspresyonunun arttığını göstermiştir (131-132). Bu çalışmalar PRX’lerin Zhang ve ark.(133) tarafından kanser radyoterapisinin hedefi olarak önerilmesinin ardından artmıştır. Çünkü, PRDX hücrelerin reaktif oksijen radikallerinden temizlenmesinin yanı sıra proliferasyonu ve yaşam sürelerine de etkilidir. Tiroid maligniteleri ile ilgili yapılmış proteomiks çalışmalarında en çok ortaklaşılan protein Peroxiredoxin’dır. **Sofiadis ve ark.**’nın (113) folliküler adenomları folliküler tiroid Ca , papiller tiroid Ca ve tümör dışındaki normal tiroid dokusu ile kıyasladıkları çalışmalarında, PRDX6 ekspresyonunu folliküler adenom dokularında, papiller ve folliküler tiroid Ca’ya göre çok az yoğunlukta saptamışlar ve folliküler adenom açısından bir belirteç olabileceğini söylemişlerdir. **Brown ve ark.** (134) papiller tiroid Ca ve folliküler tiroid Ca hastalarının tiroid dokularında Difference Gel Electrophoresis (DİGE) yöntemi ile protein ekspresyonunu karşılaştırdıkları çalışmalarında PRDX 2’nin papiller tiroid Ca grubunda daha az

eksprese olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre PRDX ekspresyonundaki değişiklikler tiroid malignitelerinde tutarlı görünmemektedir. **Krause ve ark.’nın** (135) soğuk tiroid nodülleri ve normal tiroid dokusunu karşılaştırdıkları çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumludur. Bu çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oksidasyon sistemi ile ilgili proteinlerin [PRDX-2 ve PRDX-6, glutatyon S-transferaz II (GST-II) ve DJ-1] ekspresyonunda artış saptamışlardır. Soğuk tiroid nodüllerinde tiroid hormon üretimi ile ilgili proteom verilerinin büyük değişkenlik göstermesinden dolayı, bu proteinlerin artışını malignite belirteci olarak kabul etmeden önce, nodüllerde tiroid hormon sentezinin çeşitli basamaklarını araştırmış; tiroid epitel membranında azalmış NIS ve tiroid dokusu içinde iyot eksikliğini, bunu kompanse etmek için TPO ve ThOX1/2 düzeylerinin arttığını, bu sırada oksijen radikallerinin arttığını, artmış hormon üretme çabasına rağmen son ürünün yetersiz kalması sonucu T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub> düzeyinin azaldığını, hormon sentezi azaldığından Tg turnoverının arttığı ve buna bağlı artmış Tg üretim ve yıkımının bazı şaperonları arttırdığını saptamışlardır. Çalışmamızda ekspresyonunu yüksek saptadığımız diğer proteinler olan “**Catepsin B**” (CTSB), “**Catepsin D**” (CTSD) ve “**Heat Shock Protein β**” (HSPβ) bu ilişki içerisinde düşünülecek olursa, her üç proteinin de hücre içi protein turnoverında ve artan stres sürecinde rol alması, hipertiroidi nedeniyle artmış tiroksinin salınması, artmış Tg turnoverı ve artmış Tg yıkımı ile ilişkilidir. Krause ve ark. ’nın detaylı çalışmasında kompensatuvar bir mekanizma olarak tiroid hormon sentezinin artmasının sonucu olarak CTSB ve HSP90β’ın da artacağına dair tesbitleri çalışmamızın bu sonucunu desteklemektedir (135).

Enerji metabolizması ile ilgili olan diğer yolda yer alan “**Selenium-binding protein 1**” (SELENBP1), golgi cisimciği içinde protein transportunda rol aldığı düşünülen bir proteindir. Selenyum, İyodotironin deiyodinazlar 1-3, Glutatyon peroxidazlar, Tioredoxin reduktazlar gibi enzimlerin yapısına selenosistein rezidüsü olarak katılır. İyodotironin deiyodinazlar (DIO), tiroid hormonlarının aktivasyonunda ve inaktivasyonunda rol alan bir enzimdir. Tiroid hormonunun seviyesine göre bu enzimlerin ekspresyonları değişir. Hipertiroidi durumunda hem T<sub>4</sub>’ü T<sub>3</sub>’e dönüştüren IDO2, hem de fazla olan T<sub>3</sub>’ü inaktif rT<sub>3</sub>’e dönüştüren IDO3 artmıştır. Bu sebeple çalışmamızda selenyum kullanan IDO’lar SELENBP1 düzeyini artırmıştır. Bunun yanında, tiroid hormon sentezi sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen radikallerinden

tirositleri korumak için bir selenoprotein olan glutatyon peroksidazın dokuda artması SELENBP1 artışına katkıda bulunur. Pedersen ve ark. (136) tarafından bildirilen bir toplum çalışmasında yeni tanı konulan GH'da serum selenyum düzeyleri düşük saptanmıştır. Çalışmada serum selenyum konsantrasyonu tiroid dokusundaki selenyumun direk göstergesi olmasa da, sonuçlarımız ile birlikte değerlendirildiğinde, GH'da selenyum kullanımının artmasına bağlı olarak dokuda SELENBP1 düzeyinin de artabileceği fikrini destekler. Literatürdeki malign tiroid hastalıklarının proteomiks çalışmalarına bakıldığında Sofiadis ve ark (113) ile Brown ve ark.'nın (134) çalışmaları papiller tiroid Ca'da SELENBP1'in azaldığını göstermiştir. Ayrıca, literatürde SELENBP1 ekspresyonunun androjenler ile azaldığını (137) ve östrojen tarafından düzenlendiğini bildiren çalışmalar vardır (138). GH sırasında görülen hipertiroidi, östrojen düzeylerinde artışa yol açarak SELENBP1 düzeylerinin yükseltebilmektedir. Tüm bu mekanizmalar GH'da tiroid dokusunun SELENBP1 ekspresyonunun artışına katkıda bulunuyor olabilir. **“Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferas” (OXCT1), “Creatine kinase B-type” (CKB), “Dihydrolipoyl dehydrogenase” (DLD), “Triosephosphate isomerase” (TPI1)** proteinlerinin fonksiyonları sırasıyla laketon cisimciği katabolizması, yüksek enerji ihtiyacı olan dokulara enerji sağlanması, dallı zincirli aminoasitlerin katabolizması ve glukoneogenez/glikolizin bir basamağı olarak sıralanabilir. Bu proteinlerin artışı ilk bakışta, tiroksikozun tetiklediği katabolik süreç nedeniyle glikoliz, lipoliz ve proteoliz gibi yolların aktifleştğini düşündürse de, IPA sonuçları bu proteinlerin bazı sistemlerin hastalıkları ile ilişkilerini saptamıştır. Buna göre en fazla proteinin ortaklaşıldığı hastalıklar; glukoz metabolizması ile ilgili olup pankreatit, tip 1DM, Tip 2 DM, insülin direnci, metabolik sendrom ve MODY'dir. Genel bilginiz, GH'na Tip 1 DM'un eşlik edeceğini desteklemektedir. Ancak çalışmamızın sonuçları GH'na eşlik eden diyabetin patogenezinde otoimmünite dışında diğer nedenlerin de söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma grubumuzu oluşturan hastaların tıbbi kayıtlarından diyabet öyküsü olmadığı saptanmıştır. Ancak hasta sayımızın az olması, bu hastaların prospektif olarak izlenmemesi nedeniyle kesin bir sonuca varılamaz. Tip 2 DM, bilindiği üzere insülin direnci ile başlayan bir sürecin daha ileri aşamalarını kapsar. Güncel bilgiler iskelet kası, hepatosit ve adipositlerde insülin direncininin hastalığın patofizyolojisindeki en önemli basamak olduğunu göstermiştir (139-140).

Adipoz dokunun yalnızca lipid deposu olmadığını, çeşitli sitokinleri (adipokin) salgılayan ve insulin direncini düzenleyen bir sekreter organ olduğu artık bilinmektedir (141). Adipoz dokuda trigliserid artışına bağlı hipoksi ve makrofaj infiltrasyonundan sonra, makrofajlar "Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B"nın immunomodulator etkisiyle "monocyte chemoattractant protein" (MCP1), IL-6, and TNF- $\alpha$ , gibi sitokinleri salgılar. Bu üç sitokinin insulin direnci gelişimdeki rolleri pek çok çalışma ile gösterilmiştir (142-143). TNF- $\alpha$ , insulin duyarlı dokularda "Jun N-terminal kinase 1" (JNK1) sinyal yollarını aktive etmektedir. Sitokinler yanında JNK1 aktivasyonu da insulin direncinden sorumlu tutulmuştur. Verilerimizin IPA sonuçları, proliferasyon ile ilgili yollarda saptanan proteinlerin JNK, NF- $\kappa$ B, IL-1 ve insulin salınımında rol alan PI3K gibi moleküller ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Karaciğerdeki Kupffer hücreleri adipoz dokudaki makrofajların karşılığı olan hücrelerdir. Makrofajlar IL-1 etkisiyle M1 makrofajlarına, IL-4 ve IL-13 etkisiyle M2a makrofajlarına dönüşürler. Hayvan deneyleri, yüksek yağ diyetiyle beslenme sonrası veya obesite sırasında adipoz dokuda M1 makrofajlarının arttığını, oysa zayıf hayvanlarda adipoz dokuda M2a makrofajlarının arttığını göstermiştir (144). Bu bilgiler ışığında, insulin direnci ve sonrasında gelişen DM'un immun mekanizmalarında inflamasyonun ve özellikle de makrofajların varlığı öne çıkmaktadır. GH'da makrofajlar, dendritik hücreler ve hatta B lenfositler gibi profesyonel antijen sunan hücrelerin, tiroid dokusundaki lenfositik infiltrat içinde görülebildiği ve otoimmüniteye katkıda buldukları bilinmektedir (124). Mekanizması tam anlaşılamamış olmakla beraber, Graves oftalmopatiye göz küresi arkasındaki derin adipoz doku ve tiroid dokusunun ortak antijenitasyonu, benzer inflamatuvar değişikliklerin her iki dokuda da olabileceğini düşündürmektedir. GH'da immun mekanizmaların visseral doku adipositleri veya hepatositler gibi insuline duyarlı dokularda da benzer değişikliklere yol açabileceği fikrini akla getirmektedir. Ancak bu varsayım ileri çalışmaların konusu olmaya adaydır.

Çalışmamızın önemli bir sonucu, hücre proliferasyon yolları ile ilişkili olan proteinlerin bir kısmının çeşitli tümörlerin proteomiks çalışmalarında da ortak protein olarak saptanmasıdır. Bu sonuç öncelikle, benign bir hastalık olduğunu düşündüğümüz GH'da tirotoksikozun yol açtığı metabolizma artışının hücre proliferasyonunu ve çeşitli proteinlerin sentezlerini arttırdığını, buna eşlik eden moleküller mekanizmaların

malign hastalıklardaki hücre proliferasyonu sırasında da kullanıldığını düşündürmüştür. Nitekim, IPA sonuçlarında proteinlerin sistem hastalıkları ile ilişkilendirilmesinin ardından, bazı proteinlerin pankreas tümörü, hepatoselüler karsinom ve kolorektal kanserler gibi tümörlerle ortak proteinler olduğu saptanmıştır. Ancak çalışmaya aldığımız hastaların tıbbi özgeçmişlerine bakıldığında eş zamanlı malign hastalık öyküsü bulunmamakla beraber, tiroid dokularının patolojik inceleme sonuçlarında insidental bir malignite de saptanmamıştır. GH'da tiroid dışında malignite riskinin arttığını gösteren bir çalışma Szychtave ark. tarafından bildirilmiştir. Endokrin hastalıklar nedeniyle hastaneye yatırılan 2003 kadın hastanın tıbbi kayıtlarını retrospektif olarak incelemişler, TSHR antikor ve antiTg antikor düzeylerinin meme kanserli hastalarda daha fazla oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır (145). Meme dokusunun embriyolojik kökeni ektoderm olmasına rağmen, tiroid dokusu gibi iyot yakalayabilme özelliğine sahiptir ve laktasyon sırasında sütün iyot içeriğini bu yolla sağlamaktadır (146). Aynı zamanda meme yağ dokusunda TSHR'nün bulunması, GH gibi bu reseptörü hedefleyen bir patolojik durumun meme dokusunda da değişikliğe yol açacağını düşündürmektedir (147). Özellikle düşük dereceli meme kanserlerinde, TSHR antikor sıklıkla pozitif saptanmıştır (148). Östrojene benzer şekilde, tiroid hormonları da hem normal meme dokusunda farklılaşmayı hem de meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu etkilemektedir (149-150). Bunun yanında, 17 $\beta$ -östradiol'ün normal tiroid dokusunda ve tiroid tümörlerinde büyüme faktörü bağımlı sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (151).

Çalışmamızın IPA sonuçları, GH ve östrojen arasındaki ilişkiyi doğrularak, enerji metabolizması ile ilgili protein yolağında ortak molekülün Beta Östradiol olduğunu göstermiştir. GH'nın doğurgan çağıdaki genç kadınlarda daha sık görülmesi östrojenin tiroid hücreleri üzerindeki etkisinin GH'nın etyolojisinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca erkek hastaların yaklaşık %10'unda rastlanan jinekomasti ve libido azalması gibi bulgular hiperöstrojenemiye desteklemektedir. Erkek hastalarda bu bulgulara tiroid hormonları yol açıyor olabilir. Bunun yanında, tirotoksikozun seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) konsantrasyonunu artırarak plazmada yüksek oranda SHBG'e bağlanan testosteron ve dihidrotestosteron metabolik klirenslerini azaltması ve sonuçta artan androjenlerin östrojen ürünlerine dönüşmesi bir diğer mekanizma olarak düşünülebilir.(152-153).





## **6. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Çalışmamızda, GH ve TMNG hastalarının tiroid doku örneklerinin protein profilleri proteomiks yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın sonunda GH'nın tiroid dokularından elde edilen proteinlerin TMNG hasta grubunun tiroid dokularında ya çok düşük düzeyde ya da hiç eksprese olmadığı saptanmıştır.

GH grubunda saptadığımız proteinlerden hücre proliferasyon yolları ile ilgili olanların bazıları pankreas tümörü, hepatoselüler karsinom ve kolorektal kanserler gibi tümörlerle; enerji metabolizması yolları ile ilgili proteinlerin bazıları ise pankreatit, tip 1DM, Tip 2 DM, insulin direnci, metabolik sendrom ve MODY gibi glukoz metabolizması hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir.

GH'da tiroid dışı malignitelerin görülme sıklığı ile ilgili daha kesin bilgiler elde etmek için, geniş ölçekli çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Hastaların takiplerinde malignite açısından şüpheli semptom ve bulgular dikkatle değerlendirilmelidir.

GH'na sıklıkla Tip 1 DM'un eşlik etmesine rağmen, GH ile birlikte görülen diyabetin patogeneğinde otoimmünite dışında başka mekanizmalar rol alıyor olabilir. Dolayısıyla ,bu hastaların diyabetlerinin tedavi planında bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

Graves Hastalığı ile ilgili proteomiks çalışmalarının az sayıda olması ve günümüze kadar yapılmış çalışmaların daha çok tiroid malignitelerini içermesi nedeniyle literatürden elde edilen bilgi sınırlıdır.Çalışmamızın sonuçları GH'nın patogenezi ve klinik gidişini anlamaya yönelik gelecek araştırmalara ışık tutacaktır.

## **7. ÖZET**

GH diffüz guatr, hipertiroidi, bazı hastalarda görülen oftalmopati ve dermopati ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. GH'nın patogenezinde Tiroid Stimulan Hormon Reseptörüne (TSHR) karşı gelişen antikörlerin rol aldığı otoimmün mekanizmalar sorumlu tutulmakta; TMNG'nin ise, zaman içinde otonomi kazanarak toksik evreye geçen ötiroid multinodüler guatrdan kaynaklandığına inanılmaktadır. Günümüzde mekanizmaları tam anlaşılmamış olmakla birlikte, etyoloji ve patogenezinin farklı olduğu bilinen GH ve TMNG'nin, hastaların tiroid dokusunda farklı protein ekspresyonlarına yol açacakları düşünülmüştür. Çalışmamızda, GH ve TMNG hastalarının tiroid doku örneklerinin protein profillerini proteomiks yöntemler kullanarak karşılaştırmak ve farklılık gösteren proteinlerin hastalıkların patogenezindeki rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmaya, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı polikliniğinde Graves hastalığı tanısı ile takip edilmekte olan 12 hasta (n=12, grup G) ve kontrol grubu olarak TMNG tanısı ile takip edilen 12 hasta (n=12, grup T) alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen Graves hastalarının yaş ortalaması  $36 \pm 9,9$ ; TMNG hastalarının yaş ortalaması  $54 \pm 12,7$  yıl olarak bulunmuştur. Hastaların tiroid dokusu örneklerinden elde edilen özütlerin protein içeriği iki boyutlu jel elektroforez (2D-JE) teknikleri kullanılarak ayrıştırıldıktan sonra, proteinler MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmıştır. MASCOT yazılımı kullanılarak isimlendirilen proteinlerin fonksiyonları çeşitli veri bankalarının internet erişimleri kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmamızın sonunda GH grubunda 15 adet protein spotunun TMNG grubuna göre farklı ekspresyona olduğu görülmüştür. Bu proteinlerin hücre içerisindeki metabolik yollarda rol aldıkları saptanmıştır. Birincisi hücre büyümesi-farklılaşması ile ilişkili olan yollar [Prelaminin A/C (LMNA), "Makrophage Capping Protein" (CAPG), alfa enolaz (ENO1), "Rho GDP-dissociation inhibitor 1" (ARHGDI1), Peroxiredoxin 2 (PRDX2), Catepsin B (CTSB), Catepsin D (CTSD), Apolipoprotein A1 (APOA1), "Heat shock Protein  $\beta$ 1 (HSP  $\beta$ 1) proteinleri] ve diğeri enerji metabolizması ile ilişkili [Selenyum bağlayıcı protein 1 (SELENBP1), Kreatin kinaz B (CKB), Suksinil-KoA:3-ketoasid Koenzim A transferaz 1 (OXCT1), Dihidrolipoil

dehidrogenaz (DLD), Karbonik Anhidraz (CA1), Triozfosfat izomeraz (TPI1) proteinleri]yolaklardır.

Çalışmamızın sonucunda, hücre proliferasyon yolları ile ilişkili olan proteinlerin bir kısmıçeşitli tümörlerin proteomiks çalışmalarında da saptanmıştır. Bu çalışmamızın önemli bir sonucudur. GH'da tirotoksikozunmetabolizma artışı ve hücre proliferasyonuna yol açtığı, bu sırada kullanılan moleküler mekanizmaların malign hastalıklardaki hücre proliferasyonu sırasında da kullanıldığı düşünülebilir ancak, toksik multinoduler guatrda da tirotoksikoz olmasına rağmen bu proteinler eksprese edilememiştir. Diğer yandan sonuçlarımız çeşitli veri tabanlarında analiz edildiğinde eksprese edilen proteinlerin pankreas tümörü, hepatoselüler karsinom ve kolorektal kanserler gibi tümörlerle ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bir diğer önemli sonuç ise, eksprese edilen proteinlerinpankreatit, tip 1DM, Tip 2 DM, insulin direnci, metabolik sendrom ve MODY gibi glukoz metabolizması ile ilgili hastalıklarla ilişkilendirilmesidir. GH'na sıklıkla Tip 1 DM'un eşlik ettiği bilinmekle beraber, çalışmamızın sonuçları GH ile birlikte görülen diyabetin patogenezinde otoimmünite dışında diğer nedenlerin de söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Graves Hastalığı ile ilgili proteomiks çalışmalarının az sayıda olması ve günümüze kadar yapılmış çalışmaların daha çok tiroid malignitelerini araştırması nedeniyle literatürden elde edilen bilgi sınırlıdır. Sonuçlarımız, daha geniş çalışmalarla desteklenmeyi gerektirmektedir ve GH'nın patogenezinin anlamaya yönelik gelecekte yapılacak araştırmalar açısından umut vericidir.

**Anahtar Sözcükler:**Graves Hastalığı (GH), Tiroid Stimulan Hormon Reseptörü (TSHR), Toksik Multinodüler Guatr (TMNG), 2 boyutlu jel elektroforez (2D-JE)

## 8. SUMMARY

Graves' Disease is an autoimmune disease characterized by diffuse goiter and hyperthyroidism even though it shows symptoms of ophthalmopathy and dermopathy in some patients. Autoimmune mechanisms which contain antibodies developed against Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR) are held responsible for the pathogenesis of GD and TMNG is believed to be caused by euthyroid multinodular goiter gaining autonomy in time and going into toxic stage. With their mechanisms still not fully comprehended today, GD and TMNG are known to have different etiologies and pathogenesises and they are considered to cause different protein expressions in thyroid tissues of the patients. This study compares the protein profiles of GD and TMNG patients' thyroid tissue samples using proteomics methods and investigates the role of the differentiating proteins in the pathogenesis of the diseases.

12 patients (n=12, group G) diagnosed with Graves' disease and followed in Kocaeli University Faculty of Medicine Internal Diseases Department, Endocrinology and Metabolic Diseases Polyclinic and 12 patients (n:12, group T) diagnosed with TMNG and followed as the control group are incorporated into the study. The average age of the Graves' disease patients is  $36 \pm 9.9$  and the average age of the TMNG patients is  $54 \pm 12.7$ . The protein content of extracts obtained from the patients' thyroid tissue samples was separated with two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) method and the proteins were identified via MALDI TOF mass spectrometer. The proteins were named by MASCOT software and their functions were determined by using the internet connection of various data banks.

At the end of the study, 15 protein spots in GD group were observed in different expression than those of TMNG's. These proteins were detected to play role in two different metabolic pathways in cell. The first one is cellular growth-differentiation related pathways [Prelaminin A/C (LMNA), "Makrophage Capping Protein" (CAPG), alfa enolaz (ENO1), "Rho GDP-dissociation inhibitor 1" (ARHGDI1), Peroxiredoxin 2 (PRDX2), Catepsin B (CTSB), Catepsin D (CTSD), Apolipoprotein A1 (APOA1), "Heat shock Protein  $\beta$ 1 (HSP  $\beta$ 1) proteins] and the other is energy metabolism related [Selenium-binding protein 1 (SELENBP1), Creatine kinase B (CKB), Suksinil-KoA:3-ketoasid Koenzyme A transferaz 1(OXCT1), Dihidrolipoil

dehidrogenaz (DLD), Carbonic Anhydrase (CA1), Triosephosphate Isomerase (TPI1) proteins] pathways.

As a result of the study, some of the proteins related to cell proliferation pathways were detected in the proteomics studies of various tumors. This is a significant result of the study. It could be considered that thyrotoxicosis in GD causes metabolism increase and cell proliferation and the molecular mechanisms used in the meantime are also used during the proliferation of malign diseases. However, these proteins could not be expressed even though toxic multinodular goitre, too, has thyrotoxicosis. On the other hand, when the results were analyzed in various databases the expressed proteins were observed to be related to pancreas tumor and tumors such as hepatocellular carcinoma and colorectal cancer. The other significant result of the study is that the expressed proteins are correlated to pancreatitis, T1DM, T2DM, insulin resistance, metabolic syndrome and diseases related to glucose metabolism such as MODY. While it is known that GD is usually accompanied with DM Type 1, the results of the study suggest that there could be other causes for the pathogenesis of diabetes seen with GD other than autoimmunity.

The information in literature is limited since there are few proteomics studies about Graves's disease and the studies up to now have rather researched thyroid malignancies. The results need to be backed up by more comprehensive studies and the results are promising in terms of future studies as to understanding the pathogenesis of GD.

**Keywords:** Graves' disease (GD), Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR), Toxic Multinodular Goitre (TMNG), Two-dimensional Gel Electrophoresis (2D-GE).

## **8. KAYNAKLAR DİZİNİ**

1. Mandel SJ, Larsen PR, Davies TF. CHAPTER 12 – Thyrotoxicosis. *Williams Textbook of Endocrinology*. By Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, MD, P. Reed Larsen, MD and Henry M. Kronenberg, MD. 12th Edition. Copyright © 2011 Elsevier

2. Graves RJ: Newly observed affection of the thyroid. *London Med Surg J* 1835; **7**:515-523
3. Parry CH: *Collections from the Unpublished Medical Writings of the Late Caleb Hillier Parry*. London, Underwood, 1825
4. von Basedow KA: Exophthalmos durch hypertrophie des zellgewebes in der Augenhole. *Wochenschr Ges Heilk Berl* 1840; **6**:197
5. Kriss JP, Pleshakov V, Chien JR. Isolation and identification of the long acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol* 1964; **24**: 1005-28
6. Latif R, Morshed SA, Zaidi M, Davies TF. The thyroid –stimulating hormone receptor: impact of thyroid stimulating hormone and thyroid stimulating hormonereceptor antibodies on multimerization, cleavage and signalling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009; **38**:319
7. Kraiem Z, Lahat N, Glaser B, Baron E, Sadoh O, Sheinfeld M Thyrotropin receptor blocking antibodies: incidence, characterization and in vitro synthesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987; **27**:409–421
8. Kraiem Z, Baron E, Kahana L, Sadeh O, Sheinfeld M Changes in the stimulating and blocking TSH receptor antibodies in a patient undergoing three cycles of transition from hypothyroidism to hyperthyroidism and back to hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992; **36**:211–214/9.
9. Weetman AP, Yatenman ME, Ealey PA, Black CM, Reimer CB, Williams Jr RC, Shine B, Marshall MJ 1990 Thyroid-stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J Clin Invest* **86**:723–727/10.
10. Davies TF, Weber CM, Wallack P, Platzer M 1986 Restricted heterogeneity and T cell dependence of human thyroid autoantibody immunoglobulin G subclasses. *J Clin Endocrinol Metab* **62**:945–949
11. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current Perspective on the Pathogenesis of Graves' Disease and Ophthalmopathy. *Endocrine Reviews* 2003; **24** (6):802-85
12. Furmaniak J, Smith BR. The structure of thyroid autoantigens. *Autoimmunity* 1990; **7**: 63-80
13. Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, Latrofa F, Johnstone AP, McLachlan SM, Rapoport B 2002 Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves' disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin horeceptor. *J Clin Invest* **110**:161–164

14. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, et al. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 2008
15. Leovey A, Nagy E, Balazs G, et al: Lymphocytes resided in the thyroid are the main source of TSH-receptor antibodies in Basedow's-Graves' disease?. *Exp Clin Endocrinol* 1992; 99:147-150./16
16. Mariotti S, del Prete GF, Mastromauro C, et al: The autoimmune infiltrate of Basedow's disease: analysis of clonal level and comparison with Hashimoto's thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol* 1991; 97:139-146./17
17. Watson PF, Pickerill AP, Davies R, et al: Analysis of cytokine gene expression in Graves' disease and multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:355-360
18. Fisfalen ME, Palmer EM, Van Seventer GA, et al: Thyrotropin-receptor and thyroid peroxidase-specific T cell clones and their cytokine profile in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3655-3663
19. Salmaso C, Olive D, Pesce G, et al: Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2002; 35:159-167
20. Marinò M, Chiovato L, Pinchera A. Chapter 80 – Graves' Disease. *Endocrinology*. By Jameson JL, De Groot 6th Ed., Philadelphia: Copyright © 2010 Elsevier Available from: <http://www.expertconsultbook.com/expertconsult>
21. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; 2: 1115-9
22. Jansson R, Karlsson A, Forsum U: Intrathyroidal HLA-DR expression and T lymphocyte phenotypes in Graves' thyrotoxicosis, Hashimoto's thyroiditis and nodular colloid goiter. *Clin Exp Immunol* 1984; 58:264-272. /21.
23. Aichinger G, Fill H, Wick G: In situ immune complexes, lymphocyte subpopulations, and HLA-DR-positive epithelial cells in Hashimoto thyroiditis. *Lab Invest* 1985; 52:132-140.
24. Londei M, Lamb JR, Bottazzo GF, et al: Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature* 1984; 312:639-641.
25. Kimura H, Davies TF: Thyroid-specific T cells in the normal Wistar rat. II: T cell clones interact with cloned Wistar rat thyroid cells and provide direct evidence for autoantigen presentation by thyroid epithelial cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 58:195-206.)



26. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, Concepcion ES, Osman R, Oashi T, Tomer Y. Arginine at position 74 of the HLA-DR beta1 chain is associated with Graves' disease. *Genes Immun.* 2004;5(3):203
27. Kabel PJ, Voorbij HA, De Haan M, et al: Intrathyroidal dendritic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:199-207
28. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, et al: Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:930-934
29. Zeitlin A, Simmonds MJ, Gough GJ Genetic Developments in autoimmune thyroid disease: an evolutionary process, *Clin Endocrinol* 2007; 68: 671-682
30. Heward JM, Allahabadi A, Daykin J. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease : replication using a population case control and family based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3394-7
31. Chen QY , Huang W, She JX, ; Baxter F, Volpe R. HLA- DRB1\*08, DRB1\*03/DRB3\*0101, and DRB3\*0202 are susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1\*07 is protective. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3182-6
32. Jacobson EM, Tomer Y: The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid* 2007; 17:949-961
33. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y: The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun* 2008; 30:58-62.
34. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al: Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423:506-511.
35. Mayans S, Lackovic K, Nyholm C, et al: CT60 genotype does not affect CTLA-4 isoform expression despite association to T1D and AITD in northern Sweden. *BMC Med Genet* 2007; 8:3
36. Tomer Y, Davies TF: Infection, thyroid disease and autoimmunity. *Endocr Rev* 1993; 14:107-120
37. Tomer Y: Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *J Autoimmun* 2010; 34:J322-J326./ 38.
38. Carter JK, Smith RE: Rapid induction of hypothyroidism by an avian leukosis virus. *Infect Immun* 1983;40:795-805
39. Fassler R, Dietrich H, Kromer G, et al: The role of testosterone in spontaneous autoimmune thyroiditis of Obese strain (OS) chickens. *J Autoimmun* 1988; 1:97-108

40. Brix TH, Knudsen GP, Kristiansen M, et al: High frequency of skewed X chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5949-5953
41. Barclay ML, Brownlie BEW, Turner JG, Wells JE. Lithium associated thyrotoxicosis: a report of 14 cases with statistical analysis of incidence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40:759-64
- 42 .Marinò M, Chiovato L, Pinchera A, Chapter 80 – Graves’ Disease *Williams Textbook of Endocrinology*. By Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, MD, P. Reed Larsen, MD and Henry M. Kronenberg, MD. 12th Edition. Copyright © 2011 Elsevier Available from: [www.williamsendo.com](http://www.williamsendo.com)
43. Kraiem Z, Lahat N, Glaser B, Baron E, Sadoh O, Sheinfeld M Thyrotropin receptor blocking antibodies: incidence, characterization and *in vitro* synthesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987; 27:409–421
44. Chang TC, Wu SL, Hsiao YL, et al: TSH and TSH receptor antibody–binding sites in fibroblasts of pretibial myxedema are related to the extracellular domain of entire TSH receptor. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:113-120
45. Daumerie C, Ludgate M, Costagliola S, et al: Evidence for thyrotropin receptor immunoreactivity in pretibial connective tissue from patients with thyroid-associated dermopathy. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:35-38
46. Villadolid MC, Nagataki S, Uetani M, et al: Untreated Graves’ disease patients without clinical ophthalmopathy demonstrate a high frequency of extraocular muscle (EOM) enlargement by magnetic resonance. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2830-2833
47. Wiersinga WM, Bartelena L: Epidemiology and prevention of Graves’ ophthalmopathy. *Thyroid* 2002; 12:855-860
48. Gamblin GT, Harper DG, Galentine P, et al: Prevalence of increased intraocular pressure in Graves’ disease—evidence of frequent subclinical ophthalmopathy. *N Engl J Med* 1983; 308:420-424
49. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current Perspective on the Pathogenesis of Graves’ Disease and Ophthalmopathy. *Endocrine Reviews* 2003; 24 (6):802-85
50. Burch HB, Bahn RS, Chapter 81 – Graves’ Ophthalmopathy. *Endocrinology*. By Jameson JL, De Groot L 6th Ed., Philadelphia: Copyright © 2010 Elsevier Available from: <http://www.expertconsultbook.com/expertconsult>

51. Stan MN, Bahn RS 2010 Risk factors for development or deterioration of Graves' Ophthalmopathy *Thyroid* (volume 20, number 7):777-783
52. Daroszewski J, Pawlak E, Karabon E, Frydecka I, Jonkisz A, Slowik M, Bolanowski M 2009 Soluble CTLA-4 receptor an immunological marker of Graves' Disease and severity of ophthalmopathy is associated with CTLA-4 Jo31 and CT60 gene polymorphisms. *Eur J Endocrinol/ Eur Fed Endocr Soc* 161: 787-793
53. Chong KK, Chiang SW, Wong GW, Tam PO, Ng TK, Hu Yj, Yam GH, Lam DS, Pang CP 2008 Association of CTLA-4 and IL-13 gene polymorphisms with Graves' Disease and ophthalmopathy in Chinese children. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2409-2415
54. Alevizaki M, Mantzou E, Cimponeriu A, Saltiki K, Phillippou G, Wiersinga W 2009 The Pro12Ala PPARgamma gene polymorphism: possible modifier of the activity and severity of thyroid associated orbitopathy (TAO). *Clin Endocrinol (Oxf)* 70: 464-468
55. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF, 1999 Mapping the major susceptibility loci for familial Graves' and Hashimotos' diseases: evidence for genetic heterogeneity and gene interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4656-4664
56. Villanueva R, Inzerillo AM, Tomer Y, et al: Limited genetic susceptibility to severe Graves' ophthalmopathy: no role for CTLA-4 but evidence for an environmental etiology. *Thyroid* 2000; 10:791-798
57. Bartalena L, Martino E, Marcocci C, et al: More on smoking habits and Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest* 1989; 12:733-737
58. Traisk F, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Andersson T, Berg G, Calissendorff J, Hallengren B, Hedner P, Lantz M, Nystrom E, Ponjavic V, Taube A, Topping O, Wallin G, Asman P, Lundell G 2009 Thyroid-associated ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism with antithyroid drugs or iodine-131. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3700-3707
59. Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, Bruno-Bossio G, Nardi M, Bartolomei MP, Lepri A, Rossi G, Martino E, Pinchera A 1998 Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 338:73-78
60. Krassas GE, Segni M, Wiersinga WM 2005 Childhood Graves' ophthalmopathy: results of a European questionnaire study. *Eur J Endocrinology/Eur Fed Endocr Soc* 153:515-521
61. Burch HB, Lahiri S, Bahn R, et al: Superoxide radical production stimulates human retroocular fibroblast proliferation in Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res* 1997; 65:311-316

62. Cawood TJ, Moriarty P, O'Farrelly C, O'Shea D 2007 Smoking and thyroid-associated ophthalmopathy: a novel explanation of the biological link. *J Clin Endocrinol Metab* 92:59–64
63. Hofbauer LC, Muhlberg T, Konig A, et al: Soluble interleukin-1 receptor antagonist serum levels in smokers and nonsmokers with Graves' ophthalmopathy undergoing orbital radiotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2244-2247
64. Tan GH, Dutton CM, Bahn RS: Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptor inhibit IL-1-induced glycosaminoglycan production in cultured human orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:449-452
65. Salvi M, Pedrazzoni M, Girasole G, Giuliani N, Minelli R, Wall JR, Roti E 2000 Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol/Eur Fed Endocr Soc* 143:197–202.
66. Davies TF, Teng CS, McLachlan SM, Smith BR, Hall R 1978 Thyrotropin receptors in adipose tissue, retro-orbital tissue and lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol* 9:303–310
67. Perros P, Kendall-Taylor P 1994 Demonstration of thyrotropin binding sites in orbital connective tissue: possible role in the pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest* 17:163–170
68. Bahn RS 2010 Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 362:726–738
69. Wakelkamp IM, Bakker O, Baldeschi L, Wiersinga WM, Prummel MF 2003 TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58:280–287
70. Khoo DH, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Tai ES, Chee SP, Eng PH, Aw SE, Fok AC 1999 The combination of absent thyroid peroxidase antibodies and high thyroid-stimulating immunoglobulin levels in Graves' disease identifies a group at markedly increased risk of ophthalmopathy. *Thyroid* 9:1175–1180
71. Noh JY, Hamada N, Inoue Y, Abe Y, Ito K 2000 Thyroid stimulating antibody is related to graves' ophthalmopathy, but thyrotropin-binding inhibitor immunoglobulin is related to hyperthyroidism in patients with Graves' disease. *Thyroid* 10:809–813
72. Goh SY, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Khoo DH 2004 Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves' disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:600–607
73. Kung AW, Yau CC, Cheng A 1994 The incidence of ophthalmopathy after radioiodine therapy for Graves' disease: prognostic factors and the role of methimazole. *J Clin Endocrinol Metab* 79:542–546

74. Mourits MP, Koornneef L, Wiersinga WM, Prummel MF, Berghout A, van der Gaag R 1989 Clinical criteria for the assessment of disease activity in Graves' ophthalmopathy: a novel approach. *Br J Ophthalmol* 73:639–644
75. Gerding MN, van der Meer JW, Broenink M, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF 2000 Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:267–271
76. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH: The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 1989; 63:908-911
77. Belfiore A, La Rosa GL, La Porta GA, et al: Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *Am J Med* 1992; 93:363-369.
78. Knudsen N, Perrild H, Christiansen E, et al: Thyroid structure and size and two-year follow-up of solitary cold thyroid nodules in an unselected population with borderline iodine deficiency. *Eur J Endocrinol* 2000; 142:224-230
79. Berghout A, Wiersinga WM, Smits NJ, et al: Interrelationships between age, thyroid volume, thyroid nodularity, and thyroid function in patients with sporadic nontoxic goiter. *Am J Med* 1990; 89:602-608
80. Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, et al: Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev* 2005; 26:504-524
81. Corral J, Martin C, Perez R, et al: Thyroglobulin gene point mutation associated with non-endemic simple goitre. *Lancet* 1993; 341:462-464.
82. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al: Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997; 17:411-422.
83. Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, et al: Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet* 2000; 90:38-44.
84. Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, et al: Recurrent T354P mutation of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in patients with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2940-2943
85. Many MC, Deneff JF, Hamudi S, et al: Effects of iodide and thyroxine on iodine-deficient mouse thyroid: a morphological and functional study. *J Endocrinol* 1986; 110:203-210
86. Raspe E, Dumont JE: Tonic modulation of dog thyrocyte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and I<sup>-</sup> uptake by thyrotropin through the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate cascade. *Endocrinology* 1995; 136:965-973

87. Parma J, Duprez L, Van Sande J, et al: Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas.*Nature* 1993; 365:649-651)
88. Führer D, Holzapfel HP, Wonerow P, et al: Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene and not in the Gs alpha protein gene in 31 toxic thyroid nodules.*J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3885-3891.
89. Georgopoulos NA, Sykiotis GP, Sgourou A, et al: Autonomously functioning thyroid nodules in a former iodine-deficient area commonly harbor gain-of-function mutations in the thyrotropin signaling pathway.*Eur J Endocrinol* 2003; 149:287-292.
90. Gozu HI, Bircan R, Krohn K, et al: Similar prevalence of somatic TSH receptor and Gs alpha mutations in toxic thyroid nodules in geographical regions with different iodine supply in Turkey.*Eur J Endocrinol* 2006; 155:535-545
91. Abs R, Stevenaert A, Beckers A: Autonomously functioning thyroid nodules in a patient with a thyrotropin-secreting pituitary adenoma: possible cause-effect relationship.*Eur J Endocrinol* 1994; 131:355-358.
92. Studer H, Huber G, Derwahl M, et al: [The transformation of Basedow's struma into nodular goiter: a reason for recurrence of hyperthyroidism].*Schweiz Med Wochenschr* 1989; 119:203-208.
93. Cheung NW, Boyages SC: The thyroid gland in acromegaly: an ultrasonographic study.*Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 46:545-549
94. Dumont JE, Ermans AM, Maenhaut C, et al: Large goitre as a maladaptation to iodine deficiency.*Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:1-10)
95. Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, et al: Iodine deficiency activates antioxidant genes and causes DNA damage in the thyroid gland of rats and mice.*Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:990-999
96. Gerard AC, Poncin S, Caetano B, et al: Iodine deficiency induces a thyroid stimulating hormone-independent early phase of microvascular reshaping in the thyroid.*Am J Pathol* 2008; 172:748-760).
97. Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, et al: Risk factors for goiter and thyroid nodules.*Thyroid* 2002; 12:879-888.
98. Scanelli G: [Lithium thyrotoxicosis, Report of a case and review of the literature].*Recenti Prog Med* 2002; 93:100-103
99. Brix TH, Hansen PS, Kyvik KO, et al: Cigarette smoking and risk of clinically overt thyroid disease: a population-based twin case-control study.*Arch Intern Med* 2000; 160:661-666

100. Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L: Major role of genes in the etiology of simple goiter in females: a population-based twin study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3071-3075
101. Hansen PS, Brix TH, Bennedbæk FN, et al: Genetic and environmental causes of individual differences in thyroid size: a study of healthy Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2071-2077
102. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with geneprod mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090-4.)
103. Marc R. Wilkins, Christian Pasquali, Ron D. Appel, Keli Ou, Olivier Golaz, Jean-Charles Sanchez, Jun X. Yan, Andrew. A. Gooley, Graham Hughes, Ian Humphery-Smith, Keith L. Williams & Denis F. Hochstrasser (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis". *Nature Biotechnology* 14 (1)
104. Gry M, Rimini R, Strömberg S, Asp lund A, Pontén F, Uhlén M, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* 2009;10:365.
105. Tambor V, Fucíková A, Lenco J, Kacerovskí M, Reháček V, Stulík J, et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res* 2010;59(4):471-97.
106. Krause K, Jeßnitzner B, Fuhrer D. Proteomics in Thyroid Tumor Research *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(8):2717–2724
107. McKenzie JM 1958 The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology* 63:372–38263.
108. Kriss JP 1968 Inactivation of long-acting thyroid stimulator (LATS) by anti- and anti- antisera. *J Clin Endocrinol Metab* 28:1440–144465.
109. Smith BR, Dorrington KJ, Munro DS 1969 The distribution of the long-acting thyroid stimulator among G immunoglobulins. *Biochem Biophys Acta* 188:89–100828
110. Manley SW, Bourke JR, Hawker RW 1974 The thyrotropin receptor in guinea pig thyroid homogenate: interaction with the long-acting thyroid stimulator. *J Endocrinol* 61:437–44567.
111. Adams DD, Kennedy TH 1967 Occurrence in thyrotoxicosis of a globulin which protects LATS from neutralization by an extract of thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 27:173–177.)

112. Krause K Schierhorn A, Sinz A, Wissmann J, Beck-Sickinger A, Paschke R, Fuhre D. 2006 Towards the Application of Proteomics to Human Thyroid Tissue *Thyroid* 16: 1131-1143
113. Sofidis A, Becker S, Hellman U, Rosenberg L. 2012 Proteomic profiling of follicular and papillary thyroid tumors *Eur J Endoc* 166: 657-667
114. Matheis N, Okrojek J, Grus FH, Kahaly GJ 2012 Proteomics of Tear Fluid in Thyroid-Associated Orbitopathy. *Thyroid* 22: 1039-1045
115. Review Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD *Genes Dev.* 2008 Apr 1; 22(7):832-53
116. Morofuji, N.; Ojima, H.; Onaya, H.; Okusaka, T.; Shimada, K.; Sakamoto, Y.; Esaki, M.; Nara, S.; Kosuge, T.; Asahina, D.; Ushigome, M.; Hiraoka, N.; Nagino, M.; Kondo, T. Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J. Proteomics* 2012, 75 (5), 1577-1589.
117. Kimura, K.; Ojima, H.; Kubota, D.; Sakamoto, M.; Nakamura, Y.; Tomonaga, T.; Kosuge, T.; Kondo, T. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. *J. Proteomics* 2013, 78, 362-373
118. Ichikawa H, Kanda T, Kosugi SI, Kawachi Y, Sasaki H, Wakai T, Kondo T. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal the role of a novel macrophage-capping protein in lymph node metastasis in gastric cancer. *J Proteome Res.* 2013 Jun 20.
119. Yoneda M, Fujii A, Ito A, Yokoyama H, Nakagawa H, Kuriyama M. High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase in Hashimoto's encephalopathy. *J Neuroimmunol.* 2007 Apr;185(1-2):195-200.
120. Chu, P. Y., Hsu, N. C., Liao, A. T., Shih, N. Y. et al., Overexpression of enolase correlates with poor survival in canine mammary carcinoma. *BMC Vet. Res.* 2011, doi:10.1186/1746-6148-7-62.
121. Tsai, S. T., Chien, I. H., Shen, W. H., Kuo, Y. Z. et al., ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *Eur. J. Cancer* 2010, 46, 1712–1723.
122. Yamashita T, Okamura T, Nagano K, Imai S, Abe Y, Nabeshi H, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer. *Pharmazie.* 2012 Mar;67(3):253-5
123. Chiang WF, Ho HC, Chang HY, Chiu CC, Chen YL, Hour TC, Chuang SJ, Wu YJ, Chen HR, Chen JH, Liu SY, Lu CL, Chen JY. Overexpression of Rho GDP-



issociation inhibitor alpha predicts poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011 Jun;47(6):452-8.

124. Staels B, Van Tol A, Chan L, Will H, Verhoeven G, Auwerx J. 1990 Alterations in thyroid status modulates apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. *Endocrinology.* 127:1144–1152.

125. Strobl W, Gorder NL, Lee YCL, Gotto AM, Patsch W. 1990 Role of thyroid hormone in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. *J Clin Invest.* 85:659–667.

126. Ozata M, Yildirimkaya M, Yilmaz K, Kutluay T, Corakci A, Beyhan Z, Gundogan MA. The effects of thyroid status on serum apolipoprotein A-I-containing lipoprotein particles. *Horm Metab Res.* 1998 Apr;30(4):217-21

127. Tan KC, Shiu SW, Kung AW. Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Aug;83(8):2921-4.

128. O'Brien T, Katz K, Hodge D, Nguyen TT, Kottke BA, Hay ID. 1997 The effect of treatment of hypothyroidism and hyperthyroidism on plasma lipids and apolipoproteins AI, AII and E. *Clin Endocrinol (Oxf).* 46:17–20.

129. Verdugo C, Perrot L, Ponsin G, Valentin C, Berthezene F. 1987 Time-course of alterations of high density lipoproteins during thyroxine administration to hypothyroid women. *Eur J Clin Invest.* 17:313–316.

130. Agdeppa D, Macaron C, Mallik T, Schnuda ND. 1979 Plasma high density lipoprotein cholesterol concentration in thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 49:726–729.

131. Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG & Soini Y. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *Journal of Pathology* 2002 196 316–323. (doi:10.1002/path.1042)

132. Fujita Y, Nakanishi T, Hiramatsu M, Mabuchi H, Miyamoto Y, Miyamoto A, Shimizu A & Anigawa N. Proteomics-based approach identifying autoantibody against peroxiredoxin VI as a novel serum marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2006 12 6415–6420. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1315)

133. Zhang B, Wang Y & Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Letters* 2009 286 154–160.

134. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, Netea-Maier RT, Chiang SA, Heinz DE, Shroyer KR, Duncan MW, Haugen BR 2006 Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog* 45:613–626

135. Krause K, Karger S, Schierhorn A, Poncin S, Many MC, Fuhrer D 2007 Proteomic profiling of cold thyroid nodules. *Endocrinology* 148:1754–1763
136. Pedersen IB, Knudsen N, Carlé A, Schomburg L, Köhrle J, Jørgensen T, Rasmussen LB, Ovesen L, Laurberg P. Clin Endocrinol (Oxf). 2013 Feb 28. doi: 10.1111/cen.12185. [Epub ahead of print] Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study.
137. Yang M., Sytkowski A.J. Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells *Cancer Res.* 58:3150-3153(1998)
138. Zhang S, Li F, Younes M, Liu H, Chen C, Yao Q Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. *journal.pone* 2013 May 21
139. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, et al: A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998 Nov; 2:559-569.
140. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, et al: Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000 Jul; 6:87-97.
141. Kahn BB, Flier JS: Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000 Aug; 106:473-481
142. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al: CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006 Jan; 116:115-124
143. Weston CR, Davis RJ: The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007 Apr; 19:142-149
144. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007 Jan; 117:175-184
145. TSH receptor antibodies have predictive value for breast cancer - retrospective analysis. Szychta P, Szychta W, Gesing A, Lewiński A, Karbownik-Lewińska M. *Thyroid Res.* 2013 May 16;6(1):8. doi: 10.1186/1756-6614-6-8
146. Zygmunt A, Adamczewski Z, Wojciechowska-Durczyńska K, Cyniak-Magierska A, Krawczyk-Rusiecka K, Zygmunt A, Karbownik-Lewińska M, Lewiński A: Evaluation of efficacy of iodine prophylaxis in Poland based on the examination of schoolchildren living in Opoczno Town (Lodz Voivodship). *Thyroid Res* 2012, 5:23.
147. Ali A, Mir MR, Bashir S, Hassan T, Bhat SA: Relationship between the level of Serum Thyroid Hormones and the Risk of Breast Cancer. *J Biol Agr Healthc* 2011, 2:56–60.

148. Oh HJ, Chung JK, Kang JH, Kang WJ, Noh DY, Park IA, Jeong JM, Lee DS, Lee MC: The relationship between expression of the sodium/iodide symporter gene and the status of hormonal receptors in human breast cancer tissue. *Cancer Res Treat* 2005, 37:247–250.
149. Dinda S, Sanchez A, Moudgil V: Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells. *Oncogene* 2002, 21:761–768.
150. Conde I, Paniagua R, Zamora J, Blaquez MJ, Fraile B, Ruiz A, Arenas MI: Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation. *Ann Oncol* 2006, 17:60–64.
151. Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1072–1077
152. Meikle AW: The interrelationships between thyroid dysfunction and hypogonadism in men and boys. *Thyroid* 2004; 14(suppl 1):S17-S25.
153. Tagawa N, Takano T, Fukata S, et al: Serum concentration of androstenediol and androstenediol sulfate in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr J* 2001; 48:345-354.