

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ**

**KARACİĞER FİBROZİSİNİN EVRELENDİRİLMESİNDE PROTEOMİK  
ANALİZ İLE YENİ BİYOMARKERLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI**

**ANKARA**

**2009**

## Karaciğer Fibrozisinin Evrelendirilmesinde Proteomiks Analizi İle Yeni Biyomarkerların Araştırılması

### ÖZET

Hepatik fibroz, sindirim sistemi hastalıkları arasında ölümün en sık görülen nedenidir ve sirozun gelişimi ile birlikte ilerleyen, farklı etiyolojilerdeki birçok kronik karaciğer hastalıklarının bir özelliğidir. Kronik karaciğer hastalığı olan olgularda karaciğer dokusundaki fibrozis varlığının ve miktarının değerlendirilmesi; tedavi stratejisini, tedaviye yanıtı ve prognozu belirleyen en önemli etkidir. Bu çalışmanın amacı karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde proteomik analiz ile yeni biyolojik belirteçlerin araştırılmasıdır.

Toplam 30 kronik HBV ve 57 kronik HCV enfeksiyonu kanıtlanmış toplam 87 hasta serumu ve 32 sağlıklı kontrol analiz edilmiştir. Hastalardan alınan karaciğer biyopsi örnekleri METAVIR skorlama sistemine uygun olarak evrelendirildi. Buna göre, 24 hasta F0, 22 hasta F1, 10 hasta F2, 8 hasta F3 ve 23 hasta F4 olarak evrelendirilmiştir. Serum proteinleri IMAC30 (bakır) ve CM10 ProteinÇip dizinlerinde çalışılmış ve SELDI ("Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization") ProteinÇip Sistem 4000 kütle spektrometrisinde (MS) analiz edilmiştir. Data analizinde "CIPHERGEN Express software", versiyon 3.0.1. ve "Biomarker Patterns software" versiyon 5.0 (Ciphergen Biosystems) kullanılmıştır.

Biomarker Patterns software, versiyon 5.0 (Ciphergen Biosystems) ile oluşturulan karar ağaçları ile çoklu belirteç panelleri hafif (F0,F1,F2) ve ileri evre fibrozisi (F3, F4) tanımlamıştır. F4 evresi ile karşılaştırıldığında diğer tüm fibrozis evreleri arasında ayırt edici protein pikleri bulunmuştur. Sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında F0 ve F1 evreleri arasında ve F0 ile F1 arasında ayırt edici pik bulunamamıştır.

Ülkemizde ilk defa SELDI-TOF MS ile yapılan bu çalışma bu teknolojinin karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde uygulanabilir bir teknoloji olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre hafif fibrozlu evreler için ayırt edici proteomik özellik bulunamamış ancak hafif ve ileri evre fibrozis grupları için ayırt edici özellikler bulunmuştur. Ayrıca siroz hastaları diğer fibrozis evreleri ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında ayırt edici protein profili vermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Karaciğer fibrozisi, biyolojik belirteçler, proteomiks, SELDI-TOF kütle spektrometrisi, protein çip

# Searching For Novel Biomarkers In Determination of The Stages of Liver Fibrosis By Using Proteomic Analysis

## ABSTRACT

Hepatic fibrosis is a common feature of many chronic liver diseases of different etiologies that could lead to cirrhosis. The accurate assessment of the presence and severity of liver fibrosis is of paramount importance in determining treatment strategies, response to treatment, and prognosis in patients with chronic liver disease. The aim of this study was to investigate potential proteomic biomarkers for assessing the hepatic fibrosis using proteomic analysis.

Serum samples of 87 patients with chronic liver disease (57 chronic hepatitis C, 30 chronic hepatitis B) with histological diagnosis and 32 healthy controls were analyzed. Serum samples of patients were collected on the same day the liver biopsy was performed. All liver biopsies were analyzed by the same pathologist, and fibrosis was assessed using the METAVIR index, which revealed F0 fibrosis in 24, F1 in 22, F2 in 10, F3 in 8 and F4 in 23 patients. Serum proteins were profiled on both IMAC30 copper and CM10 ProteinChip array types and analyzed using surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) ProteinChip System 4000 Mass spectrometer. The comparison between mild fibrotic and severe fibrotic patients was performed using tree classification (cross-validation) depending on peak intensity with the Biomarker Patterns software, version 5.0 (CIPHERGEN Biosystems).

Some SELDI proteomic features were found to be discriminative for mild (F0,F1,F2) vs. severe fibrosis (F3,F4). None of the proteomic features of healthy control serum profiles were found to be discriminatory when compared to those of patients with F0 and/or F1 fibrosis. No statistically significant discriminatory peak was evident between F0, F1 and F2 fibrosis.

SELDI-TOF MS technology is a feasible approach for the discovery of potential biomarkers for assessing liver fibrosis. The results of this study reveal discriminatory peaks between protein profiles of cirrhotic patients and other stages of liver fibrosis and healthy controls, indicating that potential biomarkers among the proteins that are differentially expressed can be notably determined for staging mild and severe fibrosis.

**Keywords:** Liver fibrosis, biomarkers, proteomics, SELDI-TOF Mass Spectrometry, protein chip

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Karaciğer Fibrozisi ve Mekanizması	1
1.2 Karaciğer Fibrozisinin Evrelendirilmesinin Önemi	4
1.3. Karaciğer Fibrozisinin Evrelendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	5
1.4. Proteomik Yaklaşımlar	8
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>27</b>
3.1. Hasta ve Kontrol Grupları	27
3.2. Kalite Kontrol (“Quality Control”) Örneği	28
3.3. SELDI-TOF Kütle Spektrometrisi (MS) ile Analiz	28
3.3.1 Kalibrasyon	29
3.3.2. SELDI-TOF MS Analizi İçin Örnek Hazırlama	30
3.3.3. IMAC30 Çip Dizinleri İçin Uygulama	31
3.3.4. CM10 Çip Dizinleri İçin Uygulama	33
3.3.5. SELDI-TOF MS ile Veri Oluşturulması	34
3.3.6. İstatistiksel Analiz	35
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b>	<b>37</b>
4.1. SELDI Sisteminin Tekrarlanabilirliği	37
4.2. IMAC30 Çip Dizini İçin Analiz Sonuçları	38
4.2.1. IMAC30 Düşük Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları	38
4.2.2. IMAC30 Yüksek Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları	48
4.2.3. IMAC30 için Karar Ağacı Analizi	51
4.3. CM10 Çip Dizini İçin Analiz Sonuçları	53
4.3.1. CM10 Düşük Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları	53
4.3.2. CM10 Yüksek Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları	61
4.3.3. CM10 için Karar Ağacı Analizi	64
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>67</b>
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	84

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karaciğerin hasara cevabı	3
Şekil 1.2. İki boyutlu jel elektroforezi ile artan ve azalan proteinlere (biyolojik belirteç) örnek	9
Şekil 1.3. İki boyutlu (2D) jel elektroforezi; IEF: İzoelektrik odaklama, IPG: İmmobilize pH gradyanı	10
Şekil 1.4.1. Bireysel SELDI ProteinÇip Sistemi	12
Şekil 1.4.2. Kurumsal SELDI ProteinÇip Sistemi	12
Şekil 1.5. SELDI-TOF MS çip dizinleri	13
Şekil 1.6. Farklı pH'larda proteinlerin farklı yük kazanması	14
Şekil 1.7. SELDI süreci: Protein çip ve "time of flight" (TOF)-kütle spektrometrisi (MS)	15
Şekil 3.1. Protein standardı düşük molekül ağırlıkları	29
Şekil 3.2. Protein standardı yüksek molekül ağırlıkları	30
Şekil 3.3. Bir biyoişlemciye çok kanallı pipet ile uygulama	31
Şekil 3.4. Nitriloasetik asit (NTA) gruplarının metal ile şelatlanması ve bu yüzeye protein bağlanması	31
Şekil 3.5. Anyonik CM10 çip yüzeyine pozitif yüklerin bağlanması	33
Şekil 4.1. Karakteristik özellikleri analiz edilen pikler	37
Şekil 4.2. IMAC30 çipi m/z 3952 ve 4278 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması	42
Şekil 4.3. 3952 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi	43
Şekil 4.4. 4278 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi	43
Şekil 4.5. IMAC30 çipi m/z 9286 ve 11725 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması	44
Şekil 4.6. IMAC30 çipi m/z 9286 ve 11725 için gruplar arası pik görüntüsü karşılaştırması	45
Şekil 4.7. 9286 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi	45
Şekil 4.8. 11725 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi	46
Şekil 4.9. IMAC30 çipi düşük lazer enerjisi protokolü için ısı haritası	47
Şekil 4.10. IMAC30 çipi yüksek lazer enerjisi protokolü için ısı haritası	50
Şekil 4.11. IMAC30 çipinde hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) fibrozis gruplarının ayrıştırılması için oluşturulan karar ağacı	51
Şekil 4.12. F3, F4 sınıfı için ROC analizi çizelgesi	52
Şekil 4.13. IMAC30 için özgüllük ve duyarlılık ile ppv ve npv değerleri çizelgesi	53
Şekil 4.14. CM10 çipi m/z 3952 ve 4278 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması	58
Şekil 4.15. 4284 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi	58
Şekil 4.16. 4300 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi	59
Şekil 4.17. CM10 çipi düşük lazer enerjisi protokolü için ısı haritası	60
Şekil 4.18. CM10 çipi yüksek lazer enerjisi protokolü için ısı haritası	63
Şekil 4.19. CM10 çipinde hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) fibrozis gruplarının ayrıştırılması için oluşturulan karar ağacı	65
Şekil 4.20. F3, F4 sınıfı için ROC analizi çizelgesi	66
Şekil 4.21. CM10 karar ağacı için özgüllük ve duyarlılık ile ppv ve npv değerleri çizelgesi	66
Şekil 5.1. HCC, HBV ve sağlıklı kontrol grupları arasında 11724 Da piki için jel görüntüsü karşılaştırması	71
Şekil 5.2. IMAC30 çipi m/z 11725 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması	71

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. IMAC30 için analiz edilen kişi sayısı ve fibroz evreleri	32
Çizelge 3.2. CM10 için analiz edilen kişi sayısı ve fibroz evreleri	34
Çizelge 4.1. Seçilen piklerin karakteristik özellikleri ve %CV değerleri	38
Çizelge 4.2. IMAC30 düşük molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla için ayırt edici pik sayısı	39
Çizelge 4.3. IMAC30 F4 (Siroz) ve SK (sağlıklı kontrol) grupları karşılaştırması	40
Çizelge 4.4. IMAC30 F0, F1, F2 ve F3, F4 gruplarının karşılaştırması	41
Çizelge 4.5. IMAC30 m/z 3952 ve 4278 için gruplar arası karşılaştırma	41
Çizelge 4.6. 9286 Da ve 11725 Da pikleri için F4 grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması	44
Çizelge 4.7. IMAC30 yüksek molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla için ayırt edici pik sayısı	48
Çizelge 4.8. IMAC30 yüksek molekül için F4 ve SK grupları karşılaştırması	49
Çizelge 4.9. CM10 düşük molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla ayırt edici pik sayısı	54
Çizelge 4.10. CM10 için F4 ve SK grupları karşılaştırmasında ROC>0,8 olan pikler	55
Çizelge 4.11. CM10 için F4 ve SK grupları karşılaştırmasında ROC<0,2 olan pikler	56
Çizelge 4.12. CM10 düşük molekül F0, F1, F2 ve F3, F4 gruplarının karşılaştırması	57
Çizelge 4.13. CM10 m/z 4284 ve 4300 için gruplar arası karşılaştırma	57
Çizelge 4.14. CM10 yüksek molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla ayırt edici pik sayısı	61
Çizelge 4.15. CM10 yüksek molekül F0, F1, F2 ve F3, F4 grupları karşılaştırması	62
Çizelge 5.1. Hafif ve ileri evre fibrozis grupları için ayırt edici pikler	69
Çizelge 5.2. 11725 Da pikleri için F4 grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması	70

## SİMGELER DİZİNİ

2D	İki Boyutlu
$\mu$ l	Mikrolitre
AFP	Alfa-Fetoprotein
ALP	Alkalın Fosfataz
ALT	Alanin Transaminaz
ANN	“Artificial Neural Network”
AST	Aspartat Transaminaz
AUROC	ROC kavisinin altındaki alan
CuSO <sub>4</sub>	Bakır sülfat
CV	Değişim katsayısı
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
EAM	Enerji absorbe edici molekül
EDM	“Expression Difference Mapping”
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
ESM	Ekstrasellüler Matriks Komponentleri
GGT	$\gamma$ -glutamiltransferaz
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Hepatoselüler Kanser
HCl	Hidroklorik asit
HCV	Hepatit C Virüsü
HLPP	İnsan Karaciğer Proteom Projesi
HSH	Hepatik Stellat Hücreleri
HUPO	İnsan Proteom Organizasyonu
IEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradyanı
kDa	Kilo Dalton
MS	Kütle Spektrometresi
NASH	Nonalkolik Steatohepatit
m/z	Kütle/Yük
MALDI	“Matrix Assisted Laser desorption/Ionisation”
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit

npv	Negatif prediktif değer
NTA	Nitriloasetik Asit
PBS	Fosfatlı Tuz Tamponu
pI	İzoelektrik Noktası
ppv	Pozitif prediktif değer
ROC	“Receiver Operating Characteristic”
S/N	Sinyal/Gürültü
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez
SELDI	“Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization”
SK	Sağlıklı Kontrol
SPA	Sinapinik Asit
TFA	Trifluoroasetik Asit
TOF	“time of flight”-Uçuş süresi



# 1.GİRİŞ

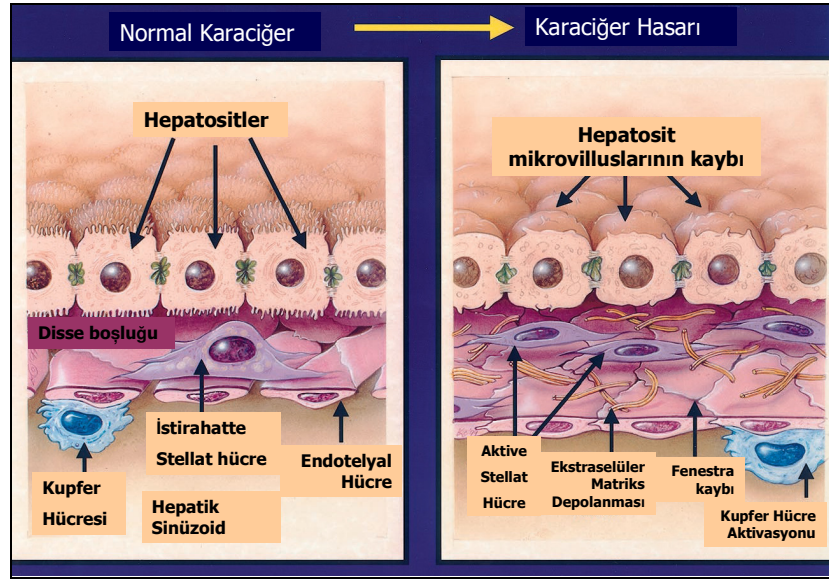
## 1.1. Karaciğer Fibrozisi ve Mekanizması

Karaciğer fibrozisi, sindirim sistemi hastalıkları arasında ölümün en sık görülen nedenidir ve sirozun gelişimi ile birlikte ilerleyen, farklı etiyolojilerdeki birçok kronik karaciğer hastalıklarının bir özelliğidir. Batılı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de kronik hepatit C virüs (HCV) ve hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu, kronik karaciğer hastalığı ve sirozun en sık görülen nedenlerindedir. Hepadnaviral enfeksiyonlar geçici veya kalıcı karaciğer inflamasyonuna neden olur. Dünyada yaklaşık 360 milyon insan kronik HBV taşıyıcısıdır ve her yıl yaklaşık 650,000 kişi HBV'ye bağlı karaciğer hasarının (siroz veya hepatoselüler kanser) ilerlemesi ile hayatını kaybetmektedir (Shepard et al. 2006). HCV enfeksiyonu da kronik karaciğer hastalığının önemli nedenlerinden biridir ve dünyada 170 milyondan fazla kişi kronik olarak HCV ile enfektedir (Burak et al. 2000, Teo et al. 2004). Kronik HCV enfeksiyonlu kişilerin %15-20'si 20 yıl sonra siroz (Burak et al. 2000, Teo et al. 2004, Fischer et al. 2004) ve %5-10'u hepatoselüler kanser (HCC) geliştirirler (Fischer et al. 2004). Hepatik fibrozisi tetikleyen diğer etkenler otoimmün hastalıklar, helmintik enfeksiyon, aşırı demir veya bakır yüklemesi ve safra yollarında tıkanmadır (Friedman 2003). Ayrıca NASH (*nonalkolik steatohepatit*)'ın fibrozisin önde gelen nedeni olduğuna dair bilimsel veriler her geçen gün artmaktadır (Jansen 2004).

Hasarı tamir etmeye yönelik bir yara iyileşmesi süreci olarak da tanımlanabilen karaciğer fibrozisi, ekstrasellüler matriks komponentlerinin (ESM) artması (fibrojenez) ile bilinen ve karaciğerdeki tanımlanabilir dinamik bir süreçtir. Fibrojenez regülasyonu, multifaktöriyeldir ve en önemli faktörü inflamasyondur (Albanis and Friedman 2006, Gutierrez-Reyes et al. 2007). Ekstrasellüler matriks metabolizmasının dinamik bir süreç olduğu ve birikiminin bilinenden daha çok tersine çevrilebilir olduğu netleşmiştir. Son yıllarda ESM bileşenlerindeki artış ve metabolizmasının anlaşılmasında kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır. Karaciğer hasarına bağlı olarak fibrozis ilerledikçe, subendotelial bölgedeki disse boşluğu ve sinüzoide meydana gelen değişimler, hem hücresel yanıtta hem de ESM kompozisyonundaki değişiklikleri kapsamaktadır. Normal karaciğerde retinoid için temel depolama bölgesi olan hepatik stellat hücrelerinin (HSH) aktivasyonu skar matriks birikimine neden olmaktadır. Bu daha

sonra hepatik fonksiyonun bozulması ile sonuçlanan hepatosit mikrovili ve sinüzoidal endotelyal fenestra kaybına neden olmaktadır (Şekil 1.1.). ESM birikiminin esas kaynağı olarak hepatik stellat hücrelerinin (HSH) bulunması bu hücrelerin aktivasyonu ile sonuçlanan sitokinler gibi çok sayıda sinyalin bulunmasını sağlamıştır. Aktive HSH'lerin karaciğer hasarını artırabileceği düşünülen, TGF beta-1, PDGF-BB, fibroblast büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, trombosit aktive edici faktör, ET-1 ve nötrofilleri salgıladığı düşünülmektedir. HSH'ler ayrıca interlökin-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinleri de salgılamaktadır ve bunlar direkt olarak hasar bölgesine gitmektedir (Gentilini et al. 2000, Tangkijvanich et al. 2001 ).

ESM proteinlerinin aşırı birikimi karaciğerin normal yapısını bozar ve organın normal fonksiyonunu bozarak sonunda patofizyolojik hasara yol açar. Normal karaciğerde ESM üretimi ile yıkımı oranları eşittir ve bunun sonucunda matriks oluşmaz. Fibrojenez, ESM oluşumu ve yıkımı arasında bir dengesizlik olduğu sürece söz konusudur. Matriks metalloproteinazlarını (MMP) da içeren proteinazlar matriks yıkımından sorumludur. Bunlar beş kategoride toplanırlar: interstitial kollajenler (MMP-1, -8, -13), jelatinazlar (MMP-2, -9), stromelisinler (MMP-3, -7, -10, -11), membran tipi (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) ve metalloelastazlar (MMP-12) (Benyon and Arthur 2001). Metalloproteinazların düzenlemesi kompleks bir olgudur. MMP'lerin gen ifadesindeki düşüş ile azalan regülasyonu veya doku inhibitörlerindeki artış ESM birikimine yardımcı olmaktadır. İlerleyen fibrozis artan TIMP-1 ve TIMP-2 ile ilişkilidir ki bu MMP aktivitesinde net bir düşüğe götürür ve böylece matriks birikimi oluşur (Iredale et al. 1998, Iredale 2001).



Şekil 1.1. Karaciğerin hasara cevabı (Friedman 2000'den uyarlanmıştır.)

Kollajenin özellikle de kollajen fibrilin artan birikimi fibrozisin en yaygın özelliğidir. Karaciğer hastalığında yapılan birkaç deneysel hayvan modeli HSH'nin fibroz oluşumu sırasında aşırı kollajen üretiminden sorumlu birincil hücre olduğunu desteklemektedir (Mak et al. 1984, Schuppan 1990, Milani et al. 1990). Karaciğerde tanımlanan farklı kollajenlerin sayısı artmaya devam ediyorsa da en yaygın görülen ve geniş alanda artan kollajenler tip I ve tip III kollajenlerdir. Karaciğer fibrozisi esnasında hem mRNA hem de protein düzeyinde değişen kollajen sentezi incelenmiş ve tip I kollajende dramatik bir artış ve tip III kollajen düzeyinde de yine anlamlı ama nispeten daha az bir artış görülmüştür (Friedman et al. 1992). Karaciğer fibrozisinin deneysel modellerinden izole edilen HSH'lerde kollajen proteinlerin yerleşimi ve artmış mRNA seviyesi gösterilmiştir (Milani et al. 1990, Maher et al. 1990, Nakatsukasa et al. 1990). Hepatik stellat hücreleri sıklıkla kollajen fiberlerle yakın ilişkili olarak sentrilobular skarda artan hücre sayısı ile tanımlanmıştır (Maher et al. 1990, Tsukamoto et al. 1986). Yapılan deneylerde karaciğer fibrozisi olan hayvan modellerinden izole edilen HSH'lerde kontrol hayvanlarına oranla daha çok kollajen sentezlendiği görülmüştür (Schuppan 1990, Schmitt-Graff et al. 1993). Karaciğer fibrozisinde, kollajenler dışında iki büyük protein ailesi olan glikoproteinler ve proteoglikanların da aşırı birikimi bilinmektedir (Friedman 2000). Fibrotik karaciğerde fibronektin, laminin, merozin, tenaskin, nidojen ve hyaluronik asit gibi bazı farklı glikoproteinlerin ifadesinin artmış olduğu görülmüştür. Karaciğer fibrozisi sırasında heparin, dermatan, kondroitin

sülfatlar, perlekan, sindekan, biglikan ve dekorin gibi bazı proteoglikanların artan birikimi de tanımlanmıştır (Li and Friedman 1999).

Çok sayıda hücresele değişiklik hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkili ise de hücrelerin fibrojenik yanıtını destekleyen iki ana olay gerçekleşmektedir (Shigeki et al. 2006). Birincisi, HSH'ler ekstrasellüler matriks sentezinde ve birikiminde dramatik bir artış ile sonuçlanan gen ifadesi paternlerini değiştirirler ve bu hücreler direkt fibrojenik olurlar. İkinci olarak, karaciğerde bulunan fibrojenik hücre sayısını etkili bir şekilde çoğaltan hücresele aktivasyon ile HSH'lerin çoğalma hızı artar. Bu nedenle, HSH'lerin hem fibrojenik hem de çoğaltıcı yanıtını azaltmayı veya inhibe etmeyi hedefleyen etkili bir tedavinin, aktive olmuş HSH'lerin karaciğer fibrozisinin ilerlemedeki zararlı etkilerini azaltacağına inanılmaktadır. Ancak, primer patojenik ajan yok edilmediğinde fibrozisi durduracak hatta düzeltecek kabul edilmiş bir tedavi halen yoktur.

## **1.2. Karaciğer Fibrozisinin Evrelendirilmesinin Önemi**

Fibrozis tedavi edilmediği takdirde, siroza kadar ilerleyebilir ve sonunda karaciğer yetmezliğine ve ölüme neden olabilir. Karaciğer fibrozisinin ilerlemiş son evresi olan siroz için tek seçenek hasta için anlamlı risk ortaya çıkaran karaciğer organ naklidir. Dünya çapında HBV'ye bağlı ölümlerin çoğu infeksiyonun kronik sekellerinden kaynaklanmaktadır. 2000 yılı için HBV kaynaklı toplam 620.000 ölümün 580.000 (%94)'inin siroz ve hepatoselüler karsinomdan (HCC) kaynaklandığı tahmin edilmiştir (Goldstein et al 2005). İlerleyen fibrozis sonucu siroz oluşumu gelişir ise HCC'nin bir yıl içinde gelişme riski %1-%5 arasındadır (Di Bisceglie 1997). HCC en yaygın primer karaciğer kanseridir ve dünyada tüm kanserler arasında beşinci sırayı alır. Batılı ülkelerde son 10 yılda HCC insidansı ve mortalite oranı artmıştır (El-Serag and Mason 1999). Asya'da ise HCC kansere bağlı ölümlerden en önemlilerdendir (Parkin et al. 2000). HCC'ye bağlı ölüm oranının azaltılması için karaciğer sirozunun ve hepatoselüler karsinomun erken teşhisi önemlidir. Ancak karaciğer sirozu ve küçük HCC'nin teşhisi genellikle zordur. Bu nedenle siroz ve hepatoselüler kansere kadar uzanan geniş bir klinik spektrumu olması nedeniyle kronik karaciğer hastalarında tedavi ve takip önem kazanmaktadır. Geri dönüşebilir karaciğer fibrozisin kesin teşhisi ve yaygınlığının en doğru şekilde tayini kronik karaciğer hasarı olan hastalarda tedaviyi

yönlendirebilmek, hastalığı öngörmek ve HCC'ye bağlı mortalite oranını azaltmak açısından oldukça önemlidir.

### **1.3. Karaciğer Fibrozisinin Evrelendirilmesinde Kullanılan Yöntemler**

Histolojik teşhis ve fibrozisin seviyesine değer biçmede uygulanan karaciğer biyopsisi uzun yıllardır bir altın standart olmuştur. Karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde her biri karaciğer biyopsisine dayalı görsel evrelendirme temelli farklı sistemler önerilmiştir (Knodell et al. 1981, Ishak et al. 1995, Dufour et al. 1998). Karaciğer biyopsisinin değerlendirilmesinde kullanılan kıstaslar oldukça önemlidir. Birçok merkez biyopsilerin değerlendirilmesinde standardize edilmiş evrelendirme sistemlerini kullanmaktadır. En sık kullanılan standardize edilmiş sistemler; histoloji aktivite dizini (indeksi) (HAI: Knodell skoru), HAI skurun METAVIR skoru ve daha sonra modifiye edilmiş olan Ishak (Knodell et al. 1981, Ishak et al. 1995) ve METAVIR skorlarıdır (Bedossa and Poynard 1996).

Karaciğer biyopsisi uygulaması nadir ancak ciddi komplikasyonları olan, anlamlı morbidite (%1-5) ve mortalite (1/10,000) oranı ile bazı sınırlamalara sahip invazif bir işlemdir (Blanc et al. 2005). Biyopsi sonrasında bireylerin yaklaşık %20'sinde sağ üst kadranda veya sağ omuzda ağrı oluşur (Cadranel et al. 2000), karaciğer biyopsisine bağlı ölüm oranı %1 kadar yüksek oranda olabileceği gibi (Perrault et al. 1978, McGill et al. 1990, Cadranel et al. 2000), %0,3-%0,5 arasında değişen oranlarda yan etkiler (intraperitoneal kanama, hemobilia, kolanjit, plörit, peritonit, pnömotoraks, hemotoraks, subkutanöz amfizem ve subfrenik apse) görülmüştür (Froehlich et al. 1993, Cadranel et al. 2000). Karaciğer biyopsisi en iyi ellerde bile düşük oranda da olsa kanama ve infeksiyon oluşumunu içeren bazı komplikasyonlar ile ilişkilendirilir. Karaciğer fibrozinin ilerlemesi bireyler arasında belirgin şekilde farklılık göstermekte ve fibrozis evrelendirme sistemlerinde olduğu gibi doğrusal olarak ilerlemeyebilmektedir. Bu nedenle bir kişinin tedavisinin doğru şekilde sürdürülebilmesi için biyopsi uygulamasının belli sürelerde tekrarlanması söz konusudur. Ancak biyopsi maliyeti yüksek bir uygulamadır. Ayrıca karaciğer biyopsisi fibrozisin yorumlanmasında örnekleme hatasına ve değişkenliğine meyilli bir prosedür olup hasta ve hekim için önemli derecede kaygı yaratır ve fibrotik süreçte sadece statik bir fikir verir (Bedossa and Poynard 1996). Tüm bu nedenlerle, karaciğer fibrozisinin

evrelendirilmesinde altın standart olarak kabul gören biyopsiye alternatif olarak geliştirilmekte olan ve serum biyokimyasal belirteçlerle yapılan çeşitli testler bilinmektedir.

Biyopsiye alternatif olarak geliştirilmekte olan karaciğer fibrozisinin seruma dayalı testlerine ilgi son zamanlarda oldukça artmış ve çok sayıda araştırmacı tarafından bazı dizinler geliştirilmiştir. Karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde önerilen biyolojik belirteçlerin bazıları direkt olarak fibrojenez sırasında ESM'de olan modifikasyonlara bağlı olduğundan bunlara "direkt belirteçler" denmektedir. ESM metabolizmasını direkt olarak yansıtmayan hepatik fonksiyona bağlı değişimleri yansıtan belirteçler ise "direkt olmayan belirteçler" olarak adlandırılmaktadır (Friedman 2003, Sebastiani and Alberti 2006). Karaciğer fibrozisinin direkt belirteçleri hyaluronan, laminin, kartilaj glikoprotein 39'u içeren bazı glikoproteinler, prokollojen III, tip IV kollojen gibi kollojen aileleri, kollojenazlar ve onların inhibitörleri ile fibrojenetik süreç ile ilişkili çok sayıda sitokinlerdir (TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ ). Bu belirteçler potansiyel olarak sadece karaciğer fibrozisinin evreledirilmesinde değil aynı zamanda karaciğer fibrojenezinin hızının değerlendirilmesinde de kullanılabilir. Bu belirteçlerin kullanımının en önemli sınırlaması her hastanede rutin olarak ulaşılamamasıdır (Sebastiani 2009). Direkt olmayan belirteçler periferel kandan ölçülebilen biyokimyasal parametrelerdir. Bu belirteçler karaciğer hasarının direkt olmayan ifadeleridir ve karaciğer fibrozisinin evresi ile istatistiksel olarak ilişkilidir. İlk olarak geliştirilen invazif olmayan testlerden biri aspartat transaminaz (AST)- alanin transaminaz (ALT) oranı (AAR) olup kolay ulaşılabilir ve masrafsız bir yöntemdir. Ancak HCV hastalarında yapılan çalışmalar çok değişken sonuçlar vermiştir. Bu çalışmalara göre testin duyarlılığı (sensitivite) %31,5-81,3 arasında değişirken özgüllük (spesifite) %60-83,6 arasında değişim göstermiştir (Giannini et al. 2003, Lackner et al. 2005). Bu dizin dışında, Forns ve arkadaşları (Forns et al. 2002) bağımsız olarak en az iki araştırmacı grup tarafından daha validasyonu yapılan yaş, trombosit sayımı, kolesterol ve  $\gamma$ -glutamiltransferaz (GGT) konsantrasyonu temelli bir dizin geliştirmişlerdir (Patel et al. 2003, Thabut et al. 2003). Daha basit bir dizin olarak AST ve trombosit sayımı (APRI skoru) da Wai ve arkadaşları tarafından önerildi (Wai et al. 2003). İlk defa Imbert-Bismut ve arkadaşları (Imbert-Bismut et al. 2001) tarafından kullanılan ve apolipoprotein A1, haptoglobin, alfa 2-makroglobulin,  $\gamma$ -glutamiltransferaz ve total bilirubin olmak üzere toplam beş biyokimyasal marker içeren algoritma "Fibrotest"

olarak ticarileştirilmiştir. Yine fibrozisnin evrelendirilmesinde kullanılan bir diğer test FIB-4 testidir. Bu test yaş ve AST (U/L) değerlerinin çarpımının trombosit sayısı ve ALT (U/L) değerleri ile hesaplanan bir testtir. Bu testte 1.45'in altındaki değerlerde ileri evre fibrozisi dışlamada negatif prediktif değeri %90 iken 3.25'in üzerindeki değerlerde ileri evre fibrozis tanısı için pozitif prediktif değeri %65 olarak bulunmuştur (Sterling et al. 2006, Vallet-Pichard et al. 2007). Ancak şimdiye kadar bulunan ve biyopsinin yerini almaya çalışan tüm bu kandan "biyomarker" (biyolojik belirteç) elde etme dizinleri fibrozisnin evrelendirilmesinde bazı sınırlamalara sahiptir (Afdhal 2003). Ayrıca bu testlerin hiçbirinin birbiri üzerinde bir üstünlüğü yoktur. Örneğin yaş sınırlaması ile Forns ve arkadaşlarının geliştirdiği dizin, düzenli alkol tüketen, obez hastalar ve HBV veya HIV ile koinfekte olan 65 ve üzeri yaşta hastaları dışlamaktadır. Daha da önemlisi yalnızca %51 hasta tam olarak sınıflandırılabilir iken geriye kalan hastaların skorlama sistemi belirsizdir. Yapılan retrospektif analizlerde ileri evre fibrozisnin teşhisinde Fibrotest'in Forns derecelendirmesinden biraz daha iyi olduğu ve fibrozis derecesi ile daha lineer bir ilişki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Hem Fibrotest hem de Forns derecelendirmesi fibrozis evrelendirmesinde sınırlara sahip ise de Fibrotest ileri evre fibrozisnin teşhisinde daha büyük pozitif öngörü değerine (%90) sahiptir. Ancak bu testlerin hiçbiri fibrozisnin farklı histolojik evrelerini doğru bir şekilde ayırt edememektedir. Fibrotest de büyük orandaki hastayı belirsiz gruba dâhil etmektedir. Bu nedenle bugüne kadar geliştirilmiş olan testlerin hiç biri bir diğerine tek başına bir üstünlük sağlamamaktadır.

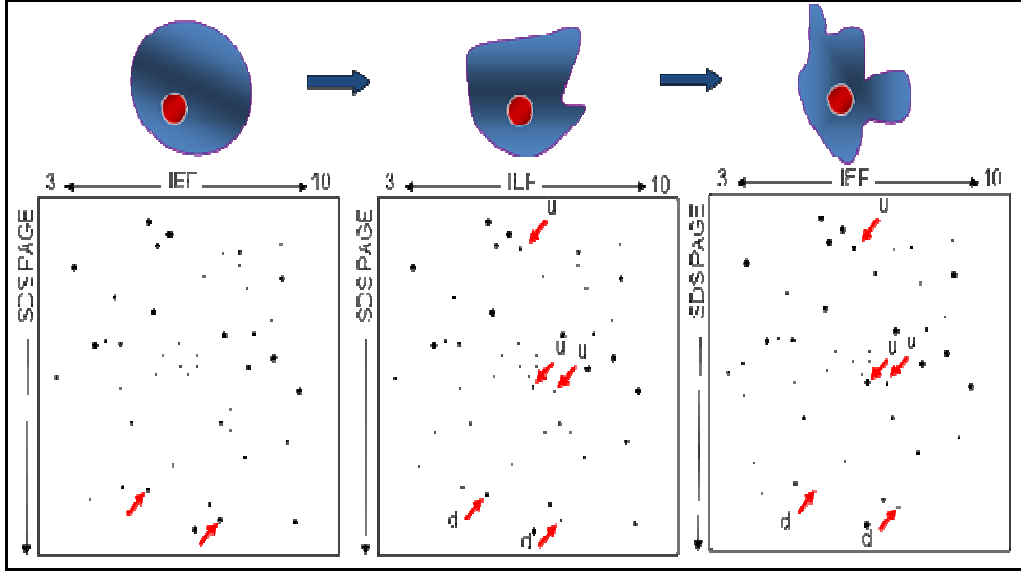
Bugüne kadar oluşturulan sistemlerin çok sayıda hastayı sınıflayamaması aslında pek de şaşırtıcı değildir. Çünkü bu sistemlerin hiç biri gerçekten fibrozisi ölçmemekte fakat hastalığın ilerlemesi ile bağlantılı hepatik fonksiyonun değişimini yansıtmaktadır. Fibrozisnin varlığı ve yaygınlığının en doğru şekilde tayin edilmesi kronik karaciğer hasarı olan hastalarda tedaviyi yönlendirebilmek ve prognozu öngörmek açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle günümüzde uygulanmakta olan klinik ve laboratuvar testlerinden daha iyi bir prognostik doğruluğa sahip invazif olmayan biyolojik belirteçlere önemle ihtiyaç duyulmaktadır. Karaciğer fibrozisnin değerlendirilmesinde invazif olmayan metodların geliştirilmesi ve valide edilmesi ile herhangi yeni bir tedavinin etkisi hızla ve kolaylıkla değerlendirilebilecektir. Bu nedenle klinisyenler karaciğer fibrozisini evrelendirmek ve karaciğer biyopsi tekrarı ihtiyacını sınırlamak için metodlar aramaktadır. Serum belirteçleri hastalığın kesitsel

evrelendirilmesinde yeni yeni ortaya çıkan bir klinik role sahip ise de karaciğer biyopsisinden vazgeçmek için çok sayıda sorunun cevaplanması gerekmektedir. Bugün proteomiks birçok hastalıkta ve hepatoselüler kanseri de içeren birçok kanser tipinde olduğu gibi karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde de belirteçlerin bulunması için etkili bir araç olarak umut vermektedir (Chignard and Beretta 2004, Yokoyama et al. 2004).

#### **1.4. Proteomik Yaklaşımlar**

Klinik proteomiksin temel amaçları hastalığın erken teşhisi veya farklı aşamalarını invazif olmayan yöntemlerle belirleyebilmek için biyolojik belirteçler bulmak ve tedaviye müdahale edebilmek amacıyla potansiyel hedefler belirlemektir. Biyolojik belirteç iki ya da birden fazla biyolojik durum için (örneğin; hastalık durumuna karşı sağlıklı durum) miktara bağlı olarak değişebilen madde veya molekül (örneğin; peptid veya protein) olarak tanımlanabilir (Şekil 1.2.). Bir biyolojik belirteç fizyolojik veya patolojik bir durumu gösteren biyolojik bir parametredir. Biyolojik belirteç araştırma çalışmalarında izlenen basamaklar beş aşamada özetlenebilir; klinik soruyu tanımlama ve kontrol - hasta gruplarının seçimi olmak üzere araştırmanın tasarlanması aşaması, hasta ve kontrol gruplarında farklı eksprese olan proteinleri ve moleküler ağırlıklarını doğru saptama aşaması olan buluş aşaması (aday belirteç/lerin belirlenmesi), daha geniş sayıda hasta ve kontrol grupları kullanarak prediktif değeri en iyi biyolojik belirteç/leri bulma aşaması olan validasyon aşaması, biyolojik belirteç proteinin eldesi ve purifikasyonu aşamalarını içeren tanımlama aşaması ve validasyonu yapılmış biyolojik belirteç/ler ile kantitatif testlerin geliştirilmesi aşamaları ile test geliştirme aşamasıdır.





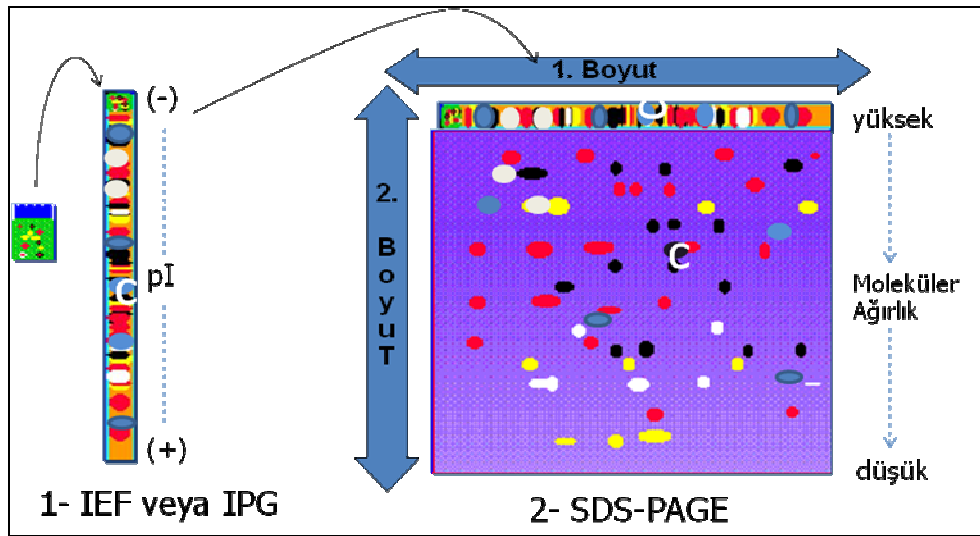
**Şekil 1.2.** İki boyutlu jel elektroforezi ile artan ve azalan proteinlere (biyolojik belirteç) örnek “u” ile gösterilen noktalarda ifade artışı (“upregulation”) ve “d” ile gösterilen noktalarda ifade azalışı (“downregulation”) gösterilmektedir.

Belirteçler veya belirteçler topluluğu hastalığın başlangıcının veya hastalığın seyrinin, hastaların komplikasyonlar geliştirme risklerine göre tabakalaşmasını ve böylece hastalığın hem gidişatını ve ilerleyişini hem de tedavi amaçlı müdahalenin istenmeyen potansiyel etkisinin tahminini kolaylaştırmalıdır (Weston and Hood 2004). Bu bağlamda 10,000 değişik proteine kadar plazma veya serum çalışmaları dikkat çekmektedir ve bilim adamları için önem kazanmaktadır (Wrotnowski 1998). Analizler gereksiz yapılan işler değildir çünkü bu proteinlerden %0,2’si kadar az bir kısmı plazma veya serumun total protein içeriğinin %99’unu oluşturur ve geriye kalan %99,8 proteinin konsantrasyonu  $10^{-3}$  Molar (M)’dan  $10^{-12}$  M’ye kadar değişiklik gösterir. Bu durum plazma/serum proteomunun analizi için herhangi bir yönteme büyük bir talep oluşturmaktadır. Örneğin albumin mikrogram düzeyinde bulunurken aynı zamanda az miktarda bulunan bir protein femtogram ( $10^{-9}$  mikrogram) aralığında ölçülebilir. Çok düşük miktarda bulunan peptit ve proteinlerin bulunmasının önemi çok sayıda çalışmada defalarca tartışılmıştır (Basso et al. 2002, Petricoin et al. 2002a, Jang et al. 2004). Plazma/serum proteomunun düşük konsantrasyonu nedeniyle saptaması zor olan henüz bulunamamış, karakterize edilmemiş ve değerlendirilememiş çok sayıda biyolojik belirteci içerdiği varsayılabilir (Liotta et al. 2003).

“Proteom” kelimesi İlk olarak 1994’te Avustralyalı araştırmacı Marc R Wilkins tarafından, bir organizmanın genomu tarafından eksprese edilen proteinlerin tümü

olarak tanımlanmıştır. Proteom, bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir anda bulunan proteinlerin tümünü ifade eder. Proteomun analiz edilmesi olarak da kısaca tanımlanabilen “proteomiks” ifadesi ise pratikte, geniş çaplı protein ayırma ve tanımlama tekniklerinin kullanılması ile yapılan proteom çalışması olarak tanımlanmaktadır. Proteomiks; biyoloji, biyoinformatik ve protein biyokimyasını içeren disiplinler arası bir bilim dalıdır. Hastalıkların tanımlanması ve tedavi geliştirmede yaygın olarak kullanılan genetik tekniklere ek olarak gelişen proteomik teknikler araştırmacılar için büyük bir umut ışığı olmuştur.

Proteomiks, iki boyutlu (2D) jel elektroforezi, görüntüleme analizi, kütle spektrometresi, amino asit dizi analizi ve biyoinformatik gibi gelişmiş tekniklerin birleşimini kullanmaktadır. Proteomiks alanındaki gelişmeler iki boyutlu jel elektroforezinin 1975 yılında kullanımıyla başlamıştır (O’Farrell 1975). Kompleks protein ve karışımlarının ayrılması ve karakterizasyonunda kullanılan bu yöntem ile proteinler birinci boyutta yüklerine göre ayrılırken ikinci boyutta moleküler kütlelerine (Dalton, Da) göre ayrılmaktadır (Şekil 1.3.).



**Şekil 1.3.** İki boyutlu (2D) jel elektroforezi; IEF: İzoelektrik fokuslama, IPG: İmmobilize pH gradyanı

Proteomiks çalışmalarındaki anahtar gelişme ile bir elektrik veya manyetik alanda yüklenmiş parçacıkların hareketi temeline dayanarak moleküllerin moleküler ağırlıklarını analize imkân sağlayan kütle spektrometresi (MS) tekniği geliştirilmiştir. İyon kaynağı, kütle analizör ve detektör olmak üzere üç bileşenden oluşan kütle spektrometresi, analiz edilecek maddelerin kütle/yük (“mass to charge” [m/z])

oranlarını kantite etmek için kullanılır. Bu kantitasyondan kütle belirlenir ve bu kütleyle sahip protein tanımlanır. Yüksek duyarlılıktaki kütle spektrometresi tekniği ile ayrıştırılmış proteinlerin tanımlanması yapılabildiği gibi direkt karmaşık biyolojik örnekler kullanılarak da proteinler tanımlanabilmektedir. Protein gibi büyük biyomolekülleri oldukça duyarlı biçimde kolayca iyonize edebilen ve kütle spektrometresinde iyon kaynağı olarak kullanılan iki temel yöntemden biri olan MALDI (“Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation”) 1988 yılında Karas ve Hillenkamp tarafından sunuldu (Karas and Hillenkamp 1988). MALDI, ışığı absorbe eden bir matriks varlığında analizi yapılan molekülün yüzeyden kopma ve iyonizasyonu için gerekli enerjiyi lazerden kullanan bir çarpma iyonizasyon tekniğidir. Bu iyonizasyon tekniğinde her bir lazer atışında oluşan iyonların ayrılması ve çözülmesi için bir atış analizörüne ihtiyaç vardır. Bu nedenle MALDI ile rutin olarak kullanılan iyon ayırıcı kütle analizörü, iyonların ağırlıklarıyla doğru orantıda bir süre içerisinde detektöre ulaşmasını sağlayan “time of flight-uçuş süresi” (TOF) analizördür. Kütle spektrometresinde kullanılan ve MALDI’den daha kompleks diğer bir yöntem temel iyon kaynağı elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniğidir. ESI tekniği analit ve çözücü molekülleri içeren akışkanın ince kapillerde yüksek voltaj ve atmosferik basınçta dağılması temeline dayanmaktadır. Bu sistemde yüklü peptidler, vakum koşulu altında geçer ve kütle/yük oranlarına göre elektrik alanda ayrışırlar. Bu teknolojilerin sağladığı en önemli avantajı ardı ardına kütle spektrometresi uygulanabilmesidir (MS/MS). MS/MS teknolojisi MALDI-TOF MS’den daha avantajlı olarak peptitlerin dizi bilgilerinin yani peptit parmak izinin belirlenmesini ve böylece proteinin daha duyarlı olarak tanımlanmasını sağlar. MS/MS spektrasi hem elektrosprey iyonizasyon-MS (ESI-MS) hem de MALDI-MS ile elde edilebilir. MALDI-MS nispeten daha basit peptit karışımlarının analizinde kullanılırken karma sıvı kromatografi ESI-MS sistemi (LC-MS) daha karmaşık örneklerin analizinde tercih edilmektedir.

Proteomiks alanında son teknolojinin gelişmesini sağlayan ve protein çip biyolojik belirteç sisteminin temelini oluşturan “Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization” (SELDI) kavramı 1993’de Hutchens ve Yip tarafından sunulmuştur (Hutchens and Yip 1993). Ciphergen tarafından geliştirilmiş olan SELDI ProteinÇip Sistemi’nin 4000 serisi bireysel (Şekil 1.4.1.) ve kurumsal (Şekil 1.4.2.) versiyonları olmak üzere iki tiptir ve bu sistemler ProteinÇip okuyucusu, ProteinÇip

dizinleri ve CIPHERGENExpress bilgisayar yazılımı olmak üzere toplam 3 bileşenden oluşur.



Şekil 1.4.1. Bireysel SELDI ProteinÇip Sistemi



Şekil 1.4.2. Kurumsal SELDI ProteinÇip Sistemi

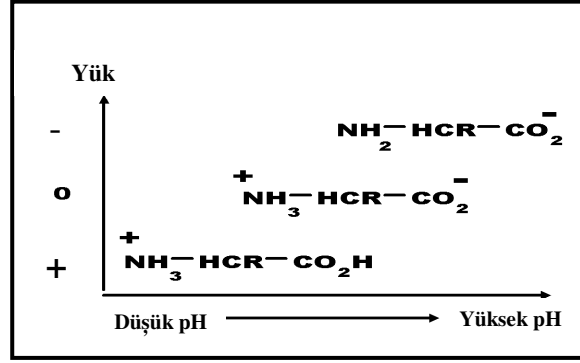
SELDI-TOF kütle spektrometrisi (MS) “ProteinChip” teknolojisi, binlerce farklı protein içeren serum/plazma, doku homojenizatları ve hücre lizatları gibi kompleks protein kompozisyonlarını ayrıntılı şekilde belirleyebilmekte ve az miktarda bulunan proteinleri de ayrıştırarak saptayabilmektedir. Protein çip teknolojisinde uygulanan ayrıştırma tekniği 2D jel elektroforezi teknolojisinde uygulanan birinci boyut ayırma olarak bilinen izoelektrik fokuslamadır. Bu aşamada analiz edilecek örnek (serum, plazma, hücre lizatları, vücut sıvıları) iyon değişim (“ion exchange”) ayrıştırmaya tabii tutularak farklı pH’larda elde edilir. Farklı pH’larda elde edilen proteinlerin değişik kimyasal yüzeye sahip proteinçip “array”lere bağlanma eğilimi proteinlerin izoelektrik noktalarına bağlı olarak değişecektir. Protein çip teknolojisinde uygulanan bu ayrıştırma tekniği 2D jel elektroforezi teknolojisinde uygulanan birinci boyut ayırma olarak bilinen izoelektrik fokuslamadır. Farklı pH’lara ayrılan örnekler daha sonra ikinci boyut analizlemeye tabii tutularak hidrofobik (H50), anyonik (WCX-CM10), katyonik (SAX-Q10) ve metal (bakır, çinko vb.) bağlama (“Immobilized Metal Affinity Capture”-IMAC30) özelliğine sahip farklı kromatografik özelliklere (kimyasal yüzey) sahip çiplere uygulanır (Şekil 1.5.).



**Şekil 1.5.** SELDI-TOF MS çip dizinleri

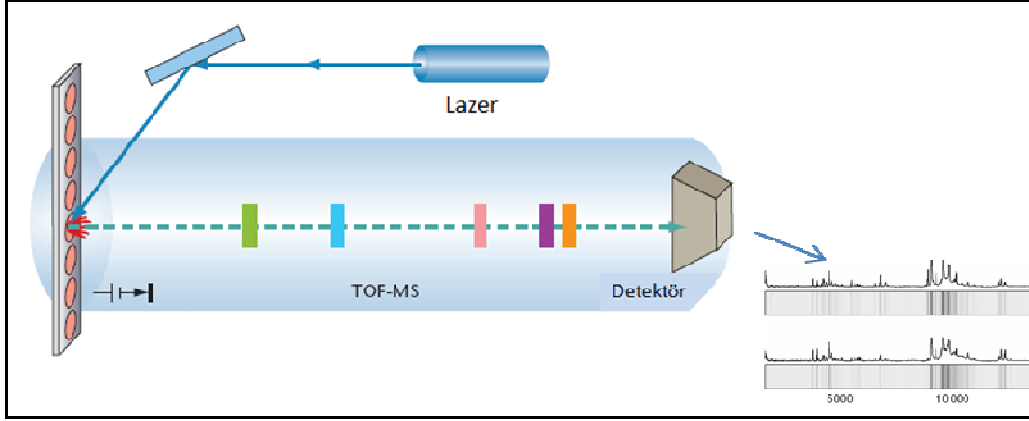
Çeşitli örnekler, SELDI protein çip dizinlerine (“array”) tuzlar ve deterjanlar gibi diğer kütle spektrometri metodlarında problem yaratan moleküllere herhangi bir ön uzaklaştırma yapılmaksızın direkt olarak uygulanabilmektedir. Örnekteki proteinler ve peptitler kovalent olmayan bağlarla çip yüzeyine biyokimyasal özelliklerine bağlı olarak bağlanır. Bu nedenle kullanılan çip dizininin yüzey özelliklerine bağlı olarak örneklerin çiplere yüklenmesinde kullanılan tampon’un pH değeri de önem kazanmaktadır. Her protein özel bir pH değerinde eşit sayıda pozitif ve negatif yük içerir ki bu değere izoelektrik noktası (pI) denir ve bu noktada proteinin net yükü sıfırdır. Bir proteinin pI değeri asidik ve bazik fonksiyonel gruplarının sayısına bağlı olarak değişir. Protein pI değerinden düşük pH’da bir tampon ile muamele edildiğinde pozitif yük kazanır ( $[\text{COO}^-] < [\text{NH}_3^+]$ ). Tam tersi bir durumda pI değerinden yüksek pH’daki bir tampon ile muamele edildiğinde protein negatif yük kazanır ( $[\text{COO}^-] > [\text{NH}_3^+]$ ) (Şekil 1.6.). Böylece özellikle biyolojik belirteç araştırmalarında sık kullanılan SELDI-TOF MS teknolojisi ile protein içeriği bilinmeyen örnekler için kullanılan çipin kimyasal özelliğine bağlı olarak örnekler farklı pH’daki tamponlarla muamele edilerek çip yüzeyine bağlanma sağlanmaktadır. Örneğin asidik proteinler kuaterner amonyum grupları içeren katyonik yüzeye (Q10 çipi), bazik proteinler pozitif yükleri ile anyonik karboksilat grupları içeren anyonik yüzeye (CM10); histidin, triptofan, sistein ve fosforlanmış aminoasitlerini içeren proteinler aktif yüzeyinde nikel, bakır, demir ve çinko gibi polivalent katyonik metalleri şelatlayan nitriloasetik asit (NTA) gruplarını içeren IMAC çipine bağlanmaktadır. Bağlanmayan proteinler ve peptitler gibi tuzlar, deterjanlar ve diğer kontaminantlar fosfatlı tuz tamponu (PBS) gibi basit tamponlarla yıkanır ve uzaklaştırılır. Yüzeyde bağlı kalan peptit-proteinler protein çip okuyucuda analiz edilir. Bu teknoloji ile ayrıca PS10, PS20 ve RS100 gibi aktive edilmiş yüzey dizinleri kullanılarak karmaşık biyolojik örnekten araştırılan

biyomoleküllerin kovalent olarak sabitlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu dizinler, antikor-antijen, reseptör-ligand, nükleik asit bağlanma proteini çalışmaları ve özgül protein çiftlerinin bulunması gibi çalışmalar için kullanılmaktadır.



**Şekil 1.6.** Farklı pH'larda proteinlerin farklı yük kazanması

SELDI-TOF MS sistemi de MALDI-TOF MS teknolojisi gibi uçuş süresi (TOF) tekniği ile peptit ve proteinlerin kütle/yük oranlarının kesin ölçümüne dayanan bir tekniktir. Çip dizininde bulunan protein bağlanmış noktalara yapılan lazer atışı ile peptit-proteinler iyonize olarak vakum tüpte uçurulur ve detektöre ulaşarak bilgisayar programında bir profil oluştururlar (Şekil 1.7.). Moleküllerin lazer atışı ile çip üzerinden kopmasını ve iyonize olmasını sağlayan enerji abzorbe edici moleküller (EAM) kullanılır. Çiplere proteinler bağlandıktan ve yıkama yapıldıktan sonra EAM eklenir ve örnekle beraber kristalize olur. Bu moleküllerin en önemli özellikleri örnek spektrumu ile karışmaması ve lazer dalga boyunda yüksek molarda emicilik göstermesidir. Son yıllarda birçok hastalık için özellikle biyolojik belirteç araştırma çalışmalarında kullanılan SELDI-TOF MS Protein Çip teknolojisi, izole edilmiş veya moleküler ağırlıklarıyla karakterize olarak piklerin kümelenmesi ile oluşmuş protein profillerinin yüksek çözünürlükte belirlenmesini sağlayarak, farklı patolojik durumların oldukça hassas ve anlamlı tekrar edilebilirlikte ayırımına olanak sağlamaktadır.



**Şekil 1.7.** SELDI süreci: Protein çip ve “time of flight” (TOF) - kütle spektrometrisi (MS)

SELDI teknolojisi daha kısa zamanda sonuç almak konusunda birçok çalışmada başarıyla kullanılan 2D jel elektroforezi ve MS teknolojisinden (Young and Tracy 1995) daha avantajlıdır. İki boyutlu jel elektroforezi yaklaşımında, hidrofobik, güçlü asidik veya güçlü bazik proteinlerin ayrıştırılmasının zayıf olması ve düşük miktarlardaki proteinlerin kesin olarak görüntülenememesi gibi bazı sınırlamalar vardır (Lee 2001) ve jel tabanlı metotlardan direkt ve kesin kantitatif bilginin elde edilmesindeki zorluklar SELDI teknolojisinde sorun olmamaktadır. SELDI-TOF MS’in konvansiyonel diğer metotlara göre daha avantajlı olmasının diğer bir nedeni ise daha az miktarlarda örneklerle, örneğin peptitler için femtomolar düzeyinde konsantrasyonlarla, uygulanabilir olmasıdır (Wiesner 2004). Ayrıca diğer analitik metotlarda sorun yaratan tuz ve deterjanların uygun yıkama koşullarında uzaklaştırılması ile SELDI uygulamasında sorun oluşmamaktadır. SELDI’nin örneklerin pasif bir prob üzerinde sunulduğu MALDI’den en temel farkı, örneklerin kütle spektrometrisine ekstraksiyonunda, sunumunda, amplifikasyonunda ve iyonizasyonunda aktif rol oynayan bir yüzeyde sunulmasıdır. SELDI teknolojisi ayrıca MALDI-TOF MS’den farklı olarak proteinlerin ayrıştırılması ve seçilmesi için 2D jel elektroforezi uygulamasını gerektirmeyen ve biyolojik belirteç bulma çalışmalarında küçük molekül ağırlığındaki proteinlerin ayırımında daha etkin kullanılan bir teknolojidir.

Proteomiks teknolojisindeki önemli gelişmeler ile kandaki protein kompozisyonunun ayrıntılı şekilde belirlenebilmesi karaciğerin fibrojenik aktivitesini daha doğru bir şekilde yansıtabilecektir. Karaciğer proteomunun daha iyi anlaşılması ve çalışmaların hız kazanması için İnsan Proteom Organizasyonu (HUPO) tarafından ilk

olarak 2002 yılında İnsan Karaciğer Proteom Projesi (HLPP)'nin başlaması fikri ortaya atılmıştır. HUPO HLPP'nin bilimsel amaçları arasında; sağlık ve hastalık durumlarında insan karaciğer protein bileşenlerinin karşılaştırmalı analizinin yapılması, protein lokalizasyonunun belirlenmesi ve hücre içi proteom profilinin çıkarılması, karaciğer protein-protein etkileşimlerinin karşılaştırmalı analizinin yapılarak karaciğer proteom ağının oluşturulması, karaciğer proteomunun post-translasyonel modifikasyonlarının sistematik analizinin yapılması, biyolojik belirteç bulunması amacıyla veritabanları elde etmek için Karaciğer Proteom Projesinin Plazma Proteom Projesi ile desteklenmesini ve veri tabanlarının oluşturulması bulunmaktadır (HUPO Human Liver Proteome Project).

SELDI-TOF MS kullanılarak yapılan invazif olmayan biyolojik belirteç arama çalışmaları son yıllarda oldukça hız kazanmış ve kronik karaciğer hastalarında yapılan çalışmalar özellikle HCC için belirteç aramayı amaçlamıştır. Karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesi için biyolojik belirteç arama çalışma sayısı çok olmamakla beraber yapılan çalışmalar SELDI'nin bu amaç için uygun bir teknoloji olduğunu göstermiştir. Biyopsiye alternatif olarak geliştirilmekte olan karaciğer fibrozisinin seruma dayalı testlerin karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde yeterli bulunmaması ve bu testlerin biyopsi uygulamasının önüne geçememiş olması SELDI teknolojisi ile yapılan yeni belirteçlerin aranması çalışmalarına önem kazandırmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı takip edilmediği sürece karaciğer sirozu ve kanserine kadar ilerleyebilen karaciğer fibrozisinin farklı evreleri için özgül biyolojik belirteçlerin kan örneğinde (serum) araştırılmasıdır. Belirlenen ayırt edici proteinler potansiyel belirteç olma özelliğindedir ve bu aday proteinler çok sayıda hasta ile yapılacak olan ileri validasyon çalışmaları için önem kazanmaktadır. Kan örneğinden elde edilen belirteç/ler invazif bir altın standart olan biyopsinin yerini alabilecek ve hastanın takibi kolaylaşarak uygun tedavi başlatılabilecektir. Teşhis yönünden sağlanabilecek kolaylıkların yanı sıra fibrozisin farklı evrelerinde etkili aday protein veya peptitlerin bilinmesi anti-fibrotik çalışmalar için de ilerlemeler sağlayabilecektir.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

SELDI-TOF MS teknolojisinin, günümüzde uygulanmakta olan klinik ve laboratuvar testlerinden daha iyi bir prognostik doğruluğa sahip, teşhisi kolay, düşük maliyeti olan ve invazif olmayan biyolojik belirteçlerin bulunmasında bir umut ışığı olduğu söylenebilir. SELDI protein çip biyolojik belirteç araştırma sistemi; prostat (Adam et al. 2002.), over (Petricoin et al. 2002b) ve meme (Li et al. 2002) gibi birçok kanser çeşidinde tekli veya çoklu tümör spesifik belirteçlerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu teknoloji ile dünyada her yıl bir milyondan fazla insanın ölümüyle sonuçlanan karaciğer hastalıklarının teşhisinin ve tedavisinin doğruluğunu ve kesinliğini artıracak çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Protein çip teknolojisi kullanılarak siroz (Zhu et al. 2004, Jiefeng et al. 2007) ve özellikle hepatoselüler kanserin (Poon et al. 2003, Zinkin et al. 2008, Cheng et al. 2009) erken ve kolay teşhisi amacıyla yeni biyolojik belirteçlerin bulunması için günümüze kadar çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar karaciğer hastalıklarının takibini ve tanısını kolaylaştıracak serum biyolojik belirteçlerin bulunmasında protein çip teknolojisinin mümkün bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

SELDI teknolojisi ile serum örnekleri kullanılarak karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde biyopsiye alternatif olarak geliştirilebilecek biyolojik belirteçler araştırılmıştır. Poon ve arkadaşları SELDI-TOF MS protein çip teknolojisini kullanarak, kronik hepatit B virüsü pozitif hastalarda karaciğer fibrozisinin ve sirozun değerlendirilmesinde biyolojik belirteçler araştırmıştır (Poon et al. 2005). Poon ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma, her yıl %1-4 sirozlu kronik hepatit B hastasının primer karaciğer kanseri geliştiriyor olması (Befeler 2002) nedeni ile toplam 46 HBV'li hastanın serum örnekleri ile yapılmıştır. Hastalar Ishak skorlama sistemine göre toplam 5 gruba ayrılmıştır. On hasta minimal fibrozis (Ishak skor=1), 9 hasta hafif ("mild") fibrozis (Ishak skor=2), 10 hasta ılımlı ("moderate") fibrozis (Ishak skor=3 veya 4), 8 hasta siroza giden ileri evre fibrozis (Ishak skor=5) ve 9 hasta belirgin siroz (Ishak skor=6) olmak üzere toplam 46 hasta çalışmaya alınmıştır. Bu çalışmada hastalardan alınan serum örnekleri farklı pH'larda, pH4 ve pH9, tamponlar kullanarak protein çip teknolojisinde kullanılan anyonik yüzeye (CM10 çip dizinler) uygulanmış ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak proteinlerin optimize edilmiş bağlanma koşullarında anyonik yüzeye bağlanması sağlanmıştır. Her bir örnek çift olarak dizinlere yüklenmiştir.

SELDI-TOF MS okuyucuda proteinler kütlelerine 0,9 kilo Dalton (kDa)'dan 250 kDa'a kadar bir aralıkta ayrıştırılarak profilleri elde edilmiştir. Çiplerin okutulmasıyla elde edilen veriler "Ciphergen Biomarker Wizard" yazılımı kullanılarak farklı evrelerdeki hastalara ait protein spektraları belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Buna göre; pH4'te bağlanmış olan serum örneğinde toplam 383 ve pH9'da 411 proteomik özellik bulunmuştur. Bu proteomik özelliklerden toplam 81 tanesinin protein miktarı hasta gruplarında farklılık göstermiştir. Bu 81 proteomik özellikten 6 tanesi fibrozis evresiyle doğru orantılı olarak artış gösterirken, 24 tanesi negatif olarak ilişkili bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Ancak belirlenen bu proteomik özellikler validasyon çalışması ile geliştirilmemiş ve aday proteinler tanımlanmamıştır. Bu çalışmada bulunan fibrozis ile ilişkili proteomik özellikler fibrozisli hastalarda sadece anlamlı oranda düşük ya da yüksek miktar göstermemekte, ayrıca fibrozisin şiddetiyle de anlamlı ilişki göstermektedir. Aynı çalışmada bu serum proteomik belirteçler ile karaciğer fibrozisinin belirlenmesinde kullanılabilecek "artificial neural network" (ANN) modeli oluşturmak amaçlanmıştır. Yine Poon ve arkadaşları tarafından daha önce HCC için yapılan çalışmalarda (Poon et al. 2001, Poon et al. 2003) da geliştirilen ANN modeli bu çalışmada karaciğer fibrozisinin belirlenmesi için iki şekilde geliştirilmiştir. Model 1 yalnız proteomik veriyi kullanırken, Model 2; yaş, cinsiyet, trombosit sayısı, lökosit sayısı, hemoglobin, etkinleştirilmiş kısmi tromboplastin zamanı, uluslar arası normalize edilmiş oran ve bilirubin, total protein, albumin, alanin transaminaz (ALT), alkalın fosfataz (ALP), ve alfa-fetoprotein yoğunluklarını da içermektedir. Ishak skorları ve ANN fibrozis dizini arasındaki ilişki "Spearman sıralama ilişki" testi kullanılarak yapılmıştır. Her iki ANN modeline göre Ishak skorları ile ANN fibrozis dizini arasında güçlü pozitif bir ilişki vardır (model 1,  $r=0,831$ ,  $P=0,0005$ ; model 2,  $r=0,861$ ,  $P=0,0005$ ). Bu bulgular ANN fibrozis dizininin fibrozis evreleriyle yüksek ilişki gösterdiğini ve farklı fibrozis evresine sahip hastalarda anlamlı şekilde farklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu dizin ile fibrozis evresi arttıkça fibrozisin evrelendirilmesindeki kesinliğin de arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmadaki tüm ileri evre fibrozis (Ishak skoru  $> 4$ ) hastaları doğru tanımlanmıştır. ANN fibrozisi dizini sirozun tanımlanmasında %94 duyarlılık ve %86 özgüllük göstermiştir. "Receiver Operating Characteristic" (ROC) kavis analizi ALT, total protein, bilirubin, hemoglobin ve uluslar arası normalize edilmiş oran girdi değişkenleri olarak eklendiğinde (model 2) ANN modelinin tahmin performansını artırmaktadır ve fibrozis ve siroz için  $>90$  kesinlik vermiştir. Poon ve

arkadaşları tarafından yapılmış olan bu çalışmanın sonuçları fibrozis ilişkili proteomik modelin karaciğer fibrozisinin ve sirozun tanımlanmasında yararlı bir araç olduğunu göstermiştir. Fakat bu modelin kronik hepatit B'li hastalarda kullanımının valide edilmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Göbel ve arkadaşları tarafından 2006 yılında kronik HCV hastalarında yapılan diğer bir SELDI-TOF MS çalışmasında, hafif karaciğer fibrozisinin (F1-F2), karaciğer sirozunun (F4) ve HCC'nin birbirinden ayırt edilmesi için tekli ve çoklu protein belirteçleri araştırılmıştır (Göbel et al. 2006). Bu çalışma için toplam 117 kronik hepatit C hastasından serum örneği toplanmıştır. Çalışma için 39 hafif fibrozis (F1-F2) hastası, 44 HCC geliştirmemiş siroz hastası ve 34 sirozlu ve HCC'li olmak üzere 3 hasta grubu oluşturulmuştur. Protein profilleri oluşturulmadan önce serum örneklerine pI'larına göre ayrıştırma yöntemi olan anyon değişim ("exchange") ayrıştırma uygulanmıştır. Bunun için "Expression Difference Mapping Kit" (Ciphergen Biosystems, Fremont, USA.) kullanılarak pH9, pH7, pH5, pH4, pH3 ve organik ayrışım olmak üzere 6 farklı fraksiyon elde edilmiştir. SELDI-TOF MS kullanılarak yapılan ön çalışma ile CM10 çipin diğer çiplere oranla daha fazla ayırıcı pik verdiği görülmüş ve çalışmaya bu çip ile devam edilmiştir. Tüm hasta serumları grup tarafından optimize edilen koşullarda dizinlere yüklenmiş ve SELDI-TOF MS'de analiz edilmiştir. Tüm örneklerin protein pikleri Ciphergen Express yazılımı versiyon 3.0.1 kullanılarak kümelenecek ve "Biomarker Patterns" yazılımı versiyon 5.0.2 (Ciphergen Biosystems) ile karar ağacı sınıflandırması yapılmıştır. Hafif HCV fibrozisli grup (F1,F2) ve HCV-sirozlu hasta (F4) grubu karşılaştırmasında p değeri <0,05 veren istatistiksel olarak anlamlı 22 pik bulunmuştur. HCV-sirozlu (F4) ve HCC hastalarının oluşturduğu iki grup karşılaştırıldığında ise p<0,05 veren istatistiksel olarak anlamlı 17 protein piki farklı olarak bulunmuştur. Karar ağacı kullanılarak analiz yapıldığında sirozlu hasta grubunun F1, F2 fibrozisli hasta grubundan 5 peptit/protein içeren çoklu belirteç paterni (2873, 6646, 7775, 10 525 ve 67 867 Da) ile ayrıldığını göstermişlerdir. Bu sonuç için çalışma ("training") grubu 100% özgüllük (spesifite) ve %85 duyarlılık (sensitivite) (AUROC 0.976) ve rastgele test örnekleri için %80 duyarlılık ve %67 özgüllük göstermiştir. HCC ve HCV-siroz hasta grupları karşılaştırıldığında 4 peptit/protein çoklu belirteç paneli (7486, 12 843, 44 293 ve 53 598 Da) bulunmuştur. Çalışma grubu %100 duyarlılık ve %85 özgüllük ile ve rastgele test örnekleri %68 duyarlılık ve %80 özgüllük ile HCC'nin sirozlu hastalardan ayrılabilceğini göstermiştir. Ayrıca bu aday belirteçlere

APRI skoru ve alfa-fetoprotein (AFP) değerlerinin de birleştirilmesi ile teşhisin doğruluğunun arttığı görülmüştür. HCV-siroz hastalarında fibrozisli hastalara oranla belirgin şekilde azalma gösteren 6646 Da piki için tanımlama çalışması yapılmış ve bu pikin apolipoprotein C-I olduğu bulunmuştur. Apolipoprotein A-I Fibrotest algoritmasında karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde kullanılan bir parametredir. Apolipoproteinler ayrıca farklı kanser tiplerinde belirteç olarak da kullanılmaktadır (Zhang et al. 2004). Apolipoprotein C-I'in ifadesinin azalışının kolorektal kanser hastalarını sağlıklı kontrollerden güvenilir şekilde ayırt ettiği gösterilmiştir (Engwegen et al. 2006). Apolipoprotein C-I karaciğerde ve az miktarda da ince barsakta sentezlenmektedir. HCC ve sirozdaki düşük miktarının nedeni ise düşük sentezi veya aktive olan proteazlar tarafından yıkımı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak, kronik HCV hastalarında lipit metabolizmasına katılan çok sayıda genin farklı düzenlenmesi daha önce gösterilmiştir (Su et al. 2002). Kolesterolün ve yağasidi biyosentezi yolaklarının HCV replikasyonunda ve infeksiyonunda rol oynadığına dair büyük kanıtlar vardır. Karaciğer steatozu HCV infeksiyonunun tipik özelliği olup (Moriya et al. 1997) HCV kor proteini ve NS5A proteini yağ damlacıkları ve apolipoprotein A-I ve A-II ile ilişkili bulunmuştur (Barba et al. 1997, Shi et al. 2002). Kolesterol düşürücü HMG-CoA inhibitör paravizin ile lipoprotein metabolizmasının engellenmesinin hepatit C ilişkili hepatoselüler kanserli hastalarda hayatta kalma şansını artırdığı (Kawata et al. 2001) ve replikon modelinde yine kolesterol düşürücü bir ilaç olan lovastatin ile HCV replikasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (Ye et al. 2003) Bu nedenle, apolipoprotein C-I'in lipit metabolizmasındaki görevinden (Shachter 2001) başka karaciğer fibrozisi ve kanserojenezde ilave bir patojenik rolün de mümkün olduğu düşünülmektedir. Göbel ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada SELDI-TOF MS teknolojisinin protein patern analizi ile birlikte kronik HCV hastalarında karaciğer sirozunu ve HCC'yi tanımlamakta faydalı bir yaklaşım olduğu görülmektedir. Yine bu çalışma farklı serum belirteçlerinin kombinasyonun karaciğer sirozunun ve HCC'nin erken evre teşhisinde yardımcı olacağını düşündürmektedir ve SELDI-TOF MS teknolojisinin karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde uygun bir teknoloji olduğunu göstermiştir.

Morra ve arkadaşları tarafından SELDI teknolojisi ile yapılan bir çalışmada 191 kronik hepatit C'li hastanın serum örnekleri kullanılmış ve karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde kullanılabilecek potansiyel biyolojik belirteçler araştırılmıştır

(Morra et al. 2007). Bu çalışma ile bulunan yeni proteomik model kesinliği mükemmel olmayan Fibrotest ile karşılaştırılmıştır. Hastalardan alınan biyopsi örnekleri METAVIR skoruna göre evrelendirilmiş ve F2, F3 veya F4 evreleri ileri evre fibrozis olarak tanımlanmıştır. Bu serum örnekleri için alfa 2 makroglobulin, haptoglobulin ve apolipoprotein A1, total bilirubin ve  $\gamma$ -glutamiltransferaz belirteçlerini içeren Fibrotest çalışması ile fibrozis evrelendirmesi de yapılmıştır. Serum örnekleri 3 tip (CM10, Q10, IMAC) protein çip dizinine uygun koşullarda yüklenmiş ve karaciğer fibrozisinin erken teşhisine ve doğru evrelendirilmesine olanak sağlayacak potansiyel serum biyolojik belirteçler SELDI-TOF MS ile analiz edilmiş ve gösterilmiştir. Fibrozisin METAVIR skoruna göre evrelendirilmesi sonucunda 20 kişi F0 (%10), 68 kişi F1 (%37), 50 kişi F2 (%26), 25 kişi F3(%13) ve 28 kişi F4 (%14) evresinde bulunmuştur. F2, F3 ve F4 evrelerinde oluşan ileri evre fibrozis prevalansı %54 (n=103) bulunmuştur. SELDI ile yapılan analiz sonucuna göre 8 birbirinden bağımsız pik yoğunluğu fibrozisiz veya hafif fibrozisli bireyler ile ileri evre fibrozis hastaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir. Bu sonuçlara ileri evre fibrozis varlığında 3 farklı pikin (CM10-5784, CM10-6979, IMAC-8922) yoğunluğu artmış ve 5 pikin (CM10-4520, CM10-10226, CM10-34324, Q10-13905, Q10-37338) yoğunluğu azalmıştır. Sekiz pikin çok değişkenli modelde kombinasyonu ileri evre fibrozisin tahmininde Fibrotest'e göre daha yüksek kesinlikte bir dizin oluşturmuştur. Ayrıca seçilen 8 pikten 7'si FibroTest skor ile yüksek derecede ilişkili bulunmuştur (P<0,01). Bu 7 pikten 4'ü FibroTest'in 5 bileşeni ile negatif ilişki, 3'ü pozitif ilişki göstermiştir. Sonuç olarak Morra ve arkadaşlarının SELDI-TOF MS ile yapmış oldukları bu çalışma ile 8 proteomik karakterin kombinasyonu kronik hepatit C hastalarında ileri evre fibrozisin teşhisinde kesinliği Fibrotest'ten daha yüksek bir referans biyolojik belirteç olarak bulunmuştur.

SELDI-TOF MS kullanılarak karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesi için yapılan çalışma sayısı 3 ile sınırlı iken, yapılan çalışmaların çoğu kronik hepatit hastalıklarının ileri aşaması olan hepatoselüler karsinom ve sirozun tanımlanması için biyolojik belirteç bulunması amacı ile yapılmıştır. Zhu ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bir SELDI çalışmasında kronik HBV'li sirozlu ve HCC'li hasta grupları ve sağlıklı kontrol gruplarının serum profilleri karşılaştırılmıştır (Zhu et al. 2004). CM10 çip dizini kullanılarak yapılan çalışmada "Biomarker Patterns" yazılımı kullanılarak %80 duyarlılık ve %81,8 özgüllük ile m/z 7772 ve 3933 olan 2 pik siroz

olmayan hastalarda (sağlıklı kontrol ve HCC'li) bulunurken sirozlu hastalarda görülmemiştir. Cui ve arkadaşları tarafından 2007'de yapılan bir SELDI-TOF MS çalışmasında sağlıklı kontrol grubu ve kronik HBV enfeksiyonu olan sirozlu hasta grubu ve HCC'li hasta grubu serum örnekleri ile biyolojik belirteç araştırma çalışması yapılmıştır (Cui et al. 2007). "Biomarker Patterns" yazılımı kullanılarak HCC ve sağlıklı kontrol grup karşılaştırıldığında %94,8 duyarlılık ve %94,2 özgüllükte, karaciğer sirozu olan hastalar ve sağlıklı grup için %91,6 duyarlılık ve %94,2 özgüllükte ve HBV'li hastalarla karşılaştırıldığında %95,1 duyarlılık ve %94,2 özgüllük veren karar ağaçları oluşturulmuştur. Bu çalışmada 3 terminal nod içeren bir karar ağacı ile sirozlu hasta grubunda 2049,74 Da'luk protein pikinin miktarının azaldığı ve 3166,05 Da'luk pikinin miktarının arttığı gösterilmiştir. Yetmiş yedi hastanın HCC'li olduğu hepatit C ile indüklenmiş karaciğer sirozlu 182 hastada yapılan başka bir çalışmada yine IMAC30 çip dizini ile yapılan SELDI analizi ile HCC'yi tanımlayan proteinler bulunmuştur (Ward et al. 2006). Ward ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bu çalışmada 23/23,5 kDa olmak üzere iki pikin HCC'li hasta serumunda %50 oranında arttığı gösterilmiştir (P<0,001). Bu pikler LC-MS/MS ile tanımlandığında immünoglobulinin kappa ve lambda hafif zincirleri olduğu bulunmuştur. Bu çalışma da kanser geliştiren sirozlu hastaların serum proteomunda değişiklikler olduğunu göstermektedir. Paradis ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 44'ü HCC geliştirmiş, 38'i geliştirmemiş toplam 82 siroz hastasında bu iki grubu karşılaştırarak SELDI-TOF MS ile biyolojik belirteç araştırmışlardır (Paradis et al. 2005). Bu çalışmada toplam 30 protein piki HCC'li ve HCC olmayan sirozlu hastalarda farklı ifade oranı göstermiştir. En yüksek skora sahip 6 pikten oluşturulan bir algoritma HCC varlığını veya yokluğunu test örnek setinde %92,5 hastayı, validasyon setinde %90 hastayı doğru sınıflamıştır. En iyi ayırt edici pik olan 8900 Da piki saflaştırılarak tanımlanmış ve vitronektinin V10 parçacığının C-terminal kısmı olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada hücre kültürü (HepG2) ile yapılan çalışmada HCC dokusunda vitronektin geninin ifadesinin artmadığı görüldüğünden, HCC hastalarında vitronektinin katalitik parçacığının artan düzeyinin enzimlerin aşırı üretimi sonucu yıkıma uğradığını düşündürmüştür. Bu çalışma 8900 Da'luk vitronektinin V10 parçacığının C-terminal parçacığının HCC'nin teşhisinde kullanılabileceği fikrini vermiştir. Zinkin ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları SELDI-TOF MS çalışmasında 41 HCC ve 51 HCV siroz hastasının serum protein profilleri 3 farklı çip dizininde

karşılaştırılmıştır (Zinkin et al. 2008). Siroz ve HCC'yi ayırt eden CM10 çip dizininde 3 protein, IMAC30'da 4 protein ve H50 çipinde 4 protein olmak üzere toplam 11 pik bulunmuştur (%85 duyarlılık, %85 özgüllük). Bulunan 11 pikin HCC'li hastaları HCV'li siroz hastalarından AFP gibi geleneksel olarak kullanılan biyolojik belirteçlerden daha yüksek kesinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bu belirteçlerinde ileri değerlendirmesi gerekmektedir. HBV ile ilişkili hepatoselüler karsinom ve karaciğer sirozunun ayırt edilebilir teşhisi için SELDI teknolojisi ile yapılan bir başka çalışma Wu ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada IMAC protein çip dizinleri kullanılmış ve 29 HCC ve 30 karaciğer sirozlu hasta serumu protein profilleri karşılaştırılmıştır (Wu et al. 2009). Çalışmanın sonucuna göre 45 protein/peptid pikinin iki grup arasındaki miktar farklılığı yüksek özgüllük ve duyarlılıkta gösterilmiştir. IMAC30 (bakır) çipinde HCC ve sirozlu grubu en iyi ayırt eden pik %69 duyarlılık, %83,3 özgüllük ve %80 pozitif prediktif değeri (ppv) ile 3892 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada dikkat çekici bir sonuç olarak serum AFP'si negatif bulunan 6 hasta 3892 piki miktarının artışı ile tanımlanmıştır. Çoklu protein pikleri (m/z= 9297, 29941) ve AFP'nin kombinasyonu HCC'nin tanımlanmasında %82,8 duyarlılık, %93,3 özgüllük ve %92,3 ppv ile tek başına AFP kullanımından daha iyi sonuç vermiştir (P=0,013). Bu sonuçlar 3892 pikinin AFP negatif hastalarda alternatif belirteç, AFP pozitif HCC'li hastalarda ise tamamlayıcı belirteç olabileceğini düşündürmüştür. SELDI-TOF MS ile düşük moleküler ağırlık ve düşük miktarda bulunan HCC ile bağlantılı potansiyel serum proteini bulmak için yapılan bir diğer çalışma Cui ve arkadaşları tarafından yapılmış ve 2008 yılında yayınlanmıştır (Cui et al. 2008). Toplam HBV ve siroz pozitif olan 81 HCC, 36 siroz hastası ve 43 kronik hepatit B hastası kullanılarak yapılan çalışmada CM10 çipi kullanılmıştır. Elde edilen toplam 128 serum protein pikinden 87 tanesinin yoğunluğu HCC ve siroz grubu arasında anlamlı farklılık göstermiştir (P<0,05). HCC grubu serum örneklerinde bu proteinlerden 15 tanesinin 2 katından fazla bir artış, 30 tanesinin ise 2 katından fazla azalış gösterdiği görülmüştür. HCC ve kronik hepatit B hastaları arasında 52 ayırt edici pikten 2 tanesi HCC serumunda 2 katından fazla bir artış, 7 tanesi ise 2 katından fazla azalış göstermiştir. Siroz ve kronik hepatit B grupları karşılaştırıldığında 79 anlamlı pikten 28'inin 2 kat yoğunluk farkı gösterdiği görülmüştür (P<0,05). Bu piklerden 17'si siroz grubunda artış gösterirken 11'i azalış göstermiştir. Çalışmanın ileri analizleri sonucunda bu piklerden HCC serumunda ortak olarak azalış gösteren m/z 2870, 3941,

2688, 3165 ve 5483 pikleri ile HCC ve sirozda ortak olarak yoğunluk artışı gösteren m/z 3588 ve 2017 pikleri ayırt edici pikler olarak seçilmiştir. Seçilen bu 7 ayırt edici pikin HCC teşhisinde yeni biyolojik belirteç adayı olabileceği düşünülmektedir.

Karaciğer fibrozisinde kullanılmak üzere yapılan biyolojik belirteç araştırmaları farklı proteomik teknolojilerinin kullanılmasını da içermektedir. Karaciğer sirozunun teşhisinde etkin belirteçlerin araştırılmasında sıçan serumu kullanılarak yapılan çalışmalardan biri 2004 yılında Xu ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada SELDI-TOF kütle spektrometrisi ve MALDI-TOF/TOF teknolojileri kullanılmıştır (Xu et al. 2004). Normal (n=8), tioasetamid ile indüklenmiş karaciğer sirozlu (n=22) ve safra kanalı ligasyonu oluşturularak indüklenmiş karaciğer fibrozisi (n=5) olan sıçanlardan alınan serum örnekleri CM10 çipinde analiz edilmiştir. Seçilen biyolojik belirteç seti için duyarlılık ve özgüllük %92'den yüksek bulunmuştur ve bu biyolojik belirteçlerden sirozlu sıçan serumunda tutarlı şekilde azalan bir ifade profili gösteren 3495Da proteini MALDI-TOF/TOF çift spektrometri (MS/MS) ile karakterize edilmiştir. Bu analiz sonucu 3495 Da proteinin histidince zengin glikoprotein homolojisi gösterdiği bulunmuştur. Histidince zengin glikoprotein miktarındaki azalış normal karaciğer fonksiyon kaybının bir göstergesi olarak düşünülmüştür.

MALDI-TOF MS teknolojisi ile karaciğer fibrozisinin belirlenmesinde yapılan en önemli çalışmalar serum N-glikoprotein çalışmalarıdır (Morelle et al. 2006, Kam et al. 2007, Ressonrency et al. 2008). Glikolizasyon salgılanan birçok protein için posttranslasyonel modifikasyondur ve serum proteinlerinin glikan bünyesindeki yapısal değişikliklerin karaciğer hasarının bir göstergesi olduğu yıllardır bilinmektedir. N-glikanlar, glikoproteinlerin asparajin rezidülerine kovalent olarak bağlı olan karbohidrat yan zinciri grubudur ve konjenital glikozilasyon defektlerini (Seta et al. 1996, Freze et al. 2005), kronik alkolikleri (Flahaut et al. 2003) ve karaciğer kanserini (Shimizu et al. 1996, Johnson et al. 2000) içeren birçok hastalıkla ilişkilidir. Bu bozukluk hasta serumunda görülebilmektedir (Kumada et al. 1999, Poon et al. 2002 Legros et al. 2002, Helander et al. 2004). Potansiyel tanısal serum glikanları daha önce karaciğer fibrozisi (Callewaert et al. 2004, Morelle et al. 2006), over kanser (An et al. 2006) ve meme kanseri (Kirmiz et al. 2007) için tanımlanmıştır. N-glikan profilinin potansiyel değerinin ortaya çıkarılması için yapılan bir çalışmada karaciğer fibrozisinin ve sirozun tanısında bir serum N-glikan paneli potansiyel belirteç olarak belirlenmiştir (Kam et al.



2007). Potansiyel tanısal değere sahip bu glikanların %82'si (14/17) fibrozisli hastalarda değiştiği bilinen ve karaciğer patofizyolojisini direkt olarak yansıtan serolojik belirteçler ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur. Tanısal 3 N-glikan 1341.5, 1829.7 ve 2130.3 m/z değerini vermiştir ve bunlar fibrozis evresi ile pozitif ilişki göstermiştir. Bu çalışmada yalnızca 46 hasta çalışılmış olması nedeni ile bu sonuçları doğrulamak için daha fazla sayıda hasta içeren çalışmalar gereklidir.

SELDI teknolojisi ile karşılaştırıldığında düşük saptama limiti olan ve hidrofobik veya düşük miktardaki proteinleri saptayamayan 2D jel elektroforezi teknolojisi ile de karaciğer fibrozisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar vardır (Gangadharan et al. 2007, White et al. 2007, Spano et al. 2008). Gangadharan ve arkadaşları tarafında 2007'de yayınlanan bir çalışmada potansiyel biyolojik belirteçlerin araştırılmasında serum örneklerinin protein profilleri 2D jel elektroforezi yöntemi ile karşılaştırılmış ve yeni bazı belirteçler bulunmuştur (Gangadharan et al. 2007). Bu çalışmaya farklı fibrozis evrelerinde HCV'li hastalar ve sağlıklı kontroller dâhil edilmiştir. Proteomik ifade farklılığı en çok siroz ve sağlıklı kontrol grubunda bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren 53 protein LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve SwissProt veri tabanında tanımlanmıştır. Buna göre, sirozlu hastalarda inter-alfa-tripsin inhibitörü ağır zinciri H4 (ITIH4) fragmenti, alfa-1 antişimotripsin, apolipoprotein L1 (Apo L1), prealbumin, albumin, paraoksonaz/arilesteraz 1, ve çinko-alfa2-glikoproteininin azalan ifadesi ve CD5 antijen benzeri protein (CD5L) ve beta-2 glikoproteininin ( $\beta$ 2GPI) artan ifadesi görülmüştür. Yine bu çalışmanın sonuçlarına göre hepatik skarlaşmanın belirteci olan  $\alpha$ 2 makroglobulinin ( $\alpha$ 2M) serum konsantrasyonu hepatik fibrozis ile doğru orantılı olarak artmıştır. Sirozlu hastalarda azalan ifadesi daha önce gösterilen C3 ve C4 komplement fragmentleri miktarının (Calamita and Burini 1995) da bu çalışmada hafif fibrozis ve siroz grubu serumunda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında azaldığı görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda C3 miktarının HBV ile indüklenen hepatitis ve HCC'de de azaldığı daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Steel et al. 2003). Bu belirteçlerin kombinasyonlarının hepatik skarlaşmanın evrelendirilmesinde kullanılabilir olduğu düşünülmüştür ancak bunun için daha fazla sayıda hasta ile validasyon gereklidir. 2D jel elektroforezi ile yapılan bir diğer çalışmada ise, 21 hafif fibrozisli (Metavir evre F0, F1) hasta serumu ve 23 ileri evre fibrozis serumu kullanılmıştır (White et al. 2007). Bu serum örnekleri 2D jel elektroforezi ile karşılaştırıldıktan sonra farklı bulunan

proteinler LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 3 bireysel protein spotunun ileri evre fibrozis hastalarında anlamlı şekilde ifade artışı (alfa 2-makroglobulin, haptoglobin, albumin) ve 4 proteinin (komplement C-4, serum retinol bağlanma proteini, apolipoprotein A-1 ve apolipoprotein A-IV'ün iki izoformu) ise azalış gösterdiği görülmüştür. Bu belirteçlerden haptoglobin, apolipoprotein A-1 ve alfa 2-makroglobulin Fibrotest belirteç panelinde bulunan proteinlerdir fakat diğer 4 tanesi için daha fazla sayıda hasta ile ileri çalışmalar yapılabileceği düşünülmektedir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

Bu tez çalışmasına, Ocak 2007 – Mayıs 2008 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Karaciğer Hastalıkları İzlem Polikliniğine başvuran, kronik HBV veya HCV enfeksiyonu varlığı kanıtlanmış 87 hasta dâhil edilmiştir. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 22 Ocak 2007 tarih ve 106-2759 karar ile izin alınmıştır. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan kişilerden çalışma için imzalanmış aydınlatılmış onam formu alınmıştır.

#### **3.1. Hasta ve Kontrol Grupları**

Çalışmaya, kronik HBV veya HCV enfeksiyonu kanıtlanmış toplam 87 hasta dâhil edilmiştir. Seksen yedi hastadan 13'ü kadın, 17'si erkek olmak üzere toplam 30 HBV enfeksiyonlu ve 33'ü kadın, 24'ü erkek olmak üzere toplam 57 HCV enfeksiyonlu hastalardır. Çalışmaya dahil edilme kriterleri; 18-75 yaş arası HBV veya HCV enfeksiyonları kanıtlanmış ve antiviral tedavi almamış olmaktır. Serum örneği karaciğer biyopsisi ile aynı gün ve karaciğer biyopsisinden önce alınmayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Sağlıklı kontrol olarak çalışmaya alınma kriterleri ise rutin taramalarda karaciğer hasar testleri normal, viral belirteçleri negatif ve karaciğer ultrasonografisi normal olan sağlıklı bireyler olarak uygulanmıştır. Hastalardan alınan karaciğer biyopsi örnekleri Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tek bir patolog tarafından hemotoksilen eozin ve masson trikrom boyama yapıldıktan sonra METAVIR skorlama sistemine uygun olarak evrelendirilmiştir. METAVIR skoruna göre F0 fibrozisin olmadığını, F1 septasız periportal fibrozisi, F2 az septalı periportal fibrozisi, F3 birkaç septalı periportal fibrozisi ve F4 karaciğer sirozunu ifade etmektedir. Buna göre bu çalışmada 24 hasta F0, 22 hasta F1, 10 hasta F2, 8 hasta F3 ve 23 hasta F4 olarak evrelendirilmiştir.

Toplam 87 hasta grubu ve 32 sağlıklı bireyden alınan 1'er biyokimya tüpü (9 ml) kan örneği yarım saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edilerek serum ayrılmıştır. Serumlar 20'şer mikrolitre (µl) olarak alikotlanarak kullanılabilecek kadar hemen -80°C'de saklanmıştır.

### 3.2. Kalite Kontrol (“Quality Control”) Örneği

Sağlıklı bir gönüllüden (E.K.) alınan 4 biyokimya tüpü kan örneği yarım saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika 3500 rpm’de santrifüj edilerek serum ayrılmıştır. Serumlar 20’şer µl olarak alikotlanarak kullanılabildiği kadar hemen -80°C’de saklanmıştır.

### 3.3. SELDI-TOF Kütle Spektrometrisi (MS) ile Analiz

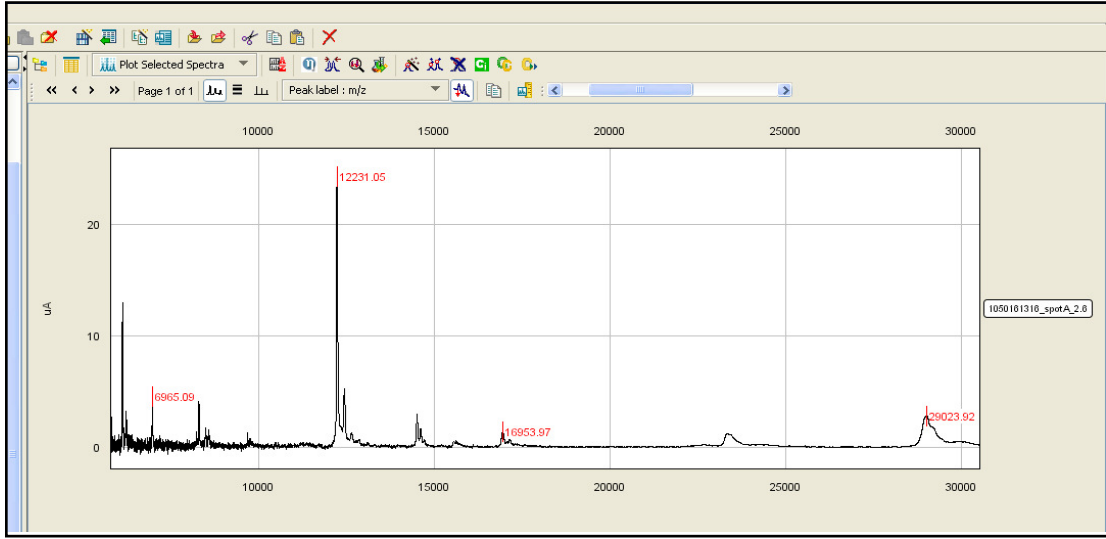
SELDI-TOF teknolojisi sağlıklı ve hasta bireylerden alınan biyolojik örneklerin içerdiği proteinlerin profillenmesi için kullanılmaktadır. Patern tanımlama algoritmaları bir grubu diğerinden ayıran işaretleri belirler ve potansiyel biyolojik belirteçler daha sonra bunların içinden seçilir.

SELDI teknolojisine eleştirel yaklaşımda kütle spektrometrisi stabilitesi ve protein çip performansının tekrarlanabilirliği konularında bazı sorular ortaya çıkmıştır (Baggerly et al. 2004, Diamandis 2004). SELDI sürecinde örnek toplama ve işleme aşamalarında yapılan değişiklikler, gözlenebilir bazı biyolojik farklılıklara neden olabilir. Bu nedenle güvenilir ve tekrarlanabilir ifade paternlerinin belirlenmesi için profillerin kalite değerlendirmesinin gerekliliği açıktır.

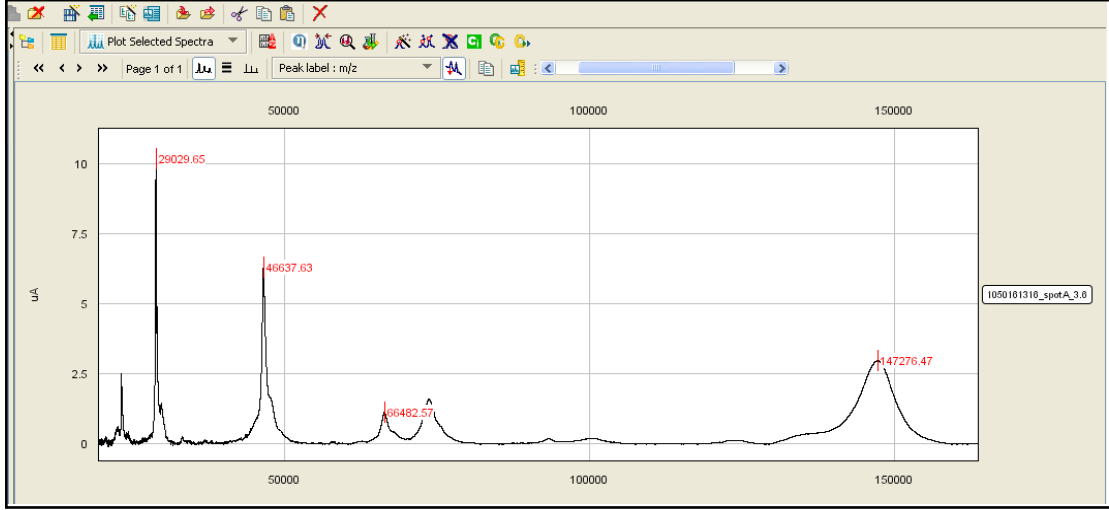
Yapılan birçok SELDI kalite kontrol çalışması, SELDI platformunun tekrarlanabilirliği (Semmes et al. 2005), biyolojik ve teknik tekrarların değişkenliği ve düşük kalitedeki spektraların belirlenmesi, elimine edilmesi (Hong et al. 2005) konularına değinmiştir. Semmes ve arkadaşlarının yaptıkları çok merkezli bir çalışmada kalite kontrol örneği spektrasından seçilen 3 pikin özellikleri kullanılarak cihaz ve deney çıktılarının tekrarlanabilirliği gösterilmiştir (Semmes et al. 2005). Bu nedenle plaka, çip ve spot değişkenliğini belirlemek için her deneyde kalite kontrol örnekleri kullanılmalı ve örnekler çift olarak uygulanmalıdır. Bu çalışmada sağlıklı bir gönüllüden alınan kalite kontrol serum örneği tüm çip dizinlerine uygulanmış ve hem cihazın hem de çiplerin tekrarlanabilirliği ölçülmüştür. Bu çalışmada seçilen 4 pikin kütle/yük oranları (m/z), çözünürlük, yoğunluk ve sinyal/gürültü (S/N) oranı değerlerinin değişim katsayıları yüzdesi (%CV) excelde hesaplanarak ve analiz edilmiştir.

### 3.3.1 Kalibrasyon

Cihazın kalibrasyonu tam kütle ağırlıkları bilinen proteinleri içeren “All-in-One-Protein Standard II” (Bio-Rad) standartları ile her okutma öncesi yapılmıştır. Standart kesin ağırlığı bilinen 7 protein içerir. Bunlardan düşük kütleler için: hirudin rekombinant 6964 Da, cytochrome c (bovine) 12 230 Da, myoglobin (equine) 16 951 Da ve karbonik anhidraz 29 023 Da kullanılırken (Şekil 3.1.) ağır kütleler için karbonik anhidraz 29 023 Da, enolaz (*Saccharomyces cerevisiae*) 46 671 Da, albumin (bovine) 66 433 Da ve IgG (bovine) 147 300 Da proteinleri kalibrasyonda kullanılmaktadır (Şekil 3.2.). Standartlar NP20 çip dizinlerine uygun koşullarda yüklenerek SELDI cihazında okutulmuştur. Cihazın tekrarlanabilirliğini ve okuduğu kütle kesinliğini sağlamak için en az 15 günde bir kalibrasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.1. Protein standardı düşük molekül ağırlıkları



Şekil 3.2. Protein standardı yüksek molekül ağırlıkları

### 3.3.2. SELDI-TOF MS Analizi İçin Örnek Hazırlama

Çalışma öncesinde SELDI için kullanılan IMAC30, CM10, Q10, H50 olmak üzere farklı kimyasal yüzeylere sahip tüm çip dizinlerinde 5'er serum örneği ile bir ön çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya göre en iyi ayırt edici pikleri veren IMAC30 ve CM10 çip dizinleri çalışmanın devamı için seçilmiş ve çalışmaya bu çip dizinleri ile devam edilmiştir. Deney sürecinde daha önce az sayıda hasta ile yapılan pilot çalışma sonucu optimize edilen bağlama süreleri ve uygun pH'daki tamponlar uygulanmıştır.

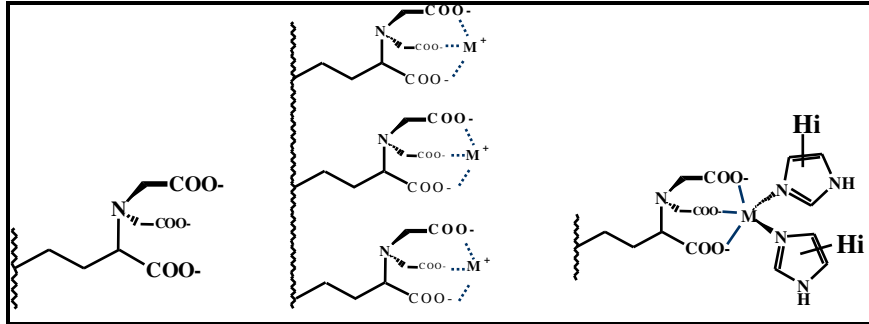
IMAC30 ve CM10 çiplerine serum yüklemesi farklı günlerde elle yapılmıştır. SELDI için kullanılan biyoişlemci ("bioprocessor") toplam 12 çipin taşınmasına olanak sağlamak ve böylece bu tabak içerisinde toplam 96 spot kullanılabilir. Her bir serum için çift spot kullanıldığından ve her bir dizine bir kalite kontrol serumu yüklendiğinden her bir çip türü için çalışma 3 gün sürmüştür ve hergün bir biyoişlemci için çok kanallı pipet kullanılarak yükleme yapılmıştır (Şekil 3.3.). Deney farklılığının olmaması için 3 farklı günde tamponların ve serumların bekletilme yüklenme süreleri aynı tutulmuştur. Yükleme tamamlanan çipler bir gece kurumaya bırakıldıktan sonra ertesi gün SELDI-TOF MS ile okutulmuş ve veriler elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Bir biyoişlemciye çok kanallı pipet ile uygulama

### 3.3.3. IMAC30 Çip Dizinleri İçin Uygulama

IMAC30 çip spotları aktif yüzeyinde nikel, bakır, demir ve çinko gibi polyvalent katyonik metalleri şelatlayan nitriloasetik asit (NTA) gruplarını içermektedir (Şekil 3.4.). Bu spotlara histidin, triptofan, sistein ve fosforlanmış aminoasitleri içeren proteinler bağlanmaktadır.



Şekil 3.4. Nitriloasetik asit (NTA) gruplarının metal ile şelatlanması ve bu yüzeye protein bağlanması

IMAC30 çip türü için 12'si HBV hastası 12'si HCV hastası olmak üzere toplam 24 F0 evresinde, 8'i HBV 14'ü HCV olmak üzere 22 F1 evresinde, 1'i HBV 6'sı HCV hastası olmak üzere toplam 7 F2 evresinde, 1'i HBV 6'sı HCV evresinde olmak üzere toplam 7 F3 evresinde, 7'si HBV 16'sı HCV hastası olmak üzere toplam 23 F4 evresinde hasta ve 29 sağlıklı kontrol (SK) serumu analize dahil edilmiştir (Çizelge 3.1.). Sadece bir kere eritilen hasta, sağlıklı kontrol ve kalite kontrol serum örnekleri -80°C'den çıkarılarak oda sıcaklığında eritildikten sonra kısa bir vorteks uygulanmış ve 1500g'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Serumlar çip dizinlerine uygulanmadan önce U9 denatürasyon tamponundan (9M üre, 2% CHAPS ve 150 mM Tris-HCl, pH 9)

15 µl ve serum örneklerinden 10 µl olmak üzere seyreltilmiştir. Kompleks protein yapılarının denatüre edilerek açılması için serumlar 40 dakika +4°C'de çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılmış, daha sonra 1500g'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve çiplere uygulanana kadar buz üzerinde bekletilmiştir.

**Çizelge 3.1.** IMAC30 için analiz edilen kişi sayısı ve fibrozis evreleri

<b>Evre</b>	<b>HCV</b>	<b>HBV</b>	<b>SK</b>	<b>Toplam</b>
F0	12	12		24
F1	14	8		22
F2	6	1		7
F3	6	1		7
F4	16	7		23
<b>Toplam</b>	54	29	29	

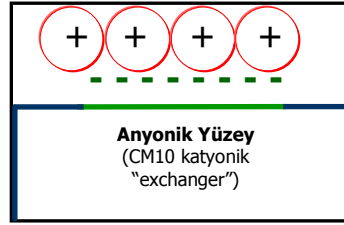
IMAC30 çip spotlarını aktive etmek için 50'şer µl 100mM'lık CuSO<sub>4</sub> (bakır sülfat) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika çalkalanmıştır. Bu işlem 2 kere yapılarak spotların aktive olması sağlanmıştır. Daha sonra spotlar 3 kere 75 µl HEPES (pH 7) ile yıkanarak bağlama tamponu olarak kullanılan PBS'den (fosfatlı tuz tamponu) (pH 7,2) her bir spota 150 µl eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. PBS uygulaması 4 kere tekrar edilmiştir. Denatürasyon tamponu ile denatüre edilen serumun 2,5 µl'si IMAC30 için bağlama tamponu olan 100 µl PBS ile tekrar seyreltilmiş ve sonuçta yaklaşık 1/100 oranında seyreltilen serumlardan 90 µl'si çip spotlarına yüklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak proteinlerin spot yüzeylerine bağlanması sağlanmıştır. Serumlar spotlara yüklenirken fibrozis evreleri bilinmeden rastgele bir sıralama yapılmış ve aynı evrelerin arka arkaya gelmesi engellenmeye çalışılmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrol serumlarının her biri çiftler şeklinde yüklenmiş, cihazın tekrarlanabilirliğini ölçebilmek için ayrıca her çip dizinine kalite kontrol serumu yüklenmiştir. Oda sıcaklığında çalkalanarak yapılan 1 saatlik bağlanma süresinden sonra spotlar tekrar PBS ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin ve tamponun uzaklaştırılması işlemi tamamlanmıştır. Bu işlem 4 kere tekrar edilmiştir. Spotlara enerji absorbe eden molekül (EAM) olan ve büyük moleküllerin kristalizasyonu için kullanılan SPA'dan (sinapinik asit) 2'şer µl eklenerek karanlık bir ortamda çipler 1 gece kurumaya bırakılmıştır. SPA hazırlanırken 125 µl %1'lik TFA (trifluoroasetik asit) ve 125 µl 100%'lük ACN (asetonitril) eklenerek 5 dakika vorteks



yapılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika tam hızda santrifüj edilerek çözünmeyen tortuların oturması sağlanmıştır.

### 3.3.4. CM10 Çip Dizinleri İçin Uygulama

CM10 çip spotları anyonik karboksil grupları içeren anyonik yüzeye sahiptir. Proteinlerin spotlara bağlanması karboksilat grupları ile elektrostatik etkileşim ile gerçekleşir (Şekil 3.5.). Bağlanma genellikle proteinlerin pozitif yüklü lizin, arjinin veya histidin rezidüleri ile gerçekleşir ve düşük tuz veya düşük pH ( $\text{pH} < \text{pI} - 1$ ) içeren tamponlar ile sağlanır.



**Şekil 3.5.** Anyonik CM10 çip yüzeyine pozitif yüklerin bağlanması

CM10 çip türü için 12'si HBV hastası 12'si HCV hastası olmak üzere toplam 24 F0 evresinde, 8'i HBV 14'ü HCV olmak üzere 22 F1 evresinde, 1'i HBV 9'u HCV hastası olmak üzere toplam 10 F2 evresinde, 1'i HBV 7'si HCV evresinde olmak üzere toplam 8 F3 evresinde, 7'si HBV 12'si HCV hastası olmak üzere toplam 19 F4 evresinde hasta ve 31 sağlıklı kontrol (SK) serumu analize dahil edilmiştir (Çizelge 3.2.). Sadece bir kere eritilen hasta, sağlıklı kontrol ve kalite kontrol serum örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak oda sıcaklığında eritildikten sonra kısa bir vorteks uygulanmış ve  $1500\text{g}$ 'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Serumlar çip dizinlerine uygulanmadan önce IMAC30 için kullanılan U9 denatürasyon tamponuna farklı olarak 2mM DTT eklenmiştir (9M üre, 2% CHAPS ve 150 mM Tris-HCl, 2mM DTT, pH 9). Serumların denatürasyonu için 5  $\mu\text{l}$  serum örneklerine 45  $\mu\text{l}$  denatürasyon tamponu eklenerek 1/10 oranında seyreltilmiştir. Kompleks protein yapılarının denatüre edilerek açılması için serumlar 40 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılmış daha sonra  $1500\text{g}$ 'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek ve çiplere uygulanana kadar buz üzerinde bekletilmiştir. Anyonik CM10 spotlarının aktivasyonu için 110  $\mu\text{l}$  optimize edilen bağlama tamponu (50 mM amonyum asetat, %0,01 Triton X-100, pH 4) eklendi çipler 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakılmıştır. Çip dizinlerinin aktivasyonu

denilebilen bu işlem 3 kere uygulanmıştır. Daha sonra bağlama tamponu olarak da kullanılan amonyum asetat (pH 4) ile tekrar 1/10 oranında seyreltilerek sonuçta 1/100 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilen ve içerdiği proteinlerin denatürasyonu sağlanan serumlar 100'er µl olarak spotlara yüklenmiş, oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak proteinlerin spot yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Serumlar çiplere yüklenirken fibroz evreleri bilinmeden rastgele bir sıralama yapılmış ve aynı evrelerin arka arkaya gelmesi engellenmeye çalışılmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrol serumlarının her biri çiftler şeklinde yüklenmiştir. Bir saatlik bağlanma süresinden sonra spotlar tekrar amonyum asetat ve triton X-100 (pH 4) içeren bağlama tamponu ile 5 dakika çalkalayıcıda yıkanarak bağlanmayan proteinler ve tampon uzaklaştırma işlemi tamamlanmıştır. Bu işlem toplam 3 kere uygulanmış ve daha sonra spotlara enerji absorbe eden molekül (EAM) olarak SPA eklenerek karanlık bir ortamda çipler bir gece kurumaya bırakılmıştır.

**Çizelge 3.2.** CM10 için analiz edilen kişi sayısı ve fibroz evreleri

<b>Evre</b>	<b>HCV</b>	<b>HBV</b>	<b>SK</b>	<b>Toplam</b>
F0	12	12		24
F1	14	8		22
F2	9	1		10
F3	7	1		8
F4	12	7		19
<b>Toplam</b>	54	29	31	

### 3.3.5. SELDI-TOF MS ile Veri Oluşturulması

Serumlar yüklendikten sonra SPA eklenen ve bir gece karanlıkta kurumaya bırakılan çipler ertesi gün daha önce optimize edilen protokollerde SELDI ProteinÇip Sistem 4000 Kütle Spektrometrisinde (Ciphergen Biosystem, Fremont, CA, USA) okutulmuştur. Spektralar pozitif iyon modunda elde edilmiş ve her spot 2 farklı lazer düzeyinde analiz edilmiştir. Hem IMAC30 hem de CM10 çip dizinlerinde düşük kütleler için 2,5 kDa'dan 50 kDa'a kadar ve ikincisi yüksek moleküllü kütleler için olmak üzere 10 kDa'dan 200 kDa'a kadar proteinler okutulmuştur. Odak kütleli düşük lazer enerjili protokol için 10 kDa değerine, yüksek lazer enerjisi için 25 kDa değerine ayarlanmıştır. IMAC30 için 5000 lazer enerjisi ve 9000 yüksek lazer enerjisi olmak üzere 2 farklı protokolde ve CM10 için 6000 ve 9000 lazer enerjisi olmak üzere iki

farklı enerji düzeyinde okuma yapılmıştır. Ham veri bu protokollerle otomatik olarak biriktirildikten sonra bu veriler daha sonra CIPHERGEN Express yazılımı, versiyon 3.0.1. (CIPHERGEN Biosystems) ile analiz edilmiştir. Daha sonra uygulanan spektra işleme sürecinde taban çizgisi ayarlama ve gürültüyü azaltmak amaçlı filtreleme işlemleri uygulanmıştır. Bundan sonra yapılan analiz aşaması spektra hizalamak, protein standardı ile spektraların kalibrasyonu ve normalizasyonudur.

Çalışma örneklerinin spot değişkenliği normalizasyon faktörü hesaplanarak değerlendirilmiştir. Normalizasyon, eklenen matriks miktarı, zamanla proteinlerin degrade olması ve cihazdaki değişimler gibi bazı değişkenlerle ortaya çıkan spektra farklılıklarına karşı spektra yoğunluklarının lineer ölçeklendirilmesidir. Normalizasyon faktörleri CIPHERGEN yazılımı ile hesaplanmıştır. Düşük kalitedeki spektraların elenmesi için herbir satır bir spektrayı ve herbir sütun normalizasyon faktörünü verecek şekilde herbir çipin verileri ayrı ayrı EXCELE aktarılmıştır. Toplam normalizasyon faktörü ortalamasının toplam 2 standart sapmasının (mean+2sd) dışında kalan spektralar verilerden çıkarılmış ve yüksek kaliteli spektraların normalizasyonu tekrar yapılarak analize devam edilmiştir.

### **3.3.6. İstatistiksel Analiz**

Herbir çip için normalize edilen verilerin analizi için CIPHERGEN Express yazılımı, versiyon 3.0.1. (CIPHERGEN Biosystems) ile “Expression Difference Mapping” (EDM) oluşturulmuştur. EDM, örnek gruplarının spektralarında bulunan aynı molekül ağırlıktaki piklerin gruplanması ve daha sonra bunların ifade düzeylerindeki farklılıkların istatistiksel ve görsel olarak gösterilmesi için gerekli algoritmaları içermektedir. Veri işlemesi sonrasında oluşturulan kümeleme (EDM) çizelgesinde her bir çipteki spektralarda bulunan pikler görülebilmektedir. Kümeleme oluşturulurken otomatik pik belirleme seçilmiş ve bunun için ilk seçimde sinyal/gürültü (S/N) oranı 5,0, piklerin çukur derinliği (“valley depth”) 2,0; minimal pik eşiği tüm spektranın %20’si ve 0,2 pik genişlik seçilmiştir. İkinci seçim için S/N oranı 3,0; pik çukur derinliği 1 olarak seçilmiştir. Bu aşamadan sonra “p değeri” hesaplaması yapılabilmektedir. Bu yazılımda ikili grupların istatistiksel karşılaştırması için parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılması için

yine parametrik olmayan Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

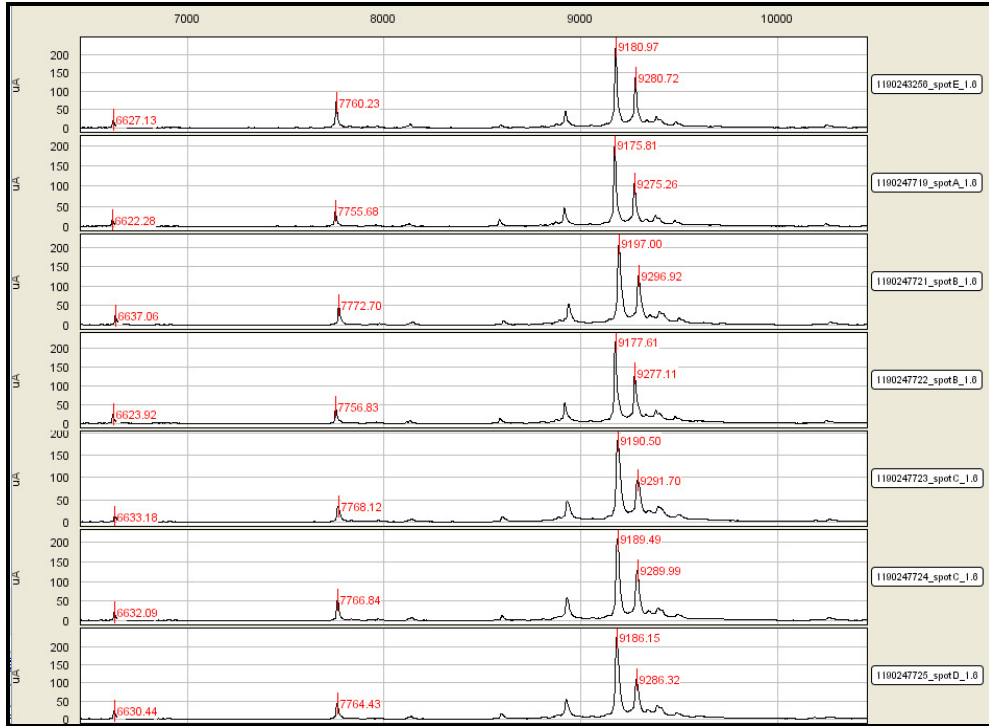
Analiz için karşılaştırılacak olan gruplar seçilmiş ve yazılım ile uygun istatistiksel yöntem seçilerek gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren pikler p değeri  $<0.05$  olarak değerlendirilmiştir. Ayırt edici pikler belirlenirken p değeri dışında ayrıca duyarlılık (sensitivite) ve özgüllük (spesifite) ölçümüne bakılarak ROC (“Receiver Operator Characteristic”) hesaplanması ile değerlendirilmiştir. ROC plot eğrisinin altındaki alan duyarlılık/özgüllüğü ifade etmektedir ki bu durumda bu rakam 1,0 veya 0,0’a ne kadar yakınsa iki grup için bu pik’in duyarlılık/özgüllük oranı o kadar yüksek olacaktır. Bu iki ölçütün yanı sıra pik yoğunluğunun yüksek veya düşük olması da önemli bir ölçüttür. Bu çalışmada P değeri  $<0,05$  ve ROC değeri  $>0,8$  veya  $<0,2$  olan pikler ayırt edici pikler olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada tek tek farklı fibroz evreleri arasında istatistiksel olarak ayırt edici protein/peptit araştırılması dışında gruplar hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) fibrosis grupları olarak birleştirilerek de analiz edilmiştir. Bu analiz için oluşturulan kümeleme listesi kullanılarak “Biomarker Patterns Software” versiyon 5.0 (CIPHERGEN Biosystems) yazılımı ile karar ağacı sınıflandırması yapılmıştır. Bu yazılım makine öğrenme (“machine learning”) temeline dayanmaktadır ve özellikle çoklu biyolojik belirteç araştırma çalışmaları için oluşturulmuştur. Tüm örnekler “cross-validation” ile analiz edilmiştir. Sınıflandırma ağacı veriyi her seferinde pik yoğunluğu için yorumlayıp bir kurala bağlı olarak 2 noda böler. Bu noktada bölünme kararı SELDI protein ifade profillerinde normalize edilmiş yoğunluk düzeyine dayanmaktadır. Bölünme süreci terminal nodlar oluşuncaya kadar devam eder ve sonuçta her bir terminal noda farklı bir grup ayrıştırılmış olur.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. SELDI Sisteminin Tekrarlanabilirliği

Cihazın tekrarlanabilirliğini ölçmek için her bir IMAC30 çip dizininde 1 spota yüklenen kalite kontrol serumundan seçilen ve her bir spektrada belirgin şekilde var olan 4 pikin karakteristik özellikleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.). Her çip dizininde kalite kontrol serumunun farklı spotlara yüklenmesine dikkat edilmiştir. Yapılan analiz sonuçları Semmes ve arkadaşlarının çok merkezli geniş çalışmasında yaptıkları değerlendirmeden yararlanılarak değerlendirilmiştir (Semmes et al. 2005). Seçilen piklerin kütle/yük oranları (m/z), çözünürlük, yoğunluk ve sinyal/gürültü (S/N) oranı değerlerinin değişim katsayıları yüzdesi (%CV) ölçülmüştür.



Şekil 4.1. Karakteristik özellikleri analiz edilen pikler

Seçilen piklerin (ortalama m/z 6629,08, 7763,29, 9184,72, 9284,76) karakteristik değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Sonuçlara göre m/z değişim katsayısı yüzdesi her bir pik için 0,07 olarak bulunmuştur. Bu değer üretici firmanın belirlediği değer olan 0,1'den düşüktür ve tanımlanmamış ve bilinmeyen bu proteinlerin kütlelerinin cihaz tarafından doğru okunduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca CV%'ler S/N için %25-43, çözünürlük %17-24 ve normalize edilen yoğunluk

için %30-37 arasında çıkmıştır. Bu değerler Semmes ve arkadaşlarının makalesindeki ölçümlerle uyumaktadır ve bu çalışmada kullanılan SELDI-TOF kütle spektrometrisinin tekrarlanabilirliğini doğrulamıştır. Cihazın ölçüm kalitesini ve doğruluğunu sağlamak için her hafta peptit ve protein kalibrasyonunun yapılmasının cihazın tekrarlanabilirliği için önemli olduğu yine aynı çalışmada belirtilmiştir. Kalite kontrol serumunun deneyde kullanılması ile haftada bir kez kalibrasyonu yapılan cihazın doğruluğu test edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Seçilen piklerin karakteristik özellikleri ve %CV değerleri

<b>Pik 1</b>	<b>m/z</b>	<b>Çözünürlük</b>	<b>S/N</b>	<b>Yoğunluk</b>
Ortalama	6629.08	473.42	32.31	23.58
Standart sapma	4.44	80.53	14.01	8.76
%CV	0.07	17.01	43.37	37.1
<b>Pik 2</b>				
Ortalama	7763.29	542.93	61.13	43.97
Standart sapma	5.43	106.29	18.03	14.98
%CV	0.07	19.57	29.50	34.07
<b>Pik 3</b>				
Ortalama	9184.72	480.06	383.53	218.71
Standart sapma	6.58	96.74	95.42	69.13
%CV	0.07	20.15	24.87	31.61
<b>Pik 4</b>				
Ortalama	9284.76	418.77	209.73	111.98
Standart sapma	6.85	98.59	75.98	33.83
%CV	0.07	23.54	36.23	30.21

## 4.2. IMAC30 Çip Dizini İçin Analiz Sonuçları

### 4.2.1. IMAC30 Düşük Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları

IMAC30 için düşük lazer enerjisi protokolünde elde edilen veriler işlenip normalize edildikten sonra EDM oluşturulmuştur. Farklı fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ayırt edici pik ( $p < 0,05$ ,  $ROC < 0,2$  veya  $ROC > 0,8$ ) sayıları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** IMAC30 düşük molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla için ayırt edici pik sayısı

<b>Karşılaştırılan</b>	<b>ROC&gt;0,8 pik sayısı</b>	<b>ROC&lt;0,2 pik sayısı</b>
F0 ve F1*	0	0
F0 ve F2*	1	4
F0 ve F3*	1	3
F0 ve F4*	14	25
F1 ve F2*	1	3
F1 ve F3	0	0
F1 ve F4*	12	22
F2 ve F3*	3	0
F2 ve F4*	13	12
F3 ve F4*	8	20
SK* ve F0	0	0
SK* ve F1	0	0
SK* ve F2	1	7
SK* ve F3	3	7
SK* ve F4	20	17
F3,F4* ve F0,F1,F2	2	5
SK* ve F0,F1,F2	0	0
SK* ve F3,F4	9	10
SK* ve F2,F3,F4	7	5

Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur. Parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi kullanılmıştır.

Çizelgede görüldüğü gibi IMAC30 için ayırt edici pik sayısı özellikle F4, F0 ve sağlıklı kontrol (SK) grupları ile karşılaştırıldığında en fazla bulunmuştur. En çok ayırt edici pik sayısına sahip sağlıklı kontrol ve F4 arasındaki anlamlı pikler ve bunların ROC ve *p* değerleri Çizelge 4.3.’te verilmiştir. Bu çizelgeye göre fibrozis evreleri arasındaki fark arttıkça ayırt edici pik sayısı da artmaktadır. Birbirine yakın evreler arasından F0-F1, SK-F0 ve SK-F1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir proteomik özellik görülmemiştir. F0-F2 evreleri arasında 5 tane istatistiksel olarak anlamlı ayırt edici pik bulunmuştur. Bu piklerden F2 evresi pozitif grup olarak seçildiğinde 0,8 ROC değeri ile ortalama *m/z* değeri 8805,7 olan protein ifade artışı gösterirken, ROC değeri <0,2 olan 3884.3, 4640.8, 9491.3, 9284.9 pikleri azalış göstermiştir. F2 evresinin hafif fibroz olarak değerlendirilmesi ve F0 ve F1 ile birlikte düşünülerek bir grup oluşturulduğunda ileri evre fibrozis grubu (F3, F4) ile arasında ayırt edici pik sayısı 7 bulunmuştur. Ayrıca sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında F3 ve F4 grupları

ileri evre fibrozis olarak değerlendirildiğinde ayırt edici pik sayısı 19 olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.3.** IMAC30 F4 (Siroz) ve SK (sağlıklı kontrol) grupları karşılaştırması

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$1.94 \times 10^{-7}$	0.918291	11725.4	11.67
2	$8.69 \times 10^{-8}$	0.918291	11847.4	1.17
3	$3.50 \times 10^{-7}$	0.903298	11939.1	2.23
4	$1.00 \times 10^{-6}$	0.888306	23584.7	0.37
5	$2.51 \times 10^{-6}$	0.873313	24334.7	0.21
6	$1.45 \times 10^{-6}$	0.873313	23693.5	0.32
7	$2.75 \times 10^{-6}$	0.873313	23129.3	0.29
8	$5.58 \times 10^{-6}$	0.873313	14901.6	0.68
9	$7.25 \times 10^{-6}$	0.858321	22986.7	0.30
10	$1.02 \times 10^{-5}$	0.858321	5868.8	7.59
11	$3.93 \times 10^{-6}$	0.858321	13350.8	1.01
12	$8.61 \times 10^{-6}$	0.843328	11554.4	0.99
13	$7.25 \times 10^{-6}$	0.843328	23472.2	0.36
14	$4.85 \times 10^{-5}$	0.828336	22903.1	0.29
15	$7.17 \times 10^{-5}$	0.813343	14685.4	1.71
16	$1.77 \times 10^{-4}$	0.813343	35008.4	0.09
17	$7.75 \times 10^{-5}$	0.804348	25166.6	0.12
18	$2.25 \times 10^{-8}$	0.045727	4278.7	35.87
19	$2.88 \times 10^{-7}$	0.090705	6852.0	1.91
20	$7.54 \times 10^{-7}$	0.105697	3968.6	13.87
21	$5.67 \times 10^{-7}$	0.105697	3952.5	28.05
22	$6.86 \times 10^{-7}$	0.12069	3269.3	14.82
23	$3.00 \times 10^{-6}$	0.12069	6432.3	8.85
24	$7.25 \times 10^{-6}$	0.135682	4641.6	12.34
25	$4.68 \times 10^{-6}$	0.135682	3151.5	7.29
26	$7.25 \times 10^{-6}$	0.144678	9391.2	6.36
27	$4.68 \times 10^{-6}$	0.144678	9493.0	7.77
28	$1.11 \times 10^{-5}$	0.150675	3773.7	3.16
29	$1.21 \times 10^{-5}$	0.153673	9587.7	2.06
30	$7.75 \times 10^{-5}$	0.165667	6569.1	1.67
31	$3.00 \times 10^{-5}$	0.165667	4303.1	8.67
32	$1.11 \times 10^{-5}$	0.165667	4486.1	3.39
33	$2.77 \times 10^{-5}$	0.174663	9286.3	56.19
34	$4.48 \times 10^{-5}$	0.18066	6670.6	6.51
35	$4.48 \times 10^{-5}$	0.183658	9348.0	7.68
36	$3.53 \times 10^{-5}$	0.189655	9417.5	6.77
37	$1.65 \times 10^{-4}$	0.195652	6630.6	19.88

\*ROC değeri hesaplamasında F4 grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.

Fibrozis grupları F0, F1, F2 olmak üzere hafif fibrozis ve F3, F4 olmak üzere ileri evre fibrozis grubu olmak üzere iki grup şeklinde karşılaştırılarak analiz



edildiğinde p değeri en küçük ve anlamlı ROC değeri veren ilk 7 pik Çizelge 4.4’de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** IMAC30 F0, F1, F2 ve F3, F4 gruplarının karşılaştırması

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$9,0 \times 10^{-9}$	0,13	4278,4	27,1
2	$1,4 \times 10^{-7}$	0,15	6851,7	2,3
3	$5,0 \times 10^{-7}$	0,15	3952,0	27,1
4	$5,6 \times 10^{-8}$	0,15	3268,7	17,3
5	$5,5 \times 10^{-7}$	0,17	3772,9	4,1
6	$6,8 \times 10^{-7}$	0,81	11847,2	1,0
7	$1,9 \times 10^{-6}$	0,80	11725,3	10,2

\*ROC değeri hesaplamasında F3, F4 grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.

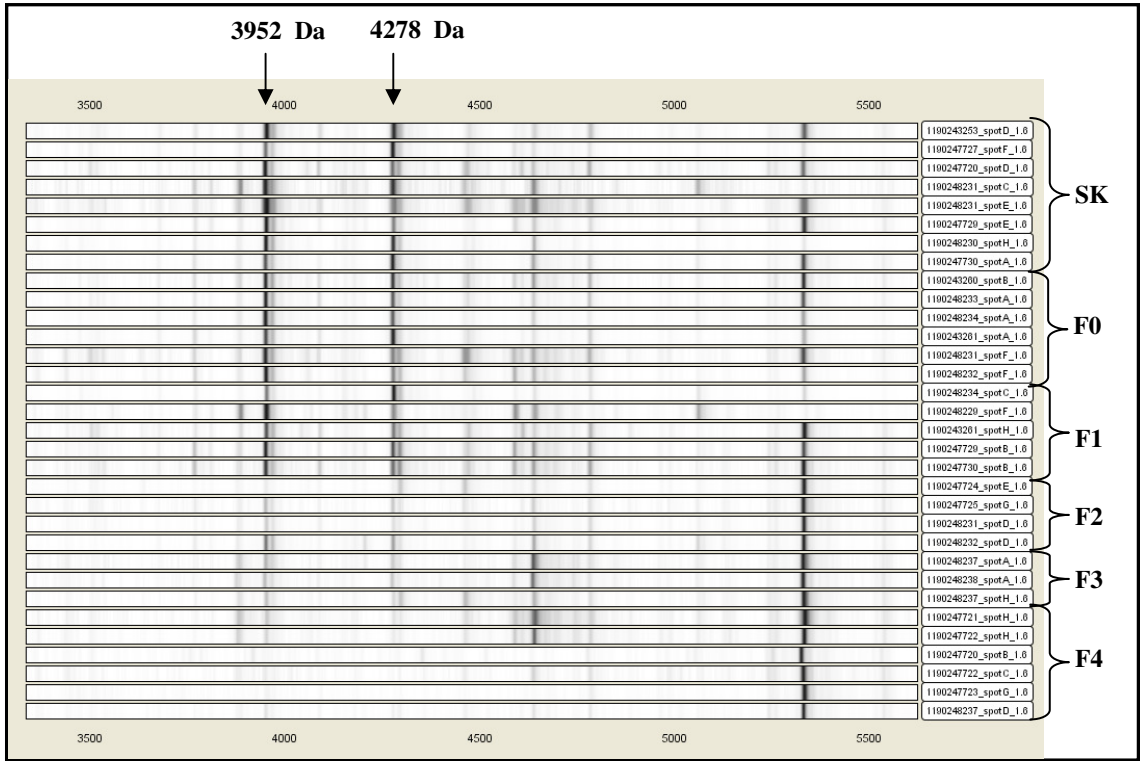
Çizelge 4.3.’te verilen ayırıcı pik özellikleri incelendiğinde yoğunlukları yüksek olan m/z değeri 3952, 4278, 9286 ve 11725 pikleri için F0,F1,F2 ve F3,F4 olmak üzere hafif ve ileri evre fibroz gruplarını karşılaştırdığımızda p değerleri  $10^{-4}$ ’ten küçük bulunmuştur (Çizelge 4.4). Ortalama m/z değeri 3952 ve 4278 olan pikler için sirozlu hastaların diğer gruplarla ayrı ayrı karşılaştırılması ile elde edilen p ve ROC değerleri ve p değeri 0,05’ten küçük olan grupların karşılaştırılması Çizelge 4.5.’de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** IMAC30 m/z 3952 ve 4278 için gruplar arası karşılaştırma

Karşılaştırılan Gruplar	m/z 3952 için		m/z 4278 için	
	ROC	P değeri	ROC	P değeri
F2 ve SK*	0,75	0,02	0,72	0,04
F3 ve F0*	0,84	0,01	0,91	$7,9 \times 10^{-4}$
F3 ve SK*	0,82	0,01	0,86	$3,7 \times 10^{-3}$
F4 ve SK*	0,89	$5,6 \times 10^{-7}$	0,95	$2,2 \times 10^{-8}$
F4 ve F0*	0,88	$2,0 \times 10^{-6}$	0,93	$9,2 \times 10^{-8}$
F4 ve F1*	0,83	0,0001	0,85	$1,3 \times 10^{-5}$
F4 ve F2*	0,76	0,047	0,72	0,025
F4 ve F3*	0,79	0,015	0,83	0,013
F4 ve F0,F1*	0,87	$5,6 \times 10^{-7}$	0,9	$1,7 \times 10^{-8}$
F4 ve F0,F1,F2*	0,85	$9,5 \times 10^{-7}$	0,9	$3,3 \times 10^{-8}$
F4 ve F0,F1,F2,F3*	0,86	$8,9 \times 10^{-7}$	0,87	$4,2 \times 10^{-8}$
F3,F4 ve F0,F1,F2*	0,84	$5,0 \times 10^{-7}$	0,86	$9,0 \times 10^{-9}$

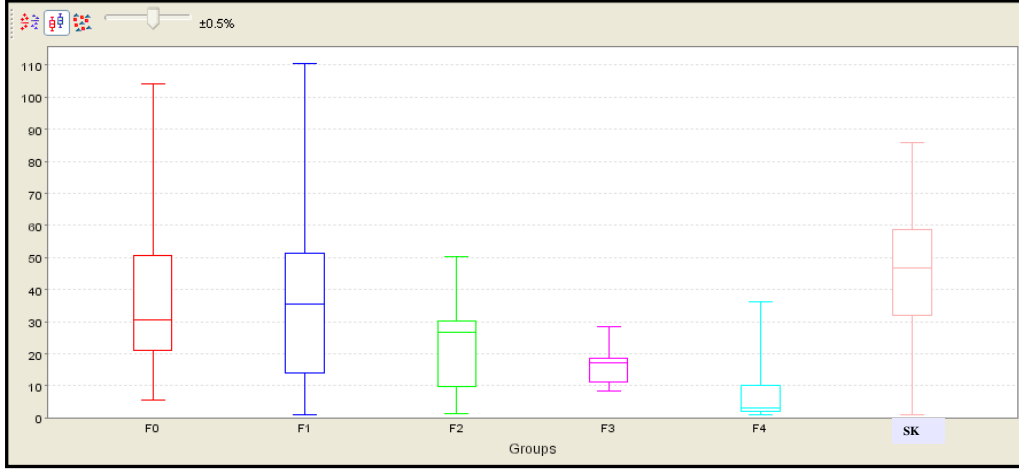
Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri hesaplaması için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur.

Şekil 4.2.'de jel görüntüsünde de görüldüğü gibi yoğunluk bu pikler için özellikle sağlıklı kontrol ve düşük fibrozis evrelerini gösteren F0 ve F1'de ve sağlıklı kontrol gruplarında artmışken, F2'den itibaren F4'e doğru gittikçe yoğunluğun azaldığını görmekteyiz. Hatta F4 evresindeki hastalarda F3 evresiyle karşılaştırıldığında neredeyse ifade gözükmemekte ve çizelgeden de görüldüğü gibi F4 ve F3 evreleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir. Daha da önemlisi bu piklerin F2 evresinden itibaren yoğunluğunda bir azalış göstermesidir ve Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi sağlıklı kontrollerle F2 evresi grubu karşılaştırıldığında da p değeri 0,05'den küçük bulunmuştur.

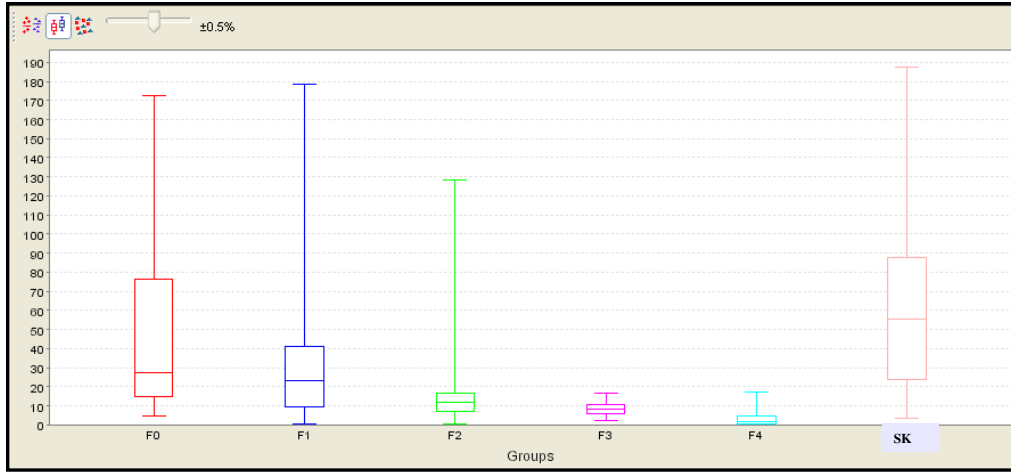


**Şekil 4.2.** IMAC30 çipi m/z 3952 ve 4278 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması

IMAC30 çipi için gruplar arasında miktar farklılığı gösteren 3952 Da ve 4278 Da pikleri için gruplar arası dağılım çizelgeleri ("group scatter plots") sırasıyla Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Hem jel görüntüsünde hem de dağılım çizelgelerinde incelendiğinde 3952 Da ve 4278 Da piklerinin yoğunluklarının fibroz evresiyle ters orantılı olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.3.** 3952 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi



**Şekil 4.4.** 4278 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi

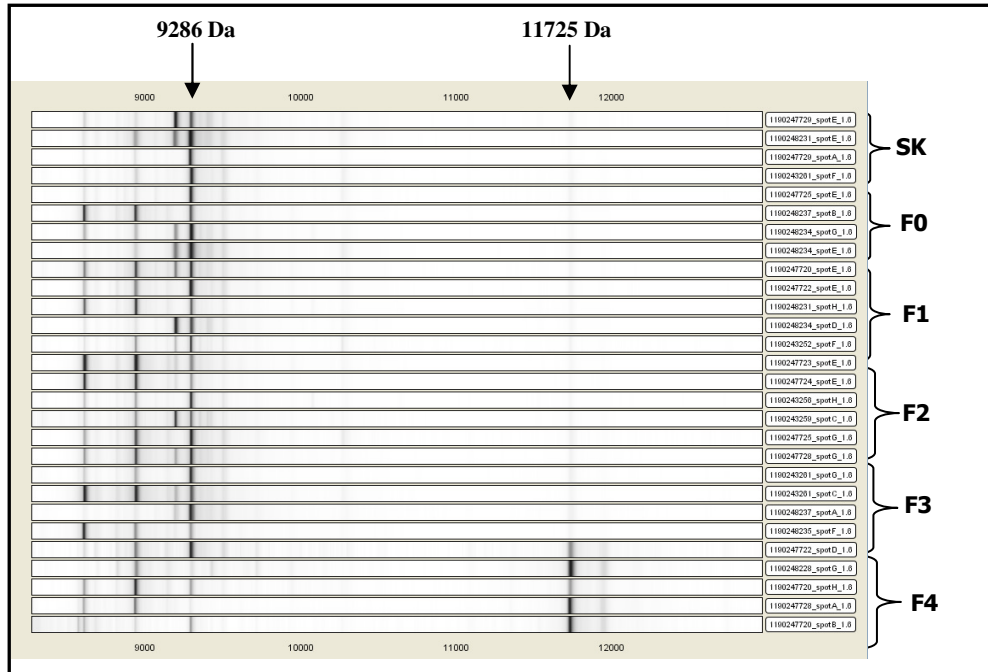
IMAC30 çipi için Tabo 4.3.'te verilen ayırt edici piklerden yüksek yoğunluktaki 9286 Da ve 11725 Da büyüklüğündeki proteomik özellikler için gruplar arası ROC ve p değerleri Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.6.** 9286 Da ve 11725 Da pikleri için F4 grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması

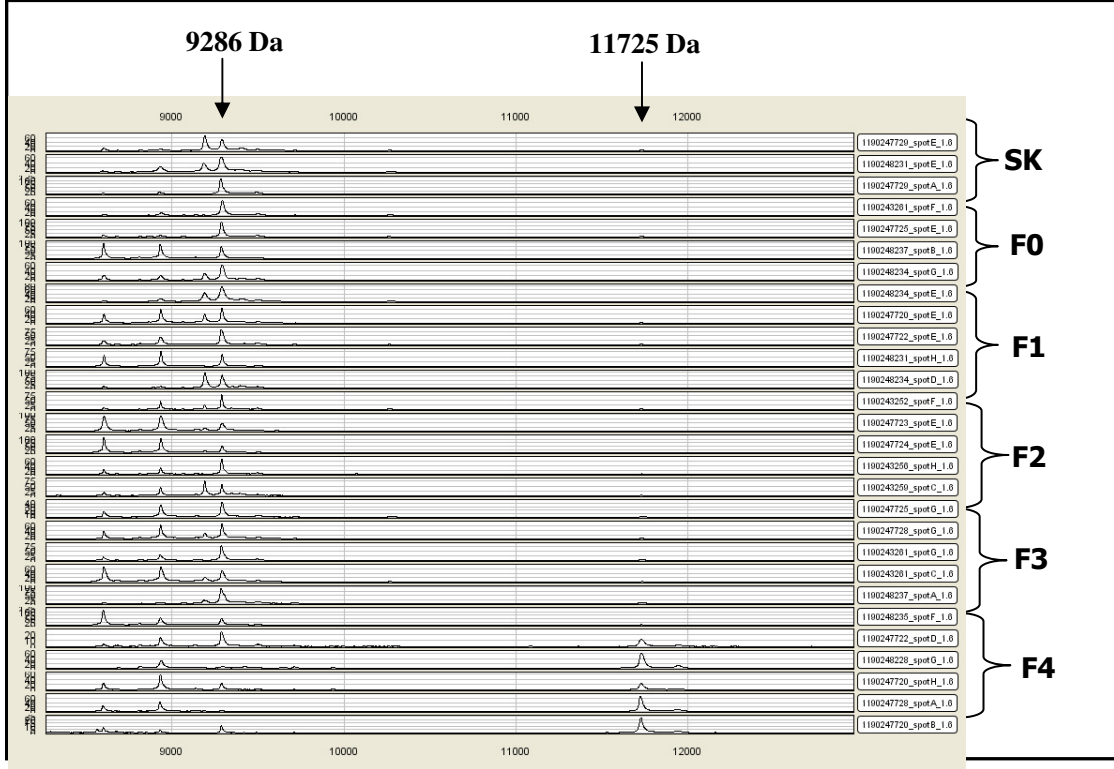
Karşılaştırılan Gruplar	m/z 9286 için		m/z 11725 için	
	ROC	P değeri	ROC	P değeri
SK ve F4*	0,17	$2,7 \times 10^{-5}$	0,92	$1,9 \times 10^{-7}$
F0 ve F4*	0,15	$2,7 \times 10^{-5}$	0,85	$2,7 \times 10^{-5}$
F1 ve F4*	0,17	$1,3 \times 10^{-4}$	0,82	$7,7 \times 10^{-6}$
F2 ve F4*	0,2	0,047	0,83	$7,5 \times 10^{-3}$
F3 ve F4*	0,16	0,017	0,72	0,041
F0,F1,F2 ve F4*	0,17	$4,5 \times 10^{-6}$	0,84	$1,4 \times 10^{-6}$
F0,F1,F2,F3 ve F4*	0,18	$3,8 \times 10^{-6}$	0,82	$1,9 \times 10^{-6}$
F0,F1,F2 ve F3,F4 *	0,22	$2,8 \times 10^{-4}$	0,80	$1,9 \times 10^{-6}$

Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri hesaplaması için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur.

Çizelge 4.6.’da da görüldüğü gibi ROC değerlerine bakıldığında 9286 Da pikinin F4 yani siroz grubunda ifadesinin azaldığı görülürken 11725 Da piki için bu evrede ifade artmaktadır (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). Bu iki pikin siroz hastaları ve diğer fibroz grupları için ayırt edici olduğu görülmektedir.

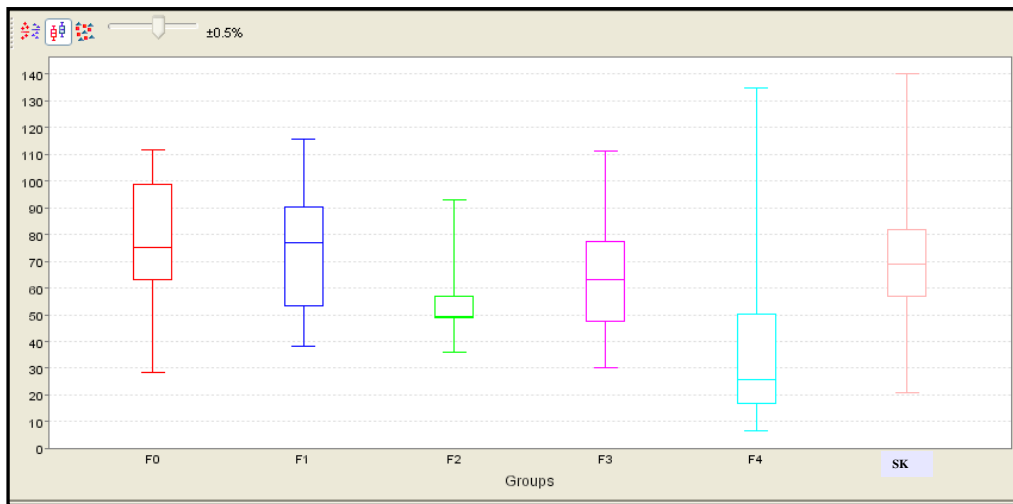


**Şekil 4.5.** IMAC30 çipi m/z 9286 ve 11725 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması

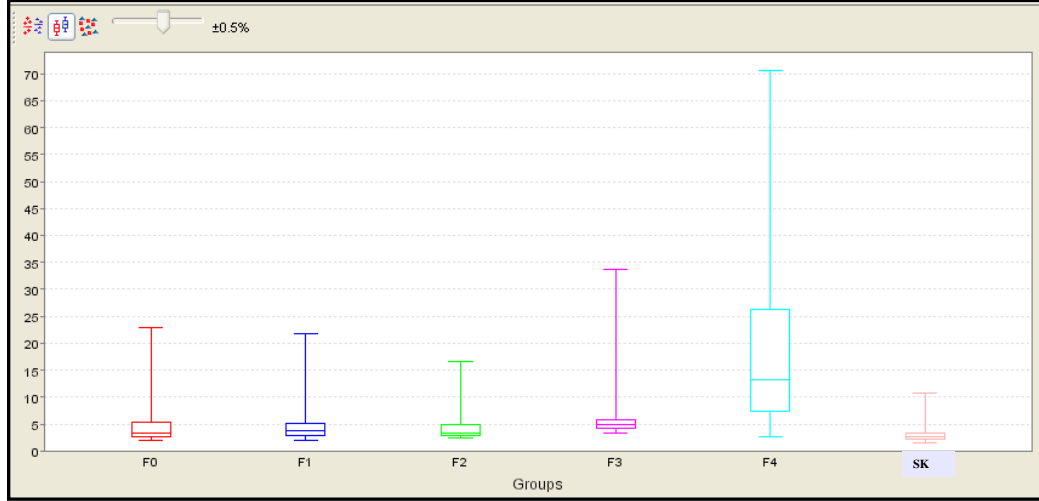


Şekil 4.6. IMAC30 çipi m/z 9286 ve 11725 için gruplar arası pik görüntüsü karşılaştırması

Siroz yani F4 evresinde diğer gruplarla yoğunluk farklılığı gösteren 9286 Da ve 11725 Da pikleri için gruplar arası dağılım çizelgeleri sırasıyla Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Dağılım çizelgelerinden de anlaşıldığı gibi bu pikler siroz evresi için ayırt edici gözükmemektedir.



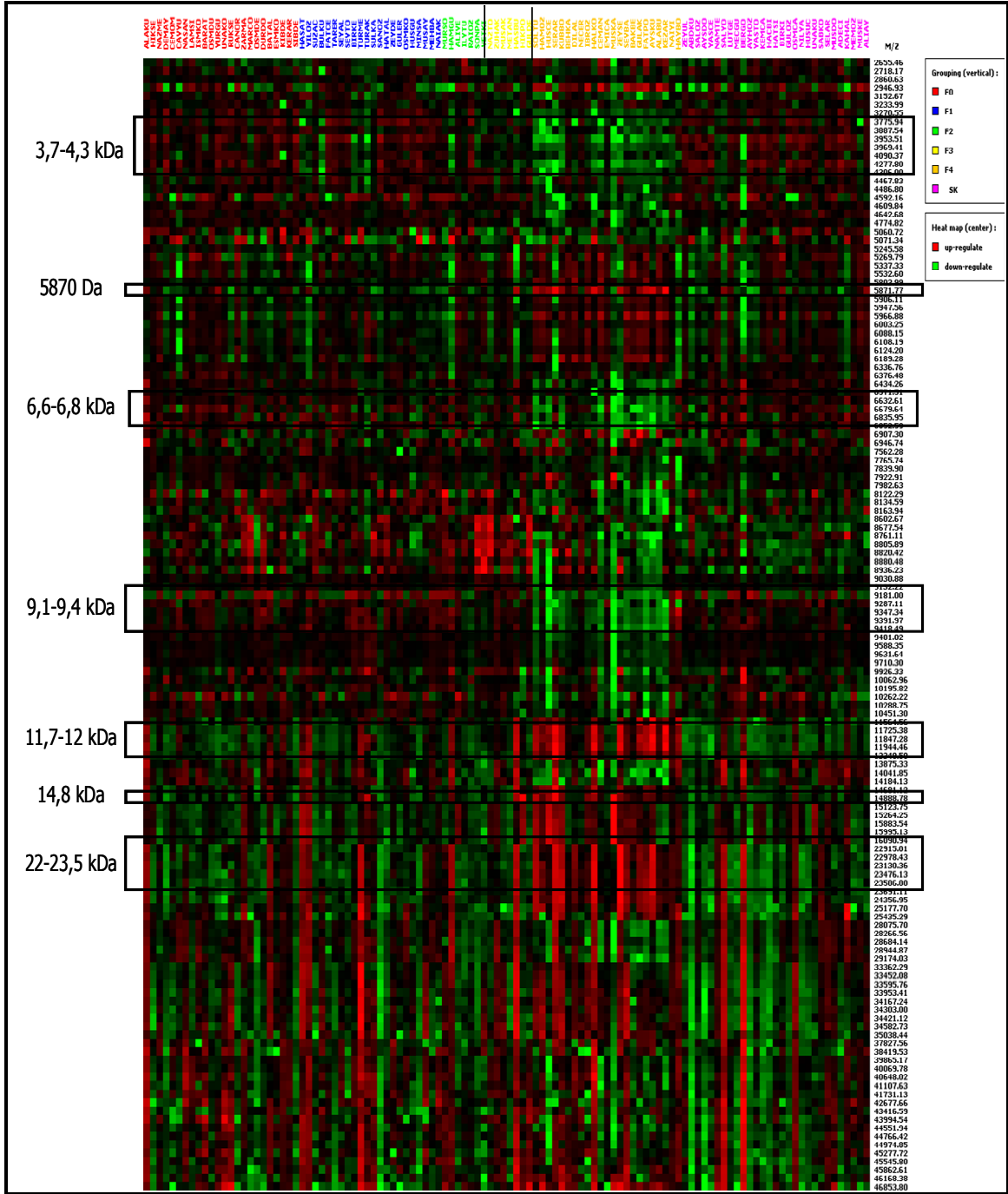
Şekil 4.7. 9286 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi



**Şekil 4.8.** 11725 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi

IMAC30 çipi için düşük lazer enerjisinde yapılan analizlerden bir diğeri ise ısı haritası (“heat map”) oluşturmaktır (Şekil 4.9.). Isı haritasındaki her bir satır bir hasta spektrasını, her bir hücre bir piki, renkler ise pik yoğunluğunu göstermektedir. Buna göre kırmızı hücreler o pikin artan yoğunluğunu, yeşil ise azalan yoğunluğunu gösterirken siyahlar yoğunluklar arasında farklılık olmadığını göstermektedir. Şekilde sırasıyla kırmızı ile yazılan hasta isimleri F0 grubunda, mavi ile yazılan grup F1, yeşil ile yazılan grup F2, sarı ile yazılan F3 grubunu, turuncu ile yazılan F4 grubunu ve pembe ile yazılan isimler sağlıklı kontrol grubunu oluşturmaktadır. Isı haritası temelde kümelenmiş bir jel görüntüsüdür.

Şekil 4.9.’da IMAC30 çipi için düşük lazer enerjisinde ısı haritası gösterilmiştir. Haritada, ifade artışı ve azalışıyla dikkati çeken pik bölgeleri kare içine alınmış ve hangi molekül ağırlığı aralığını gösterdiği yazılmıştır. Bu piklerin özellikle turuncu renk ile gösterilen F4 evresi hastaları için diğer gruplarla karşılaştırıldığında farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu pikler Çizelge 4.3.’te sağlıklı kontrol grubu ve siroz grubunun karşılaştırılması ile istatistiksel olarak anlamlı p ve ROC değeri veren pikleri içermektedir. Isı haritasında da görüldüğü gibi özellikle 3,7-4,3 Da aralığında, 5870 Da’da, 6,6-6,8 kDa, 9,1-9,4 kDa, 11,7-12 kDa, 14,8 kDa ve 22-23 kDa aralıklarında turuncu renkle yazılan F4 evresi grubu ile diğer gruplar arasında ifade farklılığı görülmektedir.



Şekil 4.9. IMAC30 çipi düşük lazer enerjisi protokolü için ısı haritası

#### 4.2.2. IMAC30 Yüksek Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları

IMAC30 çiplerine yüklenen serum örneklerindeki yüksek moleküllü kütlelerin analizi için yüksek lazer enerjisi ile 10 kDa'dan 200 kDa'a kadar proteinler okutulmuştur. Farklı evrelerin karşılaştırılması ile elde edilen istatistiksel olarak anlamlı pik sayıları ( $p < 0,05$  ve  $ROC < 0,2$  veya  $ROC > 0,8$ ) Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** IMAC30 yüksek molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla için ayırt edici pik sayısı

Karşılaştırılan	ROC>0,8 pik sayısı	ROC<0,2 pik sayısı
F0 ve F1*	0	0
F0 ve F2*	0	0
F0 ve F3*	0	2
F0 ve F4*	4	14
F1 ve F2*	0	0
F1 ve F3	0	0
F1 ve F4*	4	9
F2 ve F3*	0	0
F2 ve F4*	4	9
F3 ve F4*	7	8
SK* ve F0	0	0
SK* ve F1	0	0
SK* ve F2	1	3
SK* ve F3	1	4
SK* ve F4	13	5
F3,F4* ve F0,F1,F2	0	1
SK* ve F0,F1,F2	0	0
SK* ve F3,F4	8	3
SK* ve F2,F3,F4	4	2

Çizelgede sonuna "\*" işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur. Parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi kullanılmıştır.

Çizelge 4.7.'de görüldüğü gibi IMAC30 için ayırt edici pik sayısı özellikle F4, F0 ve sağlıklı kontrol (SK) grupları ile karşılaştırıldığında en fazla bulunmuştur. Bu çizelgeye göre fibroz evreleri arasındaki fark arttıkça ayırt edici pik sayısı da artmaktadır. Birbirine yakın evreler arasından F0-F1, F0-F2, SK-F0 ve SK-F1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir proteomik özellik görülmemiştir. Gruplar arası ayırt edici pik sayısının düşük lazer enerjisi ile elde edilen verilerde yüksek enerji ile elde edilen



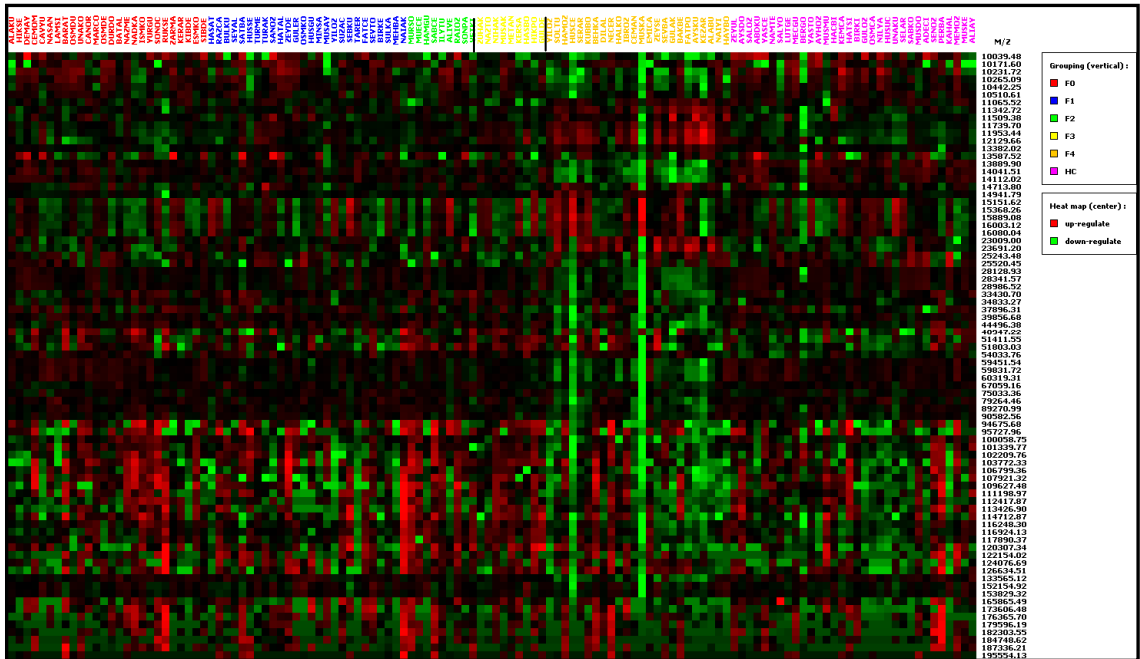
anlamli pik sayısından daha fazla olduğu gör÷lmektedir. F3 ve F4 gruplarının birleştirilmesi ile oluşturulan ileri evre fibrozis ve F0, F1 ve F2 evrelerinin birleştirilmesi ile oluşturulan hafif fibrozis grubunun karşılaştırılması ile yalnız  $4,0 \times 10^{-7}$  p değeri ve 0,18 ROC değeri ile 59393,37 Da piki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu pikin yoğunluk ortalaması 0,19 olup oldukça dűř÷ktür. En çok ayırt edici pik sayısına sahip sağlıklı kontrol ve F4 arasındaki anlamlı pikler ve bunların ROC ve p değerleri Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** IMAC30 yüksek molekül için F4 ve SK grupları karşılaştırması

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$9,8 \times 10^{-8}$	0,90	14115.53	0,81
2	$1,4 \times 10^{-7}$	0,90	14039.64	1,20
3	$2,1 \times 10^{-8}$	0,88	13885.37	1,98
4	$9,5 \times 10^{-8}$	0,88	60360.18	0,18
5	$3,5 \times 10^{-6}$	0,87	28981.40	0,42
6	$1,3 \times 10^{-6}$	0,87	28101.10	1,47
7	$1,4 \times 10^{-6}$	0,86	59433.35	0,19
8	$3,8 \times 10^{-6}$	0,84	10039.58	1,03
9	$6,6 \times 10^{-6}$	0,84	28304.17	0,80
10	$1,1 \times 10^{-5}$	0,84	133171.44	0,37
11	$5,2 \times 10^{-6}$	0,83	59838.86	0,19
12	$7,0 \times 10^{-5}$	0,80	44551.86	0,11
13	$4,3 \times 10^{-5}$	0,80	10446.01	0,76
14	$1,8 \times 10^{-7}$	0,09	11929.47	2,52
15	$7,8 \times 10^{-6}$	0,13	11339.66	0,59
16	$8,7 \times 10^{-7}$	0,13	11720.15	12,36
17	$5,7 \times 10^{-6}$	0,13	12131.01	0,61
18	$2,4 \times 10^{-5}$	0,19	11510.56	1,15

\*ROC değeri hesaplamasında SK grubu pozitif grup olarak seğilmiştir.

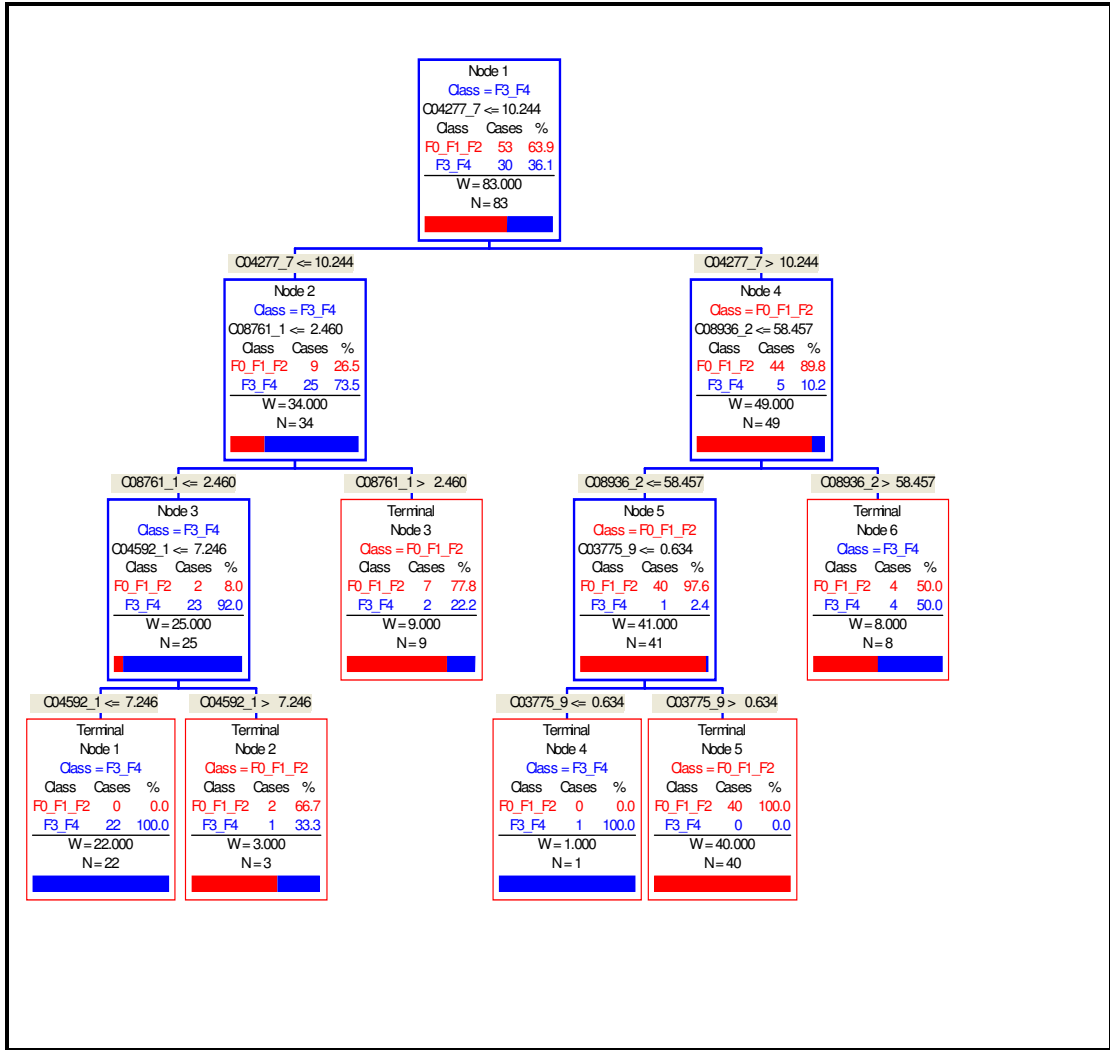
Yüksek lazer enerjisinde atış yapılarak büyük molekül ağırlıklı proteinlerin uçurulması için uygulanan bu protokol sonucu p değerleri düşük ve anlamlı ROC değerine sahip ayırt edici pikler bulunmuştur. Ancak Çizelge 4.8.'de verilen ayırt edici piklerin ortalama yoğunluklarının çok düşük olduğu görülmüştür. Çizelgede sağlıklı kontrol grubu pozitif grup olarak seçildiğinde 0,2'den küçük ROC değeri veren 11720 da pikinin ( $p=8,7 \times 10^{-7}$ , ROC= 0,13) yoğunluğunun sağlıklı kontrol grubunda azaldığını siroz grubunda arttığı anlaşılmaktadır. Bu pikin IMAC30 düşük lazer atışında da aynı ifade profili ile anlamlı bulunan 11725 Da piki ile aynı olduğu düşünülmektedir. Aradaki 5 Da'lık farkın ise Materyal ve Yöntem kısmında açıklandığı gibi kalibrasyon yapılırken seçilen protein standardı kütlelerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tüm piklerin gruplar arası ifade yoğunluğunu gösteren ısı haritası Şekil 4.10.'da verilmiştir. Bu haritaya göre belirgin bir renk farkı gözükmemektedir. Bunun nedeni de pik yoğunluklarının oldukça düşük olmasıdır.



**Şekil 4.10.** IMAC30 çipi yüksek lazer enerjisi protokolü için ısı haritası Pembe ile gösterilen HC grubu (“healthy control”) kısaltması olup sağlıklı kontrol (SK) grubunu oluşturmaktadır.

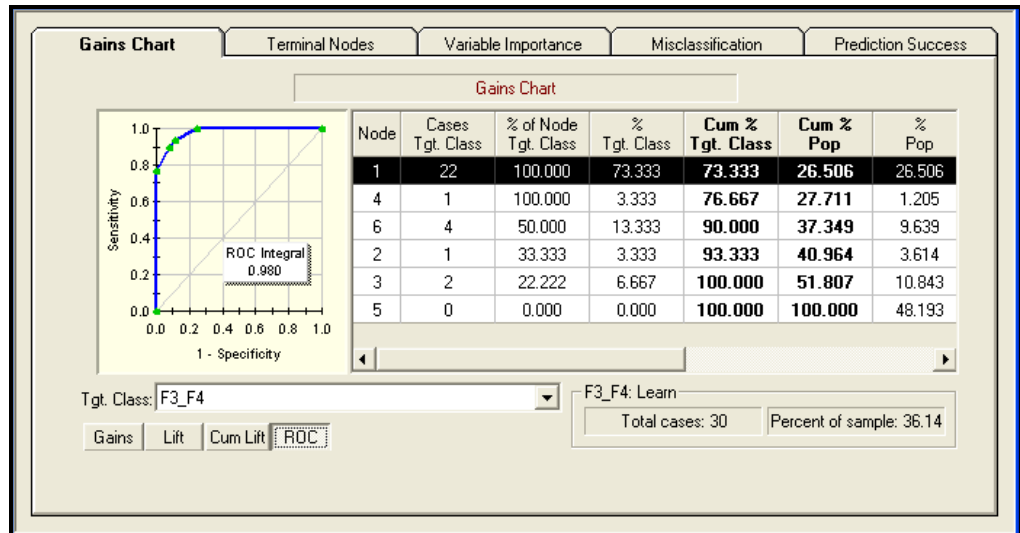
### 4.2.3. IMAC30 için Karar Ağacı Analizi

Bu çalışmada tek tek farklı fibrozis evreleri arasında istatistiksel olarak ayırt edici protein/peptit araştırılması dışında “Biomarker Patterns Software” versiyon 5.0 (CIPHERGEN Biosystems) yazılımı ile çoklu belirteçlerin bulunduğu karar ağacı sınıflandırması da yapılmıştır. Bu analiz için istatistiksel olarak daha anlamlı pikler veren IMAC30 düşük lazer enerjisinde elde edilen spektraller tercih edilmiştir. Her bir gruba düşen veri sayısı en az 30 olacak şekilde hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) olmak üzere iki fibrozis grubu analiz edilmiştir. Bunun için normalizasyon analizi ve kümeleme analizi sonrası veriler “Biomarker Patterns Software” için uygun formata sokularak analiz edilmiştir. Oluşturulan karar ağacı Şekil 4.11.’de verilmiştir.



Şekil 4.11. IMAC30 çipinde hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) fibrozis gruplarının ayrıştırılması için oluşturulan karar ağacı

Şekil 4.11.'de görülen karar ağacında kök nod olarak adlandırılan ilk kutucuk içinde bulunan 4277 Da kütleli pik yazılım tarafından ayırıcı olarak seçilmiş olan piktir. Bu nod, yani 4277 Da kütleli pik, IMAC30 çipinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı ayırt edici pik olarak bulunmuş proteomik özelliştir. İlk noddan itibaren ağacın ayırımı kutuda yazılı olan yoğunluk değerine göre sağ ya da sol kola ayrılmaktadır. Söz konusu olan ağaç için birinci nod için seçilen yoğunluk 10,44'dür ve bu yoğunluk değerine eşit veya küçük olan grup sol kola, bu değerden büyük olan grup sağ kola ayrılmıştır. Buna göre devam eden ayırım sonucu karar ağacı toplam 6 terminal noddan oluşmuştur. Oluşturulan ağaçta terminal nod 1'e bakılacak olursa bu nod ileri evre fibrozis sınıfını oluşturmuştur. İlk noddan başlanarak 4277 Da kütleli pik yoğunluğu  $\leq 10,44$  ve bunların içinde 8761 Da kütleli pik yoğunluğu  $\leq 2,460$  olan ve son olarak 4592 Da piki yoğunluğu  $\leq 7,246$  olanları terminal nod 1'de ileri evre fibrozis grubu olarak sınıflamıştır. Böylece grupların birbirinden ayrılması için çoklu biyolojik belirteç bulunmuş olmaktadır. Terminal nod 5'e bakılacak olursa bu nod hafif fibrozis sınıfını oluşturmaktadır ve toplam 53 hafif fibrozis hastasından 40'ını bu noda sınıflarken ileri evre fibrozis grubundan 0 birey bu gruba dâhil edilmiştir. Bu ayırım için ilk noddan başlanarak 4277 Da kütleli pik yoğunluğu  $> 10,44$ , 8936,2 Da piki için yoğunluğu  $\leq 58,45$  olan ve 3775,9 Da piki için  $> 0,634$  olan grup hafif fibrozis evresi olarak ayırt edilmiştir. Bu ağaç için yapılan ROC analizi F3, F4 sınıfı için 0,98 AUROC (ROC eğrisi altındaki alan) değeri vermiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. F3, F4 sınıfı için ROC analizi çizelgesi

İleri evre fibrozis grubunun hafif fibrozisli gruptan ayrımı için yapılan algoritma %83 (46/55) duyarlılık ve %75 (21/28) özgüllük ve %86 pozitif prediktif değer (ppv) ve %70 negatif prediktif değer (npv) vermiştir (Şekil 4.13.).

Test Sample Prediction Success Table					
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	Predicted Class		
			F0_F1_F2 N=55	F3_F4 N=28	
F0_F1_F2	53	86.792	46	7	
F3_F4	30	70.000	9	21	

Learn Test Class: None Count Row % Column %

Şekil 4.13. IMAC30 için özgüllük ve duyarlılık ile ppv ve npv değerleri çizelgesi

### 4.3. CM10 Çip Dizini İçin Analiz Sonuçları

#### 4.3.1. CM10 Düşük Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları

CM10 için düşük lazer enerjisi protokolünde elde edilen veriler IMAC30 çipinde uyulandığı gibi normalize edildikten sonra EDM oluşturulmuştur. Farklı fibrozis evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ayırt edici pik ( $p < 0,05$ ,  $ROC < 0,2$  veya  $ROC > 0,8$ ) sayıları Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** CM10 düşük molekül ağırlığı için fibroz evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla ayırt edici pik sayısı

Karşılaştırılan gruplar	ROC>0,8 pik sayısı	ROC<0,2 pik sayısı
F0 ve F1*	0	0
F0 ve F2*	0	0
F0 ve F3*	0	2
F0 ve F4*	23	21
F1 ve F2*	0	0
F1 ve F3	0	0
F1 ve F4*	24	19
F2 ve F3*	0	3
F2 ve F4*	7	19
F3 ve F4*	21	19
SK ve F0*	0	0
SK ve F1*	0	0
SK ve F2*	5	0
SK ve F3*	6	0
SK ve F4*	32	13
F3,F4* ve F0,F1,F2	3	0
SK* ve F0,F1,F2	0	0
SK* ve F3,F4	4	18
SK* ve F2,F3,F4	0	16

Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur. Parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi kullanılmıştır.

CM10 için yapılan analizde Çizelge 4.9.’da da görüldüğü gibi birbirine yakın sağlıklı kontrol ile F0 ve F1 arasında ve F0 ile F1 veya F2 arasında istatistiksel olarak anlamlı ayırt edici pik bulunmamıştır. Ayrıca F1 ve F2 arasında ayırt edici pik bulunamazken F1 ile F3 arasında da istatistiksel olarak anlamlı ayırt edici pik görülmemektedir. En çok ayırt edici pik sayısı IMAC30’da da olduğu gibi F4 (siroz) grubu ile F3 dâhil olmak üzere diğer fibrozis grupları arasında özellikle F0 ve F1 evreleri arasında bulunmuştur. En çok ayırt edici pik sayısına sahip sağlıklı kontrol ve F4 arasındaki anlamlı piklerden sağlıklı kontrol grubu pozitif grup olarak seçildiğinde ROC değeri >0,8 ve  $p<0,05$  olan ayırt edici pikler Çizelge 4.10.’da ROC değeri <0,2 olan pikler ise Çizelge 4.11.’de verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** CM10 için F4 ve SK grupları karşılaştırmasında ROC>0,8 olan pikler

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$1,25 \times 10^{-6}$	0,90	4300,47	32,6
2	$1,53 \times 10^{-6}$	0,89	4284,5	37,5
3	$3,08 \times 10^{-5}$	0,85	4093,03	36,1
4	$2,16 \times 10^{-5}$	0,84	3985,94	7,5
5	$1,01 \times 10^{-4}$	0,82	4383,86	7,2
6	$5,18 \times 10^{-5}$	0,82	13888,72	1,4
7	$9,33 \times 10^{-5}$	0,82	3155,92	28,5
8	$8,59 \times 10^{-5}$	0,82	9433,10	9,9
9	$1,93 \times 10^{-4}$	0,82	9507,12	3,9
10	$5,18 \times 10^{-5}$	0,82	9733,83	2,1
11	$2,65 \times 10^{-4}$	0,80	13986,6	2,2
12	$1,29 \times 10^{-4}$	0,80	4348,54	9,6
13	$2,65 \times 10^{-4}$	0,80	9643,31	2,7

\*ROC değeri hesaplamasında SK grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.10.'da verilen piklerden ROC=0,9 ve  $p=1,25 \times 10^{-6}$  olan 4300 Da, ROC= 0,89 ve  $p=1,53 \times 10^{-6}$  olan 4284 Da pikler F0, F1, F2 grupları hafif fibrozis grubu ve F3, F4 ileri evre fibrozis olmak üzere 2 grup olarak analiz edildiğinde de p değeri en düşük ilk 6 pik arasında bulunmaktadır (Çizelge 4.12). Bu piklerin gruplar arası analizi sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu gruplar ve bunların ROC ve p değerleri de Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.11.** CM10 için F4 ve SK grupları karşılaştırmasında ROC<0,2 olan pikler

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$2,07 \times 10^{-8}$	0,024	23467,71	1,8
2	$2,07 \times 10^{-8}$	0,041	22943,33	1,1
3	$2,92 \times 10^{-8}$	0,041	23044,3	1,0
4	$2,92 \times 10^{-8}$	0,041	24140,05	1,0
5	$1,84 \times 10^{-8}$	0,041	24284,17	0,8
6	$2,60 \times 10^{-8}$	0,041	25100,45	0,3
7	$5,14 \times 10^{-8}$	0,041	25277,21	0,3
8	$6,43 \times 10^{-8}$	0,058	11767,82	1,3
9	$2,38 \times 10^{-7}$	0,058	4796,471	17,6
10	$5,14 \times 10^{-8}$	0,058	22862,34	1,1
11	$4,10 \times 10^{-8}$	0,058	24991,87	0,3
12	$1,39 \times 10^{-7}$	0,058	25174,74	0,3
13	$1,39 \times 10^{-7}$	0,075	11740,16	1,6
14	$7,54 \times 10^{-7}$	0,075	25591,14	0,2
15	$1,87 \times 10^{-6}$	0,109	11697,08	2,2
16	$1,13 \times 10^{-6}$	0,109	11916,35	0,8
17	$4,50 \times 10^{-6}$	0,126	6134,721	8,0
18	$4,50 \times 10^{-6}$	0,126	11454,7	1,1
19	$3,06 \times 10^{-6}$	0,126	11536,6	1,2
20	$3,08 \times 10^{-5}$	0,143	4971,559	4,9
21	$1,05 \times 10^{-5}$	0,143	6115,792	12,5
22	$4,36 \times 10^{-5}$	0,160	5268,492	4,2
23	$4,00 \times 10^{-5}$	0,160	5909,933	128,4
24	$4,36 \times 10^{-5}$	0,160	5341,796	41,8
25	$1,26 \times 10^{-5}$	0,160	5547,638	3,7
26	$4,36 \times 10^{-5}$	0,160	4768,477	5,3
27	$4,00 \times 10^{-5}$	0,177	5002,042	6,6
28	$1,10 \times 10^{-4}$	0,177	5924,71	62,4
29	$1,29 \times 10^{-4}$	0,177	2947,028	25,8
30	$4,00 \times 10^{-5}$	0,177	6312,922	4,1
31	$1,52 \times 10^{-4}$	0,194	6194,78	11,4
32	$6,68 \times 10^{-5}$	0,194	6369,015	6,0

\*ROC değeri hesaplamasında SK grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.



**Çizelge 4.12.** CM10 düşük molekül F0, F1, F2 ve F3, F4 gruplarının karşılaştırması

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$4,4 \times 10^{-6}$	0,81	24992,8	27,1
2	$1,6 \times 10^{-5}$	0,81	24138,0	2,3
3	$4,2 \times 10^{-6}$	0,81	24286,5	27,1
4	$2,7 \times 10^{-5}$	0,20	13890,0	17,3
5	$8,1 \times 10^{-6}$	0,20	4284,3	4,1
6	$4,2 \times 10^{-6}$	0,20	4300,3	1,0

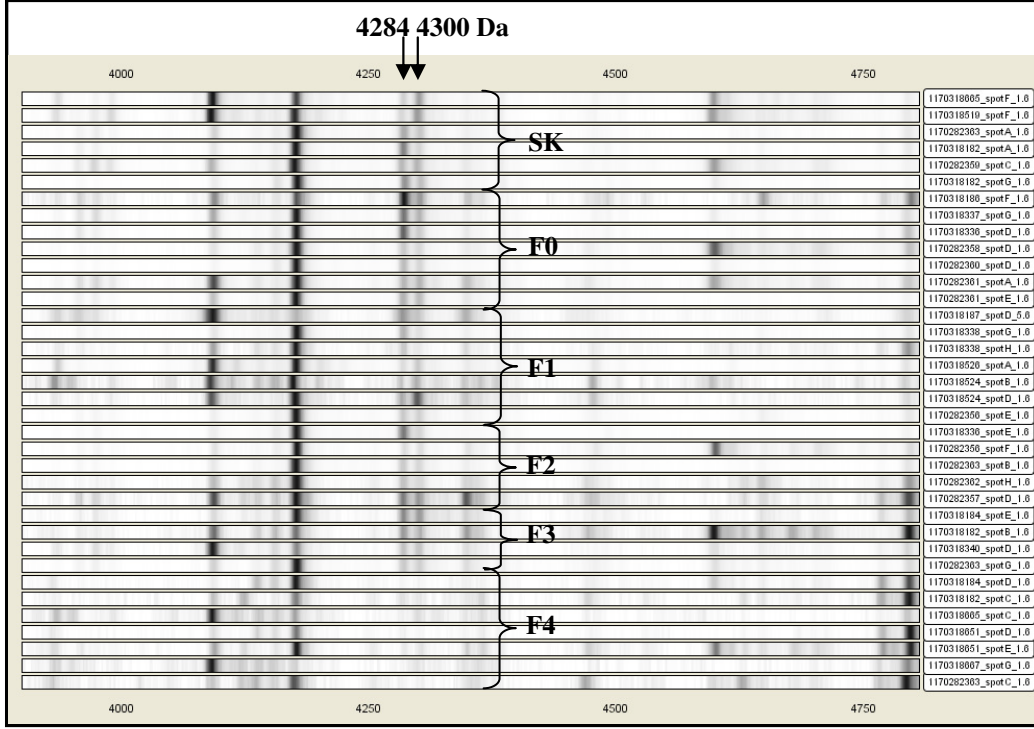
\*ROC değeri hesaplamasında F3, F4 grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.

**Çizelge 4.13.** CM10 m/z 4284 ve 4300 için gruplar arası karşılaştırma

Karşılaştırılan Gruplar	m/z 4284 için		m/z 4300 için	
	ROC	P değeri	ROC	P değeri
F4 ve SK*	0,89	$1,5 \times 10^{-6}$	0,90	$1,2 \times 10^{-6}$
F4 ve F0*	0,89	$4,2 \times 10^{-6}$	0,91	$4,2 \times 10^{-6}$
F4 ve F1*	0,86	$2,2 \times 10^{-5}$	0,90	$1,6 \times 10^{-5}$
F4 ve F2*	0,78	0,01	0,85	0,001
F4 ve F3*	0,88	0,001	0,92	0,001
F4 ve F0,F1*	0,90	$4,4 \times 10^{-7}$	0,88	$3,5 \times 10^{-7}$
F4 ve F0,F1,F2*	0,85	$7,5 \times 10^{-7}$	0,86	$2,5 \times 10^{-7}$
F4 ve F0,F1,F2,F3*	0,86	$1,5 \times 10^{-7}$	0,86	$4,4 \times 10^{-7}$
F3,F4 ve F0,F1,F2*	0,79	$4,2 \times 10^{-6}$	0,79	$8,1 \times 10^{-6}$

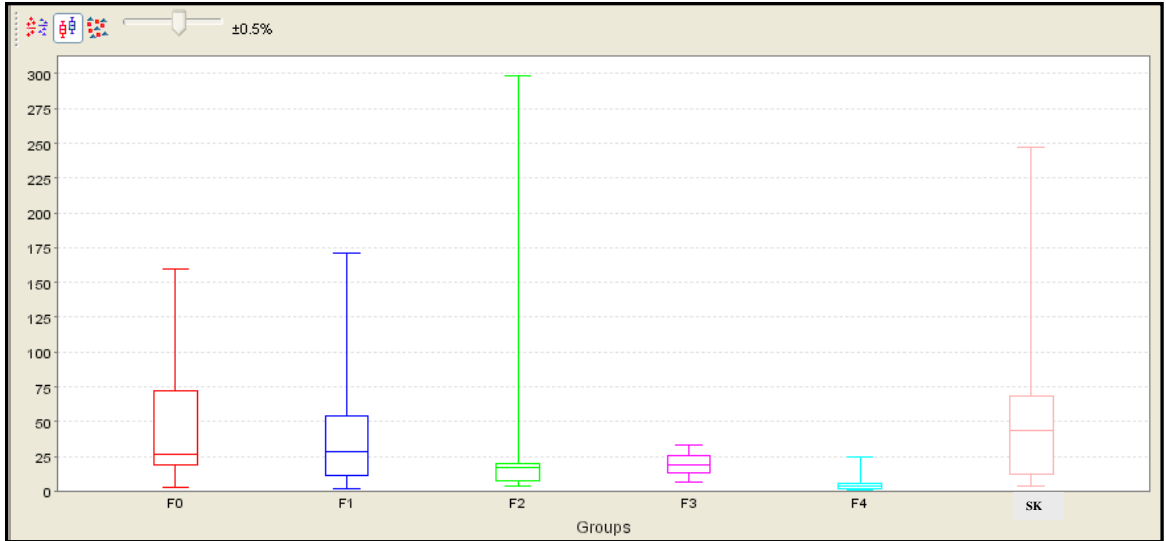
Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur.

Şekil 4.14.’de jel görüntüsünde de görüldüğü gibi bu pikler için pik yoğunlukları özellikle sağlıklı kontrol ve F3’ü de içeren diğer fibroz evreleri ile karşılaştırıldığında F4 evresi grubunda azalmıştır. Çizelge 4.13.’de gösterilmeyen diğer tüm evrelerin karşılaştırması bu pikler için  $p > 0,05$  vermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.14. CM10 çipi m/z 3952 ve 4278 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması

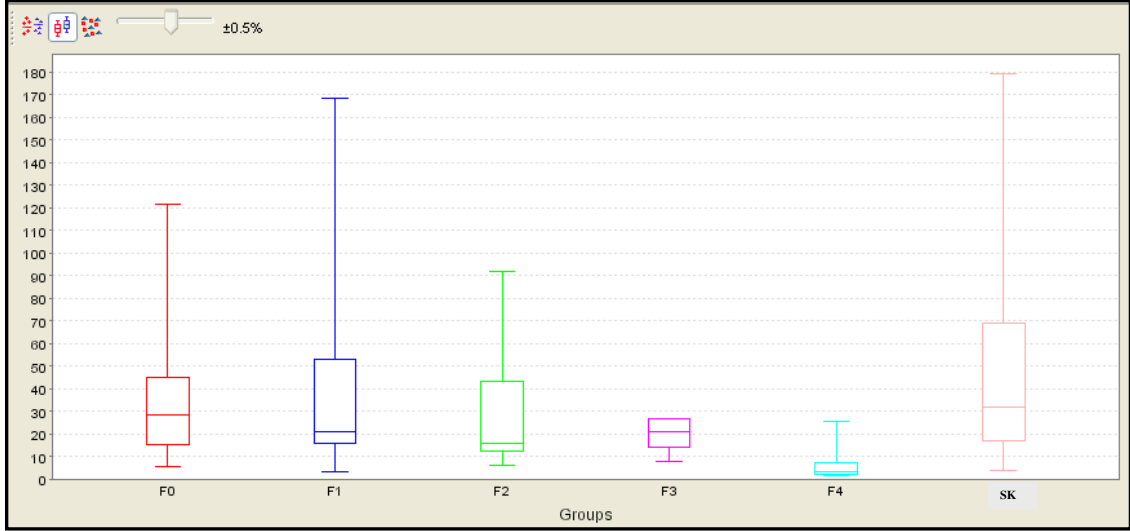
Şekil 4.14’de gösterilen yoğunluk farklılığı ayrıca gruplar arası dağılım çizelgeleri incelendiğinde de görülmektedir. Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.’da sırasıyla 4284 ve 4300 Da pikleri gruplar arası dağılım çizelgeleri görülmektedir.



Şekil 4.15. 4284 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi

Şekil 4.15.’de görüldüğü gibi 4284 Da piki F4 evresi grubu için oldukça düşük yoğunlukta iken diğer gruplarda yoğunluğun arttığı görülmektedir. Şekilden de

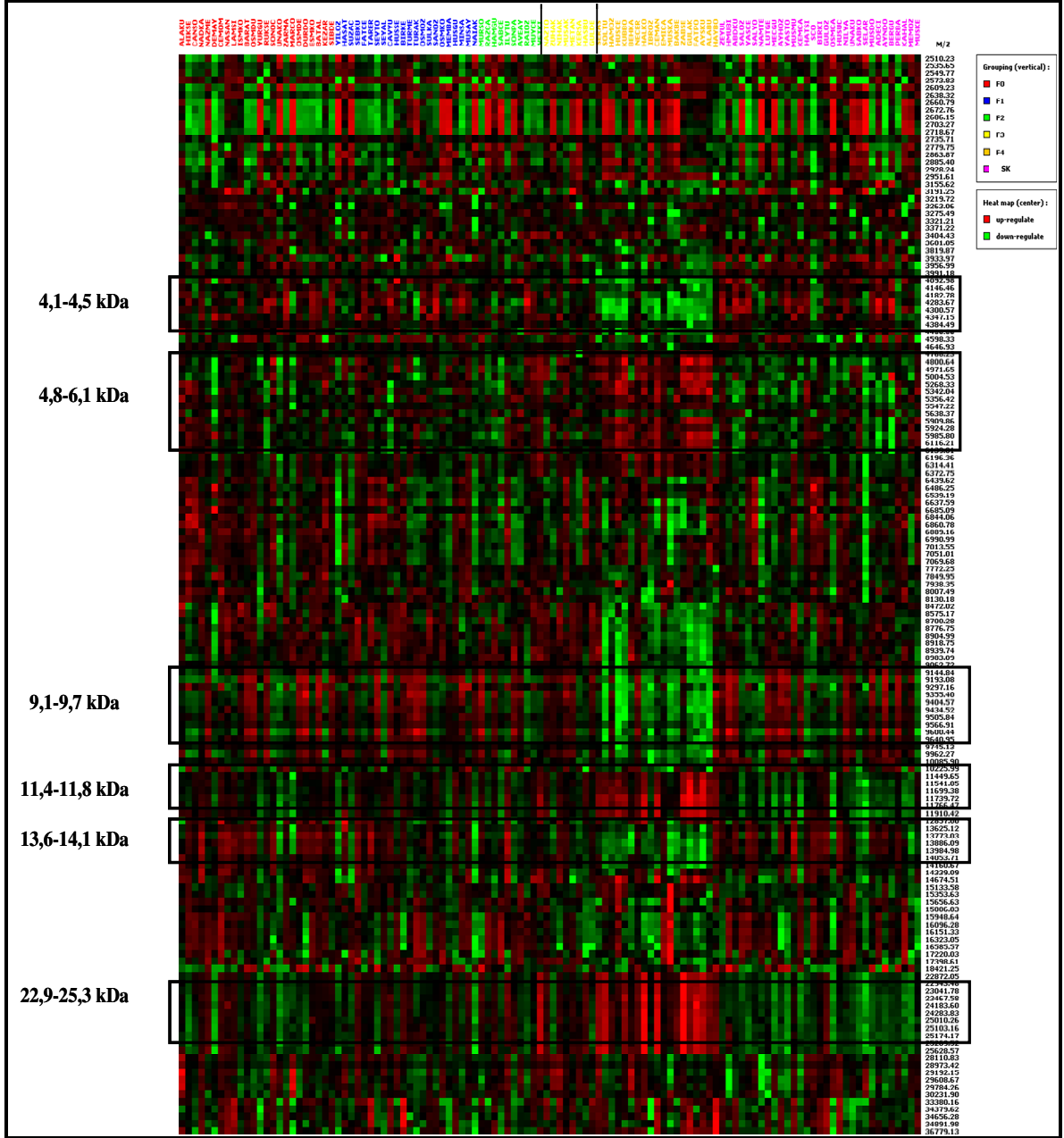
anlaşıldığı gibi F2 evresinde bazı hastalarda 4284 pikinin yoğunluğu artmıştır. Ancak diğer evrelerle karşılaştırıldığında F2 için istatistiksel olarak ayırt edici bir değer bulunmamıştır.



**Şekil 4.16.** 4300 Da piki için gruplar arası dağılım çizelgesi

Şekil 4.16'da gösterilen grup dağılım çizelgesi analizi F4 evresi dışında diğer fibroz evreleri ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir yoğunluk farkı göstermemektedir. Yine 4284 Da pikinde olduğu gibi 4300 molekül ağırlığındaki aday biyolojik belirteç için siroz evresinde yoğunluğun azaldığı görülmektedir.

Aynı anda tüm proteinlerin analizine imkân veren ısı haritası oluşturulduğunda piklerin yoğunluk farkları daha iyi ayırt edilmektedir. CM10 düşük moleküllü aday belirteçlerin araştırılması için yapılan ısı haritası analizi Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. CM10 çipi düşük lazer enerjisi protokolü için ısı haritası

Çizelge 4.10. ve Çizelge 4.11.'de verilen sonuçlar için görsel bir analiz olarak inceleyebileceğimiz ısı haritasında 4,1-4,5 kDa arası, 9,1-9,7 kDa ve 13,6-14,1 kDa arasındaki bölgelerde tüm proteinler için F4 evresinde yeşil renk ile belirtilen bir yoğunluk azalması görülmektedir. Bunun dışında siyah kare ile şekil üzerinde gösterilen 4,8-6,1 kDa arasında, 11,4-11,8 kDa ve 22,9-25,3 kDa arasındaki bölgede kalan proteinler için yoğunluğun F4 evresinde arttığı görülmektedir.

#### 4.3.2. CM10 Yüksek Lazer Enerjisi Protokolünde Analiz Sonuçları

CM10 için yüksek lazer enerjisi protokolünde 10-200 kDa arasında tüm kontrol ve hasta grupları için elde edilen protein profilleri normalize edildikten sonra EDM oluşturulmuştur. Farklı fibrozis evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ayırt edici pik ( $p < 0,05$ ,  $ROC < 0,2$  veya  $ROC > 0,8$ ) sayıları Çizelge 4.14.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.14.** CM10 yüksek molekül ağırlığı için fibrozis evrelerinin birbiriyle ve sağlıklı kontrol grubuyla ayırt edici pik sayısı

Karşılaştırılan gruplar	ROC>0,8 pik sayısı	ROC<0,2 pik sayısı
F0 ve F1*	0	0
F0 ve F2*	0	0
F0 ve F3*	21	2
F0 ve F4*	26	11
F1 ve F2*	0	0
F1 ve F3*	6	0
F1 ve F4*	21	8
F2 ve F3*	29	0
F2 ve F4*	18	7
F3 ve F4*	19	26
SK ve F0*	0	0
SK ve F1*	2	0
SK ve F2*	2	0
SK ve F3*	6	0
SK ve F4*	26	9
F3,F4* ve F0,F1,F2	8	4
SK* ve F0,F1,F2	0	0
SK* ve F3,F4	8	25
SK* ve F2,F3,F4	4	23

Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değeri için pozitif grup olarak değerlendirilen gruptur. Parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi kullanılmıştır.

Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi CM10 için yüksek moleküler için gruplar arası belirteç arama analizinde daha önce değinilen analizler de olduğu gibi düşük evreler arasında ayırt edici pik bulunmamıştır. İstatistiksel olarak ayırt edici en çok pik sayısı F3 dâhil olmak üzere F4 ve diğer fibrozis evreleri arasında bulunmuştur. Bu protokolde CM10’da elde edilen sonuçlar daha önceki analiz sonuçlarından farklı olarak en fazla ayırt edici pik sayısını SK-F4 veya F0-F4 arasında değil F3 ve F4 evreleri arasında vermiştir. CM10 için düşük lazer enerjisinde elde edilen sonuçlardan farklı bulunan bu

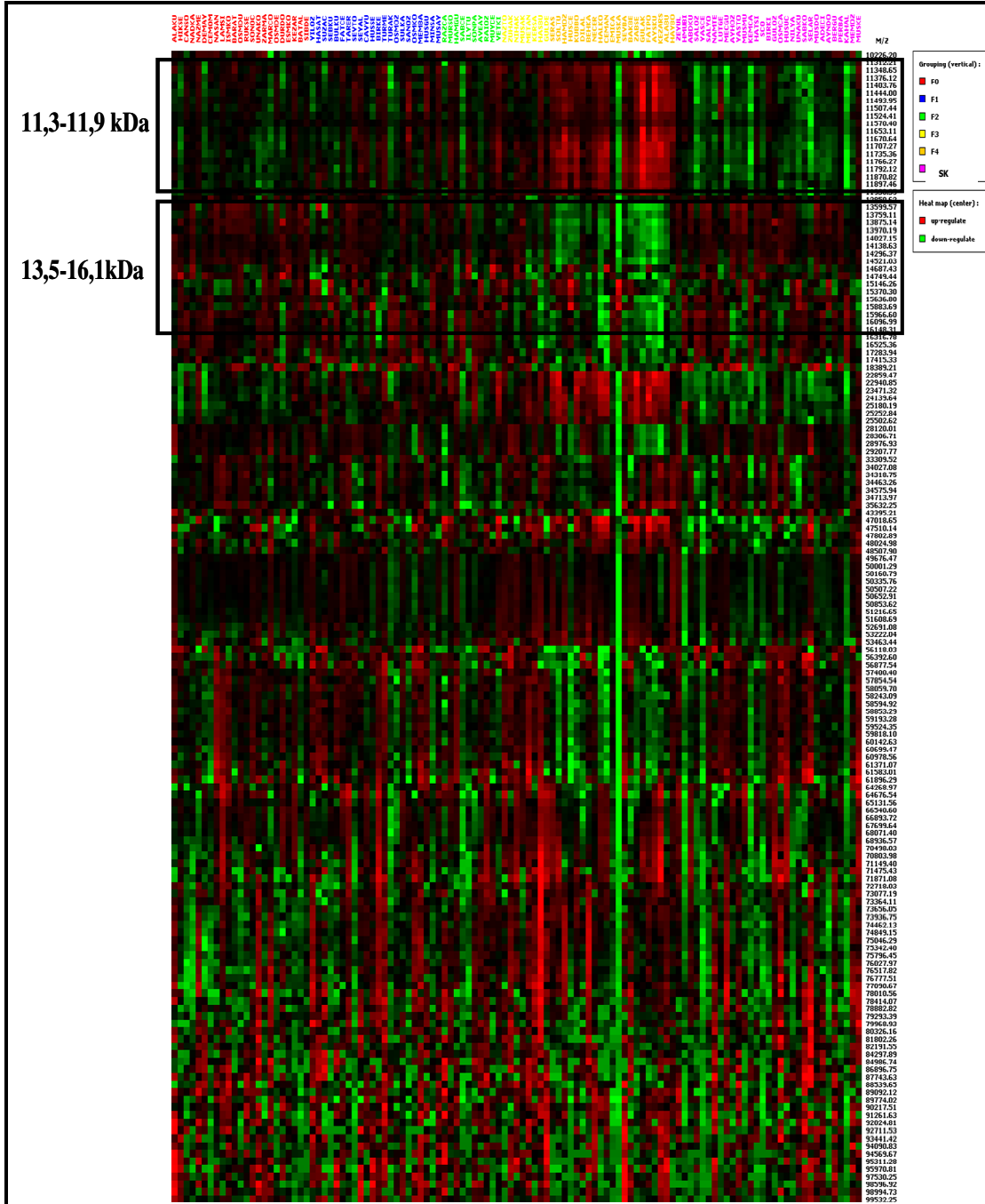
sonucun nedeninin oldukça düşük bulunan yoğunluklardan kaynaklandığı düşünülebilir. Çizelgede görüldüğü gibi hafif ve ileri evre fibrozis (F3,F4 – F0,F1,F2) olarak analiz yapıldığında ise bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan pik sayısı 12'dir. Bu pikler ve analiz sonuçları Çizelge 4.15.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.15.** CM10 yüksek molekül F0, F1, F2 ve F3, F4 grupları karşılaştırması

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$1,6 \times 10^{-7}$	0,84	11706,2	1,6
2	$7,2 \times 10^{-8}$	0,83	11898,3	0,7
3	$1,6 \times 10^{-7}$	0,83	11734,7	1,3
4	$1,9 \times 10^{-6}$	0,82	11670,7	1,6
5	$6,3 \times 10^{-7}$	0,81	11766,1	1,1
6	$5,1 \times 10^{-7}$	0,81	11795,3	1,0
7	$8,8 \times 10^{-7}$	0,80	11931,0	0,7
8	$1,6 \times 10^{-6}$	0,80	11866,5	8,6
9	$5,8 \times 10^{-8}$	0,14	13872,4	2,8
10	$1,9 \times 10^{-7}$	0,16	13967,9	3,4
11	$1,4 \times 10^{-6}$	0,17	14509,2	0,5
12	$2,1 \times 10^{-6}$	0,19	14141,8	1,2

\*ROC değeri hesaplamasında F3, F4 grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.15.'de görüldüğü gibi ayırt edici pikler 11-14,5 kDa arasındadır ve tüm piklerin yoğunlukları düşük bulunmuştur. Tüm pikler için gruplar arası analizi Şekil 4.18.'de görsel olarak ısı haritası analizinde görülmektedir.



**Şekil 4.18.** CM10 çipi yüksek lazer enerjisi protokolü için ısı haritası

Isı haritasında 11,3-11,9 kDa arasında sirozlu hasta grubunda kırmızı renk yani yoğunluk artışı görülürken 13,5-16,1 kDa arasındaki geniş bir bölgede yine siroz grubu için yeşil bir bölge yani bu pikler için yoğunluklarında bir azalış olduğu anlaşılmaktadır. Ancak haritanın geneli incelenecek olursa ayırt edilebilecek bölge çok değildir. Bunun en önemli nedeni ise spektraların düşük yoğunlukta elde edilmesidir. -

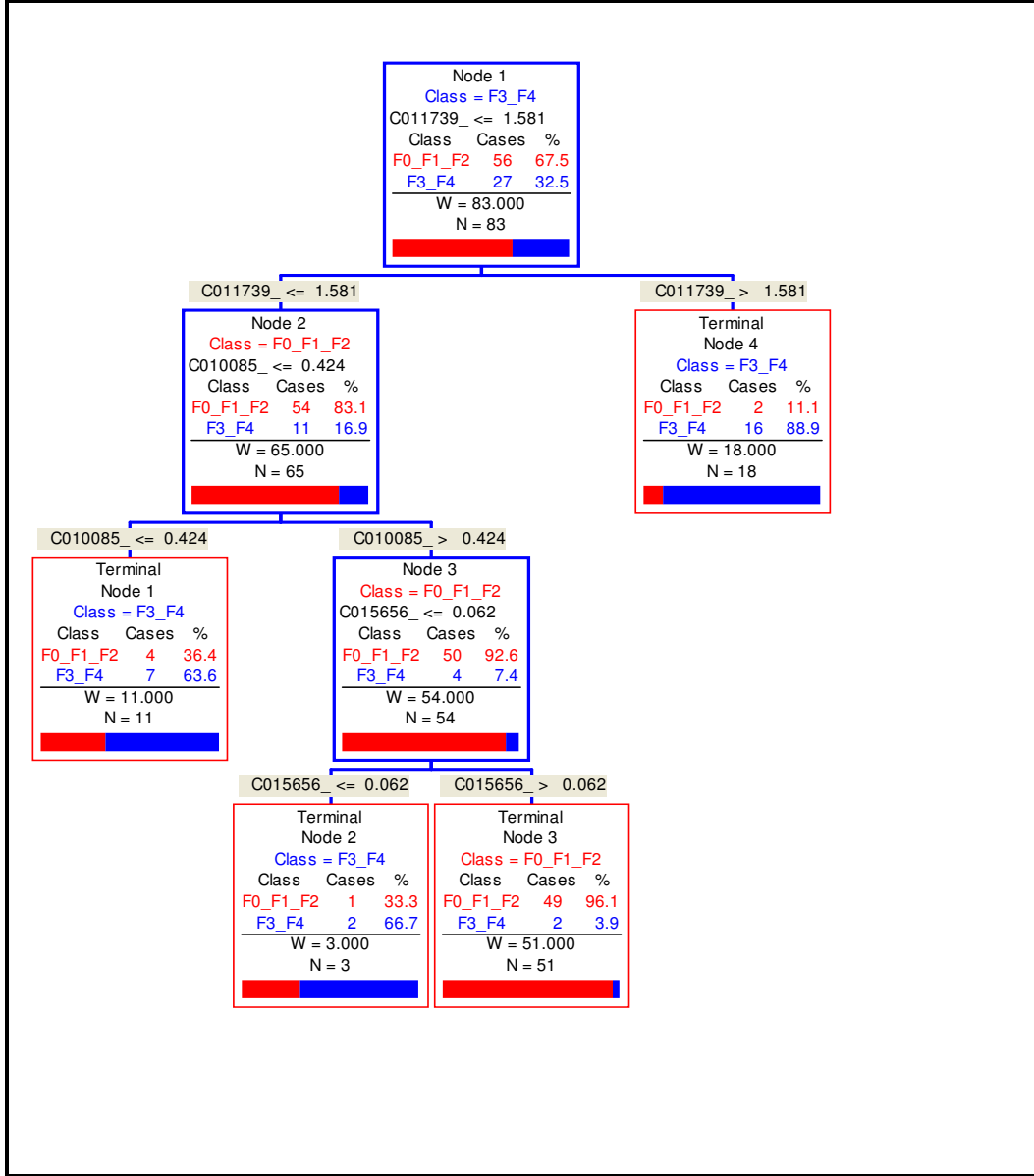
Yüksek molekülleri koparmak için yüksek lazer enerjisi kullanılmış olmasına rağmen elde edilen spektralar CM10 çipinde zayıf pikler vermiştir.

### 4.3.3. CM10 için Karar Ağacı Analizi

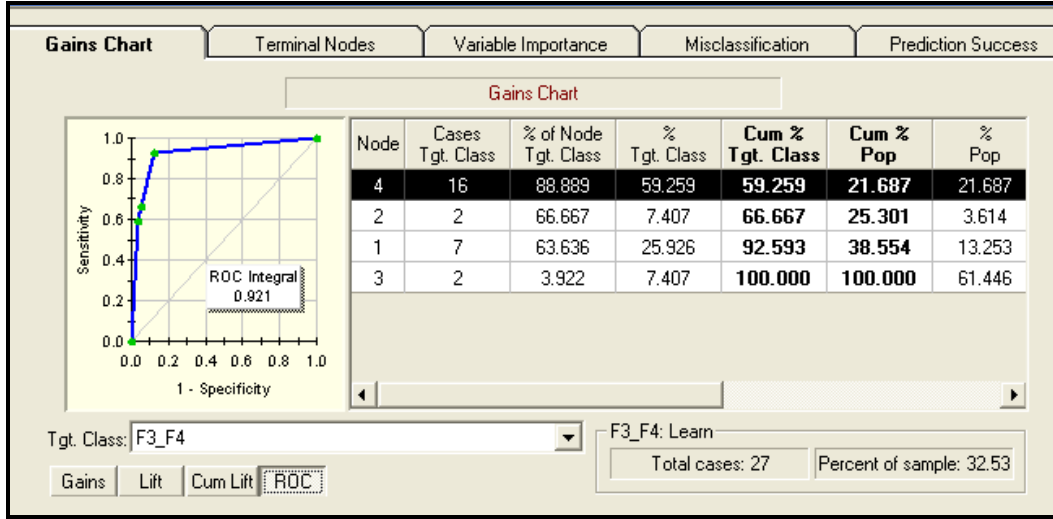
CM10 çipi analizi için tek tek farklı fibrozis evreleri arasında istatistiksel olarak ayırt edici protein/peptit araştırılması yanı sıra “Biomarker Patterns Software” versiyon 5.0 (Ciphergen Biosystems) yazılımı kullanılarak IMAC30 çipinde yapıldığı gibi karar ağacı sınıflandırması da yapılmıştır. Bu analiz için istatistiksel olarak anlamlı pik sayısı fazla olan CM10 düşük lazer enerjisinde elde edilen spektralar tercih edilmiştir. Yine grup sayısının fazla olması ve anlamlı sonuçlar elde edilebilmesi için hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) fibrozis grupları olmak üzere iki grup analiz edilmiştir. Bunun için normalizasyon analizi ve kümeleme analizi sonrası veriler “Biomarker Patterns Software” için uygun formata çevrilerek analiz yapılmıştır. Oluşturulan karar ağacı Şekil 4.19.’da verilmiştir.

Şekil 4.19.’da görülen karar ağacında kök nodda ayırt edici pik 11739 Da kütleli proteindir. Birinci nodda yoğunluk için ayırt edici değer 1,581’dir ve bu yoğunluk değerine eşit veya küçük olan grup sol kola, bu değerden büyük olan grup sağ kola ayrılmıştır. Buna göre devam eden dal oluşumu sonucu karar ağacı toplam 4 terminal noddan oluşmuştur. Oluşturulan ağaçta terminal nod 3’e bakılacak olursa bu nod hafif fibrozis sınıfını oluşturmuştur. İlk noddan başlanarak 11739 Da kütleli pik yoğunluğu  $\leq 1,581$  olan ve bunlardan 10085 Da kütleli pik yoğunluğu  $> 0,424$  olan ve son olarak 15656 Da piki yoğunluğu  $> 0,062$  olanları terminal nod 3’de hafif fibrozis grubu olarak sınıflamıştır. Bu grupta hafif fibrozisli bireylerin %96,1’ini ve ileri evre fibrozis grubunun % 3,9’unu sınıflamıştır. Bu ağaç için yapılan ROC analizi ileri evre fibrozis grubu (F3, F4) için 0,92 AUROC (ROC eğrisi altındaki alan) değeri vermiştir (Şekil 4.20.).





**Şekil 4.19.** CM10 çipinde hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre (F3, F4) fibrozis gruplarının ayrıştırılması için oluşturulan karar ağacı



Şekil 4.20. F3, F4 sınıfı için ROC analizi çizelgesi

İleri fibrozis grubunun hafif fibrozisli gruptan ayrımı için yapılan algoritma %86 (46/53) duyarlılık ve %66 (20/30) özgüllük ile %82 pozitif prediktif değer (ppv) ve %74 negatif prediktif değer (npv) vermiştir (Şekil 4.21.).

Actual Class	Total Cases	Percent Correct	Predicted Class	
			F0_F1_F2 N=53	F3_F4 N=30
F0_F1_F2	56	82.143	46	10
F3_F4	27	74.074	7	20

Şekil 4.21. CM10 karar ağacı için özgüllük ve duyarlılık ile ppv ve npv değerleri çizelgesi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Artan invazif olmayan testler ve görüntüleme tekniklerine rağmen karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde güvenle kullanılacak bir test bulunmamaktadır. Günümüzde histolojik teşhis ve fibrozisin evrelendirilmesinde halen altın standart olarak uygulanan karaciğer biyopsisi uygulaması nadir ancak ciddi komplikasyonları olan ve maliyeti yüksek invazif bir prosedürdür (Blanc et al. 2005). Bu nedenle karaciğer fibrozisinin seruma dayalı testlerine ilgi son zamanlarda oldukça artmış ve çok sayıda araştırmacı tarafından bazı dizinler geliştirilmiştir. Ancak bu testlerin hiçbiri, fibrozisin farklı histolojik evrelerini doğru bir şekilde ayırt edememektedir. Toplam beş biyokimyasal belirteç içeren algoritma olan Fibrotest de büyük orandaki hastayı belirli bir gruba dâhil edememektedir. Bugüne kadar geliştirilmiş olan testlerin hiçbirinin bir diğerine tek başına üstünlük sağlamadığı görülmektedir. Bu nedenle günümüzde uygulanmakta olan klinik ve laboratuvar testlerinden daha iyi bir prognostik doğruluğa sahip invazif olmayan biyolojik belirteçlerin araştırılmasında proteomik yaklaşımlar oldukça önem kazanmıştır. Bu çalışmada takip edilmediği sürece karaciğer sirozu ve kanserine kadar ilerleyebilen karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde kullanılacak kesinliği yüksek serum protein belirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Günümüzde farklı yazılımlar ile biyoinformatik çalışmaları içeren ProteinÇip biyolojik belirteç araştırma sistemi olan SELDI-TOF kütle spektrometrisi ile yapılan çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bu teknolojinin tekli veya çoklu biyolojik belirteç araştırmalarındaki etkinliği prostat (Adam et al. 2002), over (Petricoin et al. 2002), ve meme kanseri (Li et al. 2002) gibi değişik kanser tiplerinde gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalarda m/z 20,000 altında (<20 kDa) yüksek duyarlılık ve özgüllükte çoklu biyolojik belirteçler bulunmuştur. Karaciğer hastalıklarında yapılan çoğu çalışma siroz ve hepatoselüler kanserin teşhisini kolaylaştıracak serum belirteçlerinin araştırılması üzerine yapılmıştır. Karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesi için Poon ve arkadaşları kronik HBV'li hastalarda (Poon et al. 2005), Göbel ve arkadaşları (Göbel et al. 2006) ile Morra ve arkadaşları (Morra et al. 2007) tarafından kronik HCV'li hastalarda yapılan biyolojik belirteç araştırma çalışmaları SELDI teknolojisinin kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda fibrozis evreleri için özellikle hafif ve ileri evre

fibrozis grupları arasında ayırt edici bazı pikler bulunmuş ancak bunların validasyonları henüz yapılmamıştır.

Bu çalışmada farklı fibrozis evresindeki hasta ve sağlıklı kontrol serumları IMAC30 ve CM10 çip türlerine uygulanmış ve SELDI-TOF MS ile analiz edilmiştir. Çip türlerinin seçimi için az sayıda hasta (her evreden 5 hasta) serumu ile bir ön çalışma yapılmış ve gruplar arasında en çok ayırt edici pik sayısı veren IMAC30 ve CM10 çipleri seçilmiştir. SELDI-TOF kütle spektrometrisi için cihazın tekrarlanabilirliği bu çalışmada kalite kontrol serumu kullanılarak gösterilmiştir. Elde edilen spektralarda seçilen pik özellikleri için CV% aralıkları Semmes ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak kabul edilebilir aralıkta bulunmuştur (Semmes et al. 2005).

Karaciğer fibrozisi olan toplam 87 hasta (30 HBV, 57 HCV) ve 32 sağlıklı kontrol ile yapılan bu çalışmada IMAC30 ve CM10 çip türleri için hem düşük lazer enerjisinde hem de daha yüksek moleküllü proteinlerin analizi için yüksek lazer enerjisinde olmak üzere iki farklı protokolda spektralar elde edilmiştir. Bu analizler sonucunda her bir serum örneği için yaklaşık 450 protein piki bulunmuştur. Her evre için elde edilen spektralar ayrı ayrı birbiri ile karşılaştırılmış ve parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi ile istatistiksel analiz uygulanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı ayırt edici pik sayısı her iki çip türü için de en çok sağlıklı kontrol ve sirozlu (F4) hasta grubu profilleri arasında görülmüştür. Evrelerin hafif (F0, F1, F2) ve ileri evre fibrozis (F3, F4) olarak gruplandırılması ile de hem istatistiksel olarak anlamlı bağımsız ayırt edici pikler hem de “Biomarker Patterns Software” versiyon 5.0 (Cipergen Biosystems) yazılımı ile karar ağacı sınıflandırması sonucu çoklu belirteçler araştırılmıştır. Her iki çip türü için elde edilen yaklaşık 450 pikten 26 tanesi hafif ve ileri fibrozis için istatistiksel olarak anlamlı ayırt edici bulunmuştur. Bu 26 pik için AUROC değeri seçilen pozitif gruba bağlı olarak değişmekte ve bu değer istatistiksel olarak  $\geq 0,8$  veya  $\leq 0,2$  değerlerinde en anlamlı olmaktadır (Çizelge 5.1.). Tablo 5.1.’de hem CM10 hem de IMAC30 için hafif ve ileri evre fibrozis grupları arasında Mann-Whitney *U* testi ile istatistiksel olarak ayırt edici bulunan pikler m/z değerlerine göre verilmiştir. İleri evre fibrozis grubu pozitif olarak seçildiğinden ROC eğrisi altında kalan alan  $\geq 0,8$  bulunanlar için yoğunluğun ileri evre grubunda artış,  $\leq 0,2$

değerindekiler için ise azalış gösterdiği anlaşılmaktadır. Tablodan da görüldüğü gibi tüm bu pikler için p değeri <0,05 bulunmuştur.

**Çizelge 5.1.** Hafif ve ileri evre fibrozis grupları için ayırt edici pikler

No	P değeri	ROC	m/z	Ortalama yoğunluk
1	$9,0 \times 10^{-9}$	0,13	IMAC-4278	27,1
2	$5,8 \times 10^{-8}$	0,14	CM10-13872	2,8
3	$5,6 \times 10^{-8}$	0,15	IMAC-3268	17,3
4	$1,4 \times 10^{-7}$	0,15	IMAC-6851	2,3
5	$5,0 \times 10^{-7}$	0,15	IMAC-3952	27,1
6	$1,9 \times 10^{-7}$	0,16	CM10-13967	3,4
7	$5,5 \times 10^{-7}$	0,17	IMAC-3772	4,1
8	$1,4 \times 10^{-6}$	0,17	CM10-14509	0,5
9	$4,0 \times 10^{-7}$	0,18	IMAC-59393	0,19
10	$2,1 \times 10^{-6}$	0,19	CM10-14141	1,2
11	$8,1 \times 10^{-6}$	0,20	CM10-4284	4,1
12	$4,2 \times 10^{-6}$	0,20	CM10-4300	1,0
13	$2,7 \times 10^{-5}$	0,20	CM10-13890	17,3
14	$1,6 \times 10^{-7}$	0,84	CM10-11706	1,6
15	$7,2 \times 10^{-8}$	0,83	CM10-11898	0,7
16	$1,6 \times 10^{-7}$	0,83	CM10-11734	1,3
17	$1,9 \times 10^{-6}$	0,82	CM10-11670	1,6
18	$6,8 \times 10^{-7}$	0,81	IMAC-11847	1,0
19	$6,3 \times 10^{-7}$	0,81	CM10-11766	1,1
20	$5,1 \times 10^{-7}$	0,81	CM10-11795	1,0
21	$4,4 \times 10^{-6}$	0,81	CM10-24992	27,1
22	$4,2 \times 10^{-6}$	0,81	CM10-24286	27,1
23	$1,6 \times 10^{-5}$	0,81	CM10-24138	2,3
24	$8,8 \times 10^{-7}$	0,80	CM10-11931	0,7
25	$1,6 \times 10^{-6}$	0,80	CM10-11866	8,6
26	$1,9 \times 10^{-6}$	0,80	IMAC-11725	10,2

\*ROC değeri hesaplamasında ileri evre fibrozis (F3, F4) grubu pozitif grup olarak seçilmiştir.

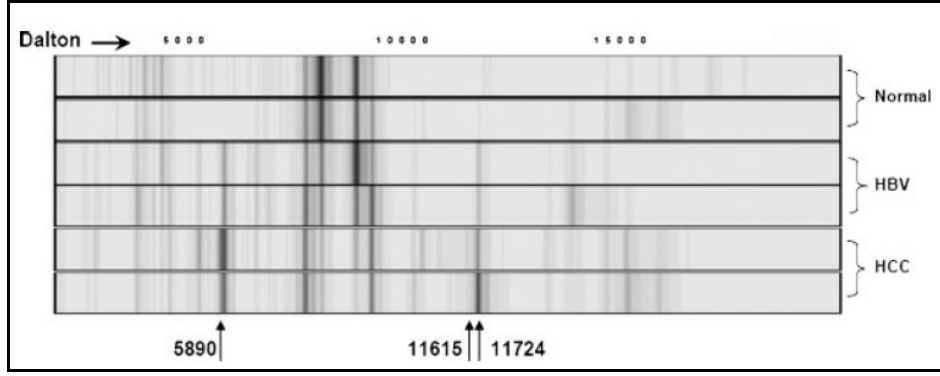
Tablo 5.1.'de gösterilen ayırt edici piklerden m/z 11725 piki için ileri fibrozis evresinde yoğunluk artışı görülmektedir (ROC=0,80,  $p=1,9 \times 10^{-6}$ ). He ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada HBV ile ilişkili hepatoselüler karsinoma (HCC) hastalarının serum örnekleri SELDI-TOF kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir (He et al. 2008). Bu çalışmada HBV ile enfekte 50 HCC hastası, 45 HBV hastası (siroz

veya kanser geliştirmemiş) ve 30 sağlıklı kontrol serumu içeren 3 grup için de bu çalışmada kullanılan IMAC-Cu (bakır) ipleri kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan ayırt edici pikler 5890, 11615 ve 11724 Da pikleridir. HCC’li hastalarda artan yoğunluğu gösterilen 11724 Da piki bu çalışmada da aynı ip turnde ayırt edici olarak bulunan 11725 Da proteini ile büyük yakınlık göstermektedir. Ancak bu çalışmada da 11724 Da proteininin tanımlanması yapılmamıştır. Çizelge 5.2.’de 11725 Da piki için evreler arası karşılaştırmanın istatistiksel sonucu gösterilmiştir. Bu tabloya göre siroz hastalarında en büyük ifade farkının ROC değeri 0,92 olan sağlıklı kontrol grubu ile olduğunu ve F0,F1,F2,F3 evreleri bir grup olarak birleştirildiğinde elde edilen ROC değerinin de 0,82 olduğu görülmektedir. Bu ROC değerleri F4 evresinde artan ifadenin diğer fibrozis evrelerinde azalırken sağlıklı kontrol grubunda azalmanın daha çok olduğunu göstermektedir ve He ve arkadaşlarının sonucu ile uyumludur. Şekil 5.1.’de He ve arkadaşlarının evreler arasında gösterdiği ifade farklılığı bu çalışmada Şekil 5.2.’de gösterilmiştir. Proteinin izelge 5.2.’de görülen ve sağlıklı kontrole doğru gittikçe azalan miktarı pikin düşük yoğunluğu nedeni ile net olarak görülememektedir. Bu sonuçlar, çalışmada HCC hastası bulunmamakla birlikte F4 evresi olarak belirlenen siroz hastalarının HCC’ye doğru giden süreç ihtimalini düşündürmektedir.

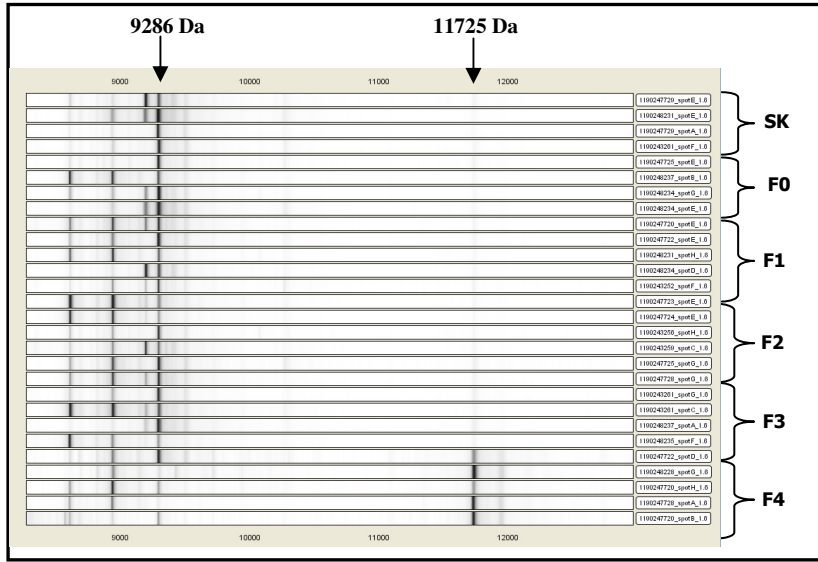
**Çizelge 5.2.** 11725 Da pikleri için F4 grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması

Karşılaştırılan Gruplar	m/z 11725 için	
	ROC	P değerleri
SK ve F4*	0,92	$1,9 \times 10^{-7}$
SK ve F3*	0,84	$7,8 \times 10^{-3}$
F0 ve F4*	0,85	$2,7 \times 10^{-5}$
F1 ve F4*	0,82	$7,7 \times 10^{-6}$
F2 ve F4*	0,83	$7,5 \times 10^{-3}$
F3 ve F4*	0,72	0,041
F0,F1,F2 ve F4*	0,84	$1,4 \times 10^{-6}$
F0,F1,F2,F3 ve F4*	0,82	$1,9 \times 10^{-6}$
F0,F1,F2 ve F3,F4 *	0,80	$1,9 \times 10^{-6}$

Çizelgede sonuna “\*” işareti gelen grup istatistiksel analiz sırasında ROC değerleri hesaplaması için pozitif grup olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 5.1.** HCC, HBV ve sağlıklı kontrol grupları arasında 11724 Da piki için jel görüntüsü karşılaştırması (He et al. 2008 makalesinden alınmıştır)



**Şekil 5.2.** IMAC30 çipi m/z 11725 için gruplar arası jel görüntüsü karşılaştırması

Bu çalışmada IMAC30 çipinde düşük lazer enerjisi yapılan analiz sonuçlarında F4 evresi için artan ifadesi bulunan 23-23,5 kDa aralığındaki diğer proteomik özellikler yine IMAC30 çipi ile yapılan Ward ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarına benzerlik göstermektedir (Ward et al. 2006). Ward ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada m/z 22 960 ve 23 530 (23/23,5 kDa) olmak üzere iki pikin HCC'li hasta serumunda %50 oranında arttığı gösterilmiştir ( $P < 0,001$ ). Bu pikler LC-MS/MS ile tanımlandığında immüoglobulinin kappa ve lambda hafif zincirleri olduğu bulunmuştur. Hafif fibrozis evresiyle karşılaştırıldığında siroz grubunda bu piklerin miktarının artmış olması Ward ve arkadaşlarının sonucu ile uyumlu olarak düşünülebilir. Ancak bu sonucu doğrulamak için HCC'li grubun da çalışmaya dahil edilmiş olması gerekmektedir. Ward ve arkadaşlarının çalışmalarında bu çalışmadakine

benzer şekilde IMAC30 çipinin aktivasyonu için bakır kullanmış olması bu aralıktaki proteinlerin aynı proteinler olduğunu düşündürmektedir.

İstatistiksel olarak anlamlı bulunan evreler arası ayırt edici pik sayıları tek tek incelendiğinde her iki çip türü için de SK-F0, F0-F1 karşılaştırmasında ayırt edici pik bulunamamıştır. F0-F2 evreleri karşılaştırmasında ise yalnızca IMAC30 çipi için düşük lazer enerjisi protokolü ile elde edilen sonuçlarda 5 tane ayırt edici pik bulunmuş diğer protokollerde ve CM10 çipinde ayırt edici pik bulunamamıştır. Bu sonucun doğrulanabilmesi için IMAC30 çalışmasında 7 olan F2 evresindeki hasta sayısının fazlalaştırılması ve 24 olan F0 evresindeki hasta sayısına yakın olması güvenilirliği arttıracaktır.

Hem IMAC hem de CM10 çipi için evrelerin tek tek karşılaştırıldığı analiz sonuçlarında düşük fibrozis evreleri arasında istatistiksel olarak ayırt edici anlamlı protein piki bulunmazken siroz evresi hastaları için F3 evresi dahil olmak üzere tüm fibrozis evreleri arasında ayırt edici anlamlı pik bulunmuştur.

Bu çalışmada tek tek farklı fibrozis evreleri arasında istatistiksel olarak ayırt edici protein/peptit araştırılması dışında karar ağacı sınıflandırmasına olanak veren “Biomarker Patterns Software” versiyon 5.0 (Ciphergen Biosystems) yazılımı ile analiz hem IMAC30 hem de CM10 çipi için yapılmıştır. Bu analiz sonucu hafif ve ileri evre fibrozis grupları için aday, çoklu biyolojik belirteçler bulunmuştur. IMAC30 çipi için oluşturulan karar ağacı 0,98 AUROC değeri ile %83 duyarlılık ve %75 özgüllük ile %86 pozitif prediktif değer (ppv) ve %70 negatif prediktif değer (npv) vermiştir. Bu değerler oluşturulan ağacın güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. IMAC 30 için bulunan 5 ayırt edici pikin (m/z 3775.9, 4277.7, 4592.1, 8761.1 ve 8936.2) farklı ifade miktarı hafif ve ileri evre fibrozis gruplarını ayırt etmiştir (Şekil 4.11.). Karar ağacında ayırt edici olarak bulunan 4277,7 Da piki Çizelge 5.1.’de de gösterilen ve hafif ve şiddetli fibrozis için Mann-Whitney *U* testi ile de ayırt edici bulunan piktir. Bu pikin SK grubundan itibaren F4 evresine doğru gittikçe azalan ifadesi Şekil 4.2.’de gösterilmiştir. CM10 için oluşturulan karar ağacında toplam 3 tane (m/z 11739, 10085, 15656) belirteç bulunmuştur. Bu ağaç için yapılan ROC analizi 0,92 AUROC değeri ile %86 duyarlılık ve %66 özgüllük değeri vermiştir. Pozitif prediktif değeri %82 ve negatif prediktif değeri %74 bulunmuştur. IMAC30 için oluşturulan karar ağacının



özgüllüğü (spesifite) CM10 için oluşturulan karar ağacından yüksek bulunmuştur. Her iki ağaç için de bulunan ayırt edici piklerin farklı olması şaşırtıcı değildir. Çünkü serumda bulunan farklı proteinler, çiplerin özelliklerine göre farklı çiplere bağlanmıştır. Bu çalışmada bulunan ayırt edici piklerin tanımlanması yapılmamıştır. Tanımlama aşamasının uygulanması için önerilen ikinci adım bu piklerin daha fazla sayıda hasta ile valide edilmesidir. Ancak her protein tek bir m/z değerine sahip olduğu için proteinin tanımlanması yapılmadan da bu proteinler hasta serumunda kesin olarak belirlenebilir. Bu nedenle bundan sonraki en önemli aşama bu belirteçlerin valide edilmesi aşamasıdır.

Bu çalışmada SELDI teknolojisinin karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesinde uygulanabilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma Türkiye’de SELDI teknolojisi ile yapılan ilk çalışmadır. Biyolojik belirteç araştırmalarında ön plana çıkan ve büyük bir kolaylık sağlayan SELDI teknolojisi ile karaciğer hastalıklarında yapılan çalışmalar artmıştır. Ancak bugüne kadar karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesi için yapılan çalışma sayısı, HCC grubunda yapılan çalışma sayısından çok daha azdır ve bu çalışma karaciğer fibrozisinin evrelendirilmesi için yapılan çalışmalara destek verecek niteliktedir.

## KAYNAKLAR

- Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. 2002. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res*, 62: 3609–14.
- Afdhal NH. 2003. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood tests. *Hepatology*, 37(5):972-4.
- Albanis E, Friedman SL. 2006. Diagnosis of Hepatic Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *Clin Liver Dis*, 10: 821-33.
- An HJ, Miyamoto S, Lancaster KS, Kirmiz C, Li B, Lam KS, Leiserowitz GS, Lebrilla CB. 2006 Profiling of glycans in serum for the discovery of potential biomarkers for ovarian cancer. *J Proteome Res*. 5:1626–35.
- Baggerly, K.A., J.S. Morris, and K.R. Coombes. 2004. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics*, 20(5): p. 777-85.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1200-1205.
- Basso D, Valerio A, Seraglia R, Mazza S, Piva MG, Greco E, Fogar P, Gallo N, Pedrazzoli S, Tiengo A, Plebani M. 2002. Putative pancreatic cancer-associated diabetogenic factor: 2030 MW peptide. *Pancreas*, 24: 8–14.
- Bedossa P, Poynard T. 1996. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, 24: 289–93.
- Befeler AS, Di Bisceglie AM. 2002. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology*, 122:1609–19.
- Benyon RC, Arthur MJ. 2001. Extracellular matrix degradation and the role of stellate cells. *Semin Liver Dis*; 21: 373–84.
- Blanc JF, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmoulière A. 2005. Investigation of liver fibrosis in clinical practice. *Hepatol Res*, 32: 1–8.
- Burak KW, Lee SS. 2000. Treatment options in patients with chronic hepatitis C. *Can J Public Health*, 91 (Suppl. 1): S22-6–S24-8.
- Cadranel JF, Rufat P, Degos F. 2000. Practices of liver biopsy in France: Results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology*, 32: 477–81.

- Calamita Z, Burini RC. 1995. Immunologic changes in alcoholic liver cirrhosis. *Arq Gastroenterol.* 32: 79–84.
- Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J, Contreras R. 2004. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med.* 10: 429–34.
- Cheng Wu, Zhanfeng Wang, Lijie Liu, Peng Zhao, Wenjing Wang, Dingkang Yao, Bing Shi, Junhua Lu, Ping Liao, Yaning Yang and Liang Zhu. 2009. Surface enhanced laser desorption/ionization profiling: New diagnostic method of HBV-related hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24: 55–62.
- Chignard N, Beretta L. 2004. Proteomics for hepatocellular carcinoma marker discovery. *Gastroenterology*, 127: S120–5.
- Cui J, Xiaonan Kang, Zhi Dai, Cheng Huang, Haijun Zhou, Kun Guo, Yan Li, Yu Zhang, Ruixia Sun, Jie Chen, Yang Li, Zhaoyou Tang, Toshimasa Uemura, Yinkun Liu. 2007. Prediction of chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by SELDI-based serum decision tree classification. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133:825–834.
- Cui JF, Yin-Kun Liu, Hai-Jun Zhou, Xiao-Nan Kang, Cheng Huang, Yi-Feng He, Zhao-You Tang, Toshimasa Uemura. 2008. Screening serum hepatocellular carcinoma-associated proteins by SELDI-based protein spectrum analysis. *World J Gastroenterol*, 14(8): 1257-1262.
- Di Bisceglie AM. 1997. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 26: 34S-38S.
- Diamandis EP. 2004. Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems. *J Natl Cancer Inst.* 96(5): p. 353-6.
- Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. 1998. Regression of hepatic fibrosis in hepatitis C with long-term interferon treatment. *Dig Dis Sci*, 43:2573–6.
- El-Serag HB, Mason AC. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340: 745-750.
- Engwegen JY, Helgason HH, Cats A, Harris N, Bonfrer JM, Schellens JH, Beijnen JH. 2006. Identification of serum proteins discriminating colorectal cancer patients and healthy controls using surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol*, 12:1536-44.
- Fischer B, Haydon E, Rehm J, Krajden M, Reimer J. 2004. Injection drug use and the hepatitis C virus: considerations for a targeted treatment approach – the case study of Canada. *J Urban Health*, 81: 428–47.

- Flahaut C, Michalski JC, Danel T, Humbert MH, Klein A. 2003. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. *Glycobiology*. 13:191–8.
- Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez- Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. 2002. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, 36: 986–92.
- Freeze HH, Aebi M. 2005. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*. 15:490–8.
- Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. 1992. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*, 15: 234–43.
- Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275:2247 –50.
- Friedman SL. 2003. Liver fibrosis—from bench to bedside. *J Hepatol*, 38(Suppl 1):S38– 53.
- Froehlich F, Lamy O, Fried M, Gonvers JJ. 1993. Practice and complications of liver biopsy. Results of a nationwide survey in Switzerland. *Dig Dis Sci*, 38: 1480–4.
- Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, and Zitzmann N. 2007. Novel Serum Biomarker Candidates for Liver Fibrosis in Hepatitis C Patients. *Clinical Chemistry* 53: 10; 1792–1799.
- Gentilini A, Marra F, Gentilini P, Pinzani M. 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 32: 227–34.
- Giannini E, Risso D, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti F, Romagnoli P, Testa E, Ceppa P, Testa R. 2003. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med*. 163: 218-224.
- Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. 2005. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol*, 34(6):1329–39.
- Göbel T, Sonja Vorderwülbecke, Katarzyna Hauck, Holger Fey, Dieter Häussinger, Andreas Erhardt. 2006. New multi protein patterns differentiate liver fibrosis stages and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C serum samples. *World J Gastroenterol*, 12(47): 7604-7612.

- Gutierrez-Reyes G, Gutierrez-Ruiz MC, Kershenovich D. 2007. Liver Fibrosis and Chronic Viral Hepatitis. *Arch Med Res*, 38: 644-51.
- He QY, Zhu R, Lei T, . Ng MYM, Luk JM, Sham P, Lau GKK, and Chiu JF. 2008. Toward the Proteomic Identification of Biomarkers for the Prediction of HBV Related Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry* 103:740–752.
- Helander A, Bergstrom J, Freeze HH. 2004. Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum transferrin glycoforms. *Clin Chem*. 50:954–8.
- Hong H, Dragan Y, Epstein J, Teitel C, Chen B, Xie Q, Fang H, Shi L, Perkins R, Tong W. 2005. Quality control and quality assessment of data from surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) time-of flight (TOF) mass spectrometry (MS). *BMC Bioinformatics*, 6 Suppl 2: p. S5.
- HUPO Human Liver Proteome Project (HLPP). [http://www.hupo.org/research/files/hlpp\\_proposal.pdf](http://www.hupo.org/research/files/hlpp_proposal.pdf)., 2009.
- Hutchens TW, Yip TT. 1993. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 7: 576–80.
- Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. 2001. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*, 357: 1069–75.
- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. 1998. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 102: 538–49.
- Iredale JP. 2001. Hepatic stellate cell behaviour during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis*. 21: 427–36.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 22: 696–9.
- Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. 2004. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res*, 14: 491–9.
- Jansen PLM. 2004. Non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 1079– 85.
- Jiefeng Cui, Xiaonan Kang, Zhi Dai, Cheng Huang, Haijun Zhou, Kun Guo, Yan Li, Yu Zhang, Ruixia Sun, Jie Chen, Yang Li, Zhaoyou Tang, Toshimasa Uemura, Yinkun Liu. 2007. Prediction of chronic hepatitis B, liver cirrhosis and

- hepatocellular carcinoma by SELDI-based serum decision tree classification. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133: 825–834.
- Johnson PJ, Poon TC, Hjelm NM, Ho CS, Blake C, Ho SK. 2000. Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms. *Br J Cancer*. 83:1330–7.
- Kam RKT, Poon TC, Chan HLY, Wong N, Hui AY and Sung JJY. 2007. High-Throughput Quantitative Profiling of Serum N-Glycome by MALDI-TOF Mass Spectrometry and N-Glycomic Fingerprint of Liver Fibrosis. *Clinical Chemistry* 53: 7; 1254–1263.
- Karas M, Hillenkamp F. 1998. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 15;60(20):2299-301.
- Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, Inada M, Tamura S, Noda S, Imai Y, Matsuzawa Y. 2001. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer*, 84: 886-891.
- Kirmiz C, Li B, An HJ, Clowers BH, Chew HK, Lam KS, Ferrige A, Alecio R, Borowsky AD, Sulaimon S, Lebrilla CB, Miyamoto S. 2007. A serum glycomics approach to breast cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 6: 43–55.
- Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. 1981. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1: 431–5.
- Kumada T, Nakano S, Takeda I, Kiriya S, Sone Y, Hayashi K, Katoh H, Endoh T, Sassa T, Satomura S. 1999. Clinical utility of *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinoma: special reference to imaging diagnosis. *J Hepatol*. 30:125–30.
- Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE. 2005. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 41: 1376-1382.
- Lee KH. 2001. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends Biotechnol*, 19: 217–222.
- Legros FJ, Nuyens V, Minet E, Emonts P, Boudjeltia KZ, Courbe A, Ruelle JL, Colicis J, de L'Escaille F, Henry JP. 2002. Carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary zone electrophoresis for detection of alcohol abuse. *Clin Chem*. 48:2177–86.
- Li D, Friedman SL. 1999. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 14: 618– 33.

- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. 2002. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, 48: 1296–304.
- Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. 2003. Clinical proteomics: written in blood. *Nature*, 425:905.
- Maher JJ, McGuire RF. 1990. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest*, 86: 1641–8.
- Mak KM, Leo MA, Lieber CS. 1984. Alcoholic liver injury in baboon: transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology*, 87: 188– 200.
- McGill DB, Rakela J, Zinsmeister AR, Ott BJ. 1990. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology*, 99: 1396–400.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H. 1990. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental liver fibrosis. *Gastroenterology*, 98: 175– 84.
- Morelle W, Flahaut C, Michalski JC, Louvet A, Mathurin P, Klein A. 2006. Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. *Glycobiology*. 16: 281–93.
- Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol*, 78 (Pt 7): 1527-1531.
- Morra R, Munteanu P, Bedossa D, Dargere J.-L, Janneau V, Paradis V, Ratziu F, Charlotte V, Thibault F, Imbert-Bismut T, Poinard. 2007. Diagnostic value of serum protein profiling by SELDI-TOF ProteinChip compared with a biochemical marker, FibroTest, for the diagnosis of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, 26: 847–858.
- Nakatsukasa H, Nagy P, Ewart RP, Chu-Chieh H, Marsden E, Thorgierson SS. 1990. Cellular distribution of transforming growth factor-h1 and procollagen type I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest*, 85: 1833– 43.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*: 4007-4021.
- Paradis V, Françoise Degos, Delphine Darg`ere, Nanou Pham, Jacques Belghiti, Claude Degott, Jean-Louis Janneau, Annie Bezeaud, Dominique Delforge, Myriam Cubizolles, Ingrid Laurendeau, and Pierre Bedossa. 2005. Identification of a New Marker of Hepatocellular Carcinoma by Serum Protein Profiling of Patients With Chronic Liver Diseases. *Hepatology*, 41: 40–47.

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 94: 153–6.
- Patel K, Muir AJ, McHutchison JG. 2003. Validation of a simple predictive model for the identification of mild hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*, 37: 1222; author reply, 1222–3.
- Perrault J, McGill DB, Ott BJ, Taylor WF. 1978. Liver biopsy: Complications in 1000 inpatients and outpatients. *Gastroenterology*, 74: 103–6.
- Petricoin EE, Paweletz CP, Liotta LA. 2002a. Clinical applications of proteomics: proteomic pattern diagnostics. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7: 433–40.
- Petricoin EF III, Ardekani AM, Hitt AB, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. 2002b. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 359: 572–7.
- Poon TC, Chan ATC, Zee B, Ho SKW, Mok TSK, Leung TWT, Johnson PJ. 2001. Application of classification tree and neural network algorithm to the identification of serological liver marker profiles in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 61: 275–283.
- Poon TC, Mok TS, Chan AT, Chan CM, Leong V, Tsui SH, Leung TW, Wong HT, Ho SK, Johnson PJ. 2002. Quantification and utility of monosialylated alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma with nondiagnostic serum total alpha-fetoprotein. *Clin Chem*. 48: 1021–7.
- Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. 2003. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem*. 49: 752–60.
- Poon TC, Hui AY, Chan HL, Ang IL, Chow SM, Wong N, Sung JJ. 2005. Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting: a pilot study. *Clin Chem*. 51(2):328-35.
- Ressomrency Hw, Varghese S, Goldman Lenka, Loffredo Ca, Abdel-Hamid M, Kyselova Z, Mechref Y, Novotny M, And Goldman R. 2008. Analysis Of Maldi-Tof Mass Spectrometry Data For Detection Of Glycan Biomarkers. *Pac Symp Biocomput*. 216–227.
- Schmitt-Graff A, Chakroun G, Gabbiani G. 1993. Modulation of perisinusoidal cell cytoskeletal features during experimental hepatic fibrosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 422:99–107.
- Schuppan D. 1990. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis*. 10: 1– 10.



- Sebastiani G, Alberti A. 2006. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol.* 12: 3682-3694.
- Sebastiani G. 2009. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases: Implementation in clinical practice and decisional algorithms. *World J Gastroenterol.* May 14; 15(18): 2190-2203.
- Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, Banez LL, Bigbee WL, Campos D, Cazares LH, Chan DW, Grizzle WE, Izbicka E, Kagan J, Malik G, McLerran D, Moul JW, Partin A, Prasanna P, Rosenzweig J, Sokoll LJ, Srivastava S, Srivastava S, Thompson I, Welsh MJ, White N, Winget M, Yasui Y, Zhang Z, Zhu L. 2005. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility. *Clin Chem.* 51(1): p. 102-12.
- Seta N, Barnier A, Hochedez F, Besnard MA, Durand G. 1996. Diagnostic value of Western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Clin Chim Acta.* 254:131-40.
- Shachter NS. 2001. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 12: 297-304.
- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. 2006. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.* 28: 112-125.
- Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology*, 292: 198-210.
- Shigeki Tsukada, Christopher J. Parsons, Richard A. Rippe. 2006. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta.* 364: 33 – 60.
- Shimizu K, Katoh H, Yamashita F, Tanaka M, Tanikawa K, Taketa K, Satomura S, Matsuura S. 1996. Comparison of carbohydrate structures of serum alpha-fetoprotein by sequential glycosidase digestion and lectin affinity electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 254: 23-40.
- Spano D, Cimmino F, Capasso M, D'Angelo F, Zambrano N, Terracciano L, and Iolascon A. 2008. Changes of the Hepatic Proteome in Hepatitis B-Infected Mouse Model at Early Stages of Fibrosis. *Journal of Proteome Research.* 7, 2642-2653.
- Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. 2003. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics.* 3:601-9.
- Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, S Sulkowski M, Torriani FJ, Diettrich DT, Thomas DL, Messinger D, Nelson M. Development of

- a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006 Jun; 43(6):1317-25.
- Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV. 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 15669-674.
- Tangkijvanich P, Tam SP, Yee HF Jr. 2001. Wound-induced migration of rat hepatic stellate cells is modulated by endothelin-1 through rho-kinase-mediated alterations in the acto-myosin cytoskeleton. *Hepatology*. 33: 74–80.
- Teo M, Hayes P. 2004. Management of hepatitis C. *Br Med Bull*. 70: 51–69.
- Thabut D, Simon M, Myers RP, Messous D, Thibault V, Imbert-Bismut F, Poynard T. 2003. Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 37: 1220–1; author reply, 1221.
- Tsukamoto H, Towner SJ, Ciofalo LM, French SW. 1986. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology*, 6: 814–22.
- Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, Fontaine H, Pol S. FIB-4: an Inexpensive and Accurate Marker of Fibrosis in HCV Infection. Comparison with Liver Biopsy and FibroTest. *Hepatology* 2007 Jul; 46(1):32-6.
- Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. 2003. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38: 518–26.
- Ward DG, Y Cheng, G N’Kontchou, TT Thar, N Barget, WWei, LJ Billingham, A Martin, M Beaugrand and PJ Johnson. 2006. Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *British Journal of Cancer*, 94: 287 – 292.).
- Weston AD, Hood L. 2004. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res*. 3: 179–96.
- White IR, Patel K, Symonds WT, Dev A, Griffin P, Tsokanas1 N, Skehel M, Liu C, Zekry A, Cutler P, Gattu M, Rockey DC, Berrey MM and McHutchison JG. 2007. Serum proteomic analysis focused on fibrosis in patients with hepatitis C virus infection. *Journal of Translational Medicine*. 5: 33.
- Wiesner A. 2004. Detection of tumor markers with ProteinChip technology. *Curr Pharm Biotechnol*. 5: 45–67.
- Wrotnowski C. 1998. The future of plasma proteins. *Genet Eng News*. 18: 14.

- Wu C, Zhanfeng Wang, Lijie Liu, Peng Zhao, Wenjing Wang, Dingkang Yao, Bing Shi, Junhua Lu, Ping Liao, Yaning Yang and Liang Zhu. 2009. Surface enhanced laser desorption/ionization profiling: New diagnostic method of HBV-related hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24: 55–62.
- Xu Xiu-Qin, Leow Chon K., Lu Xin, Zhang Xuegong, Liu Jun S., Wong Wing-Hung, Asperger Arndt, Deininger Sören and Leung Hon-chiu Eastwood. 2004. Molecular classification of liver cirrhosis in a rat model by proteomics and bioinformatics. *Proteomics* 2004, 4, 3235–3245.
- Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, Brown MS, Goldstein JL, Gale M Jr. 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 15865-15870.
- Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. 2004. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics*, 4: 2111–6.
- Young DS, Tracy RP. 1995. Clinical applications of two-dimensional electrophoresis. *J Chromatogr A*. 698: 163–79.
- Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. 2004. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 64: 5882-5890.
- Zhu Xiao-Dong, Wei-Hua Zhang, Cheng-Lin Li, Yang Xu, Wei-Jiang Liang, Po Tien. 2004. New serum biomarkers for detection of HBV-induced liver cirrhosis using SELDI protein chip technology. *World J Gastroenterol*. 10(16): 2327-29.
- Zinkin Noah T, Franck Grall, Killimangalam Bhaskar, Hasan H. Otu, Dimitrios Spentzos, Brett Kalmowitz, MeghanWells, Manuel Guerrero, John M. Asara, Towia A. Libermann, and Nezam H. Afdhal. 2008. Serum Proteomics and Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma and Chronic Liver Disease *Clin Cancer Res*, 14(2).

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI

**Doğum Yeri** : Ankara

**Doğum Tarihi** : 1979

**Medeni hali** : Evli

**Yabancı Dili** : İngilizce, Almanca

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise** : Özel Arı Fen Lisesi, Ankara-1996

**Lisans** : Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Bölümü,  
Biyoloji Öğretmenliği-2002

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü-2004

**Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Gastroenteroloji Bilim Dalı-2007-

### **Yayımları (SCI ve diğer):**

- 1- NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. Ozen SC, Dagli U, Kiliç MY, Törüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. J Gastroenterol. 2006 Apr;41(4):304-10.
- 2- Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. Celik Y, Dagli U, Kiliç MY, Törüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Scand J Gastroenterol. 2006 May;41(5):559-65.
- 3- Effects of polymorphism in G2677T/A triallelic region of MDR1 gene in Turkish patients with inflammatory bowel disease. Sapmaz A, Ozen Karatayli SC, Dagli U, Kiliç ZM, Törüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Turk J Gastroenterol. 2008 Sep;19(3):168-73.
- 4- Proteomiks ve Gastroenteroloji. Özen Karataylı SC, Bozdayı AM. Güncel Gastroenteroloji Dergisi. 2008 Haziran; 12(2):72-76.