



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIPBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TİROİD TÜMÖRLERİNDE ZIP4, ZO-1 VE CLAUDİN-1
EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA VE
REAL-TİME PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DR. MUSTAFA NACİR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR - 2020



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TİROİD TÜMÖRLERİNDE ZIP4, ZO-1 VE CLAUDİN-1 EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA VE REAL-TİME PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. MUSTAFA NACİR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi İBRAHİM İBİLOĞLU

DİYARBAKIR - 2020

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilimsel ve mesleki deneyimleri başta olmak üzere her konuda yol gösterici olan başta tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Dr. İbrahim İBİLOĞLU'na, diğer hocalarım Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM, Doç. Dr. Selver ÖZŞENER ÖZEKİNCİ, Doç. Dr. Ulaş ALABALIK, Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur KELEŞ, Dr. Öğr. Üyesi Gülay AYDOĞDU, Dr. Öğr. Üyesi Engin Deniz YILMAZ'a,

İstatistiksel değerlendirmede yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi İsmail YILDIZ'a, İngilizce profesyonel destek sunan Dr. Öğr. Üyesi Osman SOLMAZ'a,

Beraber çalışmaktan ve tanışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uz. Dr. Arif HAMİDİ, Uz. Dr. Berat SOYLU, Uz. Dr. Fatma Şule Kutlar Dursun, Dr. Nursel COŞKUNSEL, Arş. Gör. Dr. Gülden YILDIZ, Arş. Gör. Dr. Özge YAMAN COŞKUN, Arş. Gör. Dr. Hatice SERTAKAN, Arş. Gör. Dr. Medine DİCLELİ, Arş. Gör. Dr. Tuğçem BOLOVA'ya,

Çalışmamın kesit alma işlemi, immünohistokimya ve DNA izolasyon aşamalarında yardımcı olan arkadaşlarım teknisyen Neval TANIŞ ÖZDEMİR, Serdar LAÇIN, Abdürrahim GÜNDÜZ, Mesut KURTAY, Ali KARAL, biyolog Osman AKAMAN, biyolog Ali DEMİR ve kimyager Vedat YILDIRIM olmak üzere bölümümüzde çalışan tüm arkadaşlarıma,

Bu tezin hazırlanmasında maddi destek sağlayan “Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü (DÜBAP)”ne (TIP.19.019 no'lu proje),

Hayatımda her zorlukta olduğu gibi akademik hayatımda da bana desteğini esirgemeyen ailemin hekimi, eşim Feyzanur'a, bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgilerini her daim hissettiğim anneme, babama ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Eylül-2020

MUSTAFA NACİR

ÖZET

Tiroid insan vücudu için hayati fonksiyonlara sahip en önemli endokrin organlarından biridir. Mikroskobik olarak merkezi bir kolloid etrafında folikül epitel hücreleri ve bunlara komşu parafoliküler C hücrelerinden oluşur. Bu hücreler tiroid neoplazmlarının geliştiği ana kaynakları oluşturmaktadırlar. Tiroid neoplazmları en çok karşılaşılan endokrin malignitelerdir. Kadın hastalarda erkek cinsiyete göre daha fazla görülmekte olup ülkemizde tiroid kanserleri kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür. En sık boyun bölgesine olan metastaz potansiyelleri nedeni ile hastaların yaşam kalitesini ve yaşam sürelerini etkilemektedir.

ZIP4 intra membranöz yerleşimli bir çinko transmembran proteinidir. Çinko, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu üzerinde merkezi bir rol oynar ve ZIP4 gibi çinko taşıyıcılar, hücre içi çinko seviyesini değiştirerek çinko bağımlı transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenler. Bu durumun tümör migrasyonu, invazyonu ve EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş) süreçlerini desteklediği gösterilmiştir. ZO-1 ve Claudin-1, çeşitli kanserlerde miktarları artıp azalan önemli tight junction proteinleridir. Normal hücrelerde ZO-1 ve Claudin-1, epitelyal hücrelerin birbirleriyle sıkı bağlantılarını sürdürmesi için özel yapılar oluştururlar.

Bu çalışmada tiroid tümörlerinde ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 ekspresyonu ve bu ekspresyonun tümör tipleri ile prognostik parametrelerle ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamıza 2010-2019 yılları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD.'na gönderilen tiroidektomi materyalleri arasından seçilen 66 olgu dahil edilmiştir. Bu 66 olgunun; 20'si multinodüler guatr, 18'i tiroid papiller karsinom, 11'i tiroid medüller karsinom, 11'i tiroid folliküler karsinom ve 6'sı anaplastik tiroid karsinomu tanılıdır. Tüm olgulara immünohistokimyasal ve Real-Time PCR yöntemleri ile ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 çalışıldı. İmmünohistokimyasal ve Real Time-PCR çalışma sonuçları yaş, cinsiyet, histolojik alt tip, cerrahi sınır durumu ve metastaz varlığı ile karşılaştırıldı.

İHK ve RT-PCR çalışmalarının ardından ZIP4, Claudin-1 ve ZO-1'in İHK ekspresyonu ile histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. ZIP4 ve Claudin-1 daha çok tümörlü olgularda, ZO-1 ise hem tümörlü hem tümörsüz olgularda eksprese edilme eğilimi göstermiştir. Claudin-1 ile membranöz ve hücre içi lokalizasyonlu boyanma paterniyle histolojik alt tiplere göre farklı boyanma niteliği gözlenmiş, medüller tiroid karsinomu olgularının tamamında hücre içi boyanma izlenmiştir. ZIP4 ve Claudin-1'in RT-PCR ile ekspresyonu histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık göstermiş olup bu fark ZO-1 ile izlenmemiştir. Metastaz varlığının ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonu ile artmış olduğu ve ZO-1 ile anlamlı değişimin olmadığı görülmüştür.

Tiroid karsinomlarının prognostik seyirleri çoğunlukla iyi olsa da metastazlı olgularda sıklıkla boyun diseksiyonu gibi ağır cerrahi işlemlerin uygulanmasına neden olabilmektedir. Claudin-1 ve ZIP4 ekspresyonunun tiroid tümörlerinde kötü prognoz ve metastaza yatkınlığı gösterme ve hedefe yönelik tedavi geliştirme bakımından önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Tümör dışı dokuda yüksek oranda eksprese edilen ZO-1 belirtecinin ise tiroid tümörlerinde prognoz belirteci olarak kullanımının faydalı olmadığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Tiroid karsinomu, ZIP4, ZO-1, Claudin-1, Real-Time PCR, immünohistokimya

ABSTRACT

The thyroid gland is one of the most important endocrine organs with vital functions for the human body. Microscopically, it consists of follicle epithelial cells and adjacent parafollicular C cells around a central colloid. These cells constitute the main sources from which thyroid neoplasms develop. Thyroid neoplasms are the most common endocrine malignancies. They are more common in women patients than men. Thyroid cancers are the second most common type of cancer in women after breast cancer in our country. It affects the quality of life and lifespan of the patients, mostly due to their metastasis potential to the neck region.

ZIP4 is an intra-membranous zinc transmembrane protein. Zinc plays a central role in the activation of transcription factors, and zinc transporters such as ZIP4 regulate the activity of zinc-dependent transcription factors by changing the intracellular zinc level. It has been shown that this situation supports tumor migration, invasion, and EMT (epithelial-mesenchymal transition) processes. ZO-1 and Claudin-1 are important tight junction proteins that increase and decrease in amounts in various cancers. In normal cells, ZO-1 and Claudin-1 form special structures for epithelial cells to maintain tight junctions.

In this study, we aimed to investigate the expression of ZIP4, ZO-1 and Claudin-1 in thyroid tumors and the relationship of this expression with tumor types and prognostic parameters.

66 cases selected among the thyroidectomy materials sent to Dicle University Medical Faculty Pathology Department between 2010-2019 were included in our study. Of these 66 cases; 20 of them are diagnosed with multi nodular goiter, 18 of them are papillary thyroid carcinoma, 11 of them are medullary thyroid carcinoma, 11 of them are follicular thyroid carcinoma, and 6 of them are anaplastic thyroid carcinoma. ZIP4, ZO-1 and Claudin-1 were studied in all cases by immunohistochemical and Real-Time PCR methods. Immunohistochemical and Real Time-PCR study results were compared with age, gender, histological subtype, surgical margin status and presence of metastasis.

Following the IHC and RT-PCR studies, significant differences were found between the IHC expression of ZIP4, Claudin-1 and ZO-1 and histological subtypes. ZIP4 and Claudin-1 tended to be expressed more in cases with tumors, while ZO-1 in cases with and without tumors. Different staining characteristics were observed according to histological subtypes with staining pattern with membranous and intracellular localization with Claudin-1, and intracellular staining was observed in all cases of medullary thyroid carcinoma. Expression of ZIP4 and Claudin-1 by RT-PCR showed a significant difference between histological subtypes, and this difference was not observed with ZO-1. It was observed that the presence of metastasis increased with the expression of ZIP4 and Claudin-1, and there was no significant change with ZO-1.

Although the prognostic course of thyroid carcinomas is generally good, it can often cause severe surgical procedures such as neck dissection in cases with metastases. We think that Claudin-1 and ZIP4 expression can be used as an important marker in terms of showing poor prognosis and susceptibility to metastasis in thyroid tumors and developing targeted therapy. We think that the ZO-1 marker, which is highly expressed in non-tumor tissue, is not useful as a prognosis marker in thyroid tumors.

Keywords: Thyroid carcinoma, ZIP4, ZO-1, Claudin-1, Real-Time PCR, immunohistochemistry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATK:	Anaplastik Tiroid Karsinomu
cDNA:	Komplementer deoksiribo nükleik asit
CEA:	Karsinoembriyonik antijen
Ct:	Cycle treshold
EDTA:	Ethane-1,2-diylidinitrilo tetraacetic acid
FAK:	Fokal adhezyon kinaz
FTK:	Foliküler Tiroid Karsinomu
H&E:	Hematoksilen & Eozin
IGF-IR:	İnsülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü
İHK:	İmmünohistokimya
JAM:	Junctional adhezyon molekülleri
MEN:	Multiple Endokrin Neoplazi
MNG:	Multi Nodüler Guatr
MTK:	Medüller Tiroid Karsinomu
PTK:	Papiller Tiroid Karsinomu
RT-PCR:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
ZEB1:	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZIP4:	Zrt- and Irt-like protein 4
Zn:	Çinko
ZnT:	Zinc Transporter
ZO-1:	Zonula Okludens - 1

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: Tiroid Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırması (WHO 2016)	5
Tablo 2: FTK sınıflandırması	14
Tablo 3: Diferansiye Tiroid Kanserlerinde TNM Sınıflaması	21
Tablo 4: İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar	30
Tablo 5: cDNA çalışma protokolü 1. kısım	34
Tablo 6: cDNA çalışma protokolü 2. kısım	34
Tablo 7: LightCycler 480 Probe Master kullanarak her 18 µl reaksiyon için PCR karışımı hazırlama şablonu	36
Tablo 8: LightCycler 480 Cihazı ile çalışılan PCR protokolü	37
Tablo 9: Prognostik parametreler, immünohistokimyasal ve moleküler analiz sonuçları	39
Tablo 10: Histolojik alt tipler ile yaş dağılımının Ki-kare testi ile değerlendirilmesi.	41
Tablo 11: Metastaz durumu ve immünohistokimyasal ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonlarının Ki kare testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları	42
Tablo 12: Metastaz durumu ve histolojik alt tipler arasında uygulanan Ki-kare testinin istatistiksel sonuçları.	42
Tablo 13: Histolojik alt gruplar ile ZIP4'ün immünreaktivitesinin Ki-kare testi ile değerlendirilmesi	46
Tablo 14: Histolojik alt gruplar ile ZO-1'in immün pozitifliğinin Ki-Kare testi ile değerlendirilmesi	48
Tablo 15: Histolojik alt gruplar ile Claudin-1'in immünreaktivitesinin Ki-Kare testi ile değerlendirilmesi	49
Tablo 16: Histolojik alt gruplar ile Claudin-1'in boyanma paterninin Ki-kare testi ile değerlendirilmesi	52
Tablo 17: İmmünohistokimyasal ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonu korelasyonu.	53
Tablo 18: Olgulara ait RNA konsantrasyon değerleri	54
Tablo 19: PCR çalışması sonucu olgulara ait Ct değerleri.	55
Tablo 20: Histolojik alt tiplere göre ZIP4 gen ekspresyonu.	57
Tablo 21: İmmünohistokimyasal ZIP4 ile moleküler ZIP4 ekspresyonunun değerlendirilmesi	58
Tablo 22: Histolojik alt tiplere göre ZO-1 gen ekspresyonu	59
Tablo 23: Histolojik alt tiplere göre Claudin-1 gen ekspresyonu.	60
Tablo 24: ZIP4 ve Claudin-1 gen ekspresyonu karşılaştırılması.	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Diffüz hiperplazide dilate foliküllere protrüde olan hiperplastik papilla [10]	7
Şekil 2: MNG tanılı olgumuzda kolloid materyalden zengin irili ufaklı follikül yapıları izlenmektedir (H&E; X100).	8
Şekil 3: PTK klasik varyant tanılı olgumuzda merkezde fibrovasküler kor yapıları ve yüzeyde psödostratifiye follikül epitel hücreleri ile döşeli papiller yapılar izlenmektedir (H&E; X100).....	10
Şekil 4: TPK kolumnar varyant tanılı olgumuzda kolumnar tarzda dizilim gösteren folikül epiteli izlenmektedir (H&E; X100).	12
Şekil 5: TPK Onkositik varyant tanılı olgumuzda geniş eozinofilik sitoplazmalı, nükleolleri seçilebilen hücrelerden oluşan tümör izlenmektedir (H&E; X200).	13
Şekil 6: FTK olgumuzda kapsül invazyonu izlenmektedir (H&E; X100).	15
Şekil 7: Medüller karsinom tanılı olgumuzda solid büyüme paterni ve üstte amiloid birikimi izlenmektedir (H&E; X100).....	17
Şekil 8: ATK tanılı olgumuzda pleomorfik ve hiperkromatik nükleuslu atipik görünümde hücrelerden oluşan solid paternde tümör izlenmektedir (H&E; X200)..	19
Şekil 9: ZIP ve ZnT taşıyıcılarının hücre içi lokalizasyonu şematik çizimle gösterilmektedir. [22].....	23
Şekil 10 : Sıkı bağlantı proteinlerinin iki hücreli şematik çizimi [26].	25
Şekil 11 : ZIP4 aracılı transkripsiyon faktör ZEB1'in FAK ve Paxillin alt yolaklarını düzenlediği gösterilmiştir [25].	27
Şekil 12: ZIP4, ZO-1, Claudin-1 ve β -Actin için primer ve probe dizaynlarının gösterilmesi.	35
Şekil 13: Foliküler Tiroid Karsinomu tanılı olguya ait zayıf sitoplazmik ZIP4 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya-ZIP4; X200).....	44
Şekil 14: Papiller Tiroid Karsinomu klasik varyant tanılı olguya ait orta şiddette sitoplazmik ZIP4 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya-ZIP4; X200).	45
Şekil 15: Papiller Tiroid Karsinomu onkositik varyant tanılı olguya ait güçlü, sitoplazmik ZIP4 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya-ZIP4; X200).	45
Şekil 16: Papiller Tiroid Karsinomu foliküler varyant tanılı olguya ait zayıf, membranöz ZO-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- ZO-1; X400).	47
Şekil 17: Papiller Tiroid Karsinomu foliküler varyant tanılı olguya ait orta şiddette, membranöz ZO-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- ZO-1; X200).	47
Şekil 18: Multi Nodüler Guatr tanılı olguya ait güçlü, nükleer -membranöz ZO-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- ZO-1; X400).	48
Şekil 19: Papiller Tiroid Karsinomu onkositik varyant tanılı olguya ait zayıf, membranöz Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X400).	50
Şekil 20: Papiller Tiroid Karsinomu foliküler varyant tanılı olguya ait orta şiddette, membranöz Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X200).	50

Şekil 21: Papiller Tiroid Karsinomu klasik varyant tanılı olguya ait güçlü, membranöz Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X100).	51
Şekil 22: Foliküler Tiroid Karsinomu tanılı olguya ait nükleer-granüler Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X200).....	51
Şekil 23: 26-42 numaralı olgulara ait ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 gen bölgeleri ışıma eğrileri. Kırmızı renkte pik yapan eğriler ekspresyon gösteren olguları, yeşil renkte eğriler negatif olguları temsil etmektedir	56
Şekil 24: 6 numaralı olguya ait ZIP4 gen bölgesi ışıma eğrisi.	57
Şekil 25: 44 numaralı olguya ait ZO-1 gen bölgesi ışıma eğrisi.	58
Şekil 26: 22 numaralı olguya ait Claudin-1 gen bölgesi ışıma eğrisi.	60



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tiroidin Gelişimi	3
2.2. Tiroidin Anatomisi ve Histolojisi.....	3
2.3. Tiroid Tümörleri.....	4
2.3.1. Hiperplazi.....	5
2.3.2. Papiller Tiroid Karsinomu (PTK)	8
2.3.3. Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK)	14
2.3.4. Medüller Tiroid Karsinomu (MTK).....	16
2.3.5. Anaplastik Tiroid Karsinomu (ATK).....	18
2.3.6. Tümörlerde Patolojik Evreleme (pTNM)-WHO 2016 [21]	20
2.4. Çinko Taşıyıcı Kanal ZIP4.....	23
2.5. Sıkı Bağlantı Proteinleri ZO-1 ve Claudin-1	24
2.6. ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 İlişkisi.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması	29
3.2. Parafin Blok Seçimi.....	29
3.3. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Deparafinizasyon İşlemi.....	29
3.4. İmmünohistokimyasal Çalışma	30
3.4.1. İmmünohistokimyada Kullanılan Belirteçler ve Çalışma Protokolü ...	30
3.4.2. İmmünohistokimyasal Skorlama.....	32
3.5. RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve PCR Analizi.....	32

3.5.1.	RNA İzolasyonu.....	32
3.5.2.	RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması.....	33
3.5.3.	cDNA Sentezi.....	34
3.5.4.	RT-PCR Analizi.....	35
3.6.	İstatistiksel Yöntem.....	38
4.	BULGULAR.....	39
4.1.	Genel Bulgular.....	39
4.1.1.	Histolojik Alt Tip.....	41
4.1.2.	Cinsiyet.....	41
4.1.3.	Yaş.....	41
4.1.4.	Metastaz Durumu.....	42
4.1.5.	Cerrahi Sınır Durumu.....	43
4.2.	İmmünohistokimyasal Bulgular.....	43
4.2.1.	ZIP4 Ekspresyonu.....	43
4.2.2.	ZO-1 Ekspresyonu.....	46
4.2.3.	Claudin-1 Ekspresyonu.....	49
4.2.4.	İmmünohistokimyasal ZIP4, ZO-1, Claudin-1 Korelasyonu.....	52
4.3.	Gen Ekspresyon Bulguları.....	53
4.3.1.	ZIP4 Gen Ekspresyonu.....	56
4.3.2.	ZO-1 Gen Ekspresyonu.....	58
4.3.3.	Claudin-1 Gen Ekspresyonu.....	59
4.3.4.	Real-Time PCR ile ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 Gen Ekspresyon Korelasyonu.....	61
5.	TARTIŞMA.....	62
6.	SONUÇLAR.....	73
7.	KAYNAKÇA.....	75

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin maligniteler olup sıklıkları hızla artmaktadır [1]. İnce iğne aspirasyon biyopsisinin yaygınlaşan kullanımı ve radyolojik tanısal araçlardaki gelişmeler bu artışın temel nedenini oluşturmaktadır [2]. Tiroid tümörleri tiroid dokusunun epitelyel ve non-epitelyel kısımlarından gelişir. Tiroid foliküler epitelinden papiller, foliküler ve anaplastik kanserler köken alır. Tiroidin diğer neoplazilerini medüller, primer lenfoma, sarkom ve diğer organlardan tiroide yayılan yani metastatik olgular oluşturmaktadır [3].

Çinko(Zn), insan vücudundaki birçok biyolojik süreçte hayati rol oynar. Zn homeostazını ve normal biyolojik aktiviteleri korumak için Zn taşıyıcılarının hücre membranındaki rolleri önemlidir [4]. Plazma zarı boyunca sitoplazma içine Zn alarak hücrel Zn içeriğini arttıran ZIP ailesinin üyesi olan ZIP4'ün çeşitli organlara ait karsinomların gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [5]. ZIP4 literatürde genellikle kötü prognoz ve invaziv davranışla ilişkilendirilmiş olmakla birlikte organa spesifik farklı davranış paterni de bildirilmiştir [6].

Sıkı bağlantı proteinleri vücudun farklı bölmeleri arasında bir bariyer oluşturmaları, seçici paraselüler difüzyonu sağlamaları ve dokularda dengenin sürdürülmesi için oldukça önemli yapılardır [7]. Tümör ilerlemesinde hücre yüzeyinde eksprese olan ZO-1 ve Claudin-1'in sıkı bağlantı düzeneklerinin sıklıkla bozulduğu ve ekspresyonlarının azaldığı literatürde bildirilmiştir [8, 9]. Ancak ZO-1 ve Claudin-1'in hücre içi lokalize yerleşimlerinin tümör ilerleyişi ile ilişkilendirildiği yayınlar da mevcuttur [9].

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan Tiroid neoplazili hastalarda immünohistokimyasal çalışma ile ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 ekspresyon durumu ve RT-PCR yöntemi ile ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 protein varlığı değerlendirilecek, daha önce farklı tümörlerde metastatik süreçte etkili rol aldığı ispatlanmış olan membran proteinlerinin metastatik olgularda ve agresif seyreden olgulardaki değerleri ortaya konacak, varsa anlamlı farklılıkları gösterilecektir. Böylece hedefe yönelik tedavilere öncü olması ile organ metastazı olan ya da boyun diseksiyonu gerekli olan olgularda morbidite ve mortalite oranının

düşürülmesi ve sonuç olarak gereksiz cerrahi işlemlerin uygulanmasının önüne geçilmesi amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

Yunanca tireos (kalkan) ve eidos (şekil) sözcüklerinden türemiş olan tiroid bezi, vücudun büyüme ve gelişmesi için büyük bir potansiyele sahip önemli endokrin organlardan biridir [10].

2.1.Tiroidin Gelişimi

Tiroid gebeliğin 2. ve 3. haftaları arasında gelişmeye başlar ve gelişme 11. haftada tamamlanır. Bez bir ortanca ve iki yanal orijini olmak üzere üç taslak yapıdan gelişir. Ortanca anlaj foramen çekumdaki dilin tabanından gelişir. Orta anlaj, dilden, tiroglossal kanal boyunca boyun ön bölgesindeki son konumuna iner. Orta anlajın son konumuna yerleşmesinin ardından, tiroglossal kanal atrofiye uğrar, bununla birlikte kanal devam edebilir, kistik hale gelebilir, hatta duvarında mevcut olan kalıntı tiroid dokusunda papiller tiroid karsinomu (PTK) gelişebilir. Lateral anlaj, ultimobrankiyal cismi içeren “dördüncü - beşinci” brankial poş adı verilen yapıdan gelişir. Ultimobrankial cisim kalsitonin salgılayan hücreler (C hücreleri) ile ilişkilidir. Orta ve her iki yan anlajın füzyonu, C hücrelerinin baskın olduğu bezin üst lateral kısmında meydana gelir. Fokal müsin üretimi ve kist oluşumuna sahip çok katlı epitel hücrelerinin toplanmasıyla oluşan solid hücre yuvalarının ultimobrankiyal cismin kalıntıları olduğuna inanılır ve erişkin tiroidlerin % 30 kadarında görülebilir [11].

2.2.Tiroidin Anatomisi ve Histolojisi

Normal gelişiminde tiroid, bir isthmus ile birbirine bağlı iki lobdan oluşur. Normal bez ağırlığı 14 ila 18 g arasında değişmekle birlikte bu rakamlar bireyin cinsiyetine, yaşına, beslenme durumuna ve uygun iyot alımına bağlıdır. Paratiroidler ve rekürren laringeal sinirler bezin arkasında yer almaktadır. Süperior ve inferior tiroidal arterler bezi besler. Gland içi ve subkapsüler lenfatikler internal juguler lenf nodlarına drene olur. Tiroid dokusu açık kahve renkte ve solid vasıftadır.

Mikroskopik olarak tiroid bezi, merkezinde kolloid ve etrafında epitelyal hücrelerle çevrili, ortalama çapı 200 µm olan belirgin büyüklük farkları bulunan yuvarlak veya oval foliküllerden oluşur; 20 ila 40 folikül bir lobülü oluşturur.

Kalsiyum oksalat kolloidin yapı taşıdır. Aktivite derecelerine bağılı olarak, yassı ila hafif kolumnar arasında değışen tek bir foliküler hücre tabakası ile kaplanırlar. Sitoplazma, soluk asidofilik veya amfofilik boyama özelliğine sahiptir; hücrenin aktivitesi arttıkça sitoplazma miktarı da artar. Zengin granüler asidofilik sitoplazmaya sahip folikül hücreleri, Hürthle hücreleri, Askanazy hücreleri, oksifilik hücreler veya onkositler olarak adlandırılır [10].

Tiroid foliküllerinin bazal membranının komşuluğunda küçük C hücre kümeleri bulunur. Rutin boyamayla tanımlanması zor olan normal C hücreleri Kalsitonin immünohistokimyasal boyaması ile tanınabilir.

Normal tiroid dokusunda elektron mikroskopik çalışmalar, foliküler hücrelerin, merkezdeki kolloidin etrafında tek bir tabaka halinde düzenlendiğini göstermektedir. Bu hücreler lipozomlar, tam bir endoplazmik retikulum ve küçük mitokondriler içerir. Homojen kromatin yapısına sahip yuvarlak çekirdekler bulunur. İyi gelişmiş desmozomlar ve terminal barlar hücreleri ayırır. İnterstitiumda çok sayıda fenestre (pencereli) kılcal damar vardır. C hücreleri, foliküllerin bazal membranlarının sınırları içinde bulunur. Bu C hücrelerinin sitoplazmasında çift zar yapısına bağılı, kalsitonin içeren çok sayıda nörosekretuar granüller bulunur [11].

2.3.Tiroid Tümörleri

Tiroid tümörleri WHO 2016 sınıflamasına (Tablo 1) göre 21 ana gruba ayrılmıştır [12].

Tablo 1: Tiroid Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırması (WHO 2016)

❖ Foliküler Adenom	❖ Hürthle (Onkositik) Hücreli Tümörler
❖ Hyalinize Edici Trabeküler Tümör	▪ Hürthle Hücreli Adenom
❖ Diğer Enkapsüle Foliküler Paternli Tiroid Tümörleri	▪ Hürthle Hücreli Karsinom
▪ Malignite Potansiyeli Belirsiz Foliküler Tümör	❖ Kötü Diferansiye Tiroid Karsinomu
▪ Malignite Potansiyeli Belirsiz İyi Diferansiye Tümör	❖ Anaplastik Tiroid Karsinomu
▪ Papiller Benzeri Nükleer Özelliklere Sahip Noninvaziv Foliküler Tiroid Neoplazmi	❖ Skuamöz Hücreli Karsinom
❖ Papiller Tiroid Karsinomu (PTK)	❖ Medüller Tiroid Karsinomu
▪ Papiller Karsinom	❖ Mikst Medüller ve Foliküler Tiroid Karsinomu
▪ PTK Foliküler Varyant	❖ Mukopidermoid Karsinom
▪ PTK Enkapsüle Varyant	❖ Sklerozan Mukoepidermoid Karsinom
▪ Papiller Mikrokarsinom	❖ Müsinöz Karsinom
▪ PTK Kolumnar Hücreli Varyant	❖ Ektopik Timoma
▪ PTK Onkositik Varyant	❖ Timus Benzeri Farklılaşma Gösteren İğsi Epitelyal Tümör
❖ Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK), NOS	❖ İntratiroid Timik Karsinom
▪ FTK, Minimal İnvaziv	❖ Paraganglioma ve Mezenkimal / Stromal Tümörler
▪ FTK, Enkapsüle Anjiyoinvaziv	❖ Hematolenfoid Tümörler
▪ FTK, Yaygın İnvaziv	❖ Germ Hücre Tümörleri
	❖ Sekonder Tümörler

2.3.1. Hiperplazi

Tiroidin hiperplastik bozuklukları, hastalığın varsayılan patogenezi, morfolojik özellikleri ve klinik belirtileri temelinde sınıflandırılmıştır. Uygulamada, bu ana kriterler birleştirilerek üç ana tiroid hiperplazisi türü tanımlanmaktadır.

2.3.1.1.Dishormonogenetik Guatr

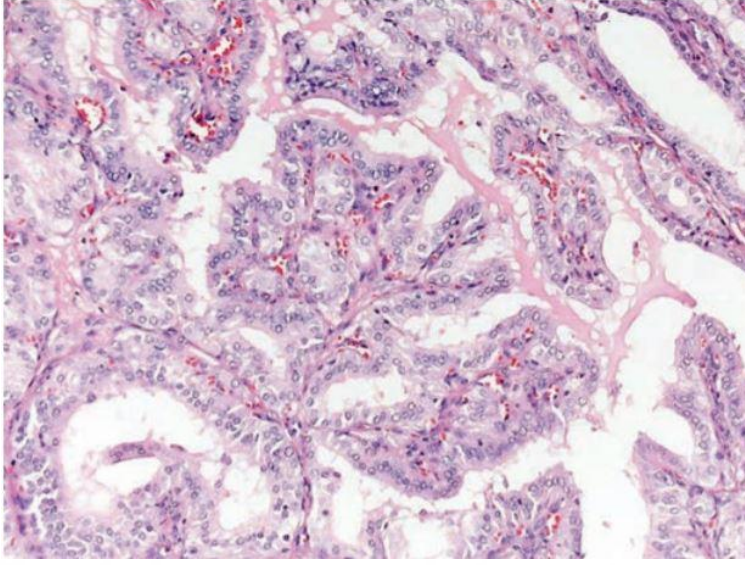
Dishormonogenetik guatr, tiroid bezinin genişlemesinin tiroid hormonlarının sentezindeki kusurlara bağlı geliştiği bir durumdur. Tiroid dishormonogenezinin (tiroid hormon sentezinin doğuştan gelen hatalarından kaynaklanan tiroid hormonu eksikliği) yaklaşık % 20'sini primer konjenital hipotiroidizm vakaları oluştururken, diğer % 80'i ise tiroid disgenezisinin sonucudur [10].

Makroskobik olarak, bez büyümüş ve multinodülerdir. Mikroskopik olarak, en yaygın değişiklik, solid ve mikrofoliküler yapı baskınlığına sahip, çeşitli mimari görünümde hiperselüler nodüllerden oluşur. Bazı durumlarda papiller ve insular oluşumlar vardır. Fibrozis, bazı durumlarda nodüllerin kenarlarında düzensizliklere sebep olan ve kapsüller invazyonu taklit edebilen yaygın bir bulgudur. Diğer yaygın özellikler arasında belirgin nükleer atipi ve az miktarda kolloid vardır. Teşhis açısından önemli bir özellik, nükleer atipinin (bizar hiperkromatik çekirdekler şeklinde) esas olarak nodüllerin kendisinden ziyade hiperplastik nodüller arasındaki dokuda mevcut olmasıdır. Mitotik figürler genellikle sürekli TSH stimülasyonunun bir sonucu olarak görülebilir. [10].

2.3.1.2.Graves Hastalığı (Diffüz Toksik Guatr)

Graves hastalığı (ayrıca Basedow hastalığı, Diffüz Toksik Guatr ve egzoftalmik guatr olarak da bilinir) tipik olarak genç yetişkin kadınlarda kas zayıflığı, kilo kaybı, sinirlilik, ısı intoleransı, yorgunluk, taşikardi, guatr ve sıklıkla iştah artışı semptomlarıyla görülür. Ayrıca çocuklarda hipertiroidizmin en sık nedenini oluşturur. Tiroid bezinin genişlemesi tipik olarak diffüzdür, ancak iyot eksikliği durumunda Graves hastalığı multinodüler guatr ile birlikte bulunabilir.

Makroskobik olarak diffüz simetrik büyüme gösteren, etsi kıvamda, kesit yüzeyi gri-kırmızı renkte tiroid bezi yapısı izlenir. Mikroskobik olarak, foliküller belirgin şekilde hiperplastiktir ve papiller karsinom ile karışmasına neden olabilecek belirgin papiller katlantılar ile birliktedir. Döşeyici epiteli kolumnar yapıdadır, bazal yerleşimli bir çekirdek, yağ ve glikojen içerebilen saydam, bazen mikro-vakuoler bazofilik veya amfofilik bir sitoplazmaya sahiptir [10].



Şekil 1: Diffüz hiperplazide dilate foliküllere protrüde olan hiperplastik papilla [10]

2.3.1.3. Nodüler Hiperplazi

Nodüler hiperplazi (multinodüler hiperplazi, nodüler veya multinodüler guatr, adenomatoid guatr, adenomatoz hiperplazi) en yaygın tiroid hastalığıdır. İyot eksikliği gibi çevresel faktörler ve genetik faktörler gelişimini etkiler.

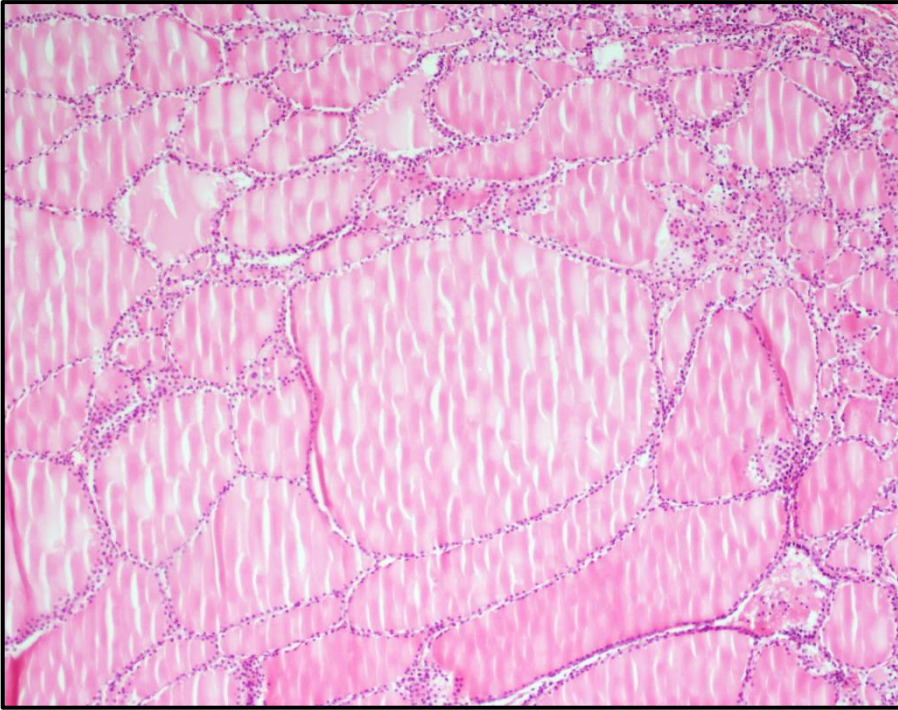
Geleneksel olarak endemik guatr olarak bilinen formda, hastalık su ve toprağın iyot eksikliğinden kaynaklanır ve tuza iyot ilavesiyle büyük ölçüde önlenabilir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünyanın diğer gelişmiş bölgelerinde en sık görülen sporadik (nodüler) guatrın patogenezi belirsizdir. Hafif diyet iyot eksikliği, hormon sentezinde hafif bozulma, doğal guatrojenler, sigara, selenyum ve demir eksikliği çeşitli şekilde patogeneizde öne sürülmüştür.

Makroskobik olarak, nodüler hiperplazili tiroid asimetric olarak genişlemekte bir lob diğerinden daha büyük olmaktadır. Tiroid kapsülü gerilebilir fakat intakttır. Kesitte çoğu bir kapsülden yoksun çoklu nodüller görülür. Kanama, kalsifikasyon ve kistik dejenerasyon şeklinde sekonder değişiklikler yaygındır [10]. Hiperplastik etiyolojiyi destekleyen özellikler kesintili kapsüllü yapı, nodüller arası doku ile belirsiz sınır ve foliküler yapının heterojen olmasıdır [13].

Mikroskopik olarak, görünüm çok değişkendir. Bazı nodüller yassı epitel ile kaplı büyük foliküllerden, bazıları aşırı hücrel ve hiperplastik, bazıları ise ağırlıklı olarak veya sadece onkositik (Hürthle) hücrelerden oluşur. Bir kısmında papiller karsinom ile karışmasına neden olabilecek bir özellik olan kistik bir folikülün lümenine bakan papiller çıkıntılar vardır [10].

Hafif asemptomatik nodüler hiperplazi vakaları tedavi gerektirmez. Eksojen tiroid hormonları ile baskılayıcı tıbbi tedavi sadece orta derecede etkilidir. Büyüme, şekil bozukluğu veya bası semptomları gelişmiş ise, bilateral veya subtotal tiroidektomi yapılır [10].



Şekil 2: MNG tanılı olgumuzda kolloid materyalden zengin irili ufaklı follikül yapıları izlenmektedir (H&E; X100).

2.3.2. Papiller Tiroid Karsinomu (PTK)

Papiller Tiroid Karsinomu en sık görülen tiroid kanseri ve en sık görülen endokrin malignite türünü oluşturmaktadır. Kadınlar erkeklerden daha fazla etkilenir (2/1 ile 4/1 arasında değişen bir oran bildirilmiştir) [14]. Herhangi bir yaş grubunda ortaya çıkabilir, genellikle ilk tanısını ortalama 40-50'li yaşlarda alır. Papiller karsinom, çocuklarda tiroid malignitelerinin %90'ından fazlasını oluşturur. Vakaların yaklaşık %5'inde, boyun bölgesine ışınlama öyküsü vardır [10].

2002 – 2012 yılları arasında ABD’de yapılan bir araştırmada 100.000 kişilik bir popülasyonda yıllık insidans 13.5’dir. 5 yıllık sağkalım ise %97,9 düzeylerinde iken PTK bağımlı ölüm olayları yaygın değildir [15].

2.3.2.1.Etiyoloji

En iyi ortaya konmuş çevresel etiyolojik faktör iyonize radyasyondur. Bunun dışında reproduktif faktörler, obezite, diyabet, sigara ve alkol tüketimi, nitrat alımı, diyetle aşırı iyot alımı, ve genetik faktörler de tanımlanmıştır. Fakat tüm bu ilişkilere rağmen etiyoloji net olarak aydınlatılamamıştır [15].

2.3.2.2.Klinik

Çoğunlukla asemptomatik tiroid kitlesi olarak tiroidin herhangi bir lobunda veya istmusta ortaya çıkabilir. Ses kısıklığı ve yutma güçlüğü olguların %20’sinde görülürken, olguların %27’sinde boyun lenf nodlarına metastaz söz konusudur. Çoğunlukla normal sınırlarda yer aldıklarından tiroid fonksiyon testleri tanıda sınırlı bir öneme sahiptir.

Tiroid sintigrafisinde tipik olarak soğuk nodül şeklinde görülürler (nadiren sıcak nodüller olabilir). Ultrasonografik görüntülemeye sınırları düzensiz, mikrokalsifikasyon alanları da içeren, hipo-izoekoik solid nodül yapısı şeklinde izlenir [10].

2.3.2.3.Makroskobik Bulgular

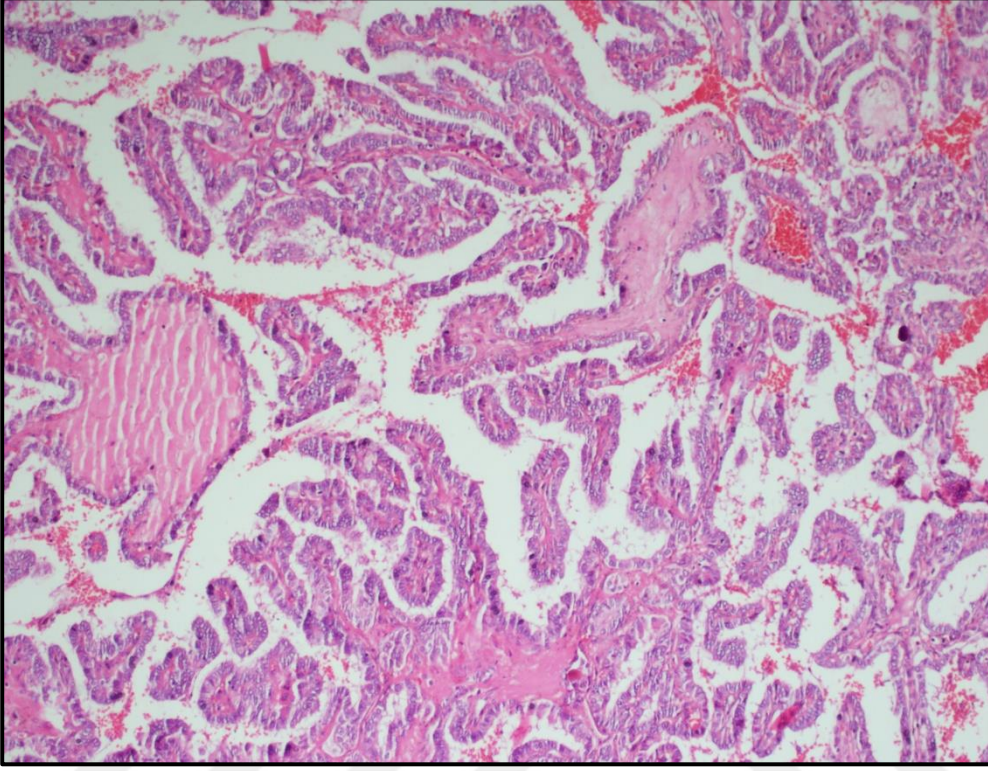
Tipik olarak ortalama 2-3 cm uzun çapa sahip, sert ve invaziv bir görünümde, genellikle beyaz renktedir. Lezyonlarda kalsifikasyon odakları, skleroz ve nadiren kist oluşumları görülebilir. Nekroz papiller karsinomun özelliği değildir ve daha yüksek dereceli bir lezyonu akla getirmektedir [11].

2.3.2.4.Mikroskobik Bulgular

Klasik Papiller karsinomun iki ana mikroskobik bulgusu papilla yapısı ve nükleer değişikliklerdir [15].

Neoplastik papilla, oval çekirdeğe sahip tek veya bazen sıralı hücre tabakası ile kaplı ve merkezinde fibrovasküler kor içerir (Şekil 3). Çoğu olguda tamamen papilla yapısı değil neoplastik foliküllerin arasında papilla yapıları izlenir. Eskiyen

ve ölü durumdaki papilla yapısındaki hücrelerde kalsiyum depolanması sonucunda lammeller şekillerde “Psammoma cisimcikleri” oluşabilir [11]



Şekil 3: PTK klasik varyant tanılı olgumuzda merkezde fibrovasküler kor yapıları ve yüzeyde psödostratifiye follikül epitel hücreleri ile döşeli papiller yapılar izlenmektedir (H&E; X100).

Papiller karsinoma ait nükleer özelliklere bakıldığında nükleer uzama, üst üste binme ve nükleer genişleme gibi boyutsal özelliklerin yanında şeffaf buzlu cam, boş yada “Annie gözü” olarak tarif edilen kromatin yapısı izlenir. Nükleus içerisinde sitoplazmik invajinasyona bağlı “psödoinklüzyon” yapısı da seçilir. Karakteristik bir diğer nükleer özellik ise nükleer “groove” denilen yarıklanmadır. Bu yarıklanma Hashimoto Hastalığı gibi diğer lezyonlarda da görülebileceğinden tanısal değildir. Sitoplazma genellikle eozinofiliktir ve mitotik figürler yoktur veya nadir görülürler [11].

2.3.2.5.İmmünohistokimya

PTK hücreleri Tiroglobülin, PAX8, ve sitokeratinler (PanCK, CK7, CAM5,2 ve AE1/AE3) için immünreaktif iken; CK20, kalsitonin, ve nöroendokrin belirteçler

için ise negatif reaksiyon gösterirler. Benign lezyonlardan ayırmada Galektin 3, HBME-1, CK19 ve CITED1 immünohistokimyasal boyaları (İHK) kullanılmakta fakat bu belirteçlerin mikroskopik bulgular eşliğinde yorumlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Membranöz HBME-1 boyanması karsinomu düşündüren en spesifik, CK19 ise en az spesifik boyanmadır . Galektin 3 nükleer ve sitoplazmik boyanma özelliği gösterir [15].

2.3.2.6.Genetik Profil

Genellikle genetik değişikliklerin çoğunluğu MAPK yolağından kaynaklanır. Tümör gelişiminde nokta mutasyonları (BRAF V600E ve NRAS gibi) yaklaşık %75, gen füzyonları yaklaşık %15, kopya sayısı varyasyonları ise yaklaşık %7 rol oynarlar. BRAF V600E PTK'de en yaygın mutasyonu oluştururken, tipik olarak klasik ve tall cell varyantta yer alır. RAS geni mutasyonları (NRAS, HRAS ve KRAS) özellikle foliküler varyantta yaygındır. Özellikle radyasyon ilişkisi bulunan ve genç yaşlı hastalarda PTK'da en sık RET/PTC gen yeniden düzenlenimi görülmektedir. TERT mutasyonları da ileri evre PTK'larda, rekürren uzak metastaz ve mortalite ile ilişkili bulunmuştur [15].

2.3.2.7.Papiller Karsinom Varyantları

Papiller Mikrokarsinom

Çapı 1cm'den daha küçük tümörleri tanımlamak için kullanılmıştır. Okült papiller karsinom, okült sklerozan karsinom, küçük papiller karsinom gibi terimler de kullanılmıştır [11]. Otopsi serilerinde %5 ile %36 arasında saptanmıştır. Papiller karsinomun nükleer ve morfolojik özelliklerini göstermektedir. Prognozu mükemmele yakın olmakla birlikte özellikle BRAF mutasyonu gösterenlerde malign biyolojik davranış gösterebilmektedir [15].

Enkapsüle Varyant

Morfolojik ve sitolojik özellikleri tipik PTK ile aynı olmasına rağmen fibröz kapsülle çevrili tümörler için bu terim kullanılır. Fokal kapsül invazyonu görülebilir. Prognozu mükemmeldir [11].

Foliküler Varyant

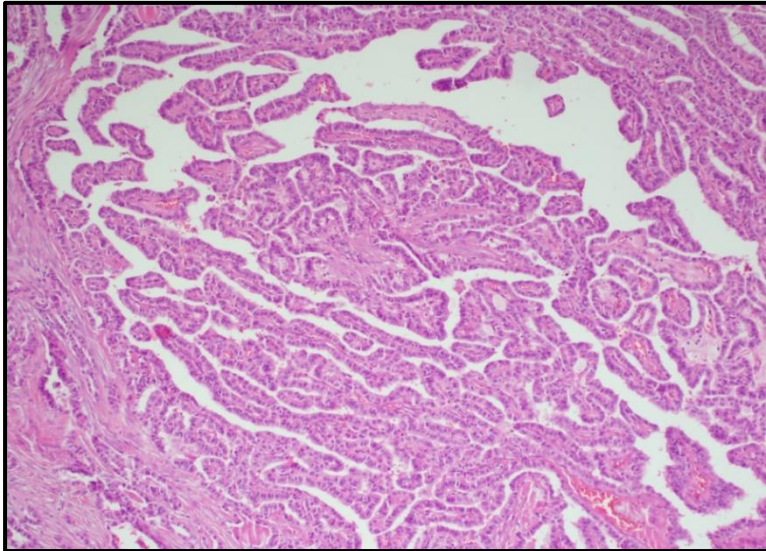
Bu tümör tamamen foliküler büyüme paterni gösterir. Diffüz ve enkapsüle alt tipleri mevcuttur. Diffüz tipi multifokal olma eğilimindedir ve uzak metastaz bu hastalarda sıktır. Enkapsüle formun prognozu mükemmele yakındır. Folikülü döşeyen neoplastik hücreler klasik PTK özelliği gösterir ve lümendeki kolloid homojen yapıda ve eozinofilik görünümündedir [11, 15].

Diffüz Skleroze Varyant

Oldukça nadir görülen bu varyant çoğunlukla kadınlarda ikinci ve üçüncü dekatlarda görülür. Bu tümör mikroskobik olarak lenfatikleri tutma eğilimindedir. Makroskobik olarak oldukça kumlu görünüm veren psammom cisimcikleri içerir. Bu tümörde çoğu zaman lenf nodu tutulumu ve %25 oranında akciğer metastazı tanı anında mevcuttur [16].

Kolumnar Hücreli Varyant

Bu nadir görülen varyantta psödostratifikasyon gösteren kolumnar hücreler görülür. Hücreler sekretuar endometriuma benzer şekilde subnükleer vakuolizasyon gösterir. PTK'nın nükleer özelliklerini kısmen göstermesinin yanında daha hiperkromatiktir. Metastatik adenokarsinomlardan ayırımı için TTF1 kullanılır. Prognozunu kapsüllü olması ve ekstratiroidal yayılım durumu belirler [15].



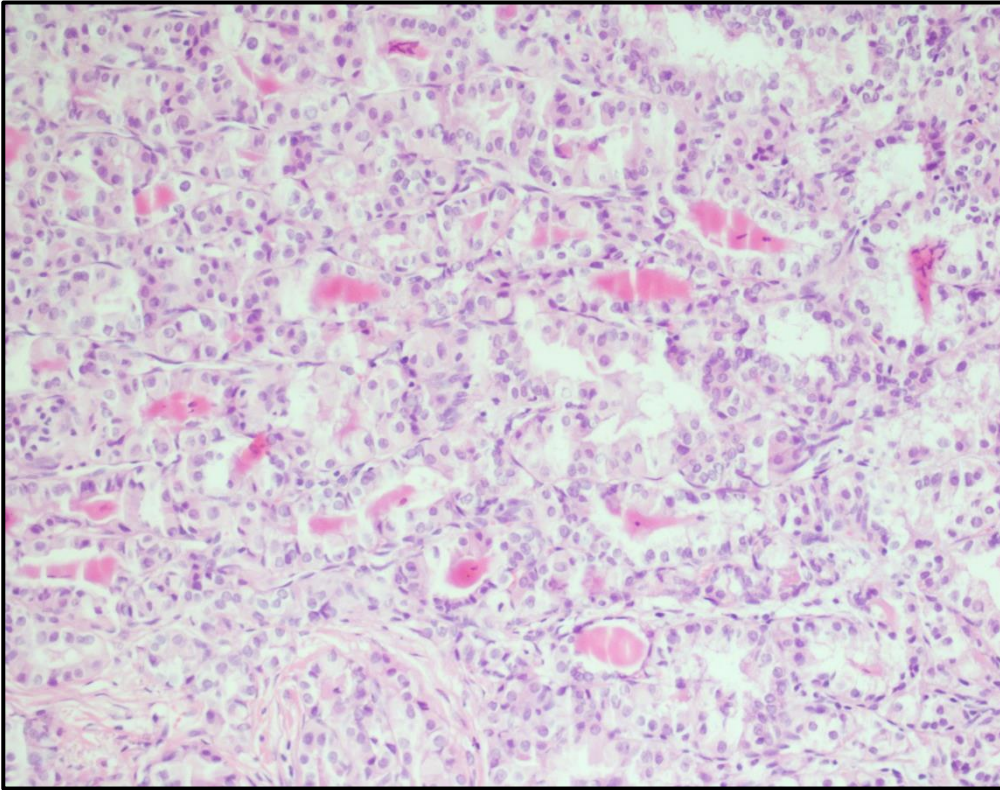
Şekil 4: TPK kolumnar varyant tanılı olgumuzda kolumnar tarzda dizilim gösteren folikül epiteli izlenmektedir (H&E; X100).

Yüksek Kolumnar Hücreli (Tall Cell) Varyant

Yükseklik-genişlik oranının 3:1'i aştığı geniş eozinofilik sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşan tümör varyantıdır. Bu hücrelerin tümörün %30'undan fazlasını oluşturması tanı için gereklidir. Bu varyant klasik karsinoma göre ekstratiroidal yayılım ve metastaz oranı yüksek olduğundan daha agresif seyreder [15].

Onkositik Hücreli Varyant

Bu tümörler papiller yapıya sahiptir ancak baskın komponent olarak ya da tümüyle Hürthle hücrelerinden meydana gelirler. Olağan papiller karsinomun nükleer özelliklerini gösterebileceği gibi bu özellikler onkositik değişikliklere bağlı olarak gizlenebilir. Bazı yazarlar onkositik morfolojinin daha agresif bir davranış kazandırdığını bildirmiştir [16].



Şekil 5: TPK Onkositik varyant tanılı olgumuzda geniş eozinofilik sitoplazmalı, nükleolleri seçilebilen hücrelerden oluşan tümör izlenmektedir (H&E; X200).

2.3.2.8.Prognoz

Genel olarak yavaş seyirli olup 5 yıllık sağ kalım oranları %96'dır. Evre I hastalarda 10 yıllık sağ kalım oranı %99 iken, evre IV hastalarda bu oran %41 bulunmuştur. Bağımsız prognostik faktörler arasında >40-45 yaş olmak, tümör çapının >3-4 cm olması, ekstratiroidal yayılım ve uzak metastaz varlığı yer alır [15].

2.3.3. Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK)

Foliküler tiroid karsinomu papiller karsinomun tanısız nükleer özelliklerini taşımayan foliküler hücrelerden kaynaklanan tiroid malignitesidir. Foliküler karsinomun tanısı, kapsülün, kan damarlarının veya komşu tiroid dokusunun invazyonuna dayanan, nispeten nadir görülen bir tümördür [10].

İleri yaş kadınlarda görülme eğilimi daha fazladır. Tüm tiroid karsinomlarının yaklaşık %6-10'unu oluşturur. Diyetle yetersiz iyot alımı etiyojide rol almaktadır.

Makroskobik olarak kalın kapsüllü solid lezyonlar ile foliküler adenomu taklit eden tümör görünümünde olabilirler. Bazen makroskobik olarak kapsül invazyonu dikkati çekebilir [17].

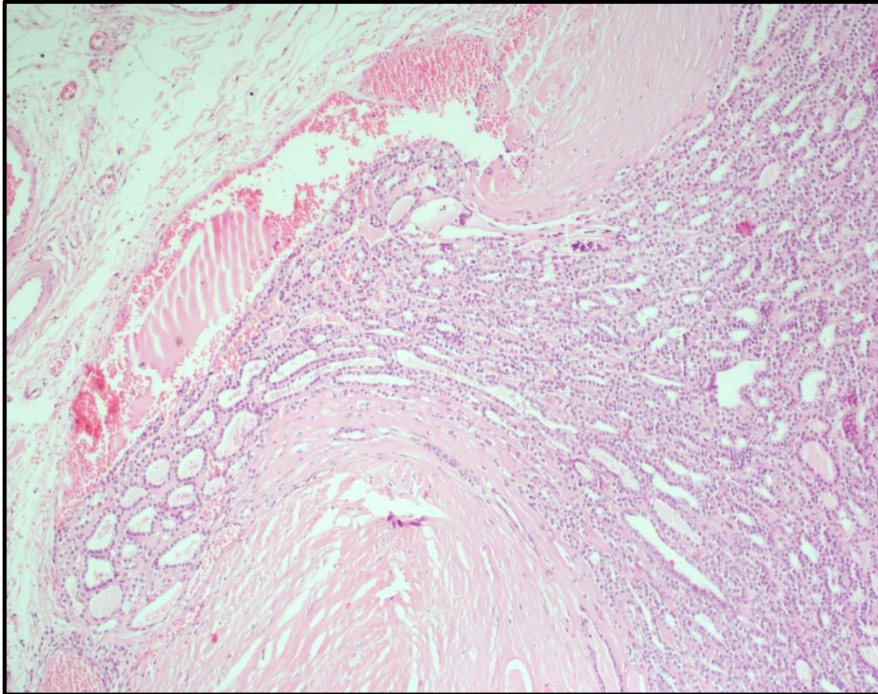
FTK tanısı kapsüller ve damar invazyonuna dayalı olarak alt grupta sınıflanabilir [10]. (Tablo 2)

Tablo 2: FTK sınıflandırması

Foliküler Karsinoma	İnvazyon
Minimal İnvaziv	Kapsüllü, sadece kapsüler invazyon (vasküler invazyon yok)
Enkapsüle Anjioinvaziv	Sınırlı damar invazyonu (kapsül invazyonu olan veya olmayan 1-3 damar) Yaygın damar invazyonu (≥ 4 damar, kapsüler invazyonu olan veya olmayan)
Yaygın İnvaziv	Yaygın invazyon (makroskobik ve

mikroskopik olarak belirgin),
multinodüler büyüme, bariz tümör
kapsülü yok

FTK'nin arkitektürel özellikleri, foliküler adenomunkilerle benzerdir. Trabeküler/solid, mikrofoliküler, normofoliküler, makrofoliküler ve diğer paternler (örneğin, kribriform) gözlenebilir. FTK, PTK'nın nükleer özelliklerinden yoksundur.[17] Kapsül invazyonu tanısı koyarken ameliyat esnasındaki manipülasyonun, biyopsiye bağlı travmanın yanıltıcı olmamasına dikkat edilmelidir (Şekil 6). Kapsül invazyonu gösteren neoplastik hücreler mantar benzeri bir görünüme sebep olurken, genellikle etrafında bunu sınırlamaya çalışan stromal reaksiyon oluşur. Foliküler karsinomda lenfatik invazyon durumu bilinmemektedir. Lenfatik tutulumun olması tanıyı daha çok PTK'nın foliküler varyantına yönlendirmektedir. Dörtten az damarın tutulması iyi prognoz ile ilişkilidir. Damar yapılarının tespiti için CD31, CD34, Faktör XIII ve TTF1 İHK belirteçleri kullanılmaktadır.



Şekil 6: FTK olgumuzda kapsül invazyonu izlenmektedir (H&E; X100).

Yaygın invaziv FTK'ler, tiroid ve ekstra tiroidal yumuşak dokuların geniş yayılımını gösterir. Vasküler invazyon sıklıkla belirgindir, ancak tek başına bir FTK'yı "yaygın invaziv" olarak sınıflandırmaz. Tiroid veya yumuşak doku yayılımının boyutundan daha önemli olanı, geniş anjiyoinvazyonun tanımlanmasıdır ve daha kötü prognoz ile ilişkilidir [17].

Genetik Profil: Foliküler karsinomlarda en sık rastlanan somatik mutasyonlar RAS nokta mutasyonları ve PPARG gen füzyonlarıdır. RAS ailesi mutasyonları tümörlerin% 30-50'sinde bulunur. En sık etkilenen bölge NRAS kodon 61, ardından HRAS kodon 61'dir.

PAX8-PPARG pozitif tümörler genç hastalarda ortaya çıkma eğiliminde olup daha sık vasküler invazyon gösterirler. RAS mutasyonları ve PPARG füzyonları bazı foliküler adenomlarda da bulunurlar ve bu iki tümör tipi arasındaki bağlantıyı desteklemektedirler [17].

Prognoz: Vasküler invazyonu olmayan sadece kapsüler invazyon gösteren folliküler karsinomların mükemmel bir prognozu vardır. Tutulan damarların sayısı arttıkça prognoz da kötüleşir. En sık uzak metastaz bölgeleri kemik, akciğer, beyin ve karaciğerdir. Dermal metastazları nadiren bildirilmiştir. TERT mutasyonu, yüksek hastalık nüksü ve kansere bağlı ölüm riski taşıyan bağımsız bir belirteçtir. Birçok FTK iyi bir şekilde ayırt edildiğinden, radyoaktif iyot tedavisine yanıt beklenir ve uzun süreli sağkalım ile ilişkili olabilir.

2.3.4. Medüller Tiroid Karsinomu (MTK)

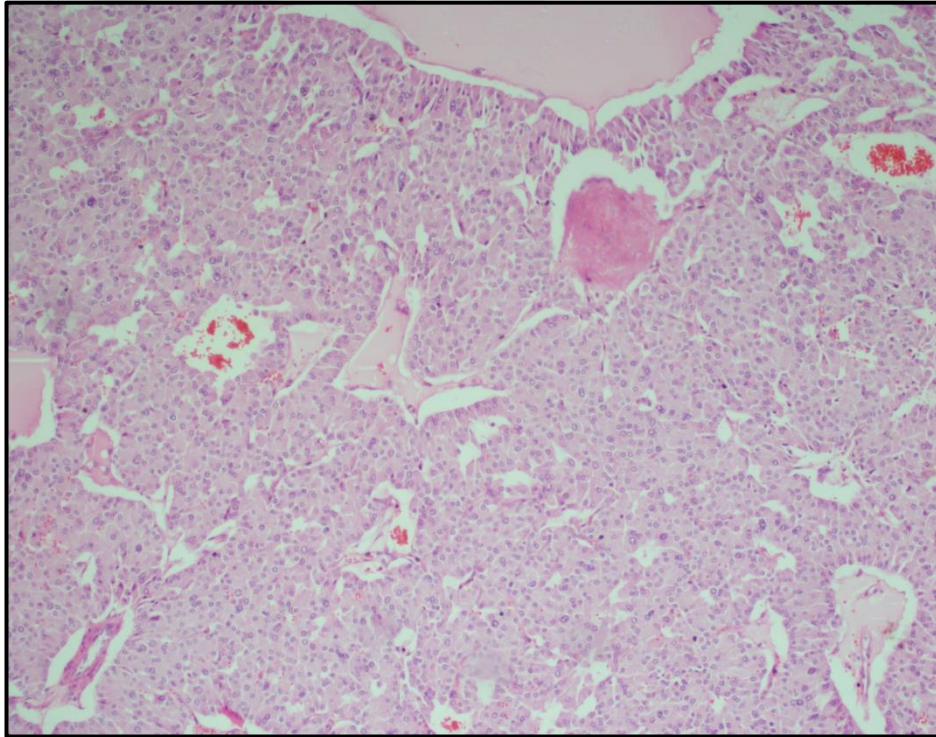
Medüller tiroid karsinomu (MTK), C hücrelerinden farklılaşarak gelişen tiroid bezinin malign bir tümörüdür. MTK tüm tiroid malignitelerinin <% 2-3'ünü oluşturur. Vakaların yaklaşık %70'ini oluşturan tümörün sporadik formları, dünyanın farklı bölgelerinde benzer sıklıklarda, hafif bir kadın baskınlığında ortaya çıkar. Sporadik tümörlerin pik insidansı, beşinci veya altıncı dekatta, kalıtsal vakalarda daha genç hasta gruplarında görülür. MTK'ların yaklaşık% 30'u kalıtsaldır, ve RET proto-onkogenindeki mutasyonlarının neden olduğu otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. Çoklu endokrin neoplazi tip 2 (MEN2); MEN2A, MEN2B ve ailesel

MTK (FMTK) fenotiplerini içerir. Şu anda FMTK, MEN2A spektrumunda bir varyant olarak kabul edilmektedir [18].

Genelde hastalar boyunda ağrısız kitle ile başvururlar. Başvuran hastaların %70'inde servikal lenf nodlarına, %10'unda uzak bölgelere metastaz varlığı izlenir. Serum kalsitonin ve CEA seviyeleri hasta takibi açısından önemlidir.

Tümörler sporadik vakalarda tek bir kitle şeklindeyken, kalıtsal vakalarda multisentrik olma eğilimindedir. Bir cm'dem küçük tümörler medüller mikrokarsinom olarak isimlendirilirler.

Mikroskopik olarak, klasik medüller karsinom, oldukça vasküler bir stroma, hyalinize kollajen ve amiloid ile ayrılan, granüler amfofilik sitoplazmalı, orta boyutlu ve yuvarlak çekirdekli hücrelerden oluşur. (Şekil 7) [10]. Tümör hücreleri değişken boyutlarda olup bu hücre tipleri yuvarlak, poligonal, plazmositoid veya iğsi şekilde olabilir [18]. Büyüme paterni karsinoid benzeri, paraganglioma benzeri, trabeküler, glandüler (tübüler ve foliküler) veya psödopapiller olabilir.



Şekil 7: Medüller karsinom tanılı olgumuzda solid büyüme paterni ve üstte amiloid birikimi izlenmektedir (H&E; X100).

İmmünohistokimya: Tümör hücreleri genellikle kalsitonin ve kalsitonin geni ile ilişkili peptit için pozitifdir. Tümör hücreleri ayrıca kromogranin ve sinaptofizin dahil genel nöroendokrin belirteçler için pozitiflik gösterir. TTF-1 çoğu vakada pozitifken tümör hücreleri tiroglobulin için negatiftir. PAX8 boyaması değişken ve zayıftır. CEA, tümörlerin büyük çoğunluğunda bulunur; bazı durumlarda, hücreler kalsitonin üretme yeteneklerini kaybeder, ancak CEA pozitifliğini korurlar [18].

Genetik Profil: Genetik olarak, kalıtsal olmayan sporadik medüller karsinom, vakaların % 40-60'ında RET mutasyonları ile karakterizedir ve M981T varyantı en yaygın olanıdır. RET'e ek olarak, önemli sayıda vakada RAS gen ailesinin mutasyonları da ortaya çıkar. Kalıtsal medüller karsinom, hastaların % 30'unda görülür ve germ hattı RET mutasyonlarına bağlı olarak yüksek penetrasyonlu otozomal dominant kalıtım paternini takip eder. Bu tür medüller karsinom, genç yaş grubunda (ortalama 35 yaş) klinik olarak belirginleşir, genellikle çoklu olup bilateraldir ve her zaman kalıntı bezinde multifokal C-hücre hiperplazisi eşlik eder. Çoklu endokrin neoplazi sendromlarının çoğunlukla ilk belirtisini oluşturur [10].

Prognoz: Palpe edilebilir tiroid nodülü ile başvuran MTK hastaları arasında, bazı serilerde servikal lenf nodu tutulumu %75'e varan oranlarda izlenmiştir [19].

Nodal metastazlar en sık ipsilateral lenf nodlarında görülür. Hematojen metastazlar en sık akciğer, karaciğer ve kemikte görülür, ancak adrenal bezler, hipofiz bezi ve meme de dahil olmak üzere çeşitli başka bölgelerde de meydana geldiği bildirilmiştir.

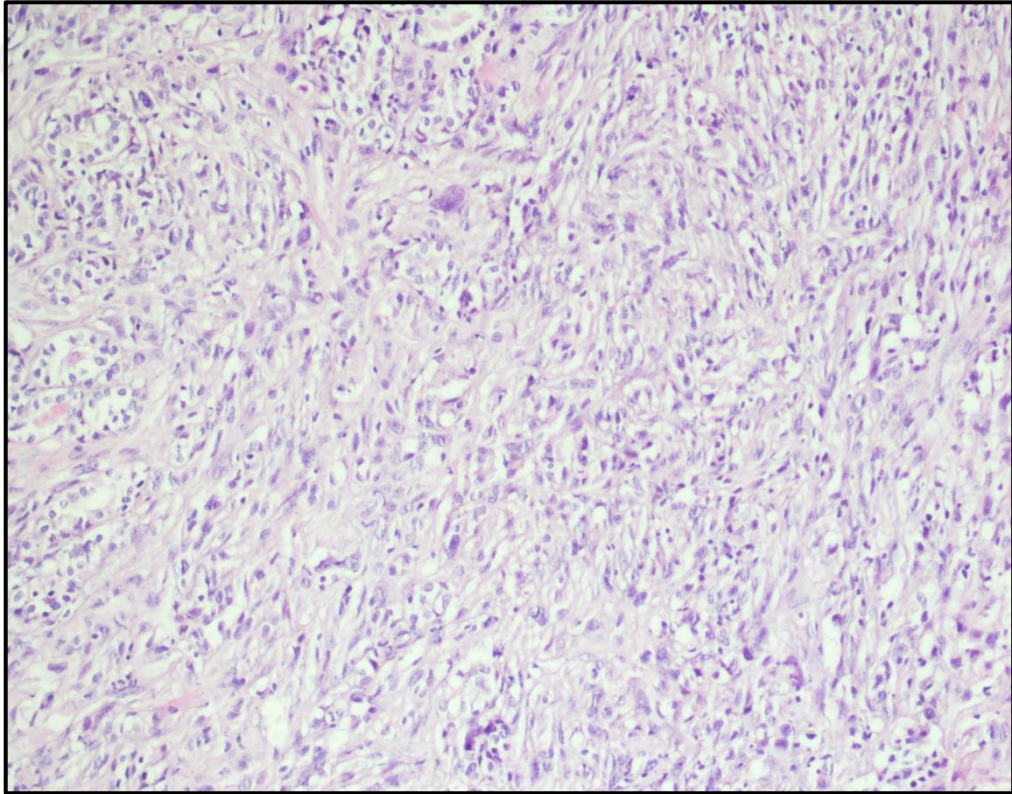
Bağımsız prognostik faktörler olarak 50 yaş sınırı ve TNM evresi gösterilebilir. Bildirilen 5 yıllık ve 10 yıllık sağkalım oranları, esas olarak hastalık evresine bağlı olarak sırasıyla %65-90 ve %45-85'tir. Kalıtsal tümörlerde sporadik vakalara göre daha düşük metastaz oranı bulunmuştur [18].

2.3.5. Anaplastik Tiroid Karsinomu (ATK)

Anaplastik tiroid karsinomu (ATK), undiferansiye foliküler tiroid hücrelerinden oluşan oldukça agresif bir tiroid malignitesidir. ATK, primer tiroid

malignitelerinin en agresif şeklidir ve ortalama 1 yıllık sağkalım oranı sadece %10-20'dir. Hastalar tipik olarak yaşlıdır ve ileri evre tümörler ile başvururlar. Kadın/erkek oranı 2:1'dir.

Hastalar tipik olarak hızlı büyüyen, sert, fiks ve geniş infiltratif boyun kitlesi ile başvururlar. En sık görülen semptomlar ağrı, ses kısıklığı, solunum zorluğu ve yutma güçlüğüdür. Diğer semptomlar arasında vokal kord paralizi, servikal ağrı ve dispne bulunur. Hastaların yaklaşık %30-40'ında en sık akciğer, kemik ve beyine uzak metastaz görülür [20].



Şekil 8: ATK tanılı olgumuzda pleomorfik ve hiperkromatik nükleuslu atipik görünümde hücrelerden oluşan solid paternde tümör izlenmektedir (H&E; X200).

Makroskopik olarak, organın büyük bir kısmını kaplayan oldukça nekrotik, hemorajik ve solid bir tümör kitlesi görülür. Nekroz, vasküler invazyon ve mitotik figürler oldukça belirgindir. Histolojik olarak, çeşitli paternler tanımlanmıştır. Tümörler genellikle çoklu hücre tiplerinden oluşur. Vakaların yaklaşık üçte birinde

“skuamoid” farklılaşma görülmesine rağmen, çoğu tümörde, dev hücreler ve iğsi hücreler de bulunur (Şekil 8). Osteoklast benzeri dev hücrelerin varlığı yaygın bir özelliktir. Yoğun fibrozis ve kalsifikasyonlarla karakterize edilen, anaplastik karsinomun bir “paucicellular” varyantı tarif edilmiştir. İğ hücreli skuamöz özelliklere sahip anaplastik karsinom, yüksek kolumnar hücreli papiller karsinomun dönüşümünün bir sonucu olabilir [11].

İmmünohistokimya: ATK sitokeratinler için pozitiflik sergiler. Tiroglobulin sıklıkla negatif iken yaklaşık olguların yarısında TTF-1 pozitifliği izlenebilir [11].

Genetik Profil: ATK'de çok çeşitli genetik değişiklikler bulunur. En sık mutasyon TP53 geninde izlenir (%30-70). Tekrarlayan diğer değişiklikler arasında BRAFV600E mutasyonu (%20), RAS genlerini (NRAS, KRAS veya HRAS; % 20) içeren değişiklikler, PIK3CA (% 10-20), PTEN (%10-15)) ve ALK yer alır. Son kanıtlar ayrıca p53, beta-katenin genleri, RAF genleri ve OEATC1'deki değişikliklerin hem nova ATK, hem de farklılaşmış tiroid karsinomları kaynaklı ortaya çıkan vakalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [11].

Prognoz: ATK'nin prognozu >% 90 oranında mortal seyrederek. Genel olarak, büyük, infiltratif tümörler daha kötü bir prognostik duruma işaret eder. İleri hasta yaşı, akut semptomlar ve lökositoz da daha düşük sağ kalım oranıyla ilişkili klinik risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. ATK'nin klinik davranışı veya tedavisine yanıt için bilinen hiçbir biyolojik belirteç yoktur [20].

2.3.6. Tümörlerde Patolojik Evreleme (pTNM)-WHO 2016 [21]

Primer tümör (pT):

Papiller, Foliküler, Az diferansiye, Hurtle hücreli, Medüller ve Anaplastik Tiroid Karsinomları için;

- pTX: Değerlendirilemiyor
- pT0: Primer tümör bulgusu yok
- pT1: Tümör boyutu 2 cm veya daha az, tiroidle sınırlı
- pT1a: Tümör, tiroidle sınırlı en büyük boyutta 1 cm veya daha az
- pT1b: Tümör boyutu 1 cm'den fazla 2 cm'den azdır, tiroidle sınırlıdır.

- pT2: Tümör 2 cm'den büyük 4 cm'den küçüktür, tiroid ile sınırlıdır.
- pT3: Tümör boyutu 4 cm'den daha fazla, tiroid ile sınırlı veya yalnızca strep kasları invaze eden ekstratiroidal yayılım mevcut
- pT3a: Tümör boyutu 4 cm'den daha fazla, tiroid ile sınırlı
- pT3b: Tümör herhangi bir büyüklükte, strep kaslara (sternohyoid, sternotiroid, tirohyoid veya omohyoid kaslar) invazyon göstermekte
- pT4: Strep kaslar haricinde gros ekstratiroidal yayılım mevcut
- pT4a: Tümör herhangi bir boyuttadır, deri altı yumuşak dokular, larenks, trakea, özofagus veya laringeal sinire invazedir.
- pT4b: Tümör prevertebral fasyayı veya karotid arteri veya mediastinal damarları invaze eder.

Bölgesel Lenf Nodu (pN):

- pNX: Değerlendirilemiyor
- pN0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
- pN1: Bölgesel lenf nodu metastazı
- pN1a: Level VI ve Level VII lenf nodlarına metastaz mevcut
- pN1b: Unilateral, bilateral veya kontralateral boyun lenf nodlarına veya retrofaringeal lenf nodlarına metastaz mevcut

Uzak Metastaz (pM):

- pMX: Uzak metastaz değerlendirilemiyor
- pM0: Uzak metastaz yok
- pM1: Uzak metastaz var

Tablo 3: Diferansiye Tiroid Kanserlerinde TNM Sınıflaması

	EVRE I	Herhangi T	Herhangi N	M0
55 YAŞ ALTI	EVRE II	Herhangi T	Herhangi N	M1
	EVRE I	T1	N0/NX	M0

55 YAŞ ÜSTÜ		T2	N0/NX	M0
	EVRE II	T1	N1	M0
		T2	N1	M0
		T3a/T3b	Herhangi N	M0
	EVRE III	T4a	Herhangi N	M0
	EVRE IVA	T4b	Herhangi N	M0
	EVRE IVB	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 3 (devam) : Medüller Tiroid Karsinomlarında TNM Sınıflaması (AJCC-2017)

EVRE I	T1	N0	M0
EVRE II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
EVRE III	T1-3	N1a	M0
EVRE IVA	T4a	Herhangi N	M0
	T1-3	N1b	M0
EVRE IVB	T4b	Herhangi N	M0
EVRE IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1

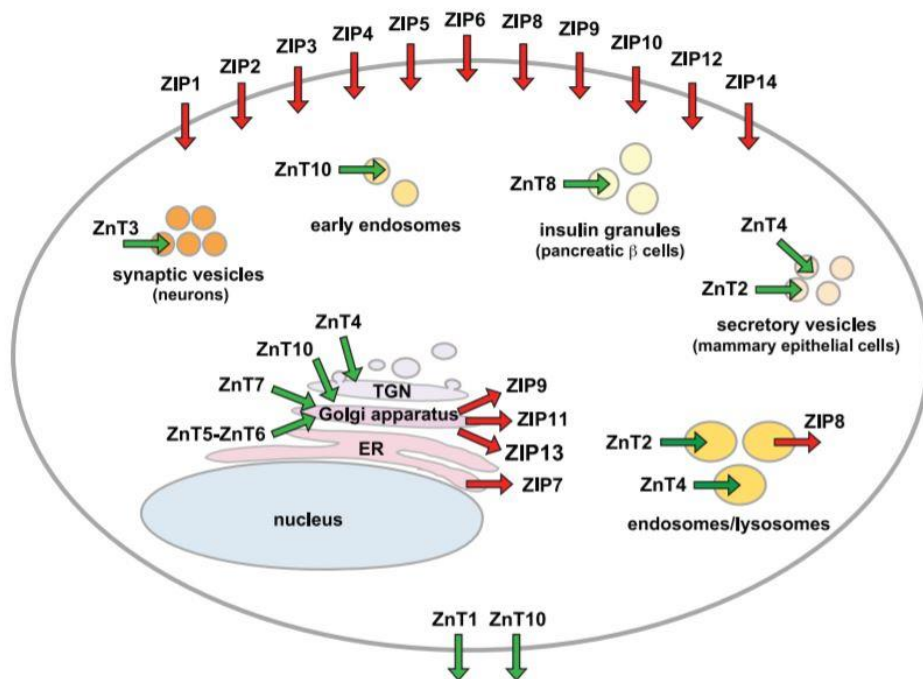
Tablo 3 (devam) : Anaplastik Tiroid Karsinomlarında TNM sınıflaması

EVRE IVA	T1-3a	N0/NX	M0
EVRE IVB	T1-3a	N1	M0
	T3b	Herhangi N	M0
	T4	Herhangi N	M0
EVRE IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.4.Çinko Taşıyıcı Kanal ZIP4

Zn-taşıyıcı ZIP4 insanlarda SLC39A4 geni tarafından kodlanan bir transmembran proteindir. Çinko, insan vücudundaki birçok biyolojik süreçte hayati rol oynar. Çinko homeostazını ve normal biyolojik aktiviteleri korumak için Zn-taşıyıcılarının hücre membranındaki rolleri önemlidir. Hücresel çinko homeostazında sırasıyla çinko alımında ve çinko salınımında işlev gören ZIP (SLC39 tarafından kodlanan) ailesi ve ZnT (SLC30 tarafından kodlanan) ailesi olmak üzere iki tip taşıyıcı tanımlanmıştır. Bugüne kadar memelilerde 10 ZnT ve 14 ZIP tanımlanmıştır [4].

ZIP'ler plazma zarı boyunca sitoplazma içine Zn alarak hücreSEL Zn içeriğini artırırken, ZnT'ler hücrelerden dışarı veya hücre içi organellere Zn akışını kolaylaştırarak hücre içi Zn seviyesini düşürmektedir (Şekil 9) [5, 22].



Şekil 9: ZIP ve ZnT taşıyıcılarının hücre içi lokalizasyonu şematik çizimle gösterilmektedir. [22]

Son zamanlarda, birçok çalışma ZIP4'ün çeşitli organlara ait karsinom gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynadığını göstermiştir [23].

Zn ve Zn-taşıyıcıların düzensizliğinin glial tümörler, prostat, meme ve pankreas ve akciğer kanserleri gibi çeşitli kanser türleri ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve epilepsi gibi beyin bozuklukları ile bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir [4].

Değişken Zn ve Zn-taşıyıcılarının hücre proliferasyonuna etkileri dokuya özgüdür. Meme bezi tümör hücrelerinde, normal hücrelerdekinden daha yüksek bir Zn konsantrasyonuna yol açan azalmış ZnT1 seviyeleri tespit edilmiştir. ZIP1 ve ZIP4'ün ekspresyonunun azalmasının, prostat kanserinde mevcut olan azalmış Zn konsantrasyonları için potansiyel bir mekanizma olduğu bilinmektedir [5]. Buna karşın overde kanser dokularının normal dokulara oranla daha yüksek ZIP4 eksprese ettiği ve tümörögenizde etkili olduğu in vivo ve invitro olarak gösterilmiştir [24].

Pankreasta çinko mevcudiyeti invazyon ve metastaz açısından önemlidir. ZIP4'ün pankreas kanserinde aşırı eksprese edildiği ve tümör büyümesine ve metastaza katkıda bulunduğu gösterilmiştir [25].

2.5.Sıkı Bağlantı Proteinleri ZO-1 ve Claudin-1

Çeşitli organlardaki (akciğerler, bağırsaklar, cilt vb.) epitel dokuları, vücuttaki biyolojik bölmeleri farklı iç ortamlarla ayıran özel yapılar oluşturur. Epitel hücreleri arasındaki hücreler arası bağlantı kompleksi, sıkı bağlantılardan (tight junction), ara bağlantılar ve desmozomlardan oluşur ve epitelyal hücre yuvasının yapılandırılması ve hücresel polaritenin korunması için esastır [26].

Boyut ve yük temelinde difüzyonu kısıtlayan paraselüler kapılar olarak işlev gören sıkı bağlantılar vücudun farklı bölmeleri arasında bir bariyer oluşturmak için gereklidirler. Seçici paraselüler difüzyon, organlarda ve dokularda dengenin sürdürülmesi için önemli bir işlemdir [7].

Hücreler arası bağlantı kompleksinde sıkı bağlantıları iki ayrı işleve sahiptir. Hücreler arası boşlukta iyonların, çözünen maddelerin ve suyun moleküler penetrasyonunu kontrol eden bir bariyer görevi görürler ve plazma zarını bölümlere

kolanjite neden olurken ve Claudin-1 eksikliği farelerde cilt geçirgenliğinin bozulması nedeniyle yenidoğan ölümüne neden olmuştur [26].

Claudin-1'in epitel hücrelerinin paraselüler bariyer bütünlüğünden sorumlu en önemli protein olduğu varsayılmaktadır. Tümör ilerlemesinde, sıkı bağlantılar düzeneği sıklıkla bozulur ve bu da hücre zarı lokalize sıkı bağlantı proteinlerinin kaybına neden olur [9].

Claudin-1 için, kolon, akciğer ve meme kanseri ve melanom dahil yaygın malignitelerde hücre altı lokalizasyonunda değişmiş bir protein ekspresyonu gözlenmiştir. Ayrıca, subselüler Claudin-1 ekspresyonu daha agresif bir tümör davranışı ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir in vitro çalışmada foliküler tiroid karsinomu metastazında membranöz ekspresyonda kayıp ve artmış nükleer Claudin-1 lokalizasyonu gösterilmiştir [9].

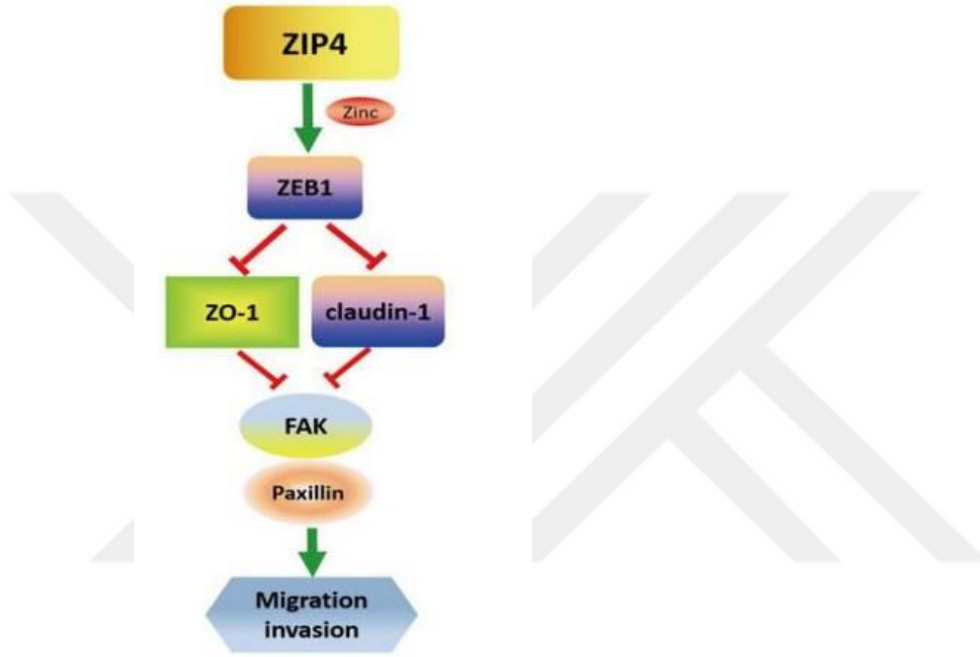
Zonula okludens-1 (ZO-1), Tight junction protein-1 olarak da bilinir, insanlardaki TJP1 geni tarafından kodlanan 220-kDa ağırlığında bir periferik membran proteinidir [27].

ZO-1; ZO-2 veya ZO-3 ile kompleksler oluşturur. Bu proteinler aktin hücre iskeleti ile claudin, okludin gibi sıkı bağlantı proteinleri arasında köprü vazifesi oluşturur. ZO-1, hücreler arası birleşme yerlerinde sinyal iletiminde rol oynayabilir. ZO-1 geni için farklı izoformları kodlayan iki transkript varyantı tanımlanmıştır. ZO-1 disfonksiyonu ile ilişkili hastalıklar arasında Çölyak Hastalığı ve Konjenital Nefrotik Sendrom bulunur [28].

ZO-1 genindeki delesyonlar veya mutasyonların aşırı büyümeye yol açması ZO-1'in bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Örneğin, insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü (IGF-IR), meme kanseri hücrelerinde ZO-1'in etkinliğini artırarak E-kaderin aracılı hücre-hücre adhezyonunu indükler [29]. Meme kanseri, kolorektal kanser ve gastrointestinal tümörlerde ZO-1 ekspresyonunun azalmasının, artan invazivlik ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ZO-1'in epitelyal-mezenkimal geçiş süreçleri ile ilişkili tümör invazyonunda rol oynadığı bildirilmektedir [30]. ZO-1 ekspresyonundaki artış küçük hücreli akciğer karsinomunda prognoz ile doğru orantılı bulunmuştur [31].

2.6.ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 İlişkisi

ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 ilişkisi pankreas karsinomu hücre dizilerinde in vitro çalışmalarla incelenmiştir. Bu çalışmalarda, FAK ve Paxillin'in genlerini hedefleyerek pankreatik kanserde migrasyon ve invazyonu aktive eden ZO-1, claudin-1 yolunun ekspresyonunu kontrol eden yeni bir ZIP4-ZEB1 bağımlı mekanizma ortaya konmuştur (Şekil 11) [25].



Şekil 11 : ZIP4 aracılı transkripsiyon faktör ZEB1'in FAK ve Paxillin alt yollarını düzenlediği gösterilmiştir [25].

Fokal adezyon kinazı (FAK) ve paxillin, integrin bağımlı sinyalleri iletmede işlev gören iki proteindir. Bu sinyaller hücre göçü, proliferasyon ve hayatta kalma gibi önemli biyolojik olayları kontrol eder. Hücre göçüne ilişkin pozitif ve negatif düzenleme yönünde etki ettiklerine yönelik farklı çalışmalar mevcuttur [32].

ZO-1 ve claudin-1 baskılanmasını modüle edebilen ZIP4 aracılı transkripsiyon faktör ZEB1'in FAK ve Paxillin alt yollarını düzenlediği gösterilmiştir. ZIP4'ün düşürülmesi, FAK ve Paxillin'in fosforilasyonunun azalmasına neden olmuş ve bu şekilde tümör metastazını engelleme yönünde etki

göstermiştir. Bu bulgular çinko kanalı ZIP4'ün pankreatik kanser invazivliği ve metastaz akışına katıldığı yeni bir yolun varlığını desteklemektedir [25].

Tümör invazyonu ile ilgili önceki çalışmalar büyük ölçüde, E-kaderin gibi hücre koruyucuları devre dışı bırakarak tümör migrasyonunu ve invazyonu harekete geçiren ve erken patogeneze katkıda bulunan ZEB1 gibi transkripsiyonel düzenleyicilere odaklanmıştır. Bu transkripsiyon faktörlerinin birçoğu çinko bağımlıdır ve çinko iyonunu koordine eden C2H2 tipine karşılık gelen dört ila altı çinko bağlanma alanı içerir [33].

ZIP4'ün düşürülmesi, pankreas kanseri hücre dizileri ve fare modellerinde invazyon belirteçlerini baskılayarak pankreatik kanser invazyonu ve göçünü inhibe etmiştir [25].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Olguların Belirlenmesi ve Hazırlanması

Çalışmamıza Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD.'na Ocak 2010-Nisan 2019 tarihleri arasında gönderilen “multinodüler guatr, tiroid papiller karsinomu, tiroid medüller karsinomu, tiroid folliküler karsinomu (minimal invaziv-yaygın invaziv), ve anaplastik tiroid karsinomu” tanısı alan, uygun tespit işlemi yapılmış ve yeterli dokuya sahip tiroidektomi materyalleri arasından seçilen 66 olgu dahil edilmiştir. Bu 66 olgunun; 20'si multinodüler guatr, 18'i tiroid papiller karsinom, 11'i tiroid medüller karsinom, 11'i tiroid folliküler karsinom (8 adet minimal invaziv, 3 adet yaygın invaziv) ve 6'sı anaplastik tiroid karsinomu tanılıdır.

Olgulara ait yaş, cinsiyet, tümörün histolojik alt tipi ve prognostik değerleri gösteren veriler Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji bölümüne ait patoloji raporlarından, hastane otomasyon sisteminden elde edilmiştir.

Çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi 23.05.2019 tarihinde 135 nolu karar ile yerel etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, TIP.19.019 nolu proje kod numarası ile desteklenmiştir.

3.2.Parafin Blok Seçimi

Tüm materyallere ait hematoksil-eozin (H&E) ve tanıya yönelik yapılmış olan immünohistokimyasal belirteçler ile boyalı preparatlar iki gözlemci (ilgili asistan ve ilgili öğretim üyesi) tarafından tekrar incelenmiştir. H&E boyalı preparatlar ile materyaller WHO sınıflamasına göre histolojik alt tiplerine ayrılmıştır. Çalışma için tümör hücrelerinin en yoğun olduğu ve nekrozun en az olduğu bloklar seçilmiştir.

3.3.Kesitlerin Elde Edilmesi ve Deparafinizasyon İşlemi

Çalışmada ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1'e yönelik immünohistokimyasal belirteçler için, rutin doku takibi işlemleri uygulanan bloklardan mikrotom cihazı (Shandon, ABD) kullanılarak her olgu için üçer adet kesit adhezivli lamalara

(Isotherm, Almanya) 5µm kalınlığında kesit alındı. Aynı esnada DNA'dan ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 gen bölgelerini PCR aracılığıyla çoğaltmak için 1,5ml reaksiyon tüplerine 5µm kalınlığında ikişer adet kesit alındı. PCR çalışmak amacıyla reaksiyon tüplerine kesit alınmadan önce doku bulaşmasını önlemek için mikrotom cihazı ksilen ile temizlendi ve her olgu için mikrotom bıçağı değiştirilerek mikrotom cihazı yeniden silindi.

İmmünohistokimyasal çalışma için kesit alınan lamlar 65°C'lik etüvde 30 dakika bekletilerek deparafinizasyonu yapıldı ve lamlara dokuların yapışması sağlandı.

3.4.İmmünohistokimyasal Çalışma

3.4.1. İmmünohistokimyada Kullanılan Belirteçler ve Çalışma Protokolü

İmmünohistokimyasal çalışmada ZIP4 (Lifespan Biosciences, ABD, poliklonal tavşan/IgG antikor, katolog no: LS-C676512), ZO-1 (Thermo Fisher, ABD, poliklonal tavşan/IgG antikor, katolog no: PA5-28858) ve Claudin-1 (Cell Signaling Technology, ABD, D5H1D klon, monoklonal tavşan/IgG antikor, katolog no: 13255) kullanıma hazır formda primer antikorlar kullanıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmanın en doğru şekilde değerlendirilmesi için kontrol dokular ile birlikte çalışıldı. ZIP4 için tümörsüz böbrek dokusu, ZO-1 için meme karsinomu ve serviks dokusu, Claudin-1 için derinin skuamöz hücreli karsinomu ve kolon adenokarsinomu dokuları içeren parafin bloklar kontrol bloğu olarak seçildi. Bu kontrol blokları kullanılarak primer antikorların optimum çalışma dilüsyonu ve inkübasyon süresi saptandı (Tablo 4).

Tablo 4: İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar

Antikor	Klon	Sellüler	Dilüsyon	İnkübasyon	Firma
Lokalizasyon					
ZIP4	Poliklonal	Sitoplazmik	1/400	32 dk	LSBio
ZO-1	Poliklonal	Membranöz	1/200	64 dk	Thermo Fisher

Claudin-1	D5H1D	Membranöz – Hücre içi	1/200	64 dk	Cell Signaling Technology
------------------	-------	--------------------------	-------	-------	---------------------------------

İmmünohistokimyasal çalışma Ventana BenchMark Ultra cihazında (Roche Diagnostics, ABD) otomatik olarak, aşağıda belirtilen sıra ile yapıldı:

ZIP4 antikoruna için;

- 1) Cihaza yerleştirilen lamalar, 72°C'ye kadar ısıtılarak deparafinizasyon yapıldı.
- 2) 95°C'ye kadar ısıtılarak Ventana Conditioner 1-EDTA solüsyonu (Roche Diagnostics, ABD) ile 36 dakika inkübe edilerek hücre iyileştirmesi yapıldı.
- 3) Antikor inkübasyonu için lamalar 37°C'ye soğutuldu ve 4 dk süre ile inkübe edildi.
- 4) Bu aşamada primer antikor uygun dilüsyonda manuel şekilde lamlara uygulandı. 32 dakika süre ile inkübe edildi.
- 5) Arka plan boyanma için bir damla hematoksin uygulanıp 20 dk, Bluing belirteci uygulanıp 8 dk süre ile inkübe edildi.

ZO-1 ve Claudin-1 antikorları için;

- 1) Cihaza yerleştirilen lamalar, 72°C'ye kadar ısıtılarak deparafinizasyon yapıldı.
- 2) 95°C'ye kadar ısıtılarak Ventana ULTRA Conditioner 2-Sitrat solüsyonu (Roche Diagnostics, ABD) ile 56 dakika inkübe edilerek hücre iyileştirmesi yapıldı.
- 3) Antikor inkübasyonu için lamalar 37°C'ye soğutuldu ve 4 dk süre ile inkübe edildi.
- 4) Bu aşamada primer antikor uygun dilüsyonda el ile lamlara uygulandı. 64 dakika süre ile inkübe edildi.
- 5) Arka plan boyanma için bir damla hematoksin uygulanıp 16 dk, Bluing belirteci uygulanıp 4 dk boyunca inkübe edildi.

Makineden çıkarılan lamalar deterjanlı su ile zarar verilmeden yıkandı, saf alkolde 5 dakika boyunca bekletildi. Ardından 5 dakika boyunca ksilende bekletildi ve lamel ile kapatıldı.

3.4.2. İmmünohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal boyama uygulanan preparatlar ışık mikroskopunda, 2 patolog tarafından semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi. ZIP4 için sitoplazmik, ZO-1 için membranöz, Claudin-1 için membranöz ve sitoplazmik-nükleer boyanma ayrı ayrı değerlendirilerek pozitif kabul edildi.

Tüm olgularda pozitif boyanan alanların yüzdesi (yaygınlığı) ve boyanma şiddeti (yoğunluğu) skorlandı ve toplam skor elde edildi. Tümör hücrelerinin %0-5'inde boyanma skor 0, %6-25'inde boyanma skor 1, %26-50'sinde boyanma skor 2, %51-75'inde boyanma skor 3 ve %76-100'ünde boyanma skor 4 olarak belirlendi. Hücrelerin boyanma şiddeti ise; boyanma mevcut değilse skor 0, zayıf boyanma varlığında skor 1, orta şiddette boyanma skor 2, güçlü boyanma skor 3 olarak belirlendi. Toplam skorda boyanma yoksa negatif, 1 ve 2 zayıf pozitif, 3 ve 4 orta şiddette pozitif, 5-7 ise güçlü pozitif olarak kabul edildi [34].

3.5.RNA İzolasyonu, Ölçümü, cDNA Sentezi ve PCR Analizi

3.5.1. RNA İzolasyonu

DNA'dan ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 gen bölgelerini PCR aracılığıyla çoğaltmak için RNA izolasyonu işlemi, Roche High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Almanya, Ref no: 06650775001)'i, santrifüj cihazı (Beckman Coulter, Microfuge 16, ABD), vorteks (IKA, Almanya) ve dijital kurutma banyosu (Labnet AccuBlock, ABD) kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde yapıldı:

- 1) Parafin bloklardan 5µm kalınlığında ikişer adet kesit alınan 1,5ml reaksiyon tüplerine 800 µl ksilen eklendi. Daha sonra 5 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 2) 400 µl etanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. 16000 devirde 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 3) 1 ml etanol eklendi, vorteks ile karıştırıldı. 16000 devirde 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 4) Etanol kalıntılarından kurtulmak için tüp kağıt havlu ile kurutuldu. 55°C'de 10 dk doku pelleti kurutuldu.

Bu basamaklar ile deparafinizasyon sağlandı ve RNA izolasyon işlemine geçildi.

- 5) Her doku peletine (yukarıda açıklandığı gibi deparafinize edilmiş), 100 µl RNA Tissue Lysis Buffer, 16 µl% 10 SDS ve 40 µl Proteinaz K çalışma solüsyonu eklendi. 5 saniye vorteks ile karıştırdı, +85°C'de 30 dakika inkübe edildi, Proteinaz K eklemenden önce +55°C'nin altına soğutuldu.
- 6) 80 µl Proteinaz K eklendikten sonra, 5 saniye vorteksle karıştırdı, 5 saniye santrifüj cihazında döndürüldü, +55°C'de 30 dakika inkübe edildi, 5 saniye santrifüj cihazında döndürüldü bu adımda berrak lizat elde edildi.
- 7) 325 µl Binding Buffer ve 325 µl etanol eklenip, 5 saniye vorteksle karıştırdı, 5 saniye santrifüj cihazında döndürüldü.
- 8) Lizat pipet ile High Pure filtreli tüp ve toplayıcı tüp kombinasyonuna aktarıldı. 30 sn 6000 devirde santrifüj edildi.
- 9) Filtreli tüp yeni toplayıcı tüpe yerleştirildi, filtre keşesini tamamen kurutmak için 16.000 devirde 2 dakika döndürüldü.
- 10) Filtreli tüp yeni toplayıcı tüpe yerleştirildi, filtreye temas etmeden 100 µl DNase çalışma solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
- 11) 500 µl Wash Buffer I çalışma solüsyonu eklenip 6000 devirde 20 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- 12) 500 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklenip 6000 devirde 20 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- 13) 500 µl Wash Buffer II çalışma solüsyonu eklenip 6000 devirde 20 sn santrifüj edildi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı. 2 dk 16000 devirde santrifüj edilerek filtrenin tamamen kuruması sağlandı.
- 14) High Pure filtreli tüpün altına 1,5 ml reaksiyon tüpü yerleştirildi. 50 µl Elution Buffer eklendi, +15-+25°C'de 1 dk inkübe edildi. 6000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Böylelikle RNA toplanmış oldu. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması

RNA'dan cDNA sentezine başlamadan önce, spektrofotometre cihazı

(BioDrop, µLite, İngiltere) kullanılarak 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarı ölçüldü. Saflık oranları 1,8 civarı olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

3.5.3. cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezinde Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya, Ref no: 04896866001)'i ve termal cyclers cihazı (SensoQuest, Almanya) kullanıldı. Aşağıda belirtilen işlemler yapıldı:

- 1) cDNA Master Kiti içerisinde bulunan reaktifler çözündürülüp buz üzerine bırakıldı.
- 2) Her reaktif berrak bir görünüm alana kadar vortekslendi.
- 3) Öncelikle her vaka için spektrofometrede ölçülen RNA 500 ng'ye göre eşitlenerek hesaplandı, diğer reaksiyon bileşenleri de Tablo 5 ve Tablo 6'da gösterildiği gibi toplam 20µl olacak şekilde hesaplandı. Buz üzerine yerleştirilen reaksiyon tüplerine reaksiyon bileşenleri bırakıldı.

Tablo 5: cDNA çalışma protokolü 1. kısım

Malzeme	Miktar
Total RNA	A µl (RNA miktarı 500 ng'a eşitlendi)
Anchored-oligo Primer	1 µl
Random Hexamer Primer	1 µl
Su	11-A µl

- 4) Tüpler 65 0C'de 10 dk bekletildi.
- 5) 10 dk sonra tüpler buza alındı.
- 6) Tüpler içerisine sırası ile Tablo x'deki gibi eklendi.

Tablo 6: cDNA çalışma protokolü 2. kısım

Malzeme	Miktar
Transcriptor RT Reaction Buffer 5X	4 µl
Protector RNase Inhibitor	0.5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5 µl

- 7) Tüpler Termal Cykler cihazında; +25 °C’de 10 dk, +50 °C’de 60 dk, +85 °C’de 5 dk, +4 °C’de sonsuz olacak şekilde bekletildi. İşlem sona erdikten sonra -20 °C’de saklandı.

3.5.4. RT-PCR Analizi

RT-PCR analizinde Roche FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, Almanya, Ref no: 06402682001) kiti, primer ve probe olarak Molbiol ZIP4 (Molbiol, Almanya, Id:), Molbiol ZO-1 (Molbiol, Almanya, Id:), Molbiol Claudin-1 (Molbiol, Almanya, Id:) ve pozitif kontrol olarak Molbiol β-Actin (Molbiol, Almanya, Id:) kullanıldı. Primerlerde ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 için 4 bölge (F, S, A, R), β-Actin için 2 bölge (F, R) temsil edildi (Şekil 12).

The ZIP4 assay:

988083	hu SLC39A4 (ZIP4), all transcripts, cDNA	NM_130849	Tm
SLC39A4 F	CggCCTTCgCTggTCT	S	1758-1773 58,1°C
SLC39A4 S	CCTTCgCTggTCTCTACgTg	S	1761-1780 57,7°C
SLC39A4 A	CgggAgCATgTCgCagA	A	1876-1860 58,8°C
SLC39A4 R	gCCgggAgCATgTCg	A	1878-1864 56,9°C
SLC39A4 P	F- CCAGgATCCAggCCTCgCTC--Q	S	1826-1807 64,5°C

The ZO-1 assay:

989083	hu TJPI (ZO-1), cDNA, all transcripts, exons 24-25	NM_03257	Tm
TJPI F	ATTgCCCTCgCagTATgC	S	4730-4747 56,0°C
TJPI S	CAGCCTgTCACCAgCg	S	4758-4773 55,8°C
THPI A	ggAATTCTgAAAATCCAATgACACT	A	4844-4820 57,1°C
TJPI R	gTgggTCTggTTTggACACTA	A	4866-4846 56,5°C
TJPI P	F-CCACATACATTCTAAGggAgCACATggTg--	S	4781-4809 65,3°C

The Claudin-1 assay:

989083	hu CLDN1, cDNA, Exons 2-4	NM_021101	Tm
CLDN1 F	CgTgCCTTgATggTggTT	S	461-478 57,4°C
CLDN1 S	CgTgCCTTgATggTggTTg	S	461-479 59,9°C
CLDN1 A	AATAgCCAgACCTgCAAgAAgAAAT	A	619-595 59,4°C
CLDN1 R	CAAATTCgTACCTggCATTgACT	A	704-682 58,7°C
CLDN1 TM	FAM-TCCCTCTgggAgTgATAgCAATCTTTgT--Q	S	483-510 64,6°C

989083	β-Actin cDNA Exon 1-2. Amplicon : 174 bp	NM_001101	Tm
ACTIN F ⁵	AgCCTCgCCTTTgCCgA	S	34-50 61,9°C 104883
ACTIN R ⁵	CTggTgCCTggggCg	A	207-193 61,8°C 104538
ACTIN TM ⁵	F-CCgCCgCCCgTCCACACCCgCC--Q	S	52-73 81,6°C

⁵ Highly Sensitive and Specific Fluorescence RT-PCR Assay for the Pseudogene-free Detection of b-Actin Transcripts as Quantitative Reference. Kreuzer, KA., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., Pauli, G., Huhn, D. and Schmidt, CA. Clinical Chemistry 45 (1999) 297-300

Şekil 12: ZIP4, ZO-1, Claudin-1 ve β-Actin için primer ve probe dizaynlarının gösterilmesi.

PCR karışımı, reaksiyon kuyusu başına 20 µl nihai hacim olacak şekilde Roche FastStart Essential DNA Probes Master kiti ile aşağıda belirtilen prosedüre göre hazırlandı.

- 1) Primerler 250 µl, problemler 150 µl su ile sulandırıldı.
- 2) Reaksiyon tüplerine buz üzerinde PCR karışımları hazırlandı. Bileşenler Tablo 7’de gösterilen sırayla eklenerek her reaksiyon kuyusu için 18 µl PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 7: LightCycler 480 Probe Master kullanarak her 18 µl reaksiyon için PCR karışımı hazırlama şablonu

Bileşen	Hacim
Su	(7,8-Primer volümü) µl
LightCycler 480 Probe Master	10 µl
Primer Solüsyon	Primer bölge x 0,5 µl
Probe solüsyon	0,2 µl
Toplam Hacim	18 µl

- 3) Yukarı ve aşağı pipetleme yaparak dikkatlice karıştırıldı.
- 4) LightCycler 480 Multiwell Plakasının her bir kuyucuğuna 18 µl PCR karışımı pipetlendi
- 5) Her kuyudaki PCR karışımına 2 µl örnek cDNA pipetlendi
- 6) MultiCell Plakası LightCycler 480 Sızdırmaz Folyo ile kapatıldı
- 7) MultiCell Plakası LightCycler 480 cihazına aktarıldı
- 8) Tablo-8’de tarif edilen PCR protokolü kullanılarak LightCycler 480 Cihazı çalıştırıldı.

Tablo 8: LightCycler 480 Cihazı ile çalışılan PCR protokolü

Tespit biçimi		Blok Tipi	Reaksiyon Volümü
Mono color hydrolysis probes Or Multi color hydrolysis probes		384	3 – 20 µl
Programlar			
Program ismi		Döngüler	Analiz modu
Pre-inkübasyon		1	Yok
Amplifikasyon		45	Niceleme
Soğutma		1	Yok
Sıcaklık Hedefleri			
Hedef (°C)	Edinme Modu	Bekletme (saat:dk:sn)	Pik değeri
Pre-inkübasyon			
95	Yok	00:05:00	4.8
Amplifikasyon			
95	Yok	00:00:10	4.8
Primer bağımlı	Yok	00:00:30	2.5
		00:00:15	
72	Tek	00:00:01	4.8
Soğutma			
40	Yok	00:00:10	2

Real Time PCR çalışmasından sonra analiz için tüm örneklerin Ct değerleri housekeeping geni olarak kullanılan β -Actin'e fold change 'kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)' yöntemiyle Microsoft Excel 2010 Bilgisayar programı aracılığıyla oranlanarak yaklaşık kat değişimi bulundu. Kat değişim değerleri <1 olanlar azalmış ekspresyon olarak kabul edilirken, kat değişim değerleri >1 olanlar artmış ekspresyon olarak kabul edildi [35].

3.6.İstatistiksel Yöntem

Araştırma verilerimizin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS 25 for Windows (Statistical Package for Social Sciences) istatistik paket programı kullanıldı. Değişkinlerin sıklığı, numerik verilerin ortalamaları ve standart sapmaları bulundu. Ölçümsel değişkenler ortalama±standart sapma (SS) ile, kategorik değişkenler sayı ve yüzde (%) ile sunuldu. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile ölçüldü. İstatistiksel değerlendirilmelerde normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin iki grup arasındaki ortalamalarının değerlendirilmesinde Bağımsız t testi, normal dağılıma uymayanlar ise Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Kategorik değişkenlerin istatistiksel değerlendirmesinde ise Ki-kare testi kullanıldı. Hipotezler çift yönlü olup, $p \leq 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na 2010- 2019 yılları arasında gönderilmiş, “multinodüler guatr, tiroid papiller karsinomu, tiroid medüller karsinomu, tiroid folliküler karsinomu (minimal invaziv-yaygın invaziv), ve anaplastik tiroid karsinomu” tanısı almış 66 adet materyal çalışmaya alındı.

Çalışmamızdaki hastaların prognostik parametreleri, immünohistokimyasal boyanma özellikleri ve moleküler analiz sonuçları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9: Prognostik parametreler, immünohistokimyasal ve moleküler analiz sonuçları

		Frekans	%
Histolojik Alt Tip	PTK	18	27,3
	FTK	11	16,7
	ATK	6	9,1
	MTK	11	16,7
	MNG	20	30,3
Cinsiyet	Kadın	48	72,7
	Erkek	18	27,3
Cerrahi Sınır (CS)	Negatif	10	15,2
	Bitişik	36	54,5
Metastaz	Yok	55	83,3
	Var	11	16,7
ZIP4 İHK	Negatif	25	37,9

	Zayıf pozitif	2	3,0
	Orta şidd. Pozitif	12	18,2
	Güçlü pozitif	27	40,9
ZO-1 İHK	Negatif	14	21,2
	Zayıf pozitif	3	4,5
	Orta şidd. Pozitif	9	13,6
	Güçlü pozitif	40	60,6
Claudin-1 İHK	Negatif	25	37,9
	Zayıf pozitif	0	0
	Orta şidd. Pozitif	16	24,2
	Güçlü pozitif	25	37,9
ZIP4 Gen Eks.	Negatif	46	69,7
	Pozitif	20	30,3
ZO-1 Gen Eks.	Negatif	4	6,1
	Pozitif	62	93,9
Claudin-1 Gen Eks.	Negatif	48	72,7
	Pozitif	18	27,3
Ortalama ±SS			
Yaş	45,97 ± 15,86		

İHK: İmmünohistokimya, PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.1.1. Histolojik Alt Tip

Olguların WHO Sınıflamasına göre 18'i tiroid papiller karsinomu, 11'i tiroid folliküler karsinomu, 6'sı anaplastik tiroid karsinomu, 11'i tiroid medüller karsinomu ve 20'si multinodüler guatr olarak değerlendirildi (Tablo-9).

4.1.2. Cinsiyet

Çalışmamızdaki 66 olgunun 48'i kadın (%72,7) 18'i erkektir (%27,3) (Tablo-9). Cinsiyete göre ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1'in immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonları arasında uygulanan Ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

4.1.3. Yaş

Olguların en genci 18, en yaşlısı 75 yaşında olup, yaş ortalaması $45,97 \pm 15,86$ olarak hesaplanmıştır. Yaşa göre ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1'in immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonları arasında uygulanan Bağımsız t testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

Histolojik alt tipler yaş gruplarıyla değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 10).

Tablo 10: Histolojik alt tipler ile yaş dağılımının Ki-kare testi ile değerlendirilmesi.

Histolojik Alt Tip	Yaş			Total
	≤ 40 yaş	40 - ≤ 60 yaş	> 60 yaş	
PTK	7 – 38,9%	8 – 44,4%	3 – 16,7%	18 - 100,0%
FTK	5 – 45,5%	3 – 27,3%	3 – 27,3%	11 - 100,0%
ATK	1 - 16,7%	1 – 16,7%	4 - 66,7%	6 - 100,0%
MTK	8 – 72,7%	3 – 27,3%	0 - 0%	11 - 100,0%
MNG	3 - 15%	14 - 70%	3 - 15%	20 - 100,0%

P değeri

0,004**

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.1.4. Metastaz Durumu

Çalışmamızda 9 hastada bölgesel lenf nodu metastazı, 2 hastada ise uzak metastaz mevcut olup bu iki grup hasta ‘metastatik grup’ olarak kabul edildi. 55 hastada ise metastaz mevcut değildi. Metastaz durumuna göre ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1’in immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonları arasında uygulanan Ki kare testi ile istatistiksel olarak immünohistokimyasal ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonu metastaz varlığı ile ilişkili bulunurken (Tablo 11), immünohistokimyasal ZO-1 ve tüm moleküler ekspresyonlar ile anlamlı farklılık izlenmedi ($p > 0.05$).

Tablo 11: Metastaz durumu ve immünohistokimyasal ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonlarının Ki kare testi ile yapılan istatistiksel inceleme sonuçları

		İHK ZIP4		İHK Claudin-1	
		Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
Metastaz	Yok	25	30	25	30
	Var	0	11	0	11
P değeri		0,005**		0,005**	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. İHK: İmmünohistokimya

Metastaz durumu ve çalışmamızda yer alan histolojik alt tipler arasında uygulanan Ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (Tablo 12).

Tablo 12: Metastaz durumu ve histolojik alt tipler arasında uygulanan Ki-kare testinin istatistiksel sonuçları.

		Metastaz Durumu	
		Yok	Var
Histolojik Alt Tip	PTK	14	4
	FTK	10	1

ATK	5	1
MTK	6	5
MNG	20	0
P değeri	0,022*	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.1.5. Cerrahi Sınır Durumu

Çalışmamızdaki 66 olgunun tamamı tiroidektomi materyaline ait olup tümörlü 46 vakada tiroid kapsülüne ait cerrahi sınıra uzaklıklar temel alınarak incelendi. Kapsüle 0,1 cm'den daha yakın olan olgular bitişik kabul edildi. Bu değerlendirmeye göre 10 olguda cerrahi sınır negatifken 36 olguda cerrahi sınır pozitif izlendi. Cerrahi sınıra göre ZO-1 ve Claudin-1'in immünohistokimyasal ve moleküler ekspresyonları ve ZIP4 moleküler ekspresyonu arasında uygulanan Ki kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p > 0,05$). ZIP4 immünreaktivitesi ve cerrahi sınır pozitifliği istatistiksel olarak ilişkili olup ($p = 0,037$) güçlü pozitif boyanan 26 hastanın 20'sinde (%76,9) cerrahi sınır bitişik izlendi.

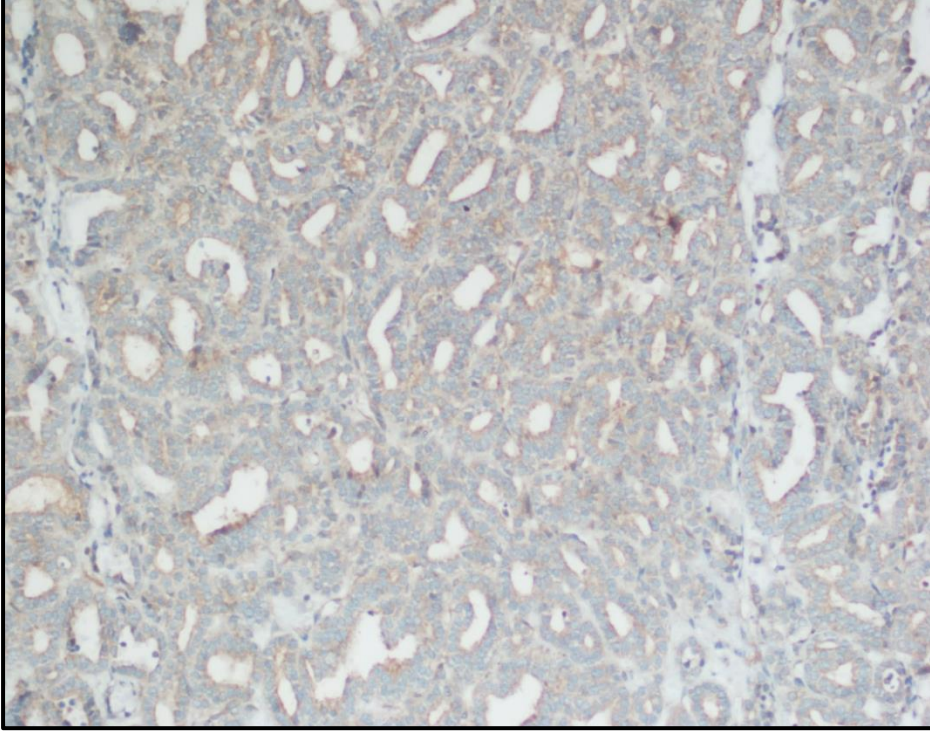
4.2.İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal çalışmada olgularımızda ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1'in ekspresyonu semikantitatif ve subjektif olarak değerlendirildi. Tüm olgularda pozitif boyanan hücre alanlarının yüzdesi (yaygınlığı) 4 puan üzerinden ve boyanma yoğunluğu 3 puan üzerinden skorlandı ve toplam skor elde edildi. Toplam skorda boyanma yoksa negatif, 1 ve 2 puan zayıf pozitif, 3 ve 4 puan orta şiddette pozitif, 5-7 puan ise güçlü pozitif olarak kabul edildi [34].

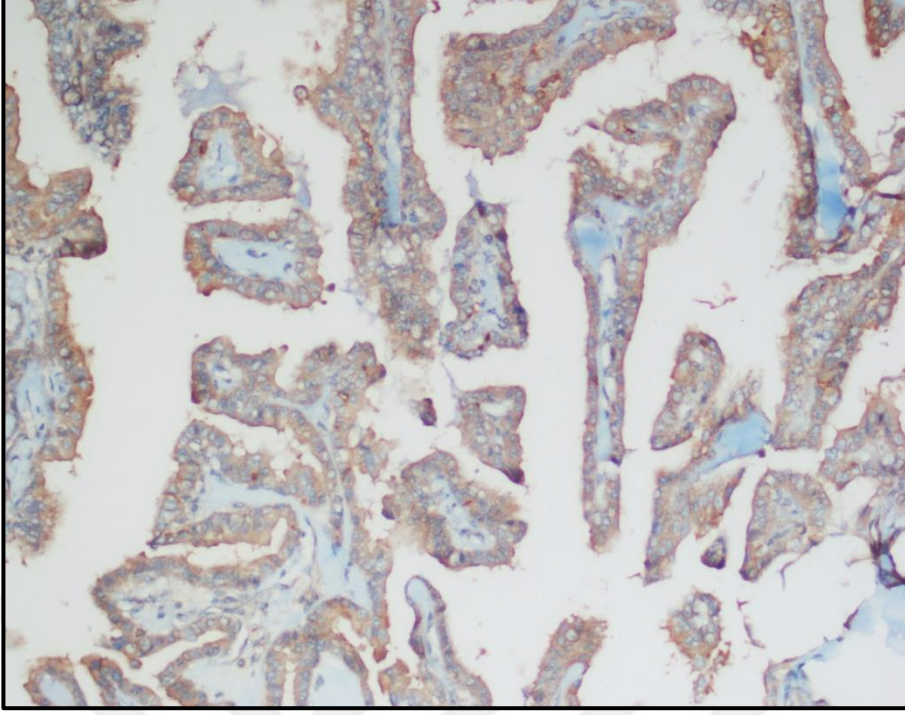
4.2.1. ZIP4 Ekspresyonu

Olgularımızda ZIP4 ekspresyonu incelendiğinde 66 olgunun 2'si zayıf (%3), 12'si orta şiddette (%18,2), 27'si güçlü (%40,9) olmak üzere toplam 41'i pozitif (%62,1), 25'i negatif (%37,9) olarak izlendi (Şekil 13, 14, 15).

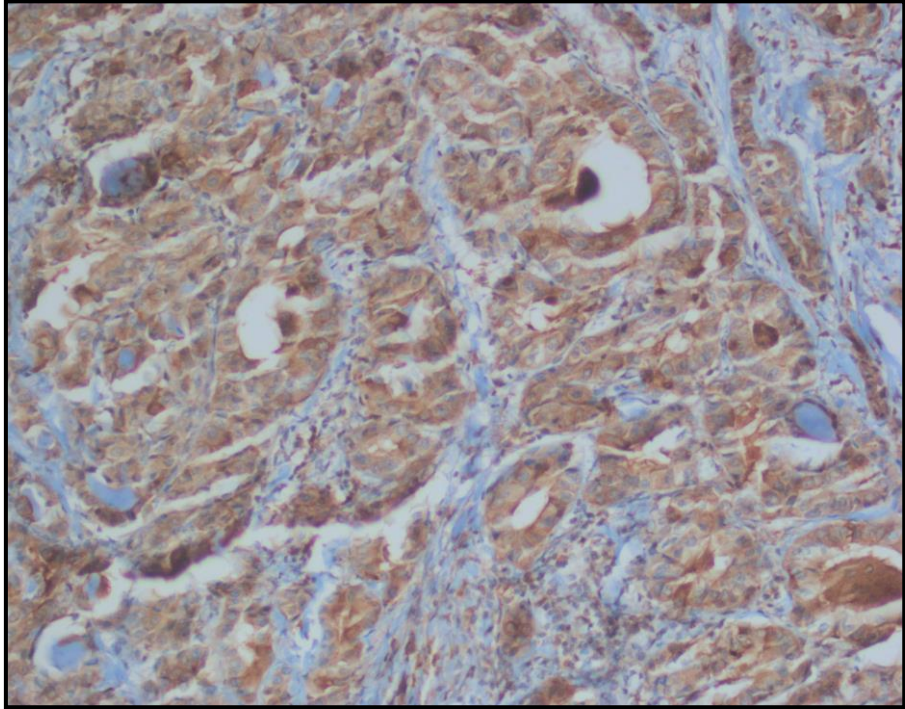
ZIP4 pozitif izlenen 41 olgunun 39'u tümöral olgular olup, immünreaktivite skoru ve histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak oldukça yüksek ilişki bulunmuştur (Tablo 13).



Şekil 13: Foliküler Tiroid Karsinomu tanılı olguya ait zayıf sitoplazmik ZIP4 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya-ZIP4; X200).



Şekil 14: Papiller Tiroid Karsinomu klasik varyant tanılı olguya ait orta şiddette sitoplazmik ZIP4 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya-ZIP4; X200).



Şekil 15: Papiller Tiroid Karsinomu onkositik varyant tanılı olguya ait güçlü, sitoplazmik ZIP4 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya-ZIP4; X200).

Tablo 13: Histolojik alt gruplar ile ZIP4'ün immünreaktivitesinin Ki-kare testi ile değerlendirilmesi.

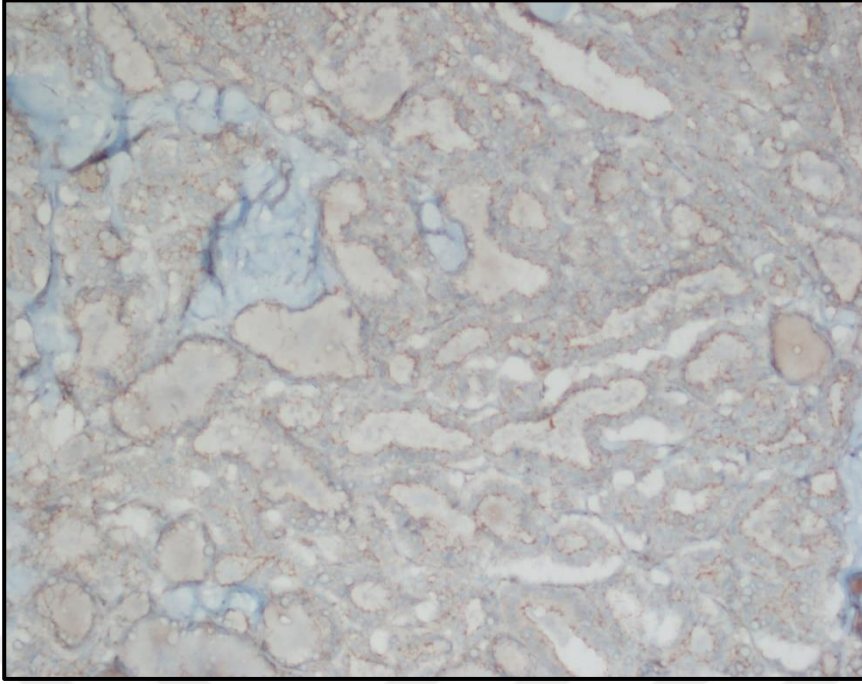
ZIP4 İmmünreaktivite					
Histolojik Alt Tip	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Total
PTK	3 - 16,7%	0 - 0,0%	5 - 27,8%	10 - 55,6%	18-100,0%
FTK	3 - 27,3%	2 - 18,2%	2 - 18,2%	4 - 36,4%	11-100,0%
ATK	1 - 16,7%	0 - 0,0%	1 - 16,7%	4 - 66,7%	6-100,0%
MTK	0 - 0,0%	0 - 0,0%	3 - 27,3%	8 - 72,7%	11-100,0%
MNG	18 - 90,0%	0 - 0,0%	1 - 5,0%	1 - 5,0%	20-100,0%
P değeri	0,000***				

*p≤0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

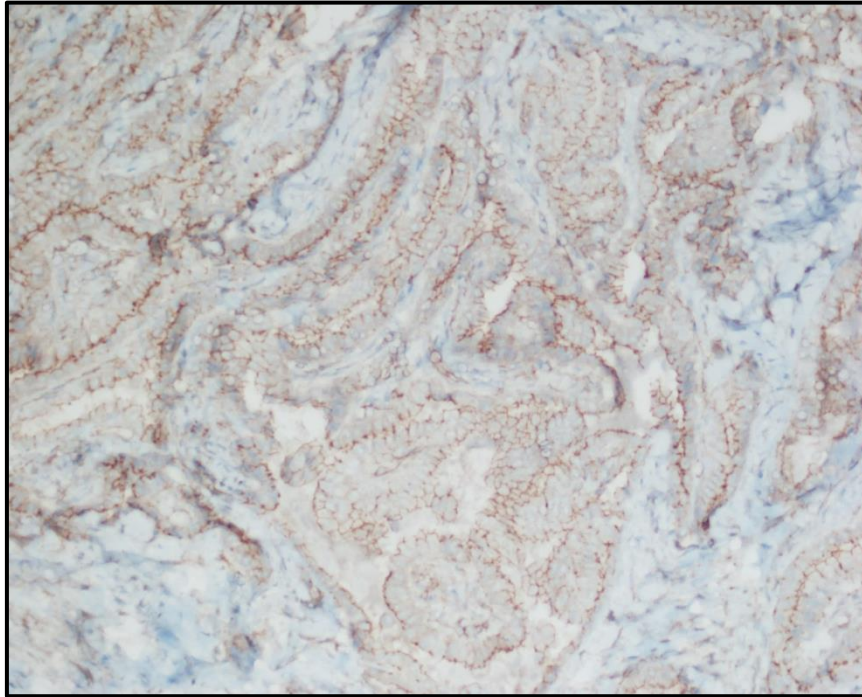
4.2.2. ZO-1 Ekspresyonu

Olgularımızda ZO-1 ekspresyonu incelendiğinde 66 olgunun 3'ü zayıf (%4,5), 9'u orta şiddette (%13,6), 40'ı güçlü (%60,6) olmak üzere toplam 52'si pozitif (%78,8), 14'ü negatif (%21,2) olarak izlendi (Şekil 16, 17, 18).

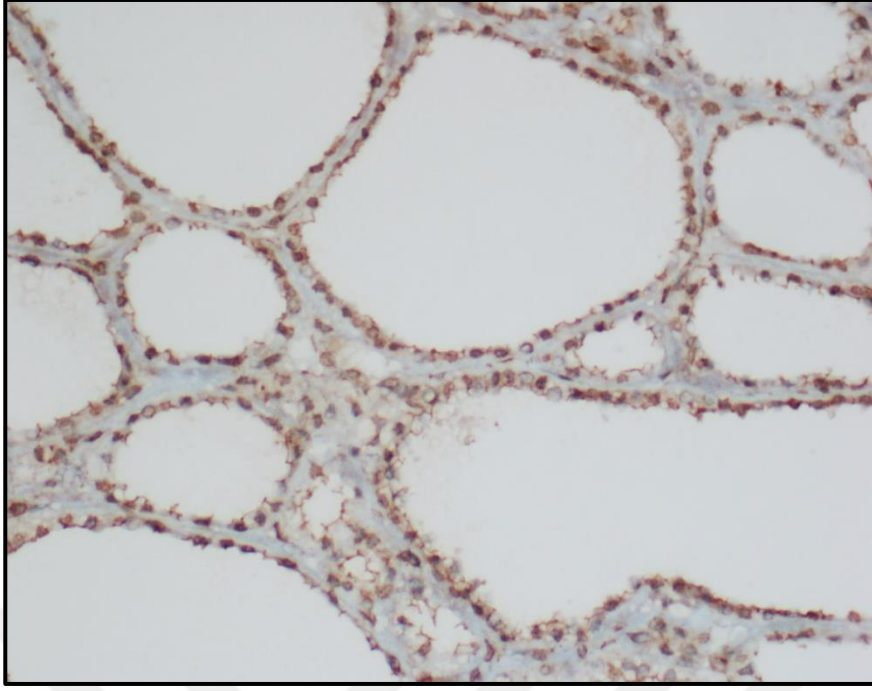
ZO-1'in immünohistokimyasal olarak histolojik alt tiplere göre immünreaktivitesi istatistiksel açıdan önemli farklılık göstermezken (p=0,086), immün pozitifliği histolojik alt tipler ile anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur (Tablo 14).



Şekil 16: Papiller Tiroid Karsinomu foliküler varyant tanılı olguya ait zayıf, membranöz ZO-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- ZO-1; X400).



Şekil 17: Papiller Tiroid Karsinomu foliküler varyant tanılı olguya ait orta şiddette, membranöz ZO-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- ZO-1; X200).



Şekil 18: Multi Nodüler Guatr tanılı olguya ait güçlü, nükleer - membranöz ZO-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- ZO-1; X400).

Tablo 14: Histolojik alt gruplar ile ZO-1'in immün pozitifliğinin Ki-Kare testi ile değerlendirilmesi.

		ZO-1 İHK	
Histolojik Alt Tip		Negatif	Pozitif
	PTK	4 - 22,2%	14 - 77,8%
	FTK	1 - 9,1%	10 - 90,9%
	ATK	2 - 33,3%	4 - 66,7%
	MTK	6 - 54,5%	5 - 45,5%
	MNG	1 - 5,0%	19 - 95,0%
P değeri		0,018*	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. İHK: İmmünohistokimya, PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.2.3. Claudin-1 Ekspresyonu

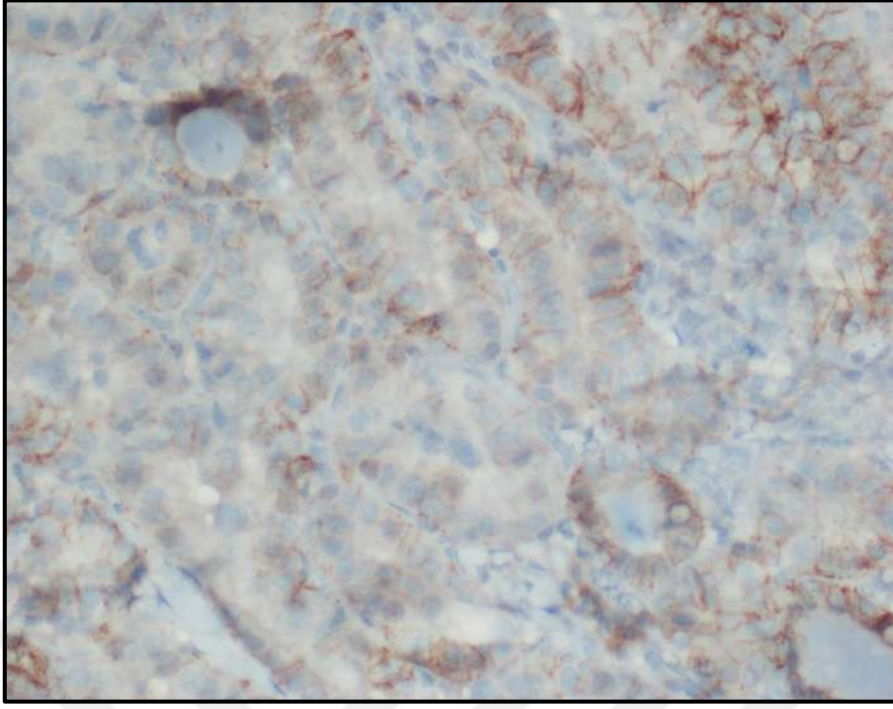
Olgularımızda Claudin-1 ekspresyonu incelendiğinde 66 olgunun 16'sı orta şiddette (%24,2), 25'i güçlü (%37,9) olmak üzere toplam 41'i pozitif (62,1), 25'i negatif (%37,9) olarak izlendi (Şekil 19, 20, 21, 22).

Claudin-1 pozitif izlenen 41 olgunun 39'u tümöral olgular olup, immünreaktivite skoru ve histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak oldukça yüksek ilişki bulunmuştur (Tablo 15).

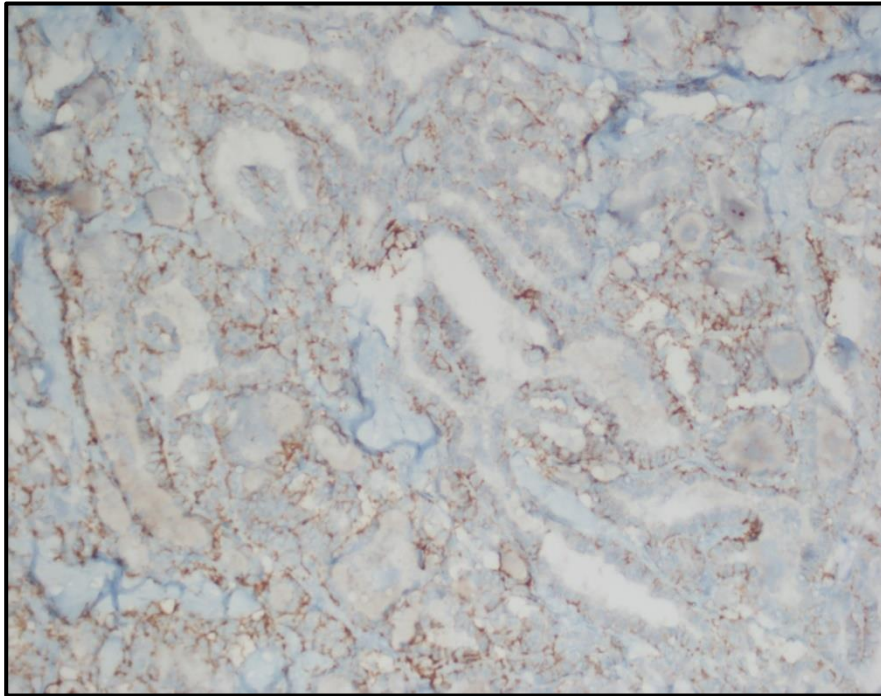
Tablo 15: Histolojik alt gruplar ile Claudin-1'in immünreaktivitesinin Ki-Kare testi ile değerlendirilmesi.

Claudin-1 İmmünreaktivitesi					
Histolojik Alt Tip	Negatif	Zayıf pozitif	Orta şidd. pozitif	Güçlü pozitif	Toplam
PTK	2 - 11,1%	0 - 0,0%	4 - 22,2%	12 - 66,7%	18-100,0%
FTK	4 - 36,4%	0 - 0,0%	2 - 18,2%	5 - 45,5%	11-100,0%
ATK	1 - 16,7%	0 - 0,0%	2 - 33,3%	3 - 50,0%	6-100,0%
MTK	0 - 0,0%	0 - 0,0%	6 - 54,5%	5 - 45,5%	11-100,0%
MNG	18 - 90,0%	0 - 0,0%	2 - 10,0%	0 - 0,0%	20-100,0%
P değeri	0,000***				

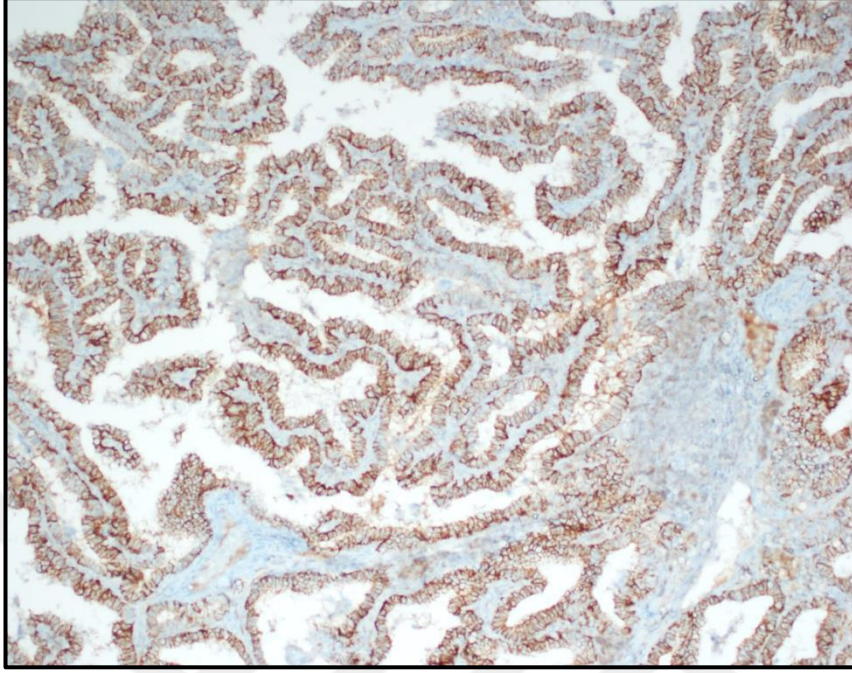
* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.



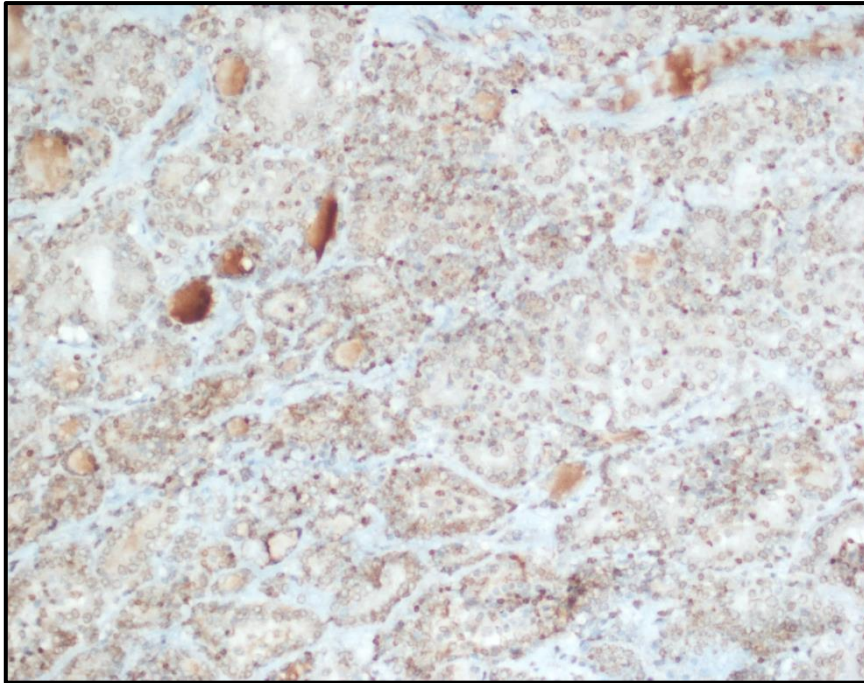
Şekil 19: Papiller Tiroid Karsinomu onkositik varyant tanılı olguya ait zayıf, membranöz Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X400).



Şekil 20: Papiller Tiroid Karsinomu foliküler varyant tanılı olguya ait orta şiddette, membranöz Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X200).



Şekil 21: Papiller Tiroid Karsinomu klasik varyant tanılı olguya ait güçlü, membranöz Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X100).



Şekil 22: Foliküler Tiroid Karsinomu tanılı olguya ait nükleer-granüler Claudin-1 pozitifliği izlenmektedir (İmmünohistokimya- Claudin-1; X200).

Claudin-1 pozitifliği 19 olguda membranöz nitelikte izlenirken, 22 olguda hücre içi (sitoplazmik, nükleer granüler) özellikte izlendi. Bu boyanma paterni ayrı ayrı değerlendirildiğinde histolojik alt tiplere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (Tablo 16).

Tablo 16: Histolojik alt gruplar ile Claudin-1'in boyanma paterninin Ki-kare testi ile değerlendirilmesi.

Claudin-1 Boyanma Paterni				
Histolojik Alt Tip	Negatif	Membranöz	Hücre İçi	Total
PTK	2 - 11,1%	16 – 88,9%	0 – 0%	18 - 100,0%
FTK	4 - 36,4%	2 – 18,2%	5 – 45,5%	11 - 100,0%
ATK	1 - 16,7%	1 – 16,7%	4 – 66,7%	6 - 100,0%
MTK	0 - 0,0%	0 – 27,3%	11 - 100%	11 - 100,0%
MNG	18 - 90,0%	0 - 70%	2 - 10%	20 - 100,0%
P değeri	0,000***			

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.2.4. İmmünohistokimyasal ZIP4, ZO-1, Claudin-1 Korelasyonu

İstatistiksel olarak ZIP4 ve Claudin-1 immünohistokimyasal ekspresyonları arasında anlamlı ilişki bulunurken ($p=0,000***$), ZO-1 ekspresyonu ise hem ZIP4 ($p=0,06$), hem de Claudin-1 ($p=0,541$) ekspresyonu ile ilişkisiz bulunmuştur.

İmmünohistokimyasal ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonları arasındaki ilişki Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17: İmmünohistokimyasal ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonu korelasyonu.

		ZIP4		
		Negatif	Pozitif	Toplam
Claudin-1	Negatif	19 - 76,0%	6 - 24,0%	25 - 100,0%
	Pozitif	6 - 14,6%	35 - 85,4%	41 - 100,0%
P değeri		0,000***		

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.3.Gen Ekspresyon Bulguları

Çalışmamızda 66 olguya ait örnekler, Roche Cobas Z 480 cihazında RT-PCR çalışıldı ve LightCycler 480 Sistemi ile analiz edildi.

Tiroidektomi materyaline ait 66 olgunun parafine gömülü dokularından ilk olarak RNA izole edildi. Olgulara ait RNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçülen konsantrasyon değerleri Tablo 18’de verilmiştir. Daha sonra bu değerler cDNA elde etmede referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 18: Olgulara ait RNA konsantrasyon değerleri.

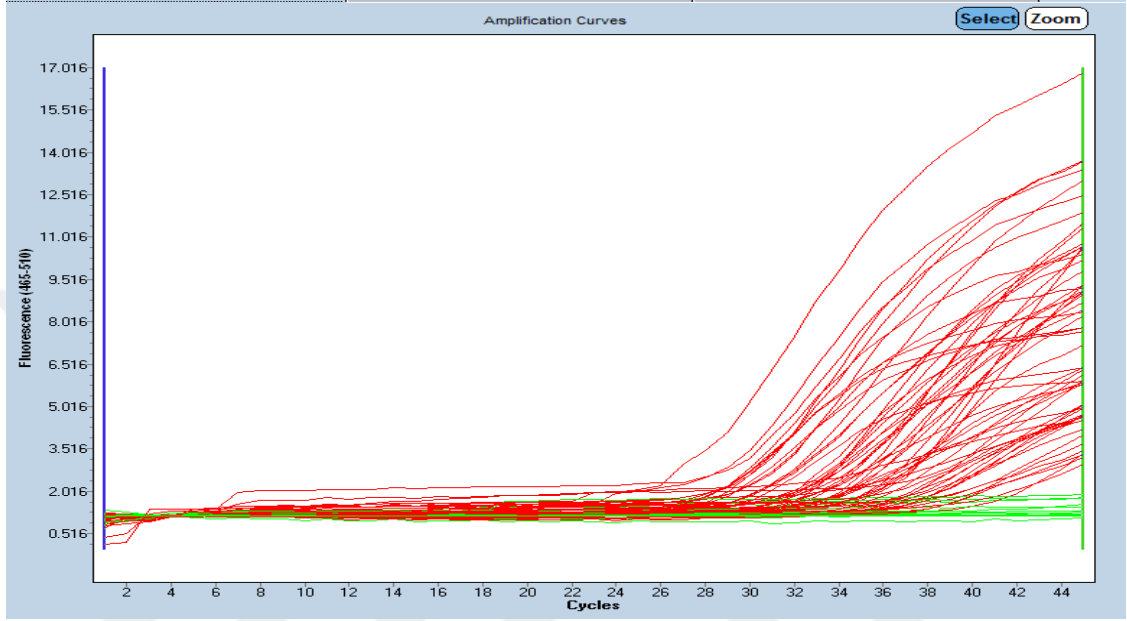
Hasta No	RNA Konsantrasyonu (µg/µl)	Hasta No	RNA Konsantrasyonu (µg/µl)
1.	271,5	34.	283,6
2.	57,94	35.	61,23
3.	198,1	36.	128,8
4.	107	37.	112,4
5.	187,9	38.	150,4
6.	232,9	39.	79,8
7.	85,49	40.	90,12
8.	115,5	41.	66,39
9.	199,9	42.	50,20
10.	148,3	43.	180,8
11.	88,38	44.	78,49
12.	158,0	45.	157,4
13.	305,5	46.	80,86
14.	179,2	47.	77,96
15.	53,72	48.	88,28
16.	92,36	49.	312,9
17.	132,2	50.	91,41
18.	196,1	51.	164,1
19.	244,3	52.	253,9
20.	135,9	53.	212,3
21.	134,7	54.	38,59
22.	66,51	55.	131,2
23.	133,6	56.	78,03
24.	149,7	57.	87,7
25.	147,3	58.	125,6
26.	56,79	59.	237,6
27.	128,1	60.	278,3
28.	188,5	61.	69,34
29.	194,7	62.	253,3
30.	196,1	63.	103,4
31.	145,4	64.	231,1
32.	275,4	65.	216,5
33.	205,5	66.	150,6

Olgulardan RNA izole edilmesini takiben cDNA elde edilerek RT-PCR analizleri yapıldı. Her olgu için β -Actin ile kıyaslanıp ‘kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)’ formülünün uygulanmasında kullanılan Ct değerleri Tablo 19’da yer almaktadır. 26-42 numaralı olgulara ait ısıma eğrileri Şekil 23’te gösterilmiştir

Tablo 19: PCR çalışması sonucu olgulara ait Ct değerleri.

Hasta No	Aktin	ZIP4	ZO-1	Cladn-1	Hasta No	Aktin	ZIP4	ZO-1	Cladn-1
1.	34,8	34,08	28,45	32,92	34.	30,98	34,93	28,99	29,93
2.	32,94	33,49	29,28	35,27	35.	39,06	---	35,79	---
3.	35,44	35,79	33,42	38,95	36.	33,39	34,66	29,91	40,48
4.	41,49	32,67	27,65	31,85	37.	33,83	34,39	26,7	38,82
5.	38,78	33,66	28,07	35,32	38.	28,97	32,64	25,97	35,53
6.	42,11	34,59	29,37	14,48	39.	37,96	40,95	33,8	---
7.	37,94	---	30,25	35,75	40.	32,75	36,92	17,53	40,98
8.	40,48	27,81	34,13	36,41	41.	32,97	34,81	29,21	37,1
9.	39,55	32,93	27,79	---	42.	34,87	36,5	30,45	---
10.	35,82	36,25	36,71	36,71	43.	41,07	41,01	35,37	---
11.	42,05	36,96	---	36,28	44.	35,6	35,56	31,71	41,94
12.	37,46	38,61	32,65	14,54	45.	38,54	39,74	32,56	---
13.	36,81	35,43	---	35,11	46.	40,78	41,33	32,93	---
14.	36,37	37,75	29,95	33,5	47.	36,26	36,42	31,64	---
15.	38,45	35,35	29,81	11,02	48.	36,25	38	31,97	---
16.	39,57	40,06	32,22	37,56	49.	33,67	36,94	32,85	---
17.	41,57	40,68	31,54	37,54	50.	40,24	40,89	33,67	---
18.	39,22	37,29	28,77	33,48	51.	34,3	34,41	30,88	40,99
19.	42,19	41,71	31,89	30,9	52.	38,89	39,63	34,56	---
20.	41,2	38,99	28,66	36,89	53.	35,71	36,73	32,01	---
21.	41,21	---	32,29	---	54.	40,41	40,33	33,5	---
22.	37,05	36,41	29,3	36,64	55.	37,61	37,11	32,36	---
23.	31,98	33,53	27,93	33,51	56.	33,86	35,45	32,08	42,85
24.	38,39	---	31,29	39,25	57.	32,43	34,6	31,35	40,34
25.	38,06	37,16	31,76	39,54	58.	35,61	35,86	31,37	---
26.	34,73	35,9	31,32	39,26	59.	33,27	36,16	31	40,48
27.	36,25	38,72	32,7	42,61	60.	35,76	38,84	31,75	---
28.	32,45	35,17	29,28	37,66	61.	27,47	30,72	27,63	35,3
29.	30,86	33,77	29,67	38,16	62.	27,45	29,79	27,36	35,14
30.	35,33	39	32,13	40,75	63.	32,32	32,95	28,71	39,29

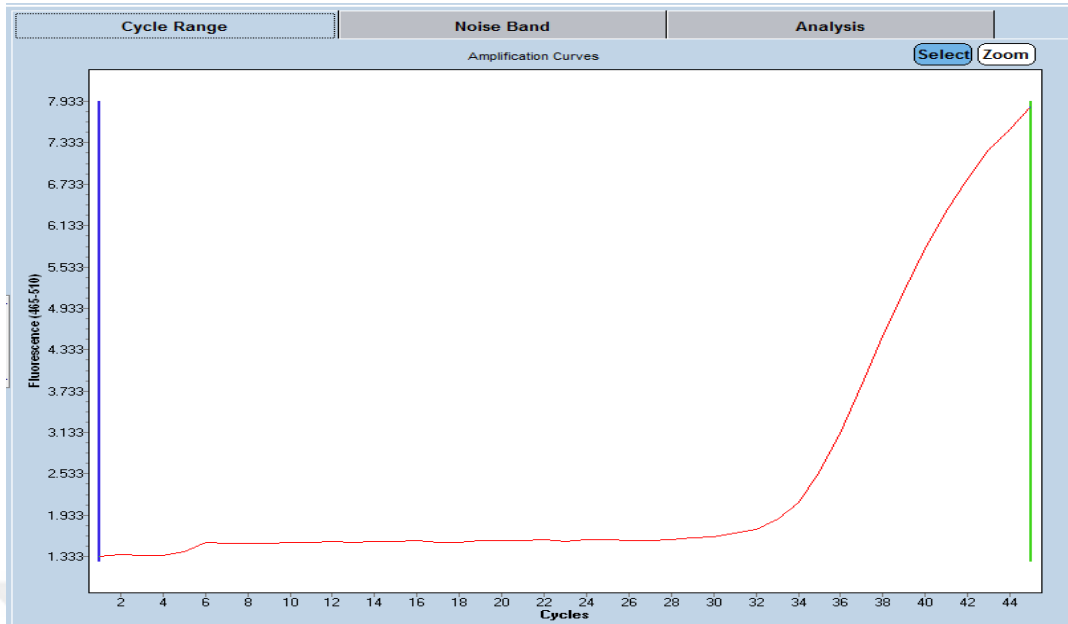
31.	33,94	40,03	29,87	---	64.	34,89	35,28	27,56	41,99
32.	42,52	---	36,1	---	65.	33,46	34,26	30,24	---
33.	30,83	33,68	28,96	38,31	66.	32,97	30,84	30,24	9,8



Şekil 23: 26-42 numaralı olgulara ait ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 gen bölgeleri ışına eğrileri. Kırmızı renkte pik yapan eğriler ekspresyon gösteren olguları, yeşil renkte eğriler negatif olguları temsil etmektedir

4.3.1. ZIP4 Gen Ekspresyonu

PCR ile elde edilen ZIP4 gen bölgesine ait ışına pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 66 olgunun 20'sinde (%30,3) gen ekspresyonu saptandı. 6 numaralı olguya ait ZIP4 gen ışına eğrisi Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 24: 6 numaralı olguya ait ZIP4 gen bölgesi ışıma eğrisi.

ZIP4 gen ekspresyonu anlamlı düzeyde ölçülen 20 olgudan 11'i PTK, 5'i FTK, 2'si MTK ve 2'si MNG tanılıdır. Histolojik alt tipler ile ZIP4 gen ekspresyonu arasında Ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Ayrıca immünohistokimyasal ZIP4 ekspresyonu ve moleküler ZIP4 ekspresyonu arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlıdır. Tablo 20 ve Tablo 21'de bu ilişkiler gösterilmiştir.

Tablo 20: Histolojik alt tiplere göre ZIP4 gen ekspresyonu.

		Moleküler ZIP4	
		Negatif	Pozitif
Histolojik Alt Tip	PTK	7 - 38,9%	11 - 61,1%
	FTK	6 - 54,5%	5 - 45,5%
	ATK	6 - 100%	0 - 0%
	MTK	9 - 81,8%	2 - 18,2%
	MNG	18 - 90%	2 - 10%
P değeri		0,002**	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

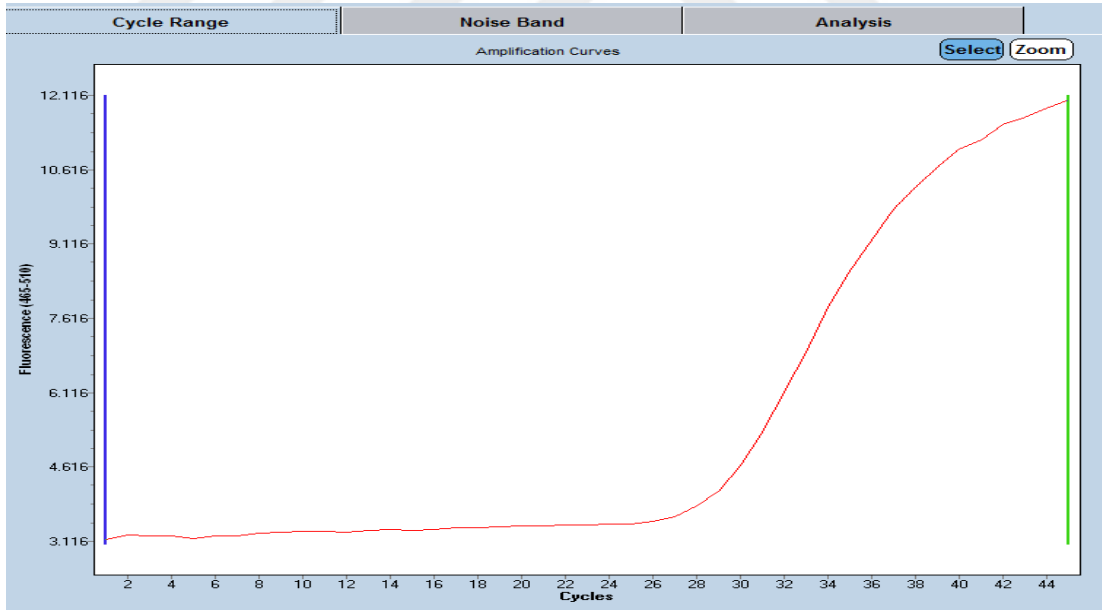
Tablo 21: İmmünohistokimyasal ZIP4 ile moleküler ZIP4 ekspresyonunun değerlendirilmesi.

		Moleküler ZIP4		
		Negatif	Pozitif	Toplam
ZIP4 İHK	Negatif	22 - 88,0%	3 - 12,0%	25 - 100,0%
	Pozitif	24 - 58,5%	17 - 41,5%	41 - 100,0%
P değeri		0,014*		

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.3.2. ZO-1 Gen Ekspresyonu

PCR ile elde edilen ZO-1 gen bölgesine ait ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 66 olgunun 62'sinde (%93,9) gen ekspresyonu saptandı. 44 numaralı olguya ait ZO-1 gen ışıma eğrisi Şekil 25'te gösterilmiştir.



Şekil 25: 44 numaralı olguya ait ZO-1 gen bölgesi ışıma eğrisi.

ZO-1 gen ekspresyonu anlamlı düzeyde ölçülen 62 olgudan 15'i PTK, 11'i FTK, 6'sı ATK, 11'i MTK ve 19'u MNG tanılıdır.

Histolojik alt tipler ile ZO-1 gen ekspresyonu arasında Ki-kare testi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0,248$, Tablo 22). Ayrıca immünohistokimyasal ZO-1 ekspresyonu ve moleküler ZO-1 ekspresyonu arasındaki ilişkide istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir ($p=0,571$).

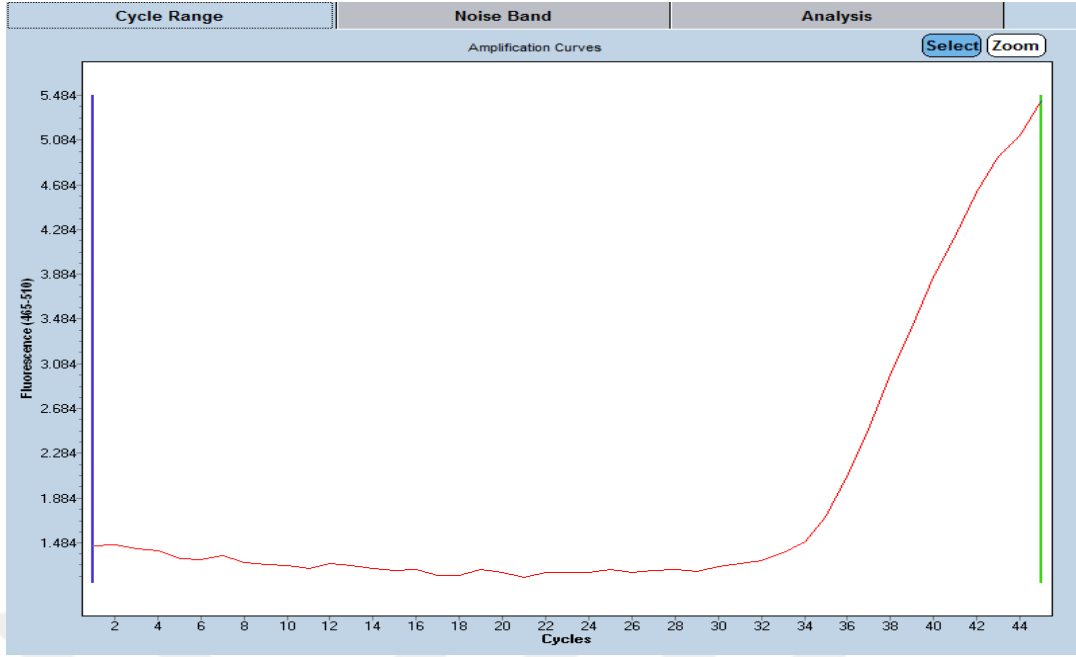
Tablo 22: Histolojik alt tiplere göre ZO-1 gen ekspresyonu.

		Moleküler ZO-1	
		Negatif	Pozitif
Histolojik Alt Tip	PTK	3 - 16,7%	15 - 83,3%
	FTK	0 - 0%	11 - 100%
	ATK	0 - 0%	6 - 100%
	MTK	0 - 0%	11 - 100%
	MNG	1 - 5,0%	19 - 95,0%
P değeri		0,248	

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.3.3. Claudin-1 Gen Ekspresyonu

PCR ile elde edilen Claudin-1 gen bölgesine ait ışıma pik değerleri ve eğri grafikleri değerlendirildiğinde 66 olgunun 18'inde (%27,3) gen ekspresyonu saptandı. 22 numaralı olguya ait Claudin-1 gen ışıma eğrisi Şekil 26'da gösterilmiştir.



Şekil 26: 22 numaralı olguya ait Claudin-1 gen bölgesi ışıma eğrisi.

Claudin-1 gen ekspresyonu anlamlı düzeyde ölçülen 18 olgudan 14'ü PTK, 3'ü FTK, 1'i ATK tanılı iken, MTK ve MNG tanılı olgularda Claudin-1 gen ekspresyonu izlenmemiştir.

Histolojik alt tipler ile Claudin-1 gen ekspresyonu arasında Ki-kare testi ile istatistiksel olarak oldukça yüksek ilişki bulunmuştur ($p=0,000^{***}$, Tablo 23). Ancak immünohistokimyasal Claudin-1 ekspresyonu ve moleküler Claudin-1 ekspresyonu arasındaki ilişkide istatistiksel olarak anlamlılık izlenmemiştir ($p=0,156$).

Tablo 23: Histolojik alt tiplere göre Claudin-1 gen ekspresyonu.

Histolojik Alt Tip		Moleküler Claudin-1	
		Negatif	Pozitif
Histolojik Alt Tip	PTK	4 – 22,2%	14 – 77,8%
	FTK	8 – 72,7%	3 – 27,3%
	ATK	5 – 83,3%	1 – 16,7%
	MTK	11 - 100%	0 - 0%
	MNG	20 - 100%	0 - 0%

P değeri

0,000***

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. PTK: Papiller Tiroid Karsinomu, FTK: Foliküler Tiroid Karsinomu, ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu, MTK: Medüller Tiroid Karsinomu, MNG: Multi Nodüler Guatr.

4.3.4. Real-Time PCR ile ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 Gen Ekspresyon

Korelasyonu

İstatistiksel olarak ZIP4 ve Claudin-1 gen ekspresyonları birbiri ile anlamlı düzeyde ilişkili izlenmiştir ($p=0,000***$, Tablo 22). Ancak ZO-1 gen ekspresyonu hem ZIP4 ($p=0,574$) hem de Claudin-1 ($p=0,298$) gen ekspresyonu ile istatistiksel olarak ilişkisiz bulunmuştur.

Tablo 24: ZIP4 ve Claudin-1 gen ekspresyonu karşılaştırılması.

		Moleküler Claudin-1		
		Negatif	Pozitif	Toplam
Moleküler ZIP4	Negatif	41 - 88,0%	5 - 12,0%	46 - 100,0%
	Pozitif	7 - 58,5%	13 - 41,5%	20 - 100,0%
P değeri		0,000***		

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tiroid, trakeanın önünde bulunan önemli bir endokrin organdır. Normalde fizik muayenede deri yoluyla palpe edilemeyen kanat şeklinde 2 lob ve bunları birbirine bağlayan istmustan oluşur. Tiroid, kalp atış hızını, kan basıncını, vücut ısısını ve bazal metabolik hızı kontrol eden hormonların sentezinde rol alır[36].

Son otuz yılda, tiroid kanseri teşhisi konan kişilerin sayısında dramatik bir artış olmuştur. 2019'da, Amerika Birleşik Devletleri'nde tiroid kanseri insidansı 52.070 vaka olarak bildirilmiş olup, kadınlar arasında en yaygın görülen 6. kanserdir. Papiller tiroid karsinomu (PTK) ve foliküler tiroid karsinomu (FTK) birlikte "iyi diferansiye tiroid karsinomları" olarak bilinir ve tiroid malignitelerinin yaklaşık %90'ını oluşturur [37].

İyi diferansiye PTK yönetimi büyük oranda rezeksiyon ve radyoaktif iyot tedavisinden oluşur ve %98,2'lik mükemmel bir 5 yıllık genel sağkalım mevcuttur. İyi diferansiye tiroid karsinomları yüksek sağkalım oranı ile uzun süre sessiz kalabilmesine rağmen, lenf nodu metastazları ve nüks oranları sırasıyla yaklaşık %50 ve %20'dir [38]. Servikal lenf nodu metastazları, lokal rekürrens ve artmış morbidite için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilir[39]. BRAFV600E durumu, iyi diferansiye tiroid karsinomu olan hastalarda genetik ve prognostik bir belirteç olarak önerilmekle birlikte, çelişkili sonuçların da yayınlanmış olması güvenilir yeni biyobelirteçlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir[37, 40]. Günümüzde, eşlik eden metastatik lenfadenopatiyi veya bu hastalığın nüksünü öngörmek için herhangi bir gen paneli mevcut değildir. Bu nedenle tiroid karsinomlu hastalarda prognostik değer için yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Biz de çalışmamızın sonuçları itibarıyla tiroid karsinomlarında prognostik açıdan önemli veriler sağlamak ve tedavi sürecine katkıda bulunması amacıyla ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 ekspresyonlarını araştırdık.

Çalışmamızda tiroidektomi yapılmış ve çeşitli tümörler yanı sıra MNG tanısı almış 66 olgudan hazırlanan parafin blok kesitlerinde immünohistokimyasal ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 ekspresyonu ile, olgulara ait dokudan elde edilen komplementer DNA'dan Real-Time PCR yöntemiyle ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1 gen ekspresyonunu

ve bunların klinokopatolojik ve prognostik parametreler açısından önemini değerlendirdik.

Literatürde tiroid karsinomlarının kadınlarda erkeklere göre 3 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir [41]. Çalışmamızda yer alan 46 tümör olgusunun 34'ünü (%73.9) kadınlar oluşturmaktadır. Bu durum literatür ile uyumludur. İyi diferansiye tiroid karsinomları olarak sınıflanan PTK ve FTK'da kadın baskınlığı ön planda iken daha agresif tümörlerde dağılımın birbirine yaklaştığı bildirilmiştir [42]. PTK ve FTK olgularımızda K/E oranı 2,8 iken ATK ve MTK olgularımızda bu oran 1,4 izlenmiş ve literatür bilgisi ile uyumlu bulunmuştur.

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre PTK için ortalama görülme yaşı 50, FTK için 70-79 yaş arası, ATK için aralık belirtilmeksizin ileri yaşlar ve MTK için beş ve altıncı dekatlar belirtilmiştir [17, 18, 20, 21]. Ayrıca herediter olguların görülmesinin MTK yaş ortalamasını aşağı çekeceği bildirilmiştir. Çalışmamızda PTK için 46, FTK için 42, ATK için 62 ve MTK için 34 yaş ortalaması mevcuttur. PTK ve ATK için bulgularımız literatürle uyumludur. MTK tanılı 2 hastamızın MEN-2a sendromlu olup yaş ortalamasını düşürmesi ve FTK olgularımızın tabloyu yeterince yansıtacak sayıda olmaması diğer verilerin farklı çıkmasını açıklayabilir.

Cabanillas ve ark. [43] çalışmalarında belirgin nodül ile başvuru anında MTK'da %70 oranında lenf nodu metastazı bulunduğunu belirtmiştir. Brassard ve ark. [38] 715 hasta üzerinde yaptıkları geniş çaplı araştırmada ilk tanı anında ve sonraki nükslerle birlikte PTK'da yaklaşık %50 oranında lenf nodu metastazı bildirmişlerdir. Bizim olgularımız arasında MTK'da %45,5, PTK'da %22,5 oranında lenf nodu metastazı olup hastaların uzun süreli izlemleri bu sonuçları arttırabilir. Ayrıca bölge hastanesi olarak hizmet veren hastanemizde temel tedavilerini alan hastalar takip ve sonraki izlemler için çevre illerdeki hastanelere başvurabilmektedirler.

Lang ve ark. [44] çalışmalarında PTK'ya ait tiroidektomi materyallerinde mikroskopik olarak cerrahi sınır pozitifliğinin rezeksiyon sonrası tümörsüz sağ kalım için bağımsız bir faktör olmadığını ancak posterior cerrahi sınır pozitifliğinin nüksü

artırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda cerrahi sınır pozitifliği, metastaz ve histolojik alt tiplerle anlamlı bir ilişki göstermemiştir.

ZIP4'ün immünohistokimyasal ekspresyonunu tiroid dokusunda araştıran bir çalışma mevcut değildir bu açıdan çalışmamız özgün nitelik kazanmaktadır. Literatürde diğer dokulara ait tümörlerde ZIP4 ekspresyonunu araştıran çalışmalar mevcuttur. Fan ve ark. [24] çalışmalarında over karsinomlarında ZIP4 ekspresyonunu araştırmışlardır. Yüksek dereceli seröz over tümörlerinin %75'i güçlü ZIP4 ekspresyonu gösterirken, düşük dereceli seröz over karsinomlarında %25 oranında güçlü ZIP4 ekspresyonu izlenmiştir. Aynı araştırmada yer alan PCR çalışmasında epitelyal over karsinomlarını temsil eden EOC hücre dizilerinde agresif tümör davranışına sahip ID8-P1 serisinde agresif olmayan ID8-P0 serisine oranla 183 kat fazla ZIP4 moleküler ekspresyon seviyesi raporlamışlardır. Endometrioid karsinom, seröz borderline tümör ve kontrol dokularının hiçbirinde ise güçlü ZIP4 ekspresyonu izlememişlerdir.

Ishida ve ark. [45] oral skuamöz hücreli karsinom vakalarını normal dokularla karşılaştırdıkları çalışmada immünohistokimyasal olarak belirledikleri skora göre kanserli dokuların normal dokulara oranla 4,2 kat daha yüksek ZIP4 eksprese ettiklerini bulmuşlardır. Ayrıca tümör boyutunun ZIP4 ekspresyonu ile korelasyonunu da bildirmişlerdir. Aynı çalışmada RT-PCR yöntemiyle oral skuamöz hücreli karsinom kökenli hücre dizilerinde ZIP4 oranını normal oral keratinositlere oranla anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.

Chen ve ark. [6] prostat kanserli ve benign prostat hiperplazili dokularda yaptıkları çalışmada RT-PCR ve Western blot yöntemleriyle ZIP4 ekspresyonunu insan dokularında ve hücre dizilerinde araştırmışlardır. Önceki çalışmaların aksine, ZIP4 ekspresyonunun her iki yöntemle de prostat kanserli dokularda azaldığını (yaklaşık 49 kat) bulmuşlardır. Bu çalışmada ZIP4'ün prostat kanserinde metastazı azaltıcı yönde etkilediği ancak prostat kanseri evresi üzerinde etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmanın diğer çalışmaların aksine sonuçlanmasının nedenini sağlıklı prostat hücrelerinde fizyolojik olarak diğer yumuşak dokuların yaklaşık 10 katı çinko içermesi ve kanser sürecinde hücre içi çinko seviyesinin %70 oranında

azalması ile açıklamışlardır [46, 47]. Bu da ZIP4'ün çinko seviyesini değiştirerek dokulara özgü proliferatif etki gösterdiği fikrini desteklemektedir.

Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak 46 tümörlü vakanın 39'u ZIP4 pozitifliği sergiledi. MNG tanılı 20 olgunun sadece 2 tanesinde ZIP4 pozitifliği izledik. Histolojik alt tiplere göre ZIP4 ekspresyonu anlamlı derecede ilişkilidir. MTK olgularının tamamı ZIP4 eksprese ederken (%100; n:11) onu sırasıyla PTK (%83,3; n:18), ATK (%83,3; n:6), ve FTK (%72,7; n:11) izlemiştir.

Çalışmamızda ZIP4 ekspresyonunu İHK yanı sıra RT-PCR ile değerlendirdik. 66 olgumuz arasında 20 olguda RT-PCR ile ZIP4 gen ekspresyonu tespit ettik. Pozitif 20 olgunun 18'i tümöral olgular olup 2 MNG olgusunda ZIP4 ekspresyonu izledik. PTK tanılı 18 olgunun 11'i (%61,1) ve 11 FTK olgusunun 5'i (%45,5) moleküler olarak ZIP4 ekspresyonu gösterdi. ZIP4 ekspresyonu için moleküler ve İHK olarak yapılan çalışmada her iki yöntem birbiriyle uyumlu sonuçlanmıştır ($p=0,014$). Ancak pozitif 39 İHK olgusuna karşın moleküler olarak 20 pozitif olgunun izlenmesinin rutin doku takip işlemleri esnasında kimyasallara maruz kalan dokunun hassas bir yapıya sahip mRNA'sının degradasyona uğramış olmasına bağlı olabileceğini düşündük.

Tüm olgular ZIP4 pozitifliği ve metastaz açısından incelendiğinde metastaz varlığı ve immünohistokimyasal ZIP4 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,05$). Metastatik olan 11 olgunun tamamı ZIP4 eksprese ederken (%100) metastaz izlenmeyen olgularda ZIP4 ekspresyon oranı %54,5'tur. ZIP4 ekspresyonu İHK boyanma sonuçlarıyla bizlere tiroid tümörlerinde kötü prognoz ve metastaza yatkınlığı göstermesi bakımından önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamız literatürde çoğu farklı organlarda ZIP4'ün ortaya konan etkisi ile uyumlu sonuçlar göstermiştir. Literatürde tümör boyutu ile ZIP4'ün ilişkili olduğu çalışmalar [45] mevcut olsa da bizim çalışmamızda tümör boyutu ile ZIP4 ekspresyonu ilişkili bulunmamıştır.

Çinkonun hücre proliferasyonu üzerine etkilerinden dolayı organlara spesifik etkilerinin olacağı bilinmektedir [45]. ZIP4 gibi çinko kanalları da hücre içi çinko seviyesini etkilemekle proliferasyon, invazyon ve hücre göçü gibi tümör biyolojisi

üzerinde ciddi etkiler gösterebilmektedir [22]. Literatürde gliomlar, over karsinomları, pankreas karsinomları gibi çeşitli tümörlerde metastaza yatkınlığı arttırdığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu ortaya konan ZIP4 prostat dokusunda diğer tümörlerden farklı bir davranış paterni ortaya koymuştur [6]. Literatürde tiroid dokusunda bu konuda çalışmanın olmaması çalışmamızın önemini arttırmakta ve tiroid dokusunda bu yönde yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

ZO-1 belirtecinin tiroid dokusunda araştırıldığı çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Fluge ve ark. [48] papiller tiroid karsinomunda ZO-1 ekspresyonunu normal tiroid dokusuyla karşılaştırdıkları çalışmada normal tiroid dokusunda apikal ve zayıf ağırlıklı boyanma paterninin papiller tiroid karsinomunda daha şiddetli, daha yüksek oranda ve patern olarak hücre içi lokalizasyonunda gerçekleştiğini raporlamışlardır.

Rebuffat ve ark. [49] tiroide tümör dışı dokularda ZO-1 immünohistokimyasal ekspresyonunu araştırmışlardır. Çalışmalarında Graves ve Hashimoto tiroititlerinde ZO-1 ekspresyonunu karşılaştırmış ve Graves hastalarında Hashimoto tiroititi hastalarına oranla daha yüksek ZO-1 ekspresyonu izlemişlerdir. Bu durumu Graves hastalığında daha sıkı folikül epitel yapısının olmasına ve Hashimoto tiroititinde folikül epitelinin dağılmasına bağlamışlardır.

Bai ve ark. [50] medüller tiroid karsinomuna ait hücre dizilerinde hücrelere tümör agresifliğini ve invazivliğini azaltan miR-376c-3p transferi sonucunda N-cadherin ve Vimentin ekspresyonunda azalma E-Cadherin ve ZO-1 ekspresyonunda artma raporlamışlardır. Böylece ZO-1'in tümör invazivliğine karşı koruyucu etkisini ortaya koymuşlardır.

Tiroid dışı organlarda da ZO-1 ekspresyonunun tümör gelişimi açısından araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Du ve ark. [51] endometrial karsinomda miktarı artan miR-103 seviyesinin ZO-1'in azalmış ekspresyonu ile korelasyonunu hücre dizilerinde RT-PCR ve western blot yöntemiyle ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda endometrial karsinom hücrelerinde tümörsüz eşdeğerlerine göre ZO-1 ekspresyonunun anlamlı bir düşüş gösterdiğini raporlamışlardır.

Ni ve ark. [31] küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda hem RT-PCR hem de immünohistokimya ile ZO-1 ekspresyonunu araştırmışlardır. Tümöral dokularda

yüksek seviyede ZO-1 ekspresyonu %69 oranında, çevre akciğer dokusunda yüksek seviyede ZO-1 ekspresyonu %83 oranında izlenmişler ve düşük ZO-1 seviyesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Babkair ve ark. [8] oral mukozaya ait normal dokular ve skuamöz hücreli karsinomlarda immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemleriyle ZO-1 ve Claudin-1 ekspresyonunu araştırmışlardır. Normal doku hücrelerinde Claudin-1 ekspresyonu izlemeyen ZO-1 ekspresyonunu membranöz ve sitoplazmik olarak izlemişlerdir. Tümörlü örneklerde ise tamamına yakını membranöz Claudin-1 pozitifliği gösterirken, ZO-1 ekspresyonu hem membranöz hem de nükleer patern özelliği göstermiştir.

Liu ve ark. [52] meme kanserinde metastaz sürecinde etkili olduğu bulunan DCLK1 geninin ZO-1 gibi epitelyal hücre belirteçlerini azalttığını ve Vimentin ve ZEB1 gibi mezenkimal markırların artan ekspresyonuna yol açtığını tespit etmişlerdir. Hücre dizilerinde moleküler yöntemlerle yapılan çalışma kanser invazivliği artınca ZO-1 ekspresyonunun azaldığını ortaya koymuştur.

Bizim çalışmamızda 66 olgumuzun 52'si immünohistokimyasal ZO-1 ekspresyonu göstermiştir. Tümöral olgularımızdan 46 olgunun 33'ü (%71,7) pozitifken, MNG olgularımızdan 20 olgunun 19'u (%95) pozitiflik göstermiştir. Tümöral olgular arasında en yüksek pozitiflik oranı %90,9 ile FTK olgularında izlenmiştir. Histolojik alt tipler ile ZO-1 immünohistokimyasal boyanması arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,018$).

Çalışmamızda ZO-1 ekspresyonunu İHK yanı sıra RT-PCR ile değerlendirdik. Olgularımız arasında 43'ü tümöral olgu, 19'u MNG olgusu olmak üzere 62 olguda PCR ile ZO-1 gen ekspresyonu tespit ettik. Çalışmamızda yer alan histolojik alt tipler ile RT-PCR sonuçları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. ZO-1 açısından İHK ve RT-PCR çalışmaları arasında da anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0,571$). ZO-1 gibi sıkı bağlantı proteinleri folikül epiteli yapısında normal dokularda da bulunabilmektedir. MNG tanılı olgularımızda yüksek oranda İHK ve RT-PCR pozitifliği bizlere ZO-1'in neoplastik süreçlerin dışında da eksprese edildiğini düşündürmektedir. İmmünohistokimyasal olarak 52 pozitif olguya karşın

RT-PCR ile 63 olguda pozitiflik görülmesinin nedeni olarak RT-PCR'ın İHK testine göre daha duyarlı ölçüm yapmasının etkili olduğunu düşündük.

Tüm olgular ZO-1 pozitifliği ve metastaz açısından incelendiğinde metastaz varlığı ile immünohistokimyasal ve moleküler ZO-1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,688$). Literatürde de belirtildiği gibi tiroid dokusunda tiroidit benzeri tümör dışı olaylar da ZO-1 ekspresyonunu etkilemektedir [49]. Bizim olgularımızda ZO-1 ekspresyonunun aralarında tirodit benzeri klinik durumların da olduğu çevresel faktörlerden etkilendiğini ve bu nedenle metastaz ve prognoz ile ilgili durumu net olarak yansıtmadığını düşünmekteyiz.

Hem tümörlü hem de tümörsüz dokularda yüksek oranda ekspresyonunu gösterdiğimiz ZO-1 proteininin tiroid tümörlerinde başka organ tümörlerinde olduğu gibi tanısız ya da prognostik parametreleri yansıtacak bir belirteç için uygun olmadığını düşünmekteyiz.

Literatürde Claudin-1 belirtecinin tiroid dokusunda araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır. Zwanziger ve ark. [9] foliküler tiroid karsinomuna ait hasta dokularında ve hücre dizilerinde yaptıkları çalışmada foliküler tiroid tümörlerinde artmış hücre içi Claudin-1 ekspresyonu ve foliküler tiroid metastazlarında artmış nükleer Claudin-1 lokalizasyonu bulmuşlardır. Ayrıca uzak metastaza ait hücre dizilerinde bölgesel lenf nodu metastazı görülen hücre dizisine kıyasla %67 daha fazla Claudin-1 protein ekspresyonu izlemişlerdir.

Süren ve ark. [53] tiroid neoplazili 114 olgu üzerinde immünohistokimyasal yöntemle Claudin-1 ekspresyonunu araştırmışlardır. MNG tanılı hiçbir olguda pozitiflik saptanmazken PTK tanılı vakaların %97'si Claudin-1 ekspresyonu göstermiştir. FTK tanılı vakaların sadece %10'unda pozitiflik izlenmesi PTK ayırıcı tanısında Claudin-1'in kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Abd el Atti ve ark. [54] 86 tümöral lezyon ve 10 normal tiroid dokusuna ait örneklerde Claudin-1 ekspresyonunu immünohistokimyasal yöntemle araştırmışlardır. Foliküler tümörler ve foliküler varyant PTK karşılaştırıldığı çalışmada Claudin-1 foliküler varyant PTK olgularının tümünde eksprese edilmiş ve ayırıcı tanıda yardımcı olacağını vurgulamışlardır.

Literatürde tiroid dışı tümörlerde de Claudin-1 ekspresyonuna ilişkin çok sayıda araştırma mevcuttur. Hoellen ve ark. [55] skuamöz hücreli serviks karsinomu dokularında, peritümoral stroma ile karşılaştırıldığında immünohistokimyasal olarak anlamlı derecede daha yüksek bir Claudin-1 ekspresyon seviyesi tanımlamışlardır. Claudin-1'in, prekanseröz servikal lezyonlar ve intraepitelyal neoplazilerde tümör oluşumunda kilit rolü olduğu varsayılmıştır [56]. Bazı çalışmalar, claudin-1'in p16INK4a'ya eşdeğer bir tümör belirteci veya prekanseröz lezyonların bir belirteci olmasını önermektedir [57].

Yamamoto ve ark. [58] dilde gelişen skuamöz hücreli karsinoma ait 86 olguda Claudin-1 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak araştırmışlardır. Claudin-1'in membranöz yerine nükleer boyandığı olgularda lenf nodu metastazı oranını anlamlı biçimde artmış bulmuşlardır. Ayrıca bu araştırmada yüzeysel yerleşimli Claudin-1'in hücre dizilerinde hareket kabiliyetini ve metastazı azalttığını bildirmişlerdir.

Holczbauer ve ark. [59] 30 hepatosellüler karsinom ve 30 peritümöral karaciğer dokusu ve 10 normal karaciğer dokusunda immünohistokimya ve Western blot yöntemleriyle Claudin-1 ekspresyonunu ölçmüşlerdir. Claudin-1 protein ekspresyonunu, siroz olmayan karaciğer ile karşılaştırdıklarında sirozda önemli ölçüde yüksek bulmuşlardır. Sirozlu karaciğerde gelişen hepatosellüler karsinomda ise sirozlulara göre önemli ölçüde yüksek Claudin-1 ekspresyonu izlemişlerdir.

Szasz ve ark. [60] meme karsinomu tanılı 96 olguda immünohistokimyasal olarak Claudin-1 ekspresyonunu araştırmışlardır. Lenf nodu metastazlarında Claudin-1 kaybının önemli bir rol aldığını ve kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Meme karsinomlarının incelendiği başka bir çalışmada ise [61] ER negatif bazal benzeri meme karsinomlarında Claudin-1 yüksekliği saptanmış ve tanısal ve prognostik bir belirteç olarak kullanımı önerilmiştir.

Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak 41 olguda Claudin-1 pozitifliği izlenirken bunların 39'unu tümöral olgular oluşturdu. Histolojik alt tiplere göre Claudin-1 ekspresyonu anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur. MTK olgularının tamamı Claudin-1 eksprese ederken (%100; n:11) onu sırasıyla PTK (%88,19; n:18),

ATK (%83,3; n:6), ve FTK (%63,6; n:11) izlemiştir. MNG olgularında ise %10 oranında (n:20) Claudin-1 ekspresyonu izlenmiştir.

Claudin-1 immünohistokimyasal pozitifliği 19 olguda membranöz özellikte izlenirken, 22 olguda hücre içi (sitoplazmik, nükleer granüler) özellikte izlendi. MTK'da olguların tamamı (%100) hücre içi boyanma özelliği gösterirken, ATK'da %75 oranında hücre içi boyanma paterni izlendi. PTK da 16 olgunun tamamı membranöz boyanma paterni sergiledi. Claudin-1'in tümöral olguları boyaması ve histolojik olarak tümör alt tiplerine göre farklı boyanma paterninin anlamlı bulunması tanısal amaçlı kullanımının yararlı olacağını düşündürmektedir. Membranöz boyanma paterni PTK tanısını desteklemek, hücre içi boyanmanın ise MTK ve ATK tanılarını desteklemek için kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Claudin-1 ekspresyonunu İHK yanı sıra RT-PCR ile değerlendirdik. 66 olgumuz arasında 18 olguda RT-PCR ile Claudin-1 gen ekspresyonu tespit ettik. Pozitif olguların tamamı tümöral olgular olup hiçbir MNG olgusunda Claudin-1 ekspresyonu izlenmedi.

18 PTK olgusunun 14'ü (%77,8) ve 11 FTK olgusunun 3'ü (%27,3) ve 6 ATK olgusunun 1'i (%16,7) moleküler olarak Claudin-1 eksprese etti. İHK çalışmamızın aksine MTK olgularının hiçbirinde RT-PCR ile pozitiflik izlenmezken MNG olgularının tamamı İHK ile uyumlu tarzda negatif sonuçlandı.

Claudin-1 ekspresyonu için moleküler ve İHK olarak yapılan çalışmalar arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir (p:0,156). Bu durumun izlenmesinin rutin doku takip işlemleri esnasında yüksek ısı, alkol, formalin ve ksilol gibi kimyasallara maruz kalan dokunun hassas bir yapıya sahip mRNA'sının etkilenmesine bağlı olabileceğini düşündük.

Tüm olgular Claudin-1 pozitifliği ve metastaz açısından incelendiğinde metastaz varlığı ve immünohistokimyasal Claudin-1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,05). Metastatik olan 11 olgunun tamamı Claudin-1 eksprese ederken (%100) metastaz izlenmeyen tümöral olgularda Claudin-1 ekspresyon oranı %54,5 idi. Claudin-1'in metastaz varlığı ile ilişkisi ZIP4 ile benzerlik göstermektedir.

Literatürde bazı yayınlarda Claudin-1'in invazyonu ve metastazı sınırlayıcı rolü vurgulanırken, bazı yayınlarda da tümöral lezyonlarda ve metastatik olgularda normal dokulara oranla artmış ekspresyonu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da metastaz açısından ekspresyonu artırıcı etki göstermiş olup, gerek İHK gerekse de RT-PCR yöntemiyle tümöral olgularda aşikar bir ekspresyon dikkati çekmiştir. Sıkı bağlantı proteinlerinin yüzeyde hücre bağlantısını sıkılaştırarak metastaz eğilimini azaltması E-kaderin örneğinden de bilineceği üzere öngörülebilir olup çeşitli çalışmalarla da desteklenmiş bir durumdur. Literatürde üzerinde durulan bir durum da hücre membranından hücre içine taşınmış olan Claudin-1 lokalizasyonunun hücre proliferasyonuna yaptığı etkidir. Bizim çalışmamızda da 6 metastatik olguda Claudin-1 ile hücre içi boyanma paterni görülmüştür. Metastaz oranı en yüksek izlenen MTK'da olguların tamamı subselüler Claudin-1 pozitifliği sergilemiştir. Hücre membranından subselüler alana yer değiştiren Claudin-1'in etki mekanizmasının aydınlatılması için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1'in birlikte incelendiği yalnız bir çalışma mevcuttur. Liu ve ark. [25] pankreas kanseri tanılı 72 hasta dokusunda ve pankreas kanserine ait hücre dizilerinde İHK'sal ve moleküler araştırmada ZIP4'ü kanserli dokularda normal dokulara oranla anlamlı derecede yüksek bulmuşlar ayrıca ZO-1 ve Claudin-1 ile negatif yönlü korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Yani tümörlü dokularda ve metastaz eğilimi olan dokularda ZIP4 ekspresyonu artarken ZO-1 ve Claudin-1 ekspresyonu ise azalmış bulunmuştur. Bu mekanizmada ZEB1'in etkili olduğu öne sürülmüştür.

Bizim çalışmamızda bu proteinler arasındaki korelasyon incelendiğinde ZIP4 ve Claudin-1 ekspresyonu arasında hem İHK hem de PCR çalışması ile ileri derecede ilişki izlenmektedir ($p=0,000^{***}$). Ancak ZO-1 her iki biyobelirteçle de anlamlı ilişki göstermemiştir.

Tiroid kanserleri, çoğu durumda düşük mortaliteye sahip sessiz tümörlerden anaplastik tiroid kanseri gibi çok agresif malignitelere kadar geniş bir klinik davranış yelpazesi sergiler [43]. Sakin diye nitelenen tümörlerin de %50'ye varan lenf nodu ve uzak metastaz oranlarıyla hastaların mortalitesine, morbiditesine ve ülkelerin

sağlık sistemlerine getirdiği yükler göz önünde bulundurulduğunda tümörlerin biyolojik davranışlarını etkileyecek hedef tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Claudin-1 ve ZIP4 ekspresyonunun tiroid tümörlerinde kötü prognoz ve metastaza yatkınlığı gösterme ve hedef tedavi geliştirme adına önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Tümör dışı dokuda yüksek oranda eksprese edilen ve tiroidit gibi klinik durumlarda da değişimlere açık olan ZO-1 belirtecinin ise tiroid için kullanımının faydalı olmadığını düşünmekteyiz.



6. SONUÇLAR

- Rastgele seçilen tiroid tümörleri ve MNG olgularında kadın oranının daha yüksek olduğu izlenmiştir.
- Yaş ile histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmiştir. Örneğin; ATK olguları ileri yaşta görülme eğiliminde iken MTK olguları daha genç yaşta görülme eğilimindedir vb.
- Metastaz varlığı ve histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Sırasıyla MTK ve PTK'da en yüksek metastaz oranları izlenmiştir.
- Tümörlere ait cerrahi sınır pozitifliği ile ZIP4, ZO-1 ve Claudin-1'in İHK ve moleküler ekspresyonları arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.
- İHK'sal ZIP4 ekspresyonu ile metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki izlenmiştir. ZIP4 pozitif hastalarda metastaz varlığı oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- ZIP4 pozitif izlenen olguların çoğunluğu tümöral olgular olup, immünreaktivite skoru ve histolojik alt tipler arasında oldukça yüksek ilişki bulunmuştur.
- ZO-1 immünreaktivitesi ile histolojik alt tipler arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.
- Claudin-1 pozitif izlenen olguların çoğunluğu tümöral olgular olup, immünreaktivite skoru ve histolojik alt tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur.
- Claudin-1'in membranöz ve hücre içi lokalizasyonlu boyanma paternleri histolojik alt tiplere göre anlamlı farklılık göstermiştir.
- İmmünohistokimyasal Claudin-1 ekspresyonu ile metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki izlenmiştir. Claudin-1 pozitif hastalarda metastaz varlığı oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- ZIP4 ve Claudin-1 immünohistokimyasal ekspresyonları anlamlı şekilde korelasyon göstermektedir. ZO-1 ekspresyonu ile hem ZIP4 hem de Claudin-1 ekspresyonu arasında korelasyon izlenmemiştir.

- Histolojik alt tipler ile ZIP4 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuş olup en yüksek ekspresyon oranı PTK'da görülmüştür.
- İHK'sal ZIP4 ekspresyonu ve moleküler ZIP4 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki mevcuttur.
- Histolojik alt tipler ile ZO-1 gen ekspresyonu arasında anlamlı farklılık izlenmedi. Ayrıca immünohistokimyasal ZO-1 ekspresyonu ve moleküler ZO-1 ekspresyonu arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- Histolojik alt tipler ile Claudin-1 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak oldukça yüksek ilişki mevcuttur.
- İHK'sal Claudin-1 ekspresyonu ve moleküler Claudin-1 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir.

7. KAYNAKÇA

1. Morris, L.G., A.G. Sikora, T.D. Tosteson, and L. Davies, The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid*, 2013. 23(7): p. 885-91.
2. Ertaş, B., H. Kaya, A. Özdilek, ve ark., Metastatic Neck Disease in Multifocal Thyroid Papillary Cancer. 2018. 56(4): p. 313.
3. Rahman, G.A., Extent of surgery for differentiated thyroid cancer: recommended guideline. *Oman Med J*, 2011. 26(1): p. 56-8.
4. Kang, X., R. Chen, J. Zhang, ve ark., Expression Profile Analysis of Zinc Transporters (ZIP4, ZIP9, ZIP11, ZnT9) in Gliomas and their Correlation with IDH1 Mutation Status. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. 16(8): p. 3355-60.
5. Huang, C., X. Cui, X. Sun, J. Yang, and M. Li, Zinc transporters are differentially expressed in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2016. 7(41): p. 66935-66943.
6. Chen, Q.G., Z. Zhang, Q. Yang, ve ark., The role of zinc transporter ZIP4 in prostate carcinoma. *Urol Oncol*, 2012. 30(6): p. 906-11.
7. Zihni, C., C. Mills, K. Matter, and M.S. Balda, Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016. 17(9): p. 564-80.
8. Babkair, H., M. Yamazaki, M.S. Uddin, ve ark., Aberrant expression of the tight junction molecules claudin-1 and zonula occludens-1 mediates cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*, 2016. 57: p. 51-60.
9. Zwanziger, D., J. Badziong, S. Ting, ve ark., The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. *Endocr Relat Cancer*, 2015. 22(5): p. 819-30.
10. Tallini, G. and T.J. Giordano, *Thyroid Gland*. 11 ed. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Vol. 1. 2018: Elsevier.
11. Baloch, Z.W. and V.A. LiVolsi, *Thyroid and Parathyroid*. 6 ed. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, ed. S.E. Mills. 2015: Wolters Kluwer Health.
12. *Tumours of the thyroid gland World Health Organization Classification of Tumours of Endocrin Organs*. 2017.
13. Boerner, S.L. and S.L. Asa, *Foliküler Lezyonlar. Tiroid Biyopsilerinin Yorumu*. 2015: Nobel Tıp Kitabevleri. 152.
14. Öksüz, H., *TPK'da Galektin-3 ve Sitokeratin-19 Ekspresyonlarının Tümör Progresyonu ile İlişkisi*. 2005, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi. p. 12.
15. Rosai, J., J.A. Saavedra, and S. Ascoli, *Papillary thyroid carcinoma World Health Organization Classification of Tumours of Endocrin Organs*. 2017.
16. Boerner, S.L. and S.L. Asa, *Papiller Lezyonlar. Tiroid Biyopsilerinin Yorumu*. 2015: Nobel Tıp Kitabevleri. 140.
17. Livolsi, V., I.A. Nallib, and Z.W. Balloch, *Follicular thyroid carcinoma World Health Organization Classification of Tumours of Endocrin Organs*. 2017. 91-95.
18. Delellis, R.A., A.A. Ghuzlan, and J.A. Saavedra, *Medullary thyroid carcinoma, in World Health Organization Classification of Tumours of Endocrin Organs*. 2017. p. 108-113.
19. Rowland, K.J. and J.F. Moley, *Hereditary thyroid cancer syndromes and genetic testing*. *J Surg Oncol*, 2015. 111(1): p. 51-60.
20. K, E.-N.A., B.Z. W., and E. C., *Anaplastic thyroid carcinoma in WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*. 2017. p. 104-106.

21. Lloyd, R., R. Osamura, G. Kloppel, and J. Rosai, Tumours of the thyroid gland. World health organization classification of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC, 2017: p. 65-142.
22. Kimura, T. and T. Kambe, The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(3): p. 336.
23. Proteintech. ZIP4 Antibody. 2019; Available from: <https://www.ptglab.com/Products/SLC39A4-Antibody-20625-1-AP.htm>.
24. Fan, Q., Q. Cai, P. Li, ve ark., The novel ZIP4 regulation and its role in ovarian cancer. *Oncotarget*, 2017. 8(52): p. 90090-90107.
25. Liu, M., J. Yang, Y. Zhang, ve ark., ZIP4 Promotes Pancreatic Cancer Progression by Repressing ZO-1 and Claudin-1 through a ZEB1-Dependent Transcriptional Mechanism. *Clin Cancer Res*, 2018. 24(13): p. 3186-3196.
26. Ichikawa-Tomikawa, N., K. Sugimoto, S. Satohisa, K. Nishiura, and H. Chiba, Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol*, 2011. 2011: p. 253048.
27. Mohandas, T.K., X.N. Chen, L.B. Rowe, ve ark., Localization of the tight junction protein gene TJP1 to human chromosome 15q13, distal to the Prader-Willi/Angelman region, and to mouse chromosome 7. *Genomics*, 1995. 30(3): p. 594-7.
28. ThermoFisher. ZO-1 Polyclonal Antibody. 2020; Available from: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/ZO-1-Antibody-Polyclonal/PA5-28858>.
29. Mauro, L., M. Bartucci, C. Morelli, S. Ando, and E. Surmacz, IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. *J Biol Chem*, 2001. 276(43): p. 39892-7.
30. Zhang, X., L. Wang, H. Zhang, ve ark., Decreased expression of ZO-1 is associated with tumor metastases in liver cancer. *Oncol Lett*, 2019. 17(2): p. 1859-1864.
31. Ni, S., L. Xu, J. Huang, ve ark., Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. 6(12): p. 2887-95.
32. Schaller, M.D., FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration? *J Cell Biol*, 2004. 166(2): p. 157-9.
33. Nieto, M.A., The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(3): p. 155-66.
34. Alabalık, U., G. Türkcü, A.N. Keleş, ve ark., Can aquaporins be used as diagnostic and prognostic markers for uterine smooth muscle tumours? *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2017. 31(1): p. 148-155.
35. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
36. Nguyen, Q.T., E.J. Lee, M.G. Huang, ve ark., Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Health Drug Benefits*, 2015. 8(1): p. 30-40.
37. Ruiz, E.M.L., T. Niu, M. Zerfaoui, ve ark., A novel gene panel for prediction of lymph-node metastasis and recurrence in patients with thyroid cancer. *Surgery*, 2020. 167(1): p. 73-79.
38. Brassard, M., I. Borget, A. Edet-Sanson, ve ark., Long-Term Follow-Up of Patients with Papillary and Follicular Thyroid Cancer: A Prospective Study on 715 Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011. 96(5): p. 1352-1359.
39. Mansour, J., D. Sagiv, E. Alon, and Y. Talmi, Prognostic value of lymph node ratio in metastatic papillary thyroid carcinoma. *J Laryngol Otol*, 2018. 132(1): p. 8-13.

40. Zheng, X., S. Wei, Y. Han, ve ark., Papillary Microcarcinoma of the Thyroid: Clinical Characteristics and BRAFV600E Mutational Status of 977 Cases. *Annals of Surgical Oncology*, 2013. 20(7): p. 2266-2273.
41. Fisher, S.B. and N.D. Perrier, The incidental thyroid nodule. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(2): p. 97-105.
42. Rahbari, R., L. Zhang, and E. Kebebew, Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol*, 2010. 6(11): p. 1771-9.
43. Cabanillas, M.E., D.G. McFadden, and C. Durante, Thyroid cancer. *Lancet*, 2016. 388(10061): p. 2783-2795.
44. Lang, B.H., T.W. Shek, and K.Y. Wan, Does microscopically involved margin increase disease recurrence after curative surgery in papillary thyroid carcinoma? *J Surg Oncol*, 2016. 113(6): p. 635-9.
45. Ishida, S., A. Kasamatsu, Y. Endo-Sakamoto, ve ark., Novel mechanism of aberrant ZIP4 expression with zinc supplementation in oral tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. 483(1): p. 339-345.
46. Feustel, A., R. Wennrich, D. Steiniger, and P. Klauss, Zinc and cadmium concentration in prostatic carcinoma of different histological grading in comparison to normal prostate tissue and adenofibromyomatosis (BPH). *Urol Res*, 1982. 10(6): p. 301-3.
47. Ogunlewe, J.O. and D.N. Osegbe, Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. *Cancer*, 1989. 63(7): p. 1388-92.
48. Fluge, Ø., D.R.F. Haugen, J.R. Lillehaug, and J.E. Varhaug, Difference in Patterns of Met Expression in Papillary Thyroid Carcinomas and Nonneoplastic Thyroid Tissue. *World Journal of Surgery*, 2001. 25(5): p. 623-631.
49. Rebuffat, S.A., M. Kammoun-Krichen, I. Charfeddine, ve ark., IL-1 β and TSH disturb thyroid epithelium integrity in autoimmune thyroid diseases. *Immunobiology*, 2013. 218(3): p. 285-91.
50. Bai, N., D. Hou, C. Mao, ve ark., MiR-376c-3p targets heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) to inhibit proliferation and invasion in medullary thyroid carcinoma cells. *Arch Med Sci*, 2020. 16(4): p. 878-887.
51. Du, J., F. Zhang, L. Zhang, Y. Jia, and H. Chen, MicroRNA-103 regulates the progression in endometrial carcinoma through ZO-1. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019. 33: p. 2058738419872621.
52. Liu, H., T. Wen, Y. Zhou, ve ark., DCLK1 Plays a Metastatic-Promoting Role in Human Breast Cancer Cells. *Biomed Res Int*, 2019. 2019: p. 1061979.
53. Süren, D., M. Yildirim, A. Sayiner, ve ark., Expression of claudin 1, 4 and 7 in thyroid neoplasms. *Oncol Lett*, 2017. 13(5): p. 3722-3726.
54. Abd El Atti, R.M. and L.S. Shash, Potential diagnostic utility of CD56 and claudin-1 in papillary thyroid carcinoma and solitary follicular thyroid nodules. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2012. 24(4): p. 175-84.
55. Hoellen, F., A. Waldmann, C. Banz-Jansen, ve ark., Claudin-1 expression in cervical cancer. *Mol Clin Oncol*, 2017. 7(5): p. 880-884.
56. Szabó, I., A. Kiss, Z. Schaff, and G. Sobel, Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol*, 2009. 24(12): p. 1607-15.
57. Benczik, M., Á. Galamb, R. Koiss, ve ark., Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res*, 2016. 22(1): p. 179-88.

58. Yamamoto, D., K. Kayamori, K. Sakamoto, ve ark., Intracellular claudin-1 at the invasive front of tongue squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastasis. *Cancer Sci*, 2020. 111(2): p. 700-712.
59. Holczbauer, Á., B. Gyöngyösi, G. Lotz, ve ark., Increased expression of claudin-1 and claudin-7 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 2014. 20(3): p. 493-502.
60. Szasz, A.M., A.M. Tokes, M. Micsinai, ve ark., Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2011. 28(1): p. 55-63.
61. Myal, Y., E. Leygue, and A.A. Blanchard, Claudin 1 in Breast Tumorigenesis: Revelation of a Possible Novel "Claudin High" Subset of Breast Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. 2010: p. 956897.

