



T.C

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PAPİLLER TİROİD KARSİNOMLARINDA BRAF v600E VE
h-TERT MUTASYONLARININ HİSTOMORFOLOJİK
BULGULARLA VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

Dr. Faruk Erdem KOMBAK

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Handan KAYA

İSTANBUL 2016

ÖNSÖZ

Tıp öğrencisi olduğum yıllarda, patolojinin kişiliğime ve hedeflerime en uygun yer olduğunu farketmediğimi itiraf ederek başlamak isterim. Bu yola biraz tesadüfen girmekle beraber, seçimimden yana hep mutlu oldum.

Bunda en büyük pay sahibi, kocaman bir aile sofrası sıcaklığındaki çalışma ortamımızdı. Mükemmel birer hoca olmanın ötesinde, aile büyüğü gibi beni sahiplendikleri için, başta tez danışmanım Prof.Dr. Handan Kaya olmak üzere, Prof.Dr.Çiğdem Ataizi Çelikel, Prof.Dr. Rengin Ahıskalı, Prof.Dr. Funda Eren, Prof.Dr.Leyla Cinel, Doç.Dr. Süheyla Uyar Bozkurt ve Doç.Dr. Kemal Türköz'e;

Her zor durumumda yardıma koşan, bana birçok şey öğreten ve yönlendiren, ne zaman arasam benim için orda olan sevgili uzmanlarım Doç.Dr. Pelin Bağcı, Yard.Doç.Dr. Emine Baş Bozkurtlar, Yard.Doç.Dr. İpek Erbarut Seven, Yard.Doç.Dr. Deniz Filinte ve Dr. Engin Ciğercioğulları'na;

Aynı işyerini paylaşmanın ötesinde, birer kardeş gibi gördüğüm asistan arkadaşlarım Dr. Aygün İkinci, Dr. Gökçe Aşkan, Dr. Dilek Kaymakçı, Dr. Hande Mollamemişoğlu, Dr.Gülçiçek Ayrancı, Dr.Fatma Gerin, Dr. Melike Eraslan, Dr.Hasan Topper, Dr.Gamze Akbaş, Dr.İdris Önem, Dr. Hülya Şahin ve Dr. İrem Şahver İşgör'e ve başta Naziye Özkan olmak üzere eğitimimde ve tezimde emeği geçen tüm laboratuvar ekibine;

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve her adımımı destekleyen sevgili aileme, beni asla yalnız bırakmayan kardeşim Dr.Erhan Bıyıklı'ya, canım dostlarım İbrahim, Uğur, Sevgi, Selçuk, Ufuk, Görkem, Duygu ve İrem'e, kaybetsem de yanımda olduğunu hissettiğim babaannem ve dedeme, sonsuz teşekkürlerimle...

Faruk Erdem Kombak

Ocak 2016

İstanbul

ÖZET

Amaç: Papiller tiroid karsinomu olgularında; BRAF v600E ve h-TERT mutasyonlarının klinik ve demografik özellikler, histomorfolojik bulgular ve prognozla ilişkisini immünohistokimya yöntemiyle araştırmak; BRAF v600E immünohistokimyasını PCR yöntemiyle karşılaştırarak sensitivite, spesifite, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerlerini belirlemek.

Gereç ve Yöntem: 2011-2015 yılları arasında retrospektif olarak incelenen tiroidektomi olgularından seçilen 107 papiller karsinom, 19 adenom ve 13 adet normal tiroid dokusunda BRAF v600E ve h-TERT immünohistokimya boyaları uygulandı. İmmünohistokimya sonuçları semikantitatif olarak değerlendirilerek istatistiksel analiz yapıldı. Bu olgular arasından randomize olarak seçilen 14 papiller karsinom, 13 papiller karsinom lenf nodu metastazı, 4 adenom dokusunda BRAF mutasyonu varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: BRAF v600E immünohistokimya ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması sonucunda elde edilen verilere dayanarak 3+ şiddette nükleer ve sitoplazmik immünoekspresyon "pozitif" kabul edildi. BRAF v600E mutasyonu en sık klasik varyantta izlendi. Foliküler varyantta mutasyon saptanmadı. Primer tümörler ve lenf nodu metastazları arasında BRAF v600E mutasyonu yönünde uyum tespit edildi.

BRAF v600E mutasyonu ile yüksek pT evresi, klasik varyant, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, düşük mitotik indeks, tümörde kapsül yokluğu, tiroid içi yayılım, tiroid kapsül invazyonu, tiroid dışı yumuşak doku invazyonu ve 5'ten yüksek patolojik risk skoru arasında anlamlı ilişki saptandı. Ancak lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz gibi kötü prognostik durumlar ile ilişkilendirilemedi.

h-TERT immünhistokimyası, yaygın non-spesifik boyanma nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı.

Sonuç: VE1 klonu ile uygulanan immünhistokimya yöntemi, BRAF v600E mutasyonu tespitinde güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntem ile çalışmamızda saptanan BRAF v600E mutasyonu oranı, literatürle uyumludur.

Çalışmamızda, BRAF v600E mutasyonu ile kötü patolojik prognostik parametrelerin bir bölümü arasında ilişki saptanmasına karşın; lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz gibi kötü prognostik durumlar ile ilişki gösterilememiştir. İyi diferansiye tiroid karsinomlarında prognozun öngörülebilmesinde morfolojik bulgular BRAF v600E mutasyonundan daha ön planda görünmektedir. Yine de; çevresel faktörlere bağlı olarak farklı serilerde farklı sonuçların görülebilmesini ve BRAF v600E mutasyonu gösteren olguların hedefe yönelik spesifik tedavilere iyi yanıt verdiği gerçeğini göz önüne alarak, demografik, klinik, morfolojik ve genetik bulguların bir bütün olarak değerlendirilmesi gerektiğini; ve BRAF v600E mutasyon analizinin primer tümörün yanısıra, daha sonra gelişen lenf nodu metastazı, uzak metastaz, nüks tümör materyallerinde de; tercihen kantitatif yöntemlerle uygulanması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: papiller, tiroid, BRAF, TERT, prognoz

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Aim: Our study aims to investigate the reflection of BRAFv600E and h-TERT mutations on papillary thyroid carcinoma upon clinical, morphological and prognostic parameters. We also intended to assess the utility of BRAF v600E immunohistochemistry, comparing to BRAF PCR.

Material and Methods: We applied BRAF v600E and h-TERT immunohistochemistry in a cohort of 107 papillary carcinomas, 19 adenomas and 13 normal thyroid tissues; chosen retrospectively between 2011-2015. Statistical analysis was based on semiquantitative immunohistochemistry findings. We also applied BRAF PCR in a subgroup of 14 papillary carcinomas, 13 metastatic lymph nodes and 4 adenomas, chosen randomly.

Findings: In regard to the comparison of BRAF v600E immunohistochemistry and BRAF PCR, 3+ nuclear and cytoplasmic immunoexpression was considered “positive”. BRAF v600E mutation was observed most frequently in classical variant cases. No mutation was detected in follicular variant cases. The mutational status of primary tumor and the lymph node metastasis were consistent.

Significant relationship of BRAF v600E mutation was not found with prognosis; but with higher pT stage, classical variant, lymphatic invasion, perineural invasion, lower mitotic index, absence of tumor capsule, intrathyroidal spread, invasion of thyroid capsule, extrathyroidal spread, and pathologic risk score higher than 5.

h-TERT immunohistochemistry was discarded due to frequent non-specific immunoreactivity.

Conclusion: Immunohistochemistry, using VE1 clone, is a reliable technique for detection of BRAF v600E mutation. Our results with immunohistochemistry are consistent with previous effort.

In our study, despite the relation between some bad pathological prognostic parameters and BRAF v600E mutation; bad prognostic conditions such as lymph node metastasis, local recurrence and distant metastasis were found to be irrelevant overall. Morphological parameters seem to be keener than BRAF v600E mutation. Nevertheless; different series display different results, possibly due to environmental factors. Considering this, and the proven success of targeted therapies against BRAF v600E mutation; a thorough assessment would be of wisdom; including clinical, morphological and genetic factors. BRAF v600E mutation analysis should be performed on both the primary tumor, and metastatic or recurrent tumor occurred afterwards; preferentially by quantitative methods.

Keywords: papillary, thyroid, BRAF, TERT, prognosis

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	I
Özet.....	II
İngilizce Özet (Abstract).....	IV
İçindekiler.....	VI
Şekil Dizini.....	IX
Tablo Dizini.....	X
Resim Dizini.....	XI
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Epidemiyoloji.....	2
2.2. Embriyoloji.....	2
2.3. Anatomi.....	3
2.4. Histoloji.....	4
2.5. Fizyoloji.....	5
2.6. Tiroid Kanseri Gelişiminde Risk Faktörleri.....	7
2.7. Patogenez ve Moleküler Genetik.....	7

2.7.1. BRAF mutasyonları.....	8
2.7.2. TERT promoter mutasyonları.....	10
2.8. Tiroid Kanserinde Sınıflama.....	11
2.8.1. Genel sınıflama.....	11
2.8.2. Papiller karsinom mikroskopik varyantları.....	12
2.8.3. Derecelendirme.....	17
2.8.4. Rutinde kullandığımız immünohistokimyasal belirteçler.....	18
2.8.5. Papiller karsinom tanısında kullanılan yeni immünohistokimyasal belirteçler.....	21
2.9. TNM Sınıflaması (DSÖ 2004).....	22
2.10. Evreleme (DSÖ 2004).....	23
2.11. Risk Stratifikasyonu.....	24
2.12. Tedavi Yaklaşımları.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Olgu Seçimi.....	26
3.2. Etik Kurul.....	26
3.3. Yöntem.....	27
3.3.1. İmmünohistokimya.....	27
3.3.2. RT-PCR.....	28
3.4. Değerlendirme.....	30
3.4.1. BRAF v600E immünohistokimyası.....	30
3.4.2. h-TERT immünohistokimyası.....	33
3.4.3. CK19 immünohistokimyası.....	36
3.4.4. HBME-1 immünohistokimyası.....	36
3.4.5. Galectin-3 immünohistokimyası.....	37
3.4.6. Ki-67 immünohistokimyası.....	37
3.4.7. BRAF RT-PCR.....	37
3.5. İstatistik.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Demografik Veriler ve Klinik Değerlendirme.....	38

4.2. Patolojik Prognostik Parametreler.....	39
4.2.1. Patolojik evre.....	39
4.2.2. Tümör çapı.....	39
4.2.3. Mikroskopik varyant.....	39
4.2.4. Cerrahi sınır.....	41
4.2.5. Patolojik risk skoru.....	41
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	42
4.3.1. BRAF v600E immünohistokimyası.....	42
4.3.2. h-TERT immünohistokimyası.....	45
4.4. RT-PCR Sonuçları.....	46
4.4.1. BRAF v600E immünohistokimyası ve BRAF PCR.....	46
4.4.2. BRAF PCR sonuçları ile BRAF v600E immünohistokimyasının değerlendirilmesi.....	47
4.4.3. BRAF v600E immünoekspresyonunun klinik ve patolojik prognostik parametrelerle ilişkisi.....	50
4.5. Prognoz.....	53
4.5.1. Demografik ve klinik verilerin prognozla ilişkisi.....	53
4.5.2. Patolojik prognostik parametrelerin prognozla ilişkisi.....	53
4.5.3. Rutinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçlerin prognozla ilişkisi.....	55
4.5.4. BRAF v600E immünoekspresyonunun prognozla ilişkisi...	56
5. TARTIŞMA.....	57
5.1. Mikroskopik Varyantlar.....	57
5.2. İmmünohistokimyasal Belirteçler.....	59
5.2.1. Rutinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçler.....	59
5.2.2. BRAF v600E immünohistokimyası.....	59
5.2.3. h-TERT immünohistokimyası.....	65
5.3. Prognoz.....	66
6. SONUÇ.....	68
7. REFERANSLAR.....	69

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. MAPK sinyal yolağı.....	9
Şekil 2. Mikroskopik varyantların yüzde dağılımı.....	39
Şekil 3. Mikroskopik varyantlarda BRAF v600E mutasyonu oranları.....	48
Şekil 4. BRAF v600E mutasyonu ile ilişkili patolojik prognostik parametreler.....	52
Şekil 5. Kötü prognozla ilişkili patolojik prognostik parametreler.....	55

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Evreleme.....	23
Tablo 2. İmmünohistokimyada kullanılan antikorlar ve özellikleri.....	28
Tablo 3. BRAF v600E immünoekspresyonu skorlaması.....	30
Tablo 4. h-TERT immünoekspresyonu skorlaması.....	33
Tablo 5. Patolojik risk skoru.....	42
Tablo 6. BRAF v600E immünohistokimya bulguları.....	43
Tablo 7. Primer tümörlerde ve aynı olguların lenf nodu metastazı örneklerinde BRAF v600E immünoekspresyonu.....	44
Tablo 8. h-TERT sitoplazmik immünoekspresyonu.....	45
Tablo 9. h-TERT nükleer immünoekspresyonu.....	45
Tablo 10. BRAF PCR sonuçları.....	46
Tablo 11. Mikroskopik varyantlar arasında BRAF v600E immünoekspresyonu.....	47
Tablo 12. Primer tümörlerde ve aynı olguların lenf nodu metastazı örneklerinde BRAF v600E mutasyonu.....	49
Tablo 13. Literatürde BRAF v600E mutasyonu ile ilişkilendirilen klinik ve morfolojik parametreler.....	64

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Normal tiroid bezi kesiti.....	5
Resim 2. Papiller karsinom – klasik varyant.....	13
Resim 3. Papiller karsinom nükleer özellikleri.....	14
Resim 4. Papiller karsinom – foliküler varyant.....	15
Resim 5. Papiller karsinom – onkositik varyant.....	16
Resim 6. Papiller mikrokarsinom.....	17
Resim 7. Papiller karsinomda CK19 immünoekspresyonu.....	18
Resim 8. Papiller karsinomda HBME-1 immünoekspresyonu.....	19
Resim 9. Papiller karsinomda Galectin-3 immünoekspresyonu.....	20
Resim 10. Papiller karsinomda Ki-67 immünoekspresyonu.....	21
Resim 11. BRAF v600E negatif.....	31
Resim 12. BRAF v600E 1+ immünoekspresyon.....	31
Resim 13. BRAF v600E 2+ immünoekspresyon.....	32
Resim 14. BRAF v600E 3+ immünoekspresyon.....	32
Resim 15. h-TERT negatif.....	34
Resim 16. h-TERT 1+ sitoplazmik immünoekspresyon.....	34
Resim 17. h-TERT 2+ sitoplazmik immünoekspresyon.....	35
Resim 18. h-TERT 3+ sitoplazmik immünoekspresyon.....	35
Resim 19. h-TERT nükleer immünoekspresyon.....	36

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

BRAF: *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

cAMP: Siklik adenosin monofosfat

CK19: Sitokeratin 19

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EMA: Epitelyal membran antijeni

ETS/TCF: *E-26 transcription factors/ternary complex factors*

FDA: *Food and Drug Administration*

h-TERT: *Human telomerase reverse transcriptase*

İHK: İmmünohistokimya

MAPK: Mitogen-aktif protein kinaz

N-CAM: Nöral hücre adhezyon molekülü

PCR: *Polymerase chain reaction*

pT: Primer tümör

RT-PCR: *Real time polymerase chain reaction*

RAİ: Radyoaktif iyot

SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*

T3: Triiodotironin

T4: Tiroksin

TTF-1: Tiroid transkripsiyon faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid papiller karsinomu, diğer sistemlerin malign tümörlerine oranla tedaviye daha iyi cevap veren ve daha iyi prognozlu tümörler olarak bilinmektedir. Ancak bu vakaların yaklaşık %10' luk bir bölümünün klinik olarak kötü seyir göstermesi sebebiyle, bu grubun erken dönemde tespit edilmesi için klinik ve patolojik parametreleri içeren çeşitli skorlama sistemleri kullanılmaktadır. Hedefe yönelik tedavi alternatiflerinin umut vaatmesi göz önüne alındığında, olguların değerlendirilmesinde moleküler belirteçlerin de dikkate alınmaya değer olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada; adenom, papiller mikrokarsinom, papiller karsinom olgularında ve metastatik lenf nodlarında BRAF V600E (*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) ve h-TERT (*Human telomerase reverse transcriptase*) immünekspresyonları çalışıldı. Olguların randomize olarak seçilen bir bölümünde, BRAF mutasyonu için real time PCR (*Polymerase chain reaction*) yöntemi de uygulandı. En az altı aylık klinik takibini bildiğimiz olgularda; hasta yaşı, cinsiyet, hastalısız sağkalım, nüks, lenf nodu metastazı, RAİ (radyoaktif iyot) tedavisine direnç gibi klinik parametreler ile; tümör çapı, histolojik varyant, nekroz varlığı, mitotik aktivite, kalsifikasyon, lenfatik - vasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör kapsülü invazyonu, tiroid kapsülü invazyonu, tiroid dışı yumuşak doku invazyonu, tiroid içi yayılım ve multisentrisite gibi patolojik parametrelerin BRAF V600E ve h-TERT mutasyonları ile ilişkisi araştırıldı. BRAF V600E ve h-TERT mutasyonlarının klinik kullanımda yer alabilmeleri ya da hedefe yönelik ilaç geliştirme projeleri açısından da değerlerinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

ABD'de (Amerika Birleşik Devletleri), erişkin popülasyonda soliter tiroid nodülü insidansı %1-10 arasında değişmekte ve bu oranın endemik guatr bölgelerinde daha yüksek olduğu bilinmektedir. Soliter nodüllerin %1 kadarı malign özelliklere sahiptir. Bu da ABD için yılda 15000 yeni papiller tiroid karsinomu olgusuna denk gelmektedir¹. Ülkemizde de, T.C. Sağlık Bakanlığı'na bağlı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu' nun Ocak 2014' te yayınladığı 'Kanser İstatistikleri' ne göre, tüm tiroid karsinomlarının cinsiyete göre yaşa standardize edilmiş hız dağılımı erkeklerde 100000' de 4,5; kadınlarda ise 100000' de 18,6' dır.

Tüm kanserler arasında, tiroid kanserleri %1,5' lik bir paya sahiptir. Bunların %85' ten çoğunu papiller karsinom, %5-15 'ini foliküler karsinom, %5' ini medüller karsinom, %5' ten azını da anaplastik (andiferansiye) karsinom oluşturmaktadır². Bu alt tiplerin farklı biyolojik ve klinik davranışları sebebiyle, her birini ayrı ayrı ele almak gereklidir.

Papiller tiroid karsinomu sıklıkla kadın bireyleri etkilemektedir. Kadın/erkek oranı yaklaşık 3/1'dir¹. Tüm yaş gruplarında görülebilmekle birlikte, 25-50 yaş aralığında daha siktir. SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) verilerine göre, ortalama yaş 1975 yılında 37.8, 1985 yılında 41.6, 1995 yılında 43.7, 2005 yılında ise 46.8'dir¹. Beyaz ırkta insidans siyah ırka göre daha yüksektir².

2.2. Embriyoloji

Embriyonda gelişen ilk endokrin organ olan tiroid bezi, fertilizasyondan sonra yaklaşık 24. günde ilkel farinks tabanındaki median bir endoderm kalınlaşmasından oluşmaya başlar. Embriyon ve dil büyürken, tiroid bezi

taslağı hyoid ve larinks kıkırdaklarının ventral yüzünden geçerek aşığı iner. 7. haftada tiroid bezinin tam şeklini aldığı ve anatomik pozisyonuna yerleştiği tahmin edilmektedir.

Tiroid taslağını oluşturan endodermal hücre kitlesi, embriyonik bağ dokudan oluşan çevre mezenkimi invaze ederek epitelyal hücre kordonları oluşturur. 10. haftada kordonlar küçük gruplar halinde bölünürler. Her bir grupta birer lümen oluşur. Hücreler bu lümen etrafında tek sıra halinde dizelenir. 11. haftada bu foliküllerde kolloid görülmeye başlar³.

2.3. Anatomi

Tiroid bezi gelişimini tamamladığında, ince bir istmusla birbirine bağlanan iki lateral lobtan oluşmakta, boynun ön-orta kısmında, trake ve tiroid kartilajın önünde yer almaktadır. Erişkin bireyde ağırlığı 15-25 gr arasındadır. Tiroid bezinin etrafı ince fibröz bir kapsülle kaplı olup, bu kapsüle yapışık fibröz septalar tiroid parankimi içine yayılarak organı lobüllere ayırır.

Subklavyan arterin tiroservikal gövdesinden kaynaklanan inferior tiroid arter ve eksternal karotid arterden kaynaklanan superior tiroid arter, tiroid bezinin arteriyal dolaşımını sağlar. Venöz drenaj ise, internal juguler ven ve brakiosefalik ven ile sağlanır. Tüm folikül yapılarını saran lenfatik ađ, önce subkapsüler kanallara, oradan da kapsül içindeki toplayıcı gövdelere bağlanır. Her iki lateral lobun üst yarısını ve istmusu drene eden lenfatikler internal juguler lenf nodlarına, alt yarısını drene edenler ise pretrakeal, paratrakeal ve prelaringeal lenf nodlarına açılırlar.

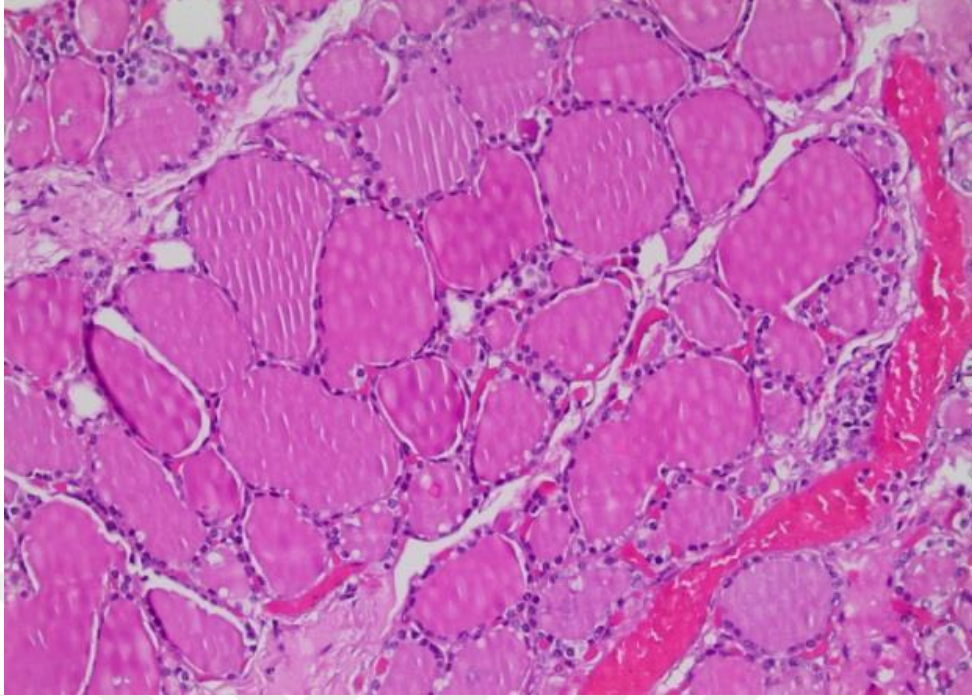
Superior ve midline servikal sempatik ganglionlardan kaynaklanan vazomotor postganglionik sinir lifleri, vasküler yapılar üzerine etki ederek tiroid bezinin sekretuar işlevini düzenler. Ayrıca, folikülleri çevreleyen adrenerjik sinir lifleri ile C hücrelerinin etrafında bulunan kolinerjik sinir lifleri de sekretuar işlevler üzerinde role sahiptir⁴.

2.4. Histoloji

Tiroid bezinin en küçük birimi, bazal membran etrafına dizili tek sıralı epitel hücrelerinden oluşan “folikül”dür. Foliküllerin lümeninde, kolloid adı verilen, büyük oranda tiroglobulinden oluşan visköz madde bulunur (Resim 1). Kolloid, aktif sekresyon halindeki foliküllerde soluk eozinofilik boyanırken, dinlenme halindeki foliküllerde koyu eozinofilik görünüm kazanır.

Foliküler hücreler veya diğer adıyla tiroisitler, tiroid bezinin fonksiyonel durumuna göre farklı boyut ve şekillerde olabilir. Yassılaştırmış (endoteloid) tiroistler göreceli olarak inaktif olup, merkezi yerleşimli yuvarlak-oval nükleusa ve ekzantrik yerleşimli nükleole sahiptir. Kromatini granüler veya kümelenmiş olabilir. Sayıca en büyük kısmı oluşturan küboidal tiroisitler kolloid sekrete ederken, daha iri nükleuslara sahip olup sitoplazması genellikle zayıf eozinofiliktir. En nadir tip olan kolumnar tiroisitler, kolloidi absorbe eder, aktif hormonları ayrıştırır ve sistemik dolaşıma verir.

Tiroisitler; tiroglobulin, TTF-1 (tiroid transkripsiyon faktörü), düşük molekül ağırlıklı keratinler, vimentin, EMA (epitelyal membran antijeni), T3 (triiodotironin), T4 (tiroksin), östrojen ve progesteron reseptörleri, S-100, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), tiroid peroksidaz, sodyum-iyodür simporter gibi farklı immünohistokimyasal belirteçleri eksprese edebilirler⁴.



Resim 1. Normal tiroid bezi kesiti

2.5. Fizyoloji

Tiroid bezinin salgıladığı aktif hormonların %93' ü T4 ve %7' si T3' tür. T3 işlevsel olarak T4' ün dört katı güçtedir. T4' ün hemen tamamı periferik dolaşımda T3' e dönüştürülerek kullanılır. T3 ve T4' ün normal üretimi için iyodür halinde yaklaşık 1mg/hafta iyot alınması gerekir. İyot yetersizliğini önlemek için, genel kullanımdaki sofrta tuzları 1/100000 oranında sodyum iyodür katılarak iyotlanır.

Tiroid hormonlarının üretiminde ilk basamak olarak, normal bezdeki iyodürü periferik kana göre 30 kata kadar konsantre edebilen aktif bir iyodür pompası ile periferik kandan iyodür tutulumu gerçekleşir. Bu iyodür pompasının stimülasyonu primer olarak, cAMP' yi (siklik adenozin monofosfat) ikinci haberci olarak kullanan TSH' dir (tiroid stimülizan hormon).

Tirosit içine alınan iyodür, apikal membrana bağlı bir peroksidaz enzimi yardımıyla oksitlenir. İyodinaz enzimi, okside iyodu hızlı bir şekilde tiroglobulin proteininin içindeki tirozin aminoasitlerine bağlar. Bu işleme “tiroglobulinin organikleşmesi” adı verilir. Bu şekilde oluşan “monoiyodotirozin” ve “diyyodotirozin” birbiriyle kenetlenerek T3 ve T4’ ü oluşturur.

Üretilen T3 ve T4 kolloid içinde depolanır. Tirositler, apikal yüzlerinden pinositik veziküller oluşturup, bunları lizozomlarla birleştirerek aktif hormonları serbestleştirirler. Serbestleşen hormonlar difüzyonla tirosit tabanından kapillerlere geçer ve sistemik dolaşıma katılıp; tiroksin-bağlayıcı globulin, tiroksin-bağlayıcı prealbumin ve albumin gibi plazma proteinlerine bağlanarak taşınır.

Tiroid hormonları çekirdek reseptörlerini aktive eder. Böylece Transkripsiyon ile mRNA oluşumu ve proteinlerin translasyonu uyarılmış olur. Translasyonu artırılan moleküller büyük oranda mitokondrial enzimler ve Na,K-ATPaz gibi transporttan sorumlu enzimler gibi hücrel metabolik aktiviteyi artırıcı yönde çalışan proteinlerdir. Bunların sonucunda; karbonhidrat ve yağ metabolizması uyarılır, bazal metabolizma hızı artar, kardiyovasküler ve respiratuar sistem aktive olur, gastrointestinal motilite artar, merkezi sinir sisteminde eksitatör etkiler oluşur⁵.

2.6. Tiroid Kanseri Gelişiminde Risk Faktörleri

Foliküler karsinom için ailesel olguların varlığı gösterilmiş olmakla birlikte, papiller karsinom olguları sporadik olarak görülmektedir. Papiller karsinom gelişiminde;

- İyonlaştırıcı radyasyon
- İyottan zengin diyet
- Diğer çevresel etkenler (volkanik bölgelerde içme suyundaki artmış bor, demir, vanadyum, manganez konsantrasyonu, vb.)
- Önceden varolan benign tiroid hastalıkları
- Hormonal ve reproduktif etkenler (obezite, yüksek östrojen düzeyi, vb.)
- Ailesel etkenler
 - FAP (familyal adenomatöz polipozis)
 - Carney kompleksi
 - Werner sendromu
- Yüksek TSH düzeyi
- Çeşitli genetik alterasyonlar (bkz. 2.7) rol oynamaktadır⁶.

2.7. Patogenez ve Moleküler Genetik

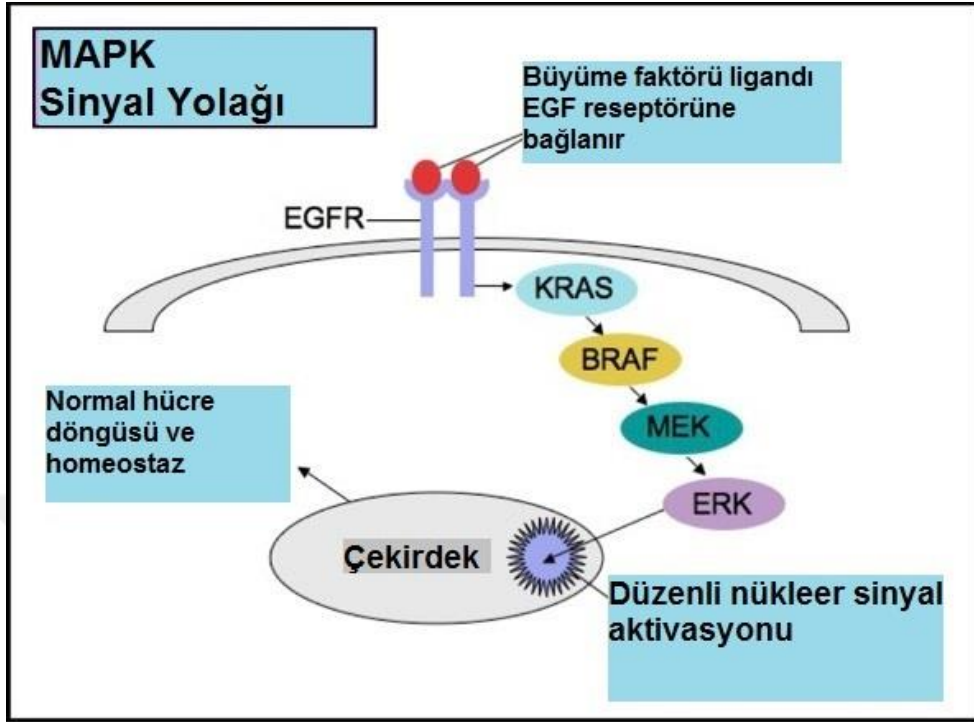
Papiller tiroid karsinomu gelişiminde rolü olduğu gösterilen genetik anomaliler ise şöyle sıralanmaktadır:

- Anöplid DNA
- *BRAF mutasyonları*
- *TERT promoter mutasyonları*
- Y kromozomu ve 22. kromozom kaybı

- Trizomi 17
- 3p, 4q, 10q delesyonları
- Kromozomal RET/PTC rearanjmanları
- Kromozomal TRK rearanjmanları
- RAS mutasyonları
- PAX8/PPAR γ rearanjmanı
- PI3K/PTEN/AKT yolağı mutasyonları
- miRNA upregulasyonu
- Somatik β -catenin mutasyonu

2.7.1 BRAF

Papiller tiroid karsinomlarında birçok farklı genetik alterasyon gösterilmiş olup⁷; bunlardan en sık olanı BRAF mutasyonlarıdır (%35-70). BRAF proto-onkogenini etkileyen mutasyonlar nokta mutasyonları, çerçeve kaymasına (frameshift) neden olmayan küçük çerçeve-içi delesyonlar, insersiyonlar ve kromozomal rearanjmanlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Papiller tiroid karsinomunda en sık görülen BRAF mutasyonu (%98-99), 1799. sırada bulunan nükleotidde timin-adenin yer değiştirmesi sonucu oluşan ve 600. sıradaki rezidüde valin-glutamat değişimine neden olan nokta mutasyonudur ve BRAF V600E ismiyle anılmaktadır. Benzer etkinliğe sahip diğer mutasyonlar V600D, V599E, V600K, G466V, G469A, L597V, K601E ve AKAP9/BRAF rearanjmanı olarak sıralanmaktadır. Bu mutasyonlar; BRAF kinaz enziminin aktivasyonuna ve böylece MAPK yolağının kronik stimülasyonuna yol açarak, BRAF proto-onkogenine onkogen özellik kazandırır. BRAF mutasyonunun tiroid kanserlerinde rekürrens⁸ ve kötü prognoz^{9, 10} ile ilişkisi bilinmektedir.



Şekil 1. MAPK sinyal yolağı

BRAF V600E mutasyonunun saptanmasında altın standart yöntem PCR olmakla birlikte, immünohistokimya¹¹ ve Sanger sekanslama gibi diğer yöntemlerle de mutasyon tespiti yapılabilmektedir. Günlük patoloji rutininin temelini oluşturan Hematoksilen-Eozin ile yapılan histomorfolojik değerlendirmede tespit edilebilen bazı histomorfolojik bulguların BRAF v600E mutasyonu ile korelasyon gösterebileceği güncel literatürde belirtilmektedir. Bu histomorfolojik bulgulardan özellikle multisentrisite, tiroid dışı yayılım, lenf nodu metastazı, infiltratif tümör sınırı varlığı, desmoplazi, fibrozis, Psammom cisimcikleri ve belirgin nükleer özellikler üzerinde durulmaktadır¹²

2.7.2. TERT promoter mutasyonları

TERT geni, telomerik DNA'ya tekrarlayan segmentler ekleyerek hücre proliferasyonunu sağlayan telomeraz kompleksinin reverse transkriptaz komponentini kodlamaktadır. Transgenik fare modelinde¹³ telomeraz kompleksi overekspresyonunun kanser insidansını artırdığı gösterilmiştir. TERT promoter mutasyonları; melanom, gliom, mesane ve tiroid tümörlerinde görülebilmektedir¹⁴.

TERT promoter mutasyonları Western-Blot, multipleks PCR ve Sanger sekanslama gibi yöntemlerle gösterilebilmektedir. İmmünohistokimya yöntemi ile TERT promoter mutasyonları sonucu ortaya çıkan telomeraz kompleks overekspresyonunu tespit etmek mümkündür.

Diferansiye tiroid kanserlerinde TERT promoter mutasyonlarının, kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir^{15, 16}. BRAF mutasyonlarının önemli rol oynadığı mitojen-aktive protein kinaz yolağında ETS/TCF (*E-26 transcription factors/ternary complex factors*) transkripsiyon faktörlerinin downstream hedef olması ve TERT ekspresyonunun ETS/TCF transkripsiyon faktörlerine bağımlı olması üzerinden yola çıkılarak BRAF ve TERT mutasyonlarının sinerjik etkileşimde bulunarak daha agresif tümör klonları oluşturduğu hipotezi¹⁷ oluşturulmuş ve çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir¹⁸. TERT DNA ve RNA'sı deneysel olarak T-helper hücrelerini ve TERT pozitif tümörlere karşı spesifik sitotoksik T lenfosit yanıtını uyardığı bilinmektedir^{19, 20}. Prognostik belirleyiciliğinin yanısıra immünoterapi seçenekleri açısından da TERT promoter mutasyonları, BRAF mutasyonları ile birlikte tiroid kanserlerinde rutin kullanıma girmeye adaydır.

2.8 Tiroid Kanserinde Sınıflama

2.8.1. Genel sınıflama

DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'nün sınıflamasına göre tiroid kanserleri, aşağıdaki gibi gruplara ayrılarak incelenir:

- Papiller karsinom
- Foliküler karsinom
- Az diferansiye karsinom
- Andiferansiye (anaplastik) karsinom
- Skuamöz hücreli karsinom
- Mukoepidermoid karsinom
- Sklerozan mukoepidermoid karsinom, eozinofili içeren
- Müsinöz karsinom
- Medüller karsinom
- Mikst medüller ve foliküler hücreli karsinom
- İğsi hücreli tümör, timus benzeri farklılaşma gösteren
- Karsinom, timus benzeri farklılaşma gösteren

2.8.2. Papiller karsinomun mikroskopik varyantları

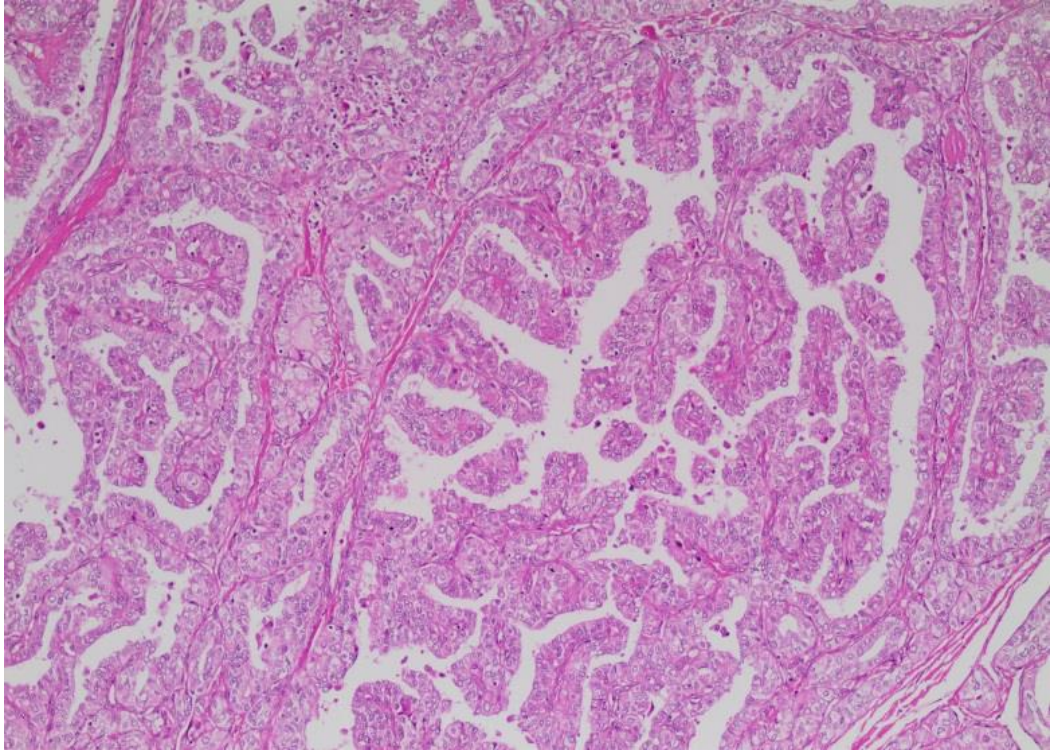
Papiller karsinomlar, farklı özellikler veya farklı hücre tiplerini, farklı stromal yanıtların kombinasyonlarını içerebilmektedir. DSÖ'nün belirlediği mikroskopik varyantlar aşağıda sıralanmıştır:

- Klasik varyant
- Foliküler varyant
- Makrofoliküler varyant
- Onkositik (Hürthle hücreli) varyant
- Berrak hücreli varyant
- Diffüz sklerozan varyant
- “*Tall cell*” (yüksek/uzun hücreli) varyant
- Kolumnar hücreli varyant
- Solid varyant
- Kribriform karsinom
- Papiller karsinom, fasiit benzeri stroma içeren
- Papiller karsinom, fokal insüler komponent içeren
- Papiller karsinom, skuamöz hücreli veya mukoepidermoid karsinom içeren
- Papiller karsinom, içsi ve dev hücreli karsinom içeren
- Kombine papiller ve medüller karsinom
- Papiller mikrokarsinom

Bu histolojik varyantlar arasında; kolumnar hücreli, *tall cell*, solid ve diffüz sklerozan varyantlar, diğerlerine göre daha kötü prognoza sahiptir. Bu varyantlar, papiller tiroid karsinomunun prognozunu inceleyen çalışmalarda bağımsız risk faktörlerine ek olarak, “Diğer potansiyel risk faktörleri” olarak tanımlanmışlardır²¹⁻²³.

2.8.2.1. Klasik varyant

Papiller karsinom, dallanan fibrovasküler bir sap etrafında dizelenen tek veya çok sıralı küboidal epitel hücrelerinden oluşur (Resim 2). Tümör hücre nükleusları berrak görünümde olup, yer yer sitoplazmanın nükleusun içine kıvrılması sonucu psödo-inklüzyonlar ve yarıklanmalar görülebilir (Resim 3). Tümör içinde, “*Psammom cisimciği*” denilen konsantrik kalsifiye yapılar görülebilir. Lenfatik invazyon sıklıkla eşlik ederken, vasküler invazyon beklenmez^{24, 25}.



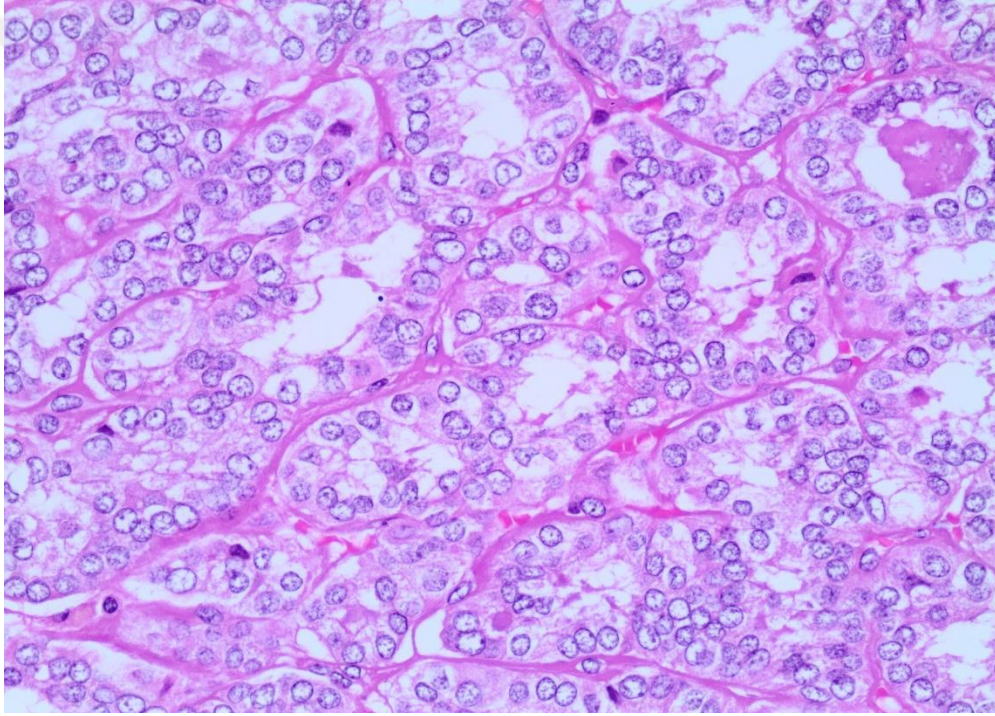
Resim 2. Papiller karsinom klasik varyant



Resim 3. Papiller karsinom nükleer  zellikleri (Siyah ok: nükleer ps doinkl zyon)

2.8.2.2. Foliküler varyant

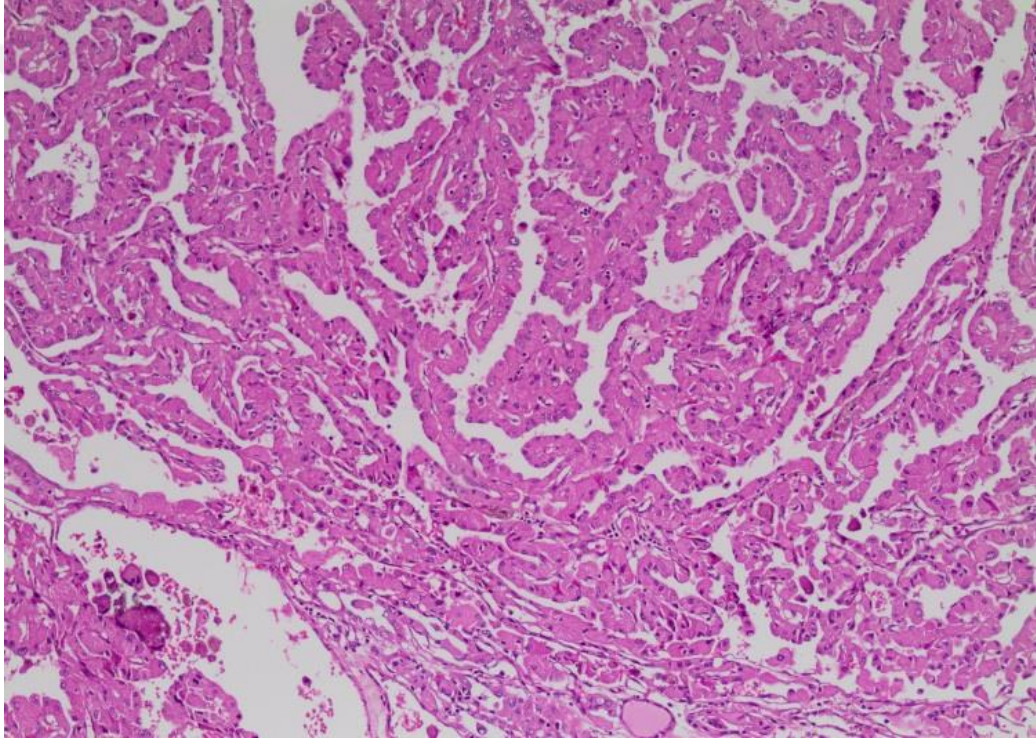
Foliküler varyant tümörler sıklıkla enkapsüledir. Klasik nükleer özelliklere sahip, ancak gerçek papilla yapısı oluşturmayan tümörlerdir. Bazal membran üzerinde gelişigüzel dizelenen ve polarite kaybı içeren hücrelerin oluşturduğu foliküler arkitektür, baskın büyüme paternidir (Resim 4). Foliküler varyantın, diğer varyantlara göre daha az lenf nodu metastazı ve daha yüksek oranda RAS mutasyonları göstermesi dikkat çekicidir²⁶.



Resim 4. Papiller karsinom foliküler varyant

2.8.2.3. Onkositik Varyant

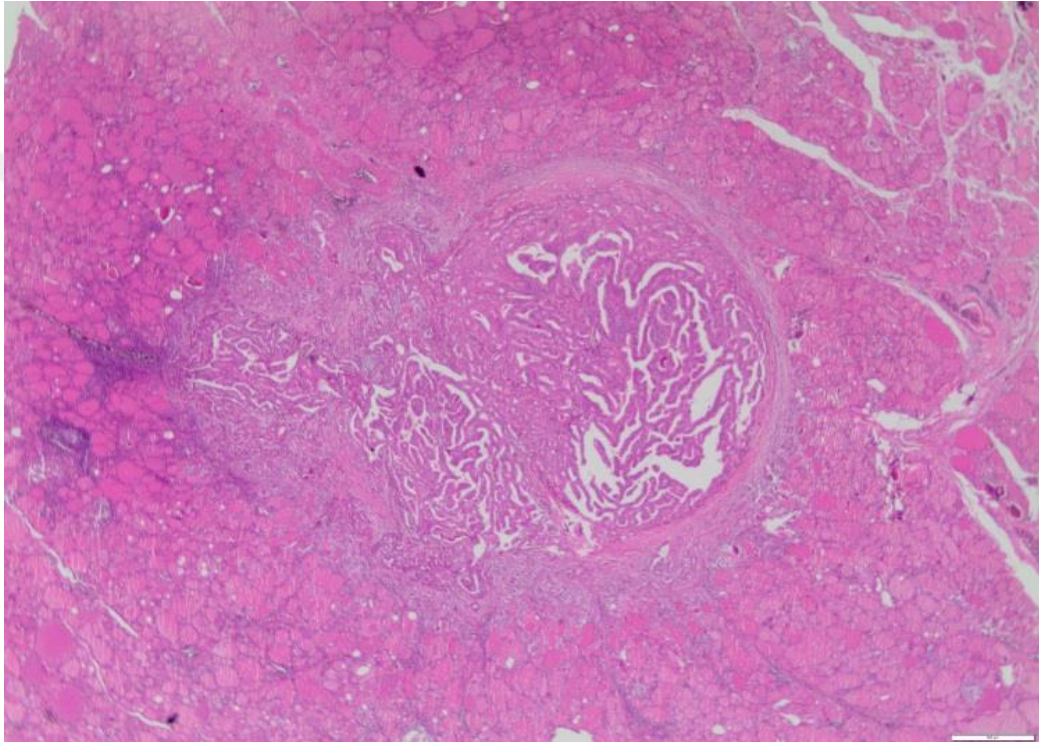
Onkositik varyantta predominant büyüme paterni papiller olmakla birlikte, foliküler ve solid patern de görülebilir. Hücre sınırları belirsiz, sitoplazma granüler-opak ve eozinofilik özelliktedir (Resim 5). Klasik papiller karsinom nükleus özellikleri bu varyantta da geçerlidir⁶.



Resim 5. Papiller karsinom onkositik varyant

2.8.2.4. Papiller mikrokarsinom

Çapı 1 cm'den küçük olan papiller karsinomlar, "papiller mikrokarsinom" olarak adlandırılır. Genellikle papiller ve/veya foliküler yapılar oluşturur. Çevre tiroid parenkiminden keskin sınırla ayrılır⁶ (Resim 6).



Resim 6. Papiller mikrokarsinom

2.8.3. Derecelendirme

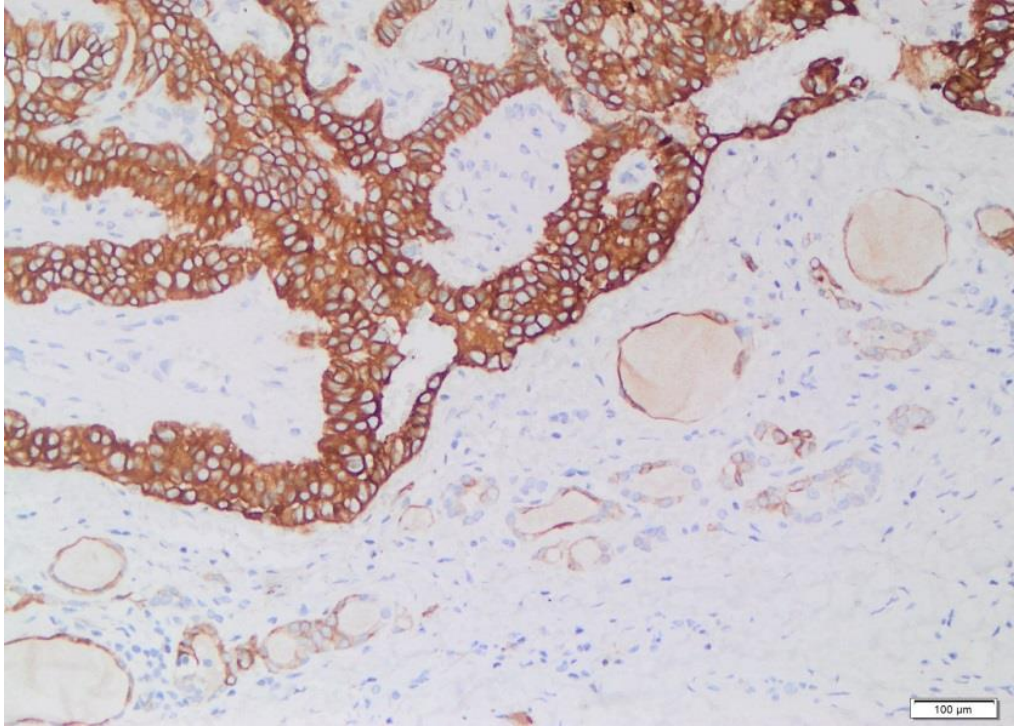
Papiller karsinomların %95'ten fazlasının iyi diferansiye olması nedeniyle derecelendirmenin değeri sınırlıdır²⁷. Az diferansiye papiller karsinomun gelişme belirtileri; solid, trabeküler veya insüler büyüme paterni ile

karakteristik nükleer özelliklerin kaybı ve genellikle bunlara eşlik eden tümör nekrozu ve artmış mitotik aktivite olarak belirtilmiştir²⁸.

2.8.4. Rutinde kullandığımız immünohistokimyasal belirteçler

2.8.4.1. Sitokeratin 19 (CK19)

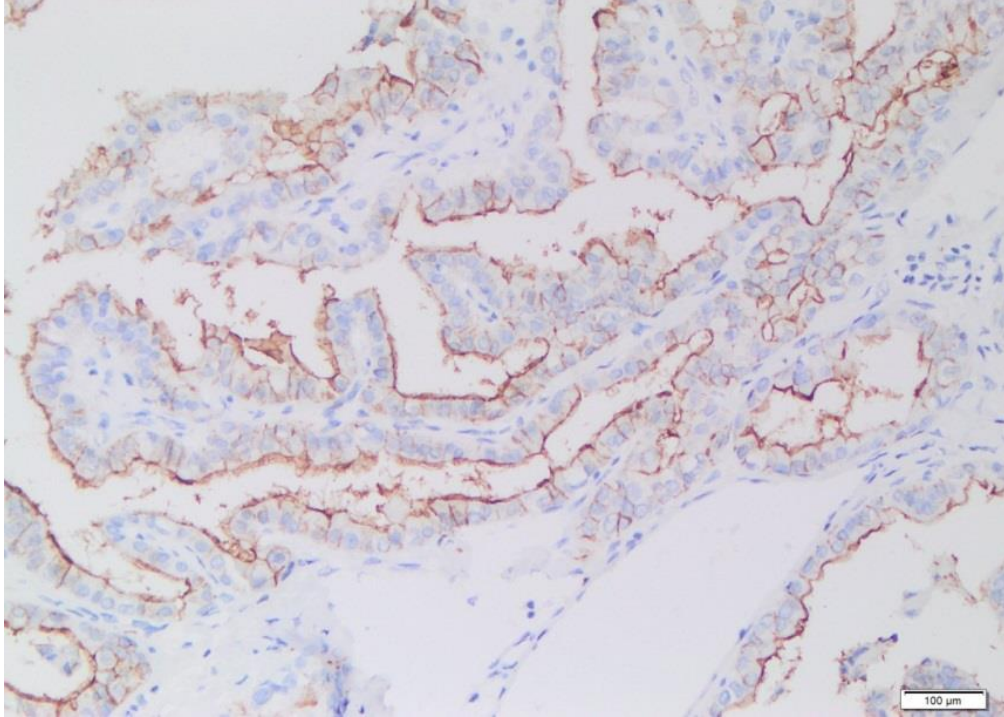
CK19'un sitoplazmik ve membranöz immünekspresyonu normal tiroid dokusunda, adenomlarda ve papiller karsinomlarda görülmektedir. Papiller karsinomlarda CK19 overekspresyonu moleküler tekniklerle gösterilmiştir²⁹. Rutin kullanımda çevre dokuya göre şiddeti artmış CK19 immünekspresyonu karsinom lehine yorumlanmaktadır (Resim 7).



Resim 7. Papiller karsinomda CK19 immünekspresyonu

2.8.4.2. *Hector Battifora Mesothelial Cell-1 (HBME-1)*

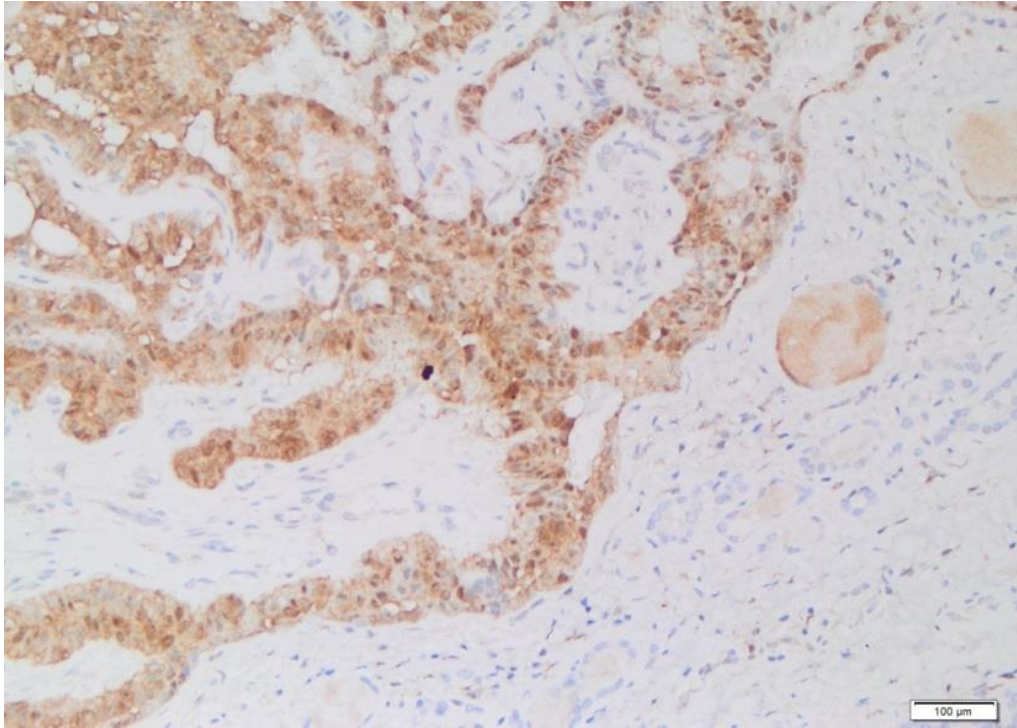
HBME-1, mezotel hücrelerinin mikrovillus yüzeyini tanıyan bir belirteç olup, papiller tiroid karsinomlarında apikal membranöz immünoekspresyon gösterir (Resim 8). Spesifitesi adenomların bir kısmında immünoekspresyonu görülen Galectin-3'e göre daha yüksektir⁶. Papiller karsinom – benign papiller hiperplazi ayırımında Galectin-3 ve CK19'dan daha spesifik olduğu gösterilmiştir³⁰.



Resim 8. Papiller karsinomda HBME-1 immünoekspresyonu

2.8.4.3. Galectin-3

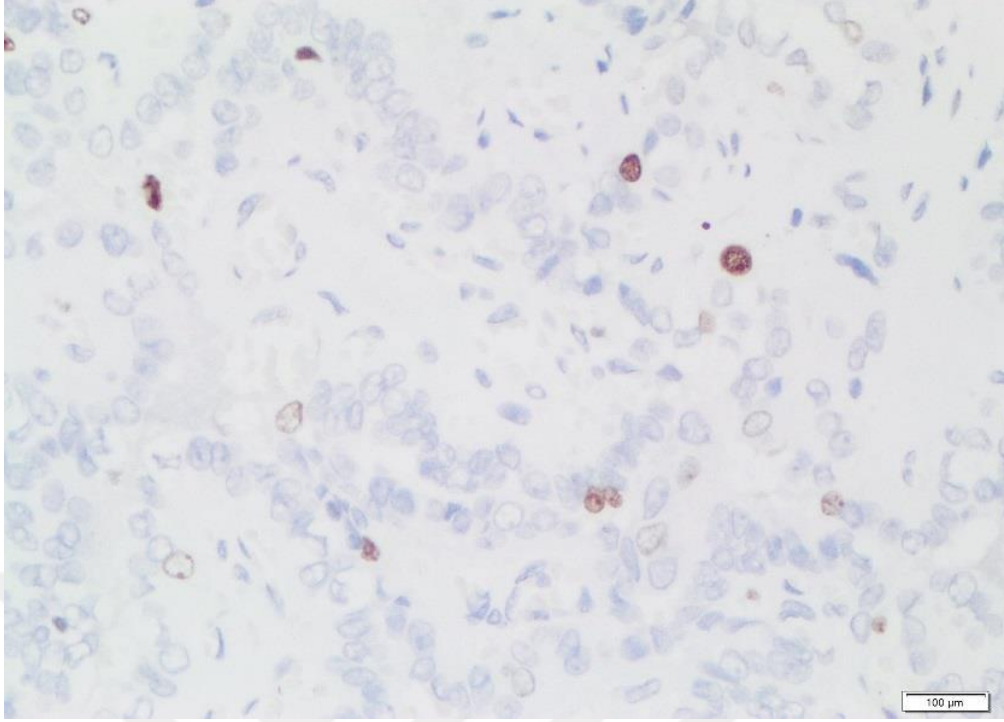
Galectin-3, hücre adhezyonunda görevli bir β -galaktozid bağlayıcı lektindir. Sitoplazmik ve nükleer immünoekspresyonunun birlikte görülmesi karsinom lehine yorumlanır (Resim 9). Sadece sitoplazmik immünoekspresyon non-spesifik olup, özellikle onkositik özellikler gösteren hücrelerde görülebilir⁶.



Resim 9. Papiller karsinomda Galectin-3 immünoekspresyonu

2.8.4.4. Ki-67

Ki-67; geç G1, S, G2 ve M fazlarında bulunan hücreleri tanıyan bir belirteç olup, boyanan tümör hücrelerinin yüzdesi “proliferasyon indeksi” olarak kullanılmaktadır. Papiller tiroid karsinomlarında Ki-67 proliferasyon indeksi, tipik olarak %5'in altındadır³¹.



Resim 10. Papiller karsinomda Ki-67 immünekspresyonu

2.8.5. Papiller karsinom tanısında kullanılan yeni belirteçler

Papiller karsinom tanısının en önemli kriteri olan nükleer şekil bozukluklarını daha net ortaya koymak ve artefakta bağlı morfolojik değişiklikleri ekarte etmek için, nükleer membran proteini olan “emerin”, immünohistokimyasal olarak kullanılmaktadır³². İyi diferansiye tiroid karsinomlarında, emerin immünekspresyonu ile saptanan nükleer protrüzyonların, malign davranış göstergesi olabileceği belirtilmektedir³³.

Özellikle foliküler lezyonlarda, nöral hücre adhezyon molekülü (N-CAM) olarak da bilinen CD56'nın kaybını; malignite lehine değerlendiren yayınlar mevcuttur³⁴. CK19, HBME-1, Galectin-3, CD56 immünekspresyonlarını değerlendiren bir derlemede ise; CD56 immünekspresyon kaybının tek başına sensitivitesinin düşük olduğu, ancak panele dahil edildiğinde tanısal açıdan faydalı olabileceği belirtilmiştir³⁵.

2.9. TNM Sınıflaması (DSÖ 2004)

pT (Primer tümör)

T1 Tümör en geniş çapı 2 cm veya daha az; tiroide sınırlı

T2 Tümör en geniş çapı 2 cm'den büyük, ancak 4 cm'den büyük değil; tiroide sınırlı

T3 Tümör en geniş çapı 4 cm'den büyük; tiroide sınırlı veya minimal tiroid dışı yayılım (sternohyoid kas invazyonu, peritiroidal yumuşak doku invazyonu, vb.) gösteren herhangi çaptaki tümör

T4a Tiroid kapsülünü aşarak subkutan yumuşak doku, larinks, trakea, özofagus veya rekürren laringeal sinir invazyonu oluşturan herhangi çaptaki tümör

T4b Prevertebral fasya, karotid arter veya mediastinal vasküler yapı invazyonu gösteren herhangi çaptaki tümör

pN (Bölgesel lenf nodları)

Nx Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilemediği durumlar

N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1a Level VI lenf nodlarına metastaz (pretrakeal, paratrakeal veya prelaringeal/Delphian)

N1b Unilateral, bilateral veya kontralateral servikal veya superior mediastinal lenf nodlarına metastaz

pM (Uzak metastaz)

Mx Uzak metastazın değerlendirilemediği durumlar

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz var

2.10. Evreleme (DSÖ 2004)

Tablo 1. Evreleme

45 yaş altı			
Evre I	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M0
Evre II	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1
45 yaş ve üzeri			
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III	T2	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Evre IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
Evre IVB	T4b	Herhangi bir N	M0
Evre IVC	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.11. Risk Stratifikasyonu

Güncel olarak, papiller karsinom tanısı alan hastaların tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde ve prognozun öngörülmesinde çeşitli skorlama sistemleri kullanılmaktadır³⁶. Klinik ve patolojik özellikleri bağdaştıran bu sistemlere örnek vermek gerekirse:

- MACIS (metastaz, yaş, rezeksiyon yeterliliği, invazyon, tümör çapı)
- AGES (yaş, grade, lokal yayılım, tümör çapı)
- AMES (yaş, metastaz, lokal yayılım, tümör çapı)
- TNM (yaş, tümör çapı, lenf nodlarının durumu, metastaz)

Niemeier ve ark.'nın çalışmasında; BRAF v600E mutasyonu ile tiroid içi yayılım, multisentrisite gibi patolojik özellikleri bir araya getiren skorlama sisteminin ise, papiller mikrokarsinomlarda agresif gidişi öngörmeye daha başarılı olduğu gösterilmiştir³⁷

2.12. Tedavi Yaklaşımları

Papiller tiroid karsinomunun konvansiyonel tedavisi lobektomi / total tiroidektomi ile bunu takip eden radyoaktif iyot ve TSH supresyonudur. Olguların büyük kısmında konvansiyonel tedaviler yeterli olmakta ve kür elde edilmektedir. Diğer yandan, %10-20 kadar olguda uzak organ metastazı gelişmekte; bunların da yaklaşık yarısında radyoaktif iyot ablasyonu ve TSH supresyonu yeterli olmamaktadır. Bu tedavilere direnç gelişiminden; BRAF mutasyonu sonucu gelişen sodyum/iyot simporter, TSH reseptörü, tiroperoksidaz, tiroglobulin ve pendrin ekspresyonlarının kaybının sorumlu olduğu gösterilmiştir^{38, 39}. Bu olgularda sistemik sitotoksik tedavinin rolü oldukça sınırlıdır⁴⁰. Papiller tiroid karsinomu olgularının küçük bir bölümünü oluştursa da; ilk tanı anında bu küçük grubun tespit edilmesini kolaylaştıran

ve farklı bir tedavi seçeneği sunan BRAF mutasyon analizinin klinik önemi oldukça fazladır.

BRAF mutasyonlarının görüldüğü diğer bir antite olan malign melanomda, tirozin kinaz inhibitörü etkili bir ajan olan Vemurafenib, FDA onayı alarak tedavi protokollerindeki yerini almıştır. Papiller tiroid karsinomu için ise; BRAF ile birlikte VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*), KİT gibi diğer tirozin kinazları inhibe eden multi-kinaz inhibitörleri olan Sorafenib^{41, 42} ve Lenvatinib^{43, 44}, 2015 yılında FDA onayı almıştır. Bu multi-kinaz inhibitörleri, radyoaktif iyot tedavisine direnç ve/veya uzak metastaz gelişmiş olgularda kullanıma girmiştir. Bu ajanlar ile progresyonsuz sağkalımda uzama elde edilmiş, ancak genel sağkalımda değişiklik tespit edilmemiştir. Henüz Faz II çalışmaları devam eden MEK inhibitörü Selumetinib ile ise, tümör hücrelerinin iyot uptake yeteneği ve karsinogenez sürecinde kaybedilen MHC-I molekülleri geri kazanılabilmektedir^{45, 46}. Bu avantajlar da göz önüne alındığında, yakın gelecekte başta tirozin kinaz inhibitörleri olmak üzere, bir çok hedefe yönelik ajanın, konvansiyonel tedavi protokollerine entegre olabileceği görülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2010-2014 yılları arasında tanı almış, klinik – patolojik evre, yaş, yaklaşık iki yıllık klinik takipleri ile HBME-1, Galectin-3, CK19 ve Ki-67 ekspresyon profillerini bildiğimiz 107 papiller karsinom ile 19 adenom ve 13 adet normal tiroid dokusunda BRAF ve h-TERT mutasyonu varlığı immünohistokimya ile araştırıldı. Randomize olarak seçilen 4 adenom, 13 lenf nodu metastazı ve 14 adet lenf nodu metastazı olmayan primer tümör dokusunda, BRAF mutasyonlarının tespiti için rt-PCR yöntemi de kullanıldı.

Hastaların yaşları minimum 8, maksimum 79, ortanca değeri (median) 44, ortalama değeri (mean) 43.96 ve standart deviasyonu 13.1 idi. Hastaların 30'u erkek (%23.8), 96'sı kadın (%76.2) olup; kadın/erkek oranı 3.2 idi.

3.2. Etik Kurul

69 protokol numaralı projemiz, 30.05.2014-8 sayılı yazı ile Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanmıştır. Projemiz; SAG-C-TUP-121114-0357 proje no ile, Marmara Üniversitesi BAPKO'nun (Bilimsel Araştırma ve Projeler Komisyonu) finansal desteği ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. Yöntem

3.3.1. İmmünohistokimya

3.3.1.1. BRAF v600E ve h-TERT

BRAF V600E ve h-TERT immünoekspresyonu, Novolink™ polimer deteksiyon sistemi ile gösterildi.

Bu yöntemde formalin fikse, parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamlara 4µm kalınlığında kesitler alınarak 37°C'de 1 gece deparafinize edildi. Üç ayrı ksilende 5 dakika ve iki ayrı %96'lık etanolde 10'ar dakika bekletilerek hidrasyon yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H₂O₂.metanol ile 20 dakika baskılandı. Ardından kesitlere mikrodalga fırında 200 W güçte Tris-EDTA Buffer (pH 9.0) ile 20 dakika antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. Oda ısısında 20 dakika soğutulan lamlar önce distile su ile sonra pH 7.4 Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Non-spesifik boyanmayı engellemek için lamlara Protein Block (Novocasta™) damlatılarak 10 dakika bekletildi. Ardından kesitler 1:100 dilüsyon oranında fare monoklonal BRAF V600E (VE-1, Spring™, Canada) antikorunda, 37°C'de, 60 dakika ve 1/100 dilüsyon oranında; tavşan poliklonal h-TERT (Y-182, Aviva, USA) antikorunda ise 37°C'de, 60 dakika ve 1/200 dilüsyon oranında inkübe edildi. Kesitlerin tümü beşer dakika iki ayrı TBS ile yıkandı ve sırasıyla Post Primary Block ve Novolink Polimer (Novocasta™, Leica, Australia) çözeltileri damlatılarak oda ısısında 30' ar dakika inkübe edildi. TBS ile yıkama sonrasında diaminobenzidin (DAB) kromojeni damlatılarak 5 dakika bekletildi. Mayer Hematoksilen ile zıt boyamanın ardından kesitler etanolden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilene alınarak uygun kapama maddesi ile kapatıldı.

Boyama işlemi esnasında eksternal negatif ve pozitif kontrol dokuları kullanıldı. BRAF V600E antikoru için pozitif kontrol dokusu olarak olarak, BRAF mutasyonu varlığı önceden rt-PCR ile gösterilmiş malign melanom

olgularına ait kesitler kullanıldı. Tiroid dokusuna ait negatif kontrol kesitlerine ise primer antikor dışında diğer bütün aşamalar uygulandı.

h-TERT boyama işlemleri sırasında pozitif kontrol olarak ürotelyal karsinom olgusuna ait kesitler kullanıldı. Negatif kontrol kesitlerine ise primer antikor dışında diğer bütün aşamalar uygulandı.

3.3.1.2. CK19, HBME-1, Galectin-3, Ki-67

Rutinde kullandığımız CK19, HBME-1, Galectin-3 ve Ki-67 belirteçleri, otomatize sistemle (Leica-Bond™) uygulanmaktadır.

Tablo 2. İmmünohistokimya kullanılan antikorlar ve özellikleri

ANTİKOR	KLON	DİLÜSYON	İNKÜBASYON SÜRESİ	SICAKLIK
BRAF V600E	VE-1	1/100	60 dakika	37°C
h-TERT	Y-182	1/200	60 dakika	37°C
CK19	AB53	1/100	30 dakika	56°C
HBME-1	HBME-1	1/50	30 dakika	56°C
Galectin-3	9C4	1/100	30 dakika	56°C
Ki-67	SP6	1/100	30 dakika	56°C

3.3.2. RT-PCR

3.3.2.1. Örneğin hazırlanması ve DNA ekstraksiyonu

Seçilen parafin bloklardan 5 µ kalınlığında 3'er adet kesit alındıktan sonra, daha önce uygun alanı işaretlenmiş Hematoksilen-Eozin lamındaki işarete göre makrodisseksiyon yapıldı. Kesitten seçilerek çıkarılan alanlar 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. 500 µL ksilen eklenerek Vortex ile 10 saniye karıştırıldı. Tüpler 15-30°C aralığında 5 dakika bekletildi. 500 µL absolut etanol eklenerek 15-30°C aralığında 5 dakika daha bekletildi. Tüpler 16000-

20000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Üstte biriken sıvı, çökeltiye dokunmadan alınıp kimyasal atığa boşaltıldı. 1 mL absolut etanol eklenip, Vortex ile 10 saniye karıştırıldı. Tüpler 16000-20000 g'de 2 dakika tekrar santrifüj edildi. Üstte biriken sıvı, çökeltiye dokunmadan alınıp kimyasal atığa boşaltıldı. Kalan çökelti, tüplerin kapağı açılarak 56°C'deki ısıtma bloğunda kurutuldu. Kuruyan çökelti, içeriğindeki etanolün tamamen buharlaştığından emin olunduktan sonra, 180 µL DNA Tissue Lysis Buffer solüsyonu içinde tekrar süspansiyon haline getirildi. 70 µL Proteinaz K eklendi.

3.3.2.2. DNA izolasyonu ve kantifikasyonu

Elde edilen süspansiyon, Vortex ile 30 saniye karıştırıldı. Tüpler 56°C'de 60 dakika inkübe edildi. Vortex ile tekrar 10 saniye karıştırıldı. Daha sonra tüpler 90 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Tüpler ısıtıcı bloktan indirilip, oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandı. 200 µL DNA Binding Buffer eklendi. Pipet yardımıyla homojen karışım oluşturuldu. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. 100 µL isopropanol eklenip, pipet ile karıştırıldı. Herbiri yaklaşık 550 µL'ye ulaşan lisat, filtre tüpleri ile toplama kabına alındı. 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpleri yeni toplama kaplarına alınıp, 500 µL Wash Buffer I eklendi. 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kaplarda biriken sıvı kimyasal atığa boşaltılıp, filtre tüpleri aynı kaplara geri kondu. 500 µL Wash Buffer II eklendi. 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kaplarda biriken sıvı kimyasal atığa boşaltılıp, filtre tüpleri yeni toplama kaplarına alındı. Filtre membranlarının kurumaması için 16000-20000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpleri, önceden etiketlenmiş yıkama tüplerine alındı. 100 µL DNA Elution Buffer filtre membranlarının merkezine yavaşça akıtıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek, filtrelerdeki DNA materyalinin mikrosantrifüj tüplerine aktarımı sağlandı. Bu aşamada DNA konsantrasyonları Nanodrop UV-Vis Spectrophotometer (ND-1000 veya ND-2000) ile hemen ölçüldü. Elde edilmesi gereken minimum DNA miktarı 5 µL olarak kabul edildi.

3.3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyon

Elde edilen DNA miktarı, kit üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, uygun miktarlarda DNA Specimen Diluent ile sulandırıldı. Spesmen sayısına göre, önerilen miktarlarda solüsyon karıştırıldı. Elde edilen spesmenler *AD-plate*'e alınarak Cobas™ cihazına yüklendi.

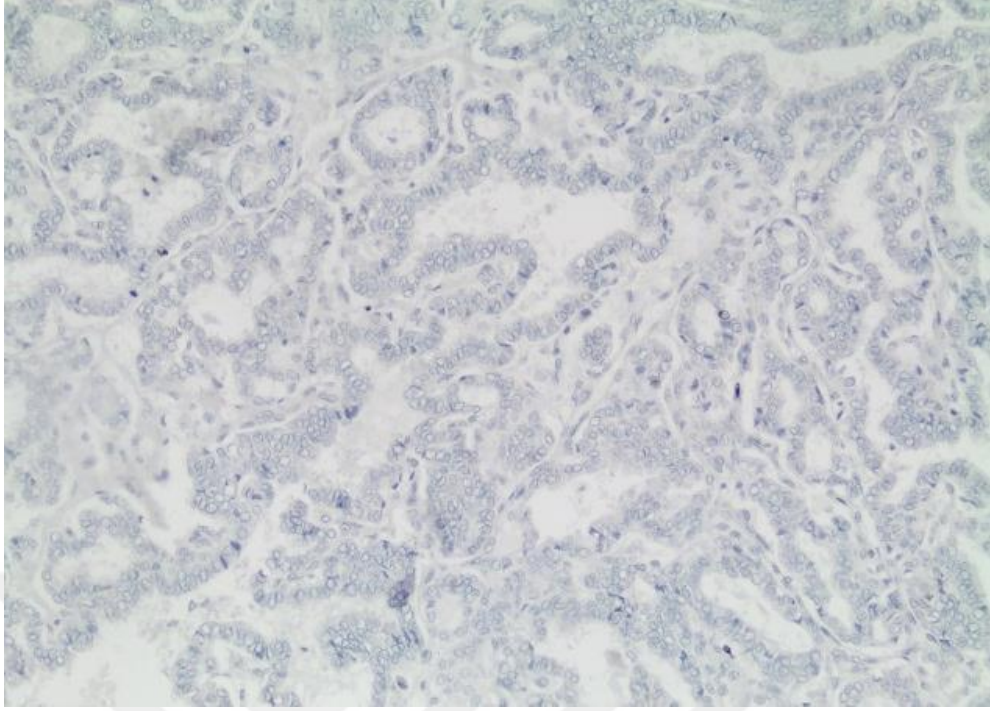
3.4. Değerlendirme

3.4.1. BRAF v600E immünohistokimyası

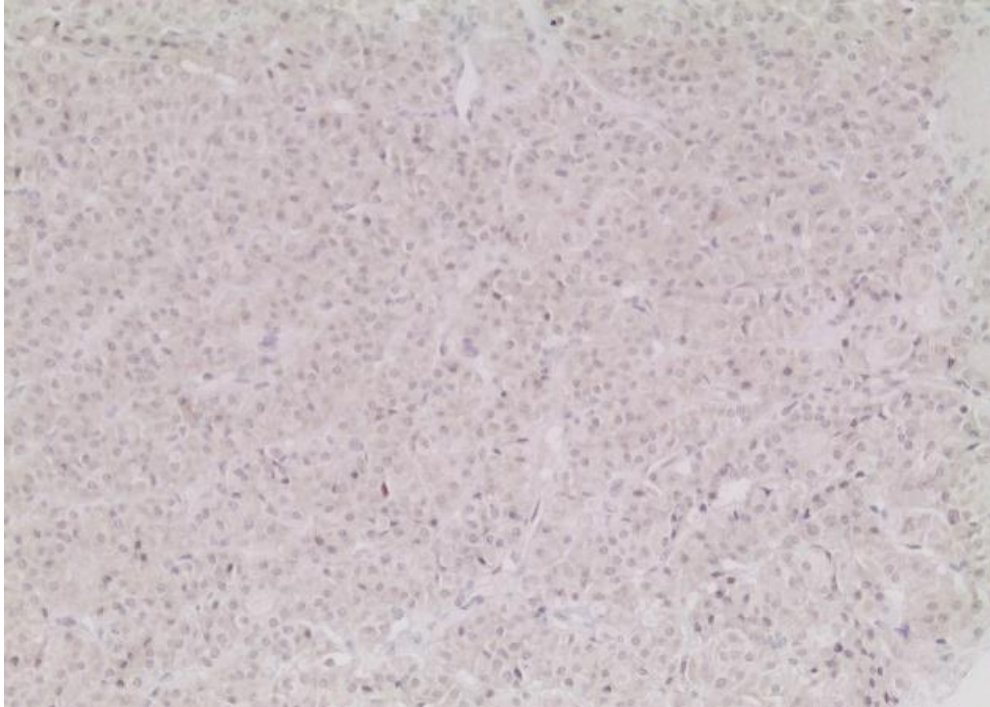
Tiroid papiller karsinomunda, kolon adenokarsinomunda ve malign melanomda BRAF v600E immünoekspresyonunun değerlendirilmesi ile ilgili bir standardizasyon henüz geliştirilmemiştir⁴⁷. Literatürde BRAF v600E immünoekspresyonunu farklı şekillerde değerlendiren yayınlar mevcuttur. Bizim çalışmamızda, BRAF v600E immünoekspresyonu, nükleer ve sitoplazmik boyanmanın yüzdesi ve şiddetine göre skorlanarak (Tablo 3) değerlendirildi.

Tablo 3. BRAF v600E immünoekspresyon skorlaması

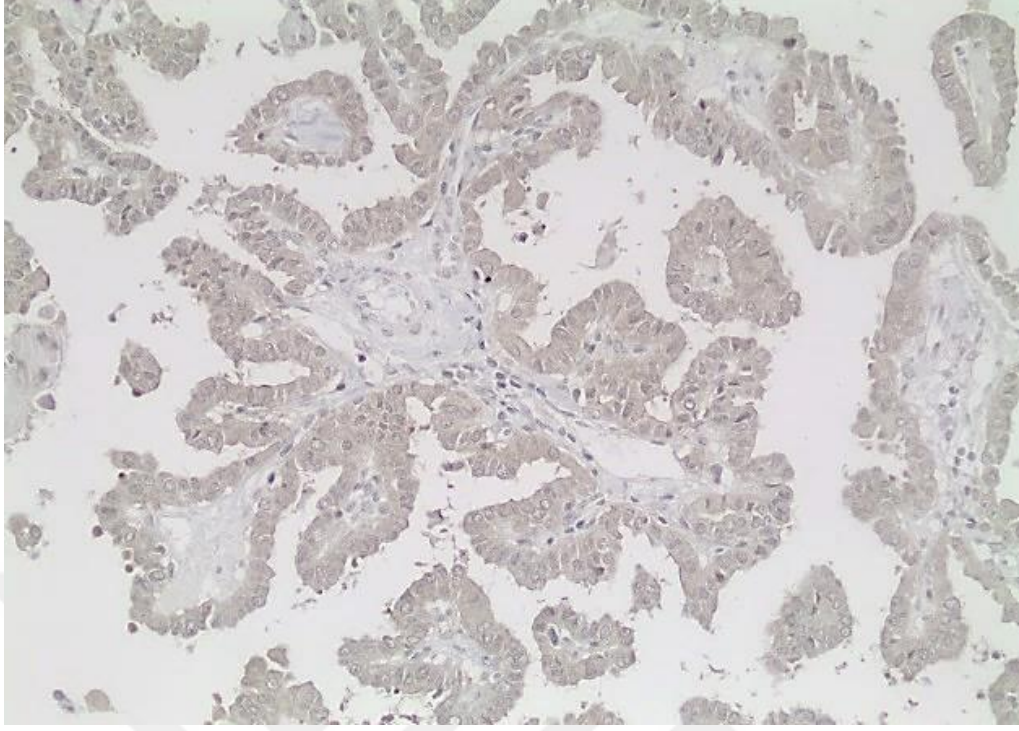
0	Negatif
1	Zayıf
2	Orta derecede
3	Şiddetli



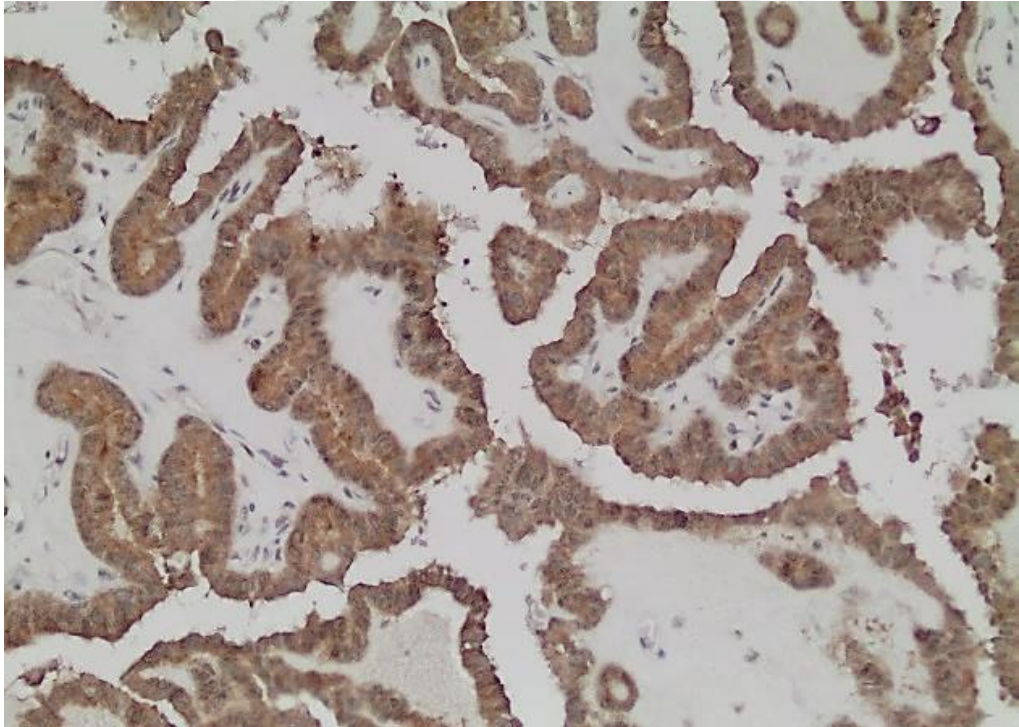
Resim 11. BRAF v600E negatif



Resim 12. BRAF v600E 1+ immünekspresyon



Resim 13. BRAF v600E 2+ immünekspresyon



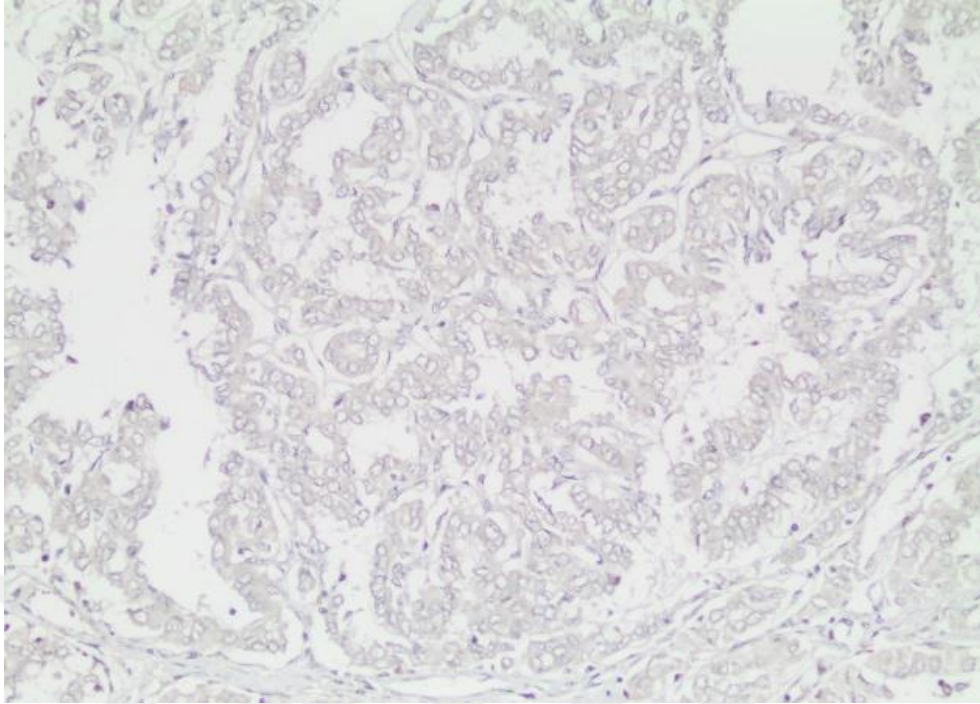
Resim 14. BRAF v600E 3+ immünekspresyon

3.4.2. h-TERT immünohistokimyası

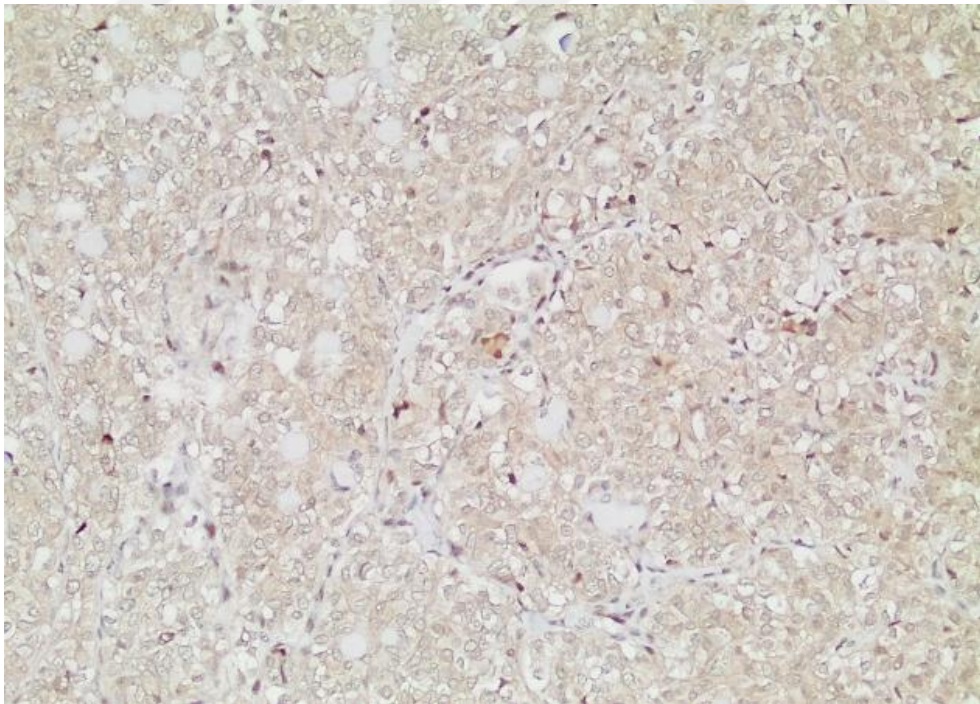
Literatürde h-TERT antikorunun klonuna göre farklı değerlendirmeler yapan yayınlar mevcuttur. 44F12 klonunu kullanan iki çalışmada^{48, 49} nükleer boyanma, yine 44F12 klonunu kullanan başka bir çalışmada⁵⁰ nükleer veya nükleer+sitoplazmik boyanma spesifik kabul edilmiştir. Y182 klonunu kullanan çalışmalar⁵¹⁻⁵³ ise, nükleer+sitoplazmik boyanmayı spesifik kabul etmiştir. Bizim çalışmamızda Y182 klonu kullanıldı. Sitoplazmik boyanma şiddeti (Tablo 4) ve nükleer boyanma yüzdesi (≤ 25 , 25-75, ≥ 75) ayrı ayrı skorlanarak değerlendirildi.

Tablo 4. h-TERT immünoekspresyon skorlaması

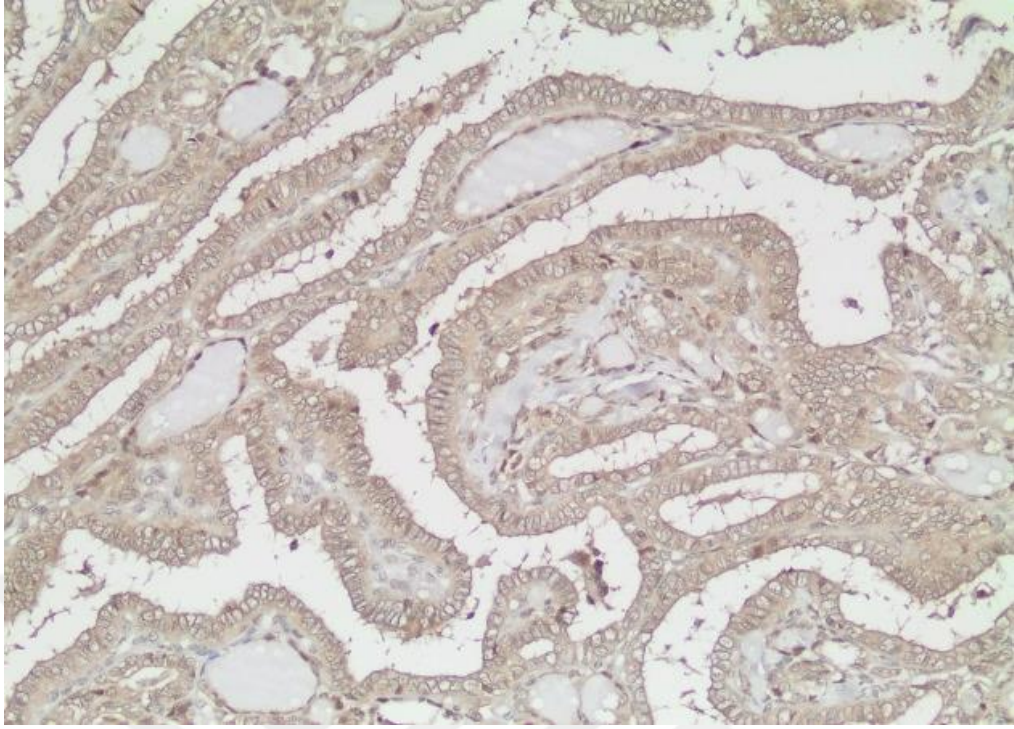
0	Negatif
1	Zayıf
2	Orta derecede
3	Şiddetli



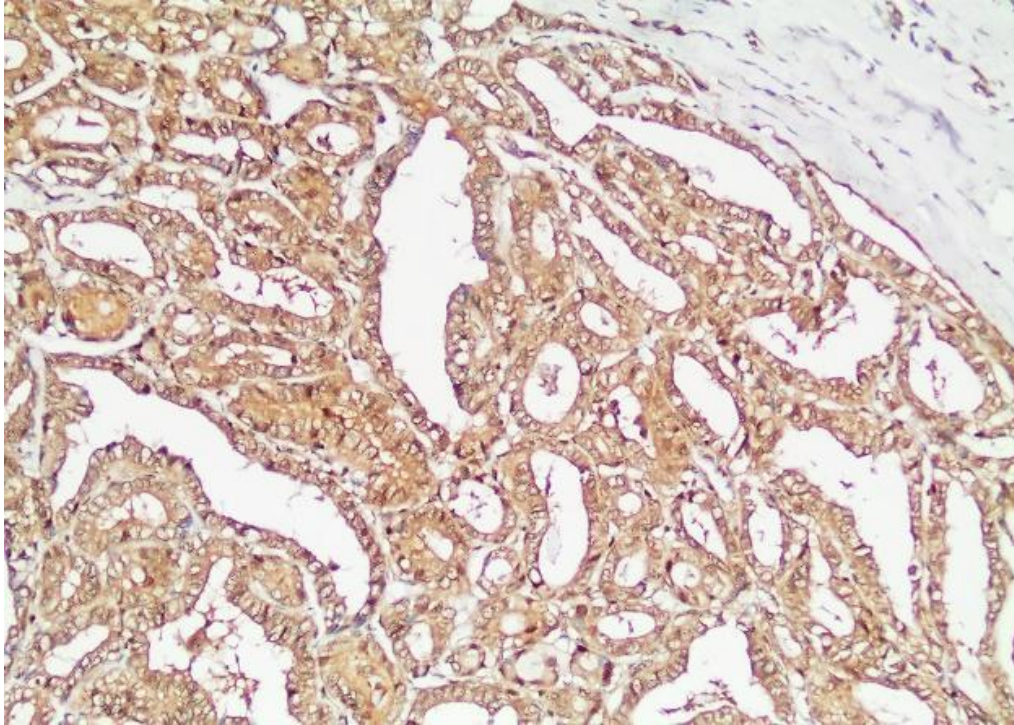
Resim 15. h-TERT negatif



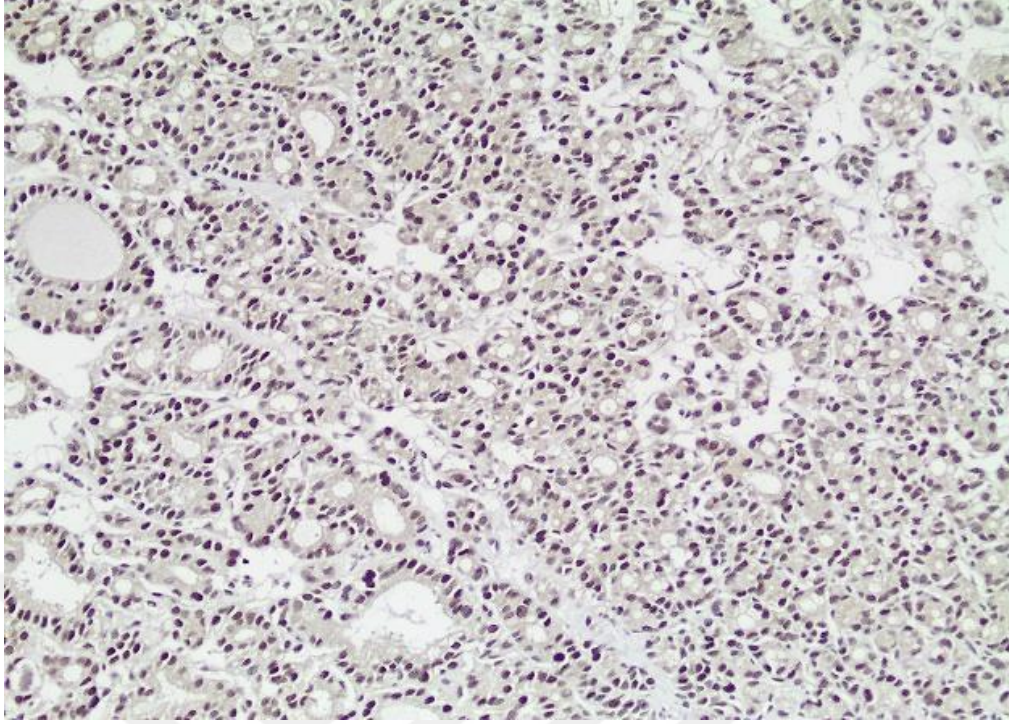
Resim 16. h-TERT 1+ sitoplazmik immünreaktivite



Resim 17. h-TERT 2+ sitoplazmik immünreaktivite



Resim 18. h-TERT 3+ sitoplazmik immünreaktivite



Resim 19. h-TERT nükleer immünreaktivite

3.4.3 CK19 immünhistokimyası

evre tiroid dokusuna göre boyanma Şiddeti artan olgular pozitif olarak değerlendirildi. Tümörün bir kısmında immünekspresyon görülen olgular "fokal pozitif" olarak değerlendirildi.

3.4.4 HBME-1 immünhistokimyası

Tümörde apikal membranöz boyanma görülen olgular pozitif olarak değerlendirildi. Tümörün bir kısmında immünekspresyon görülen olgular "fokal pozitif" olarak değerlendirildi.

3.4.5 Galectin-3 immünohistokimyası

Tümörde sitoplazmik ve nükleer boyanma görülen olgular pozitif olarak değerlendirildi. Tümörün bir kısmında immünoekspresyon görülen olgular “fokal pozitif” olarak değerlendirildi.

3.4.6 Ki-67 proliferasyon indeksi

Tümör hücrelerinde görülen nükleer boyanmanın yüzdesi, proliferasyon indeksi olarak kabul edildi. İstatistiksel değerlendirme için olgular boyanma yüzdesine göre $<5\%$ ve $\geq 5\%$ olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

3.4.7. BRAF PCR

İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen olgular arasından randomize olarak seçilen 4 adenom, 13 lenf nodu metastazı ve 14 adet lenf nodu metastazı olmayan primer tümör dokusuna PCR uygulandı.

3.5. İstatistik

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS 15 (Statistical Package for Social Sciences; IBM, USA) kullanıldı. Kategorik değişkenler için ki kare (Pearson Chi-Square) testi kullanıldı.

BRAF v600E immünoekspresyonunun PCR sonuçları ile karşılaştırılmasında Fisher's Exact test kullanıldı. Tüm istatistik testlerde p değerinin 0.05'in altında olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Demografik veriler ve klinik değerlendirme sonuçları

Çalışmamıza dahil edilen olguların 30'u erkek (%23.8), 96'sı kadın (%76.2) olup; tanı anındaki yaş ortalaması 43.96 idi (SS; 15.10, minimum 8 ve maksimum 79). Olguların 113 tanesine total tiroidektomi; kalan 13 tanesine lobektomi prosedürü uygulanmış; 49 tanesine eş zamanlı boyun disseksiyonu veya selektif peritiroidal lenf nodu eksizyonu yapılmıştı.

Sadece papiller karsinom tanılı olgular ele alındığında; olguların 24'ü erkek (%22.4), 83'ü kadın (%77.6) olup; tanı anındaki yaş ortalaması 43.91 idi (SS; 15.14, minimum 8 ve maksimum 79).

107 adet papiller karsinom olgusundan 97'sinin (%91) klinik takip bilgileri elde edildi. Takip süresi ortalama 25.3 ay olarak hesaplandı. Klinik takibine ulaşılan 97 hastanın;

- 1'i (%1) kardiyovasküler hastalık nedeniyle vefat etmişti.
- 23'ünün (%24) tanı anında lenf nodu metastazı tespit edilmişti.
- 1'inin (%1) yaklaşık 28 ay sonra lenf nodu metastazı ortaya çıkmıştı.
- 2'sinin (%2) tanı anında uzak metastazı tespit edilmişti.
- 5'inde (%5.1) lokal nüks gelişmişti.
- 65'i (%67) ise sağlıklı ve hayattaydı.

Klinik takiplerine ulaşılabilen bu 97 olgu; lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz gibi agresif davranış sergileme durumuna göre, "iyi prognozlu" ve "kötü prognozlu" olarak 2 gruba ayrılarak değerlendirildi.

4.2 Patolojik Prognostik Parametreler

4.2.1. Patolojik evre

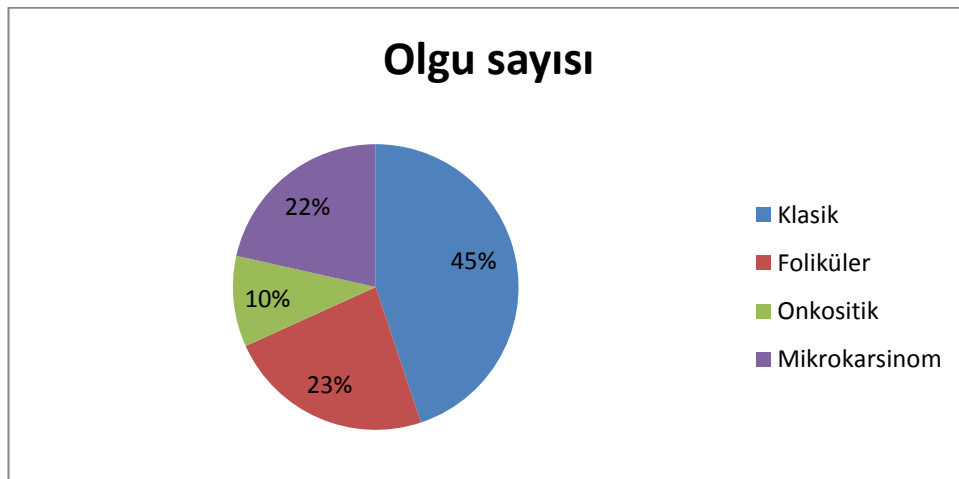
Papiller karsinom olgularının 46 tanesi (%43) pT1, 29 tanesi (%27) pT2, 32 tanesi (%30) ise pT3 olarak değerlendirildi.

4.2.2. Tümör çapı

Papiller karsinom grubunda olguların tümör çapı ortalaması 20.98 mm (SS 13.8, minimum 3 mm, maksimum 75 mm); adenom grubunda ise 25.79 (SS 15.03, minimum 9 mm, maksimum 67 mm) idi.

4.2.3. Mikroskopik varyant

Papiller karsinom grubunda, toplam 107 olgunun 48 tanesi (%45) klasik, 25 tanesi (%23) foliküler, 11 tanesi (%10) onkositik varyant, 23 tanesi (%22) de mikrokarsinom idi (Tablo 5). Adenom olgularının 16 tanesi (%84.2) foliküler, 3 tanesi (%15.8) ise onkositik morfolojiye sahipti.



Şekil 2. Mikroskopik varyantların yüzde dağılımı

4.2.3.1. Mikroskopik varyantın patolojik prognostik parametrelerle ilişkisi

- Tüm olguların 5 tanesinde nekroz izlenmişti. Bunların 3 tanesinin (%60) onkositik morfolojide olması dikkat çekiciydi. Onkositik varyant ile nekroz arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı ($p=0.002$).
- Mikroskopik varyantlar arasında mitotik aktivite açısından anlamlı farklılık saptanmadı. ($p=0.294$)
- Klasik varyant olguların %50'sinde, foliküler varyant olguların %40'ında, onkositik varyant olguların %54.5'inde, mikrokarsinomların %34.8'inde kalsifikasyon ve Psammom cisimleri izlendi. Mikroskopik varyantlar arasında, kalsifikasyon varlığı açısından anlamlı farklılık saptanmadı. ($p=0.55$)
- Lenfatik invazyon en çok klasik varyantta (%41.6) izlendi. Ancak varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. ($p=0.118$)
- Vasküler invazyon, en çok klasik varyantta (%41.7) izlendi. ($p=0.006$)
- Perinöral invazyon en çok klasik varyantta (%20.8) izlendi. ($p=0.041$)
- Tümör kapsül varlığı, en çok foliküler varyantta (%92) izlendi. ($p=0.0001$)
- Tümör kapsülü bulunan olgular arasında tümör kapsül invazyonu en çok klasik varyantta (%69) izlendi. Ancak varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. ($p=0.485$)
- Tiroid kapsül invazyonu en çok klasik varyantta (%72.9) izlendi. ($p=0.002$)
- Tiroid çevresi yumuşak doku invazyonu en çok klasik varyantta (%47.9) izlendi. ($p=0.0001$)
- Multisentrik tümör varlığı en çok onkositik varyantta (%54.5) izlendi. Ancak varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. ($p=0.291$)

- Tiroid içi yayılım en çok klasik varyantta (%75) izlendi. (p=0.0001)
- Olguların tümör dışı tiroid parankiminde %57.9 nodüler hiperplazi, %21.5 olağan morfoloji, %16.8 lenfositik tiroidit, %0.9 foliküler adenom, %0.9 dishormonogenetik guatr, %0.09 mikrokalsifikasyon izlendi. Mikroskopik varyantlar arasında tümör dışı tiroid dokusu açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. (p=0.269)

4.2.3.2. Mikroskopik varyantın rutinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçlerle ilişkisi

- HBME-1 immünespresyonu en çok mikrokarsinomlarda (%100) izlendi. (p=0,001)
- CK19 immünespresyonu açısından, mikroskopik varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. (p=0.346)
- Galectin-3 immünespresyonu, foliküler varyantta diğer varyantlara göre belirgin olarak azdı. (p=0.0001)
- Ki-67 ile ölçülen proliferasyon indeksi mikrokarsinomlarda en yüksek olmakla birlikte, mikroskopik varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. (p=0.651)

4.2.4. Cerrahi sınır

Papiller karsinom olgularının 25 tanesinde (%23.3) cerrahi sınırdaki tümör devamlılığı izlendi. Geriye kalan 82 olguda (%76.7) cerrahi sınırlar sağlam olarak değerlendirildi.

4.2.5. Patolojik risk skoru

Patolojik prognostik parametrelerin her birine 1 puan verilerek, 11 puan üzerinden değerlendirilen bir "Patolojik risk skoru" oluşturuldu (Tablo 5).

Tablo 5. Patolojik risk skoru

	Puan
Mitoz	1
Nekroz	1
Lenfatik invazyon	1
Vasküler invazyon	1
Perinöral invazyon	1
Tümör kapsül invazyonu	1
Tiroid kapsül invazyonu	1
Multisentrisite	1
Tiroid içi yayılım	1
Çevre yumuşak doku invazyonu	1
Cerrahi sınırdaki tümör varlığı	1
Toplam	11

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.3.1. BRAF v600E immünohistokimyası

Papiller karsinom olgularında BRAF v600E immünohistokimyası için 1+,2+ ve 3+ olguların oranı %71 (76/107), 2+ ve 3+ olguların oranı %50.4 (54/107), sadece 3+ olguların oranı ise %31.8'dir (34/107). Herhangi bir şiddette boyanma görülen olgularda, boyanan tümör yüzdesi 10 ile 100 arasında değişmekte olup; ortalama %90.4 olarak hesaplanmıştır.

Adenom olgularının %36.8'inde (7/19) 1+ boyanma izlenmiştir. Normal tiroid dokusuna ait örneklerin %7.7'sinde (1/13) 2+, %76.9'unda (10/13) 1+ boyanma izlenmiştir. İmmünohistokimyasal bulgular Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. BRAF v600E immünhistokimya bulguları

Grup	BRAF v600E İmmünekspresyon Şiddeti (n)				
	0	1+	2+	3+	Toplam
Papiller karsinom - Klasik varyant	11	3	7	27	48
Papiller karsinom - Foliküler varyant	13	11	1	0	25
Papiller karsinom - Onkositik varyant	2	5	3	1	11
Papiller mikrokarsinom	5	3	9	6	23
Adenom	12	7	0	0	19
Normal	2	10	1	0	13
Toplam	45	39	21	34	139

107 adet papiller karsinom olgusunun, lenf nodu metastazı mevcut olan 23 tanesinde (%21.5), hem primer tümör örneğine, hem de metastatik lenf noduna BRAF v600E immünhistokimyası uygulanmış; bu olgularda primer tümör ile metastaz örneklerinde BRAF v600E immünekspresyonunun genellikle aynı yüzde ve şiddette olduğu gözlemlenmiştir. Bu olguların 5 tanesinde (%21.7) boyanma şiddeti aynı iken, boyanan tümör oranının metastazda daha düşük olduğu; 2 tanesinde (%8.7) hem boyanma şiddeti hem de boyanan tümör oranının metastazda daha düşük olduğu, 6 olguda ise (%26) primer tümör ve lenf nodu metastazında immünekspresyon görülmediği dikkati çekmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Primer tümörde ve aynı olgunun lenf nodu metastazı örneklerinde BRAF v600E immünekspresyonu

Olgu	pT-BRAF-%	pt-BRAF-şiddet	LN-BRAF-%	LN-BRAF-şiddet
1	0	0	0	0
2	90	3	90	3
3	80	3	70	3
4	100	1	30	1
5	100	3	100	1
6	10	2	0	0
7	0	0	0	0
8	100	3	100	3
9	100	2	100	2
10	90	3	40	3
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	100	2	100	2
15	100	3	100	3
16	0	0	0	0
17	90	3	90	3
18	100	3	100	3
19	80	2	50	2
20	100	3	100	3
21	100	3	100	3
22	100	3	80	2
23	60	1	20	1

Kısaltmalar:

pT-BRAF-%: Primer tümörde BRAF immünekspresyonu görülen hücrelerin yüzdesi, pT-BRAF-şiddet: Primer tümörde görülen BRAF immünekspresyonunun şiddeti, LN-BRAF-%: Lenf nodu metastazında BRAF immünekspresyonu görülen hücrelerin yüzdesi, LN-BRAF-şiddet: Lenf nodu metastazında görülen BRAF immünekspresyonunun şiddeti

4.3.2. h-TERT immünohistokimyası

h-TERT immünoekspresyonu, sitoplazmik ve nükleer olmak üzere ayrı ayrı değerlendirildi (Tablo 8,9). Papiller karsinom, adenom ve normal tiroid olguları arasında sitoplazmik h-TERT immünoekspresyonu yönünden anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.065$). h-TERT nükleer immünoekspresyonu ise, papiller karsinom grubunda adenom ve normal tiroid olgularına göre belirgin olarak az olup, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.001$). Normal dokuda h-TERT mutasyonu ile telomeraz reaktivasyonu beklenmediğinden, bu farklılığın kullanılan h-TERT klonunun non-spesifik immünoekspresyonuna bağlı olduğu olduğu kanısına varıldı.

Tablo 8. h-TERT sitoplazmik immünoekspresyonu

Grup	h-TERT sitoplazmik immünoekspresyon şiddeti (n)				
	0	1+	2+	3+	Toplam
Papiller karsinom - Klasik varyant	4	18	18	8	48
Papiller karsinom - Foliküler varyant	6	12	6	1	25
Papiller karsinom - Onkositik varyant	3	6	0	2	11
Papiller mikrokarsinom	5	10	6	2	23
Adenom	6	8	2	3	19
Normal	0	11	2	0	13
Toplam	24	65	34	16	139

Tablo 9. h-TERT nükleer immünoekspresyonu

Grup	h-TERT nükleer immünoekspresyon yüzdesi (n)			
	<25	25-75	>75	Toplam
Papiller karsinom - Klasik varyant	26	11	11	48
Papiller karsinom - Foliküler varyant	15	5	5	25
Papiller karsinom - Onkositik varyant	3	3	5	11
Papiller mikrokarsinom	9	7	7	23
Adenom	3	5	11	19
Normal	0	5	8	13
Toplam	56	36	47	139

4.4. PCR Sonuçları

107 adet papiller karsinom ve 19 adet adenom olgusu arasından randomize olarak seçilen 31 olguya BRAF tr-PCR yöntemi uygulandı. BRAF v600E immünohistokimyası ile boyanma görülmeyen 11 olgunun 1'inde (%9), 2+ boyanma görülen 6 olgunun 1'inde (%16.6), 3+ boyanma görülen 9 olgunun 8'inde (%88.8) PCR ile BRAF mutasyonu tespit edildi. BRAF v600E immünohistokimyası ile 2+ boyanma elde edilen 5 olgunun tümü BRAF negatifti (Tablo 10).

Tablo 10. BRAF PCR sonuçları

	İHK (-)	İHK (1+)	İHK (2+)	İHK (3+)	Toplam
PCR (-)	10	5	5	1	21
PCR (+)	1	0	1	8	10
Toplam	11	5	6	9	31

4.4.1. BRAF v600E immünoekspresyonu ve BRAF PCR

BRAF v600E immünoekspresyonu ile BRAF PCR sonuçları arasındaki ilişki, Fisher's Exact Test ile değerlendirildi. "İmmünohistokimyasal olarak sadece 3+ şiddette boyanan olgular gerçek pozitifdir." hipotezi ile, en yüksek "Test sonucu olabirlik oranı (Likelihood ratio)" elde edildi.

Bu sonuçlara göre BRAF v600E immünohistokimyasının;

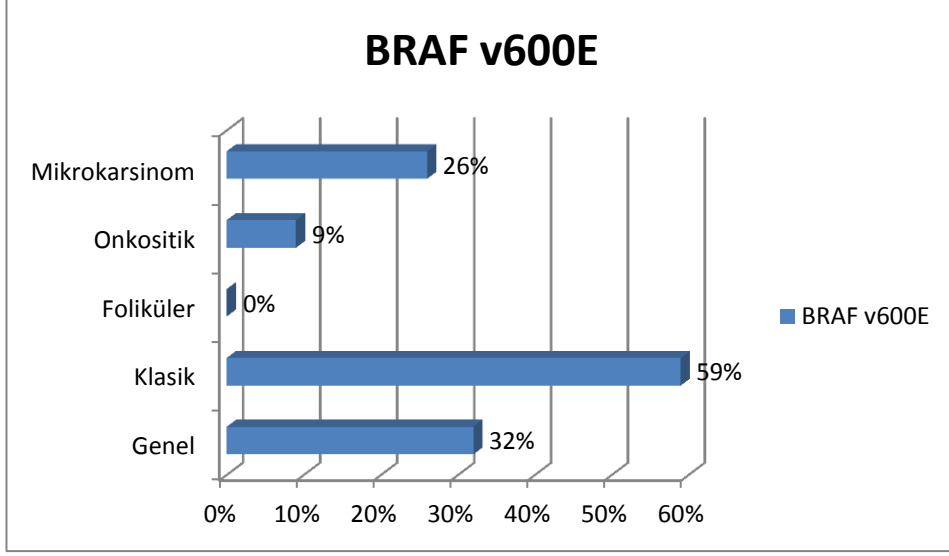
- Sensitivitesi %90.9,
- Spesifitesi %88.8,
- Pozitif prediktif değeri %95.2,
- Negatif prediktif değeri %80,
- Test sonucu olabirlik oranı (Likelihood ratio) 8.18 olarak hesaplandı.
- Test sonucu olabirlik oranınının 8.18 olması, her 10 testten 1 tanesinin yanlış olduğu anlamına gelmekteydi.

4.4.2. BRAF PCR sonuçları ile BRAF v600E immünohistokimyasının değerlendirilmesi

İmmünohistokimya ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması sonucunda elde edilen bilgiler ışığında, immünoekspresyon şiddeti 3+ olan olgular pozitif, geri kalan olgular negatif kabul edildi (Tablo 11, Şekil 3). Buna göre tüm papiller karsinom olgularının %31.8'i (34/107) BRAF v600E pozitif olarak değerlendirildi. En yüksek pozitiflik oranı klasik varyantta (%59.5) izlenmiş olup; foliküler varyant olgularda pozitiflik saptanmadı.

Tablo 11. Mikroskopik varyantlar arasında BRAF v600E immünoekspresyonu

Grup	BRAF v600E İmmünoekspresyon Şiddeti (n; [%])		
	0/1+/2+	3+	Toplam
Papiller karsinom - Klasik varyant	21	27 [%59.5]	48
Papiller karsinom - Foliküler varyant	25	0 [%0]	25
Papiller karsinom - Onkositik varyant	10	1 [%9]	11
Papiller mikrokarsinom	17	6 [%26]	23
Toplam	73	34 [%31.8]	107



Şekil 3. Mikroskopik varyantlarda BRAF v600E mutasyon oranları (3+ immünoekspresyon)

Lenf nodu metastazı olan olguların %11'i BRAF v600E pozitif olarak saptandı. Bu olguların 2 tanesinde metastatik lenf nodundaki tümörün BRAF v600E negatif olması, 2 tanesinde ise BRAF v600E immünoekspresyonu gösteren hücre oranının metastatik lenf nodunda daha düşük olması dikkati çekti (Tablo 12). Ancak primer tümör ile metastatik lenf nodundaki tümörün BRAF v600E mutasyonu yönünden ilişkisinin çok kuvvetli olduğu hesaplandı. ($\Phi=0.837$, $p=0.0001$). Primer tümör örneklerinde BRAF v600E mutasyonuna sahip hücrelerin %80-100 aralığında olduğu dikkate alındığında; intratümöral heterojenitenin lenf nodu metastazı örneklerinde daha belirgin olduğu görüldü.

Tablo 12. Primer tümörde ve aynı olgunun lenf nodu metastazı örneğinde BRAF v600E mutasyonu (3+ immünekspresyon)

Olgu	pt-BRAF	pT-BRAF-%	LN-BRAF	LN-BRAF-%
1	Negatif		Negatif	
2	Pozitif	90	Pozitif	90
3	Pozitif	80	Pozitif	70
4	Negatif		Negatif	
5	Pozitif	100	Negatif	
6	Negatif		Negatif	
7	Negatif		Negatif	
8	Pozitif	100	Pozitif	100
9	Negatif		Negatif	
10	Pozitif	90	Pozitif	40
11	Negatif		Negatif	
12	Negatif		Negatif	
13	Negatif		Negatif	
14	Negatif		Negatif	
15	Pozitif	100	Pozitif	100
16	Negatif		Negatif	
17	Pozitif	90	Pozitif	90
18	Pozitif	100	Pozitif	100
19	Negatif		Negatif	
20	Pozitif	100	Pozitif	100
21	Pozitif	100	Pozitif	100
22	Pozitif	100	Negatif	
23	Negatif		Negatif	

Kısaltmalar:

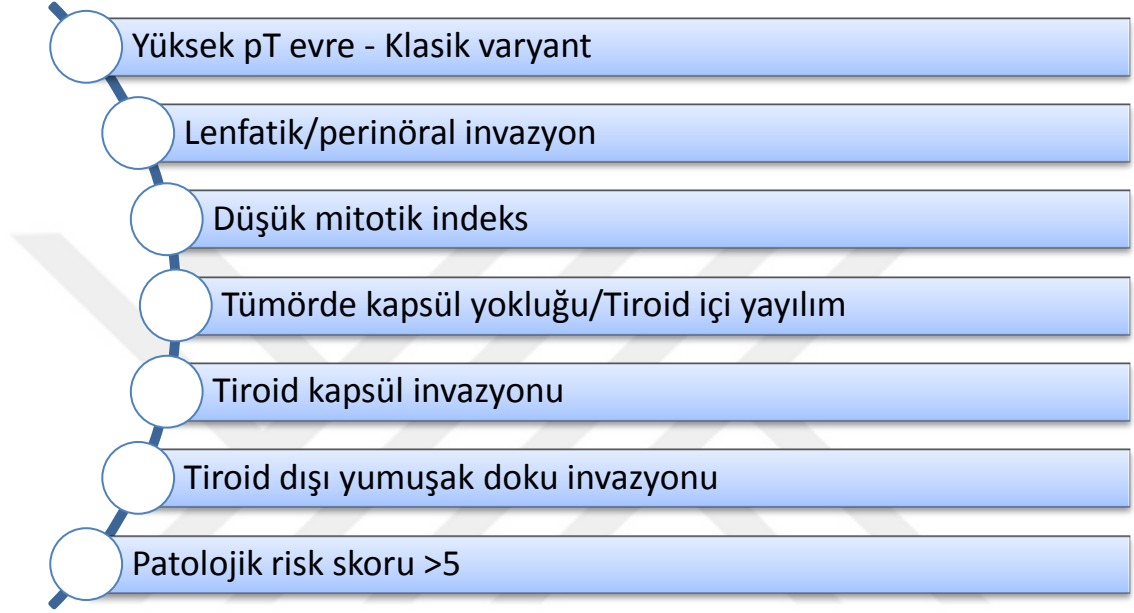
pT-BRAF: Primer tümörde BRAF v600E mutasyonu, pT-BRAF-%: Primer tümörde BRAF v600E mutasyonu görülen hücrelerin yüzdesi, LN-BRAF: Lenf nodu metastazında BRAF v600E mutasyonu, LN-BRAF-%: Lenf nodu metastazında BRAFv600E mutasyonu görülen hücrelerin yüzdesi

4.4.3. BRAF v600E mutasyonunun klinik ve patolojik prognostik parametrelerle ilişkisi

- BRAF v600E mutasyonu ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.237$).
- Olgular 45 yaş sınırına göre değerlendirildiğinde, BRAF v600E mutasyonu 45 yaş altı olgularda %29.6, 45 yaş ve üstü olgularda %33.9 oranında görülmüş olup; iki grup arasında anlamlı farklılık yoktur ($p=0.630$).
- BRAF v600E mutasyonu ile eş zamanlı lenf nodu metastazı varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.062$).
- BRAF v600E mutasyonu görülen olguların %50'si pT evre 3 olup; bu veri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.003$).
- BRAF v600E mutasyonu görülen olguların %79.4'ü klasik varyant olup; bu veri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.003$). Papiller mikrokarsinomların %17.6'sında, onkositik varyant olguların %2.9'unda BRAF v600E mutasyonu saptanmıştır. Foliküler varyant olgularda BRAF v600E mutasyonu saptanmamıştır.
- BRAF v600E mutasyonu ile nekroz varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.165$).
- Mitotik indeksi yüksek olgularda BRAF v600E mutasyonu oranı (%43.8), mitotik indeksi düşük olgulara (%20.6) göre daha düşüktür ($p=0.020$).
- BRAF v600E mutasyonu ile kalsifikasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.347$).
- BRAF v600E mutasyonu, lenfatik invazyon görülen olgularda (%47.1) görülmeyen olgulara (%23.3) kıyasla daha sıktır ($p=0.013$).
- BRAF v600E mutasyonu ile vasküler invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.247$).

- Perinöral invazyon görülen olgularda BRAF v600E mutasyonu oranı (%23.5), görülmeyen olgulara (%5.5) kıyasla daha yüksektir (p=0.006).
- Tümör kapsülü olmayan olgularda BRAF v600E mutasyonu oranı (%60.3), tümör kapsülü olan olgulara (%35.3) kıyasla daha yüksek olup; bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.016). Ancak tümör kapsülüne invazyon ile BRAF v600E mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır (p=0.086).
- Tiroid kapsül invazyonu gösteren olguların %76.5'inde, göstermeyen olguların ise %42.5'inde BRAF v600E mutasyonu saptanmıştır (p=0.001).
- Yumuşak doku invazyonu gösteren olguların %50'sinde, göstermeyen olguların ise %16.4'ünde BRAF v600E mutasyonu saptanmıştır (p=0.0001).
- BRAF v600E mutasyonu ile multisentrisite arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır (p=0.066).
- Tiroid içi yayılım gösteren olguların %82.4'ünde, göstermeyen olguların ise %32.9'unda BRAF v600E mutasyonu saptanmıştır (p=0.0001).
- BRAF v600E mutasyonu görülen olguların tümör dışı tiroid dokusunda %52.9 nodüler hiperplazi, %23.5 lenfositik tiroidit, %20.6 olağan bulgular izlenmiş olup; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.53).
- Patolojik risk skoru 5 puan sınırına göre ele alındığında; 5'ten yüksek puan alan olgularda BRAF v600E mutasyonu oranı %71 iken, 5 ve altı puan alan olgularda %22.1'dir. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.0001).
- BRAF v600E mutasyonu ile CK19, HBME-1, Galectin-3 immünoekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

- BRAF v600E mutasyonu ile Ki-67 proliferasyon indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.
- Çalışmamızda BRAF v600 mutasyonu ile ilişkili olarak belirlenen patolojik prognostik parametreler Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. BRAF v600E ile ilişkili patolojik prognostik parametreler

4.5. Prognoz

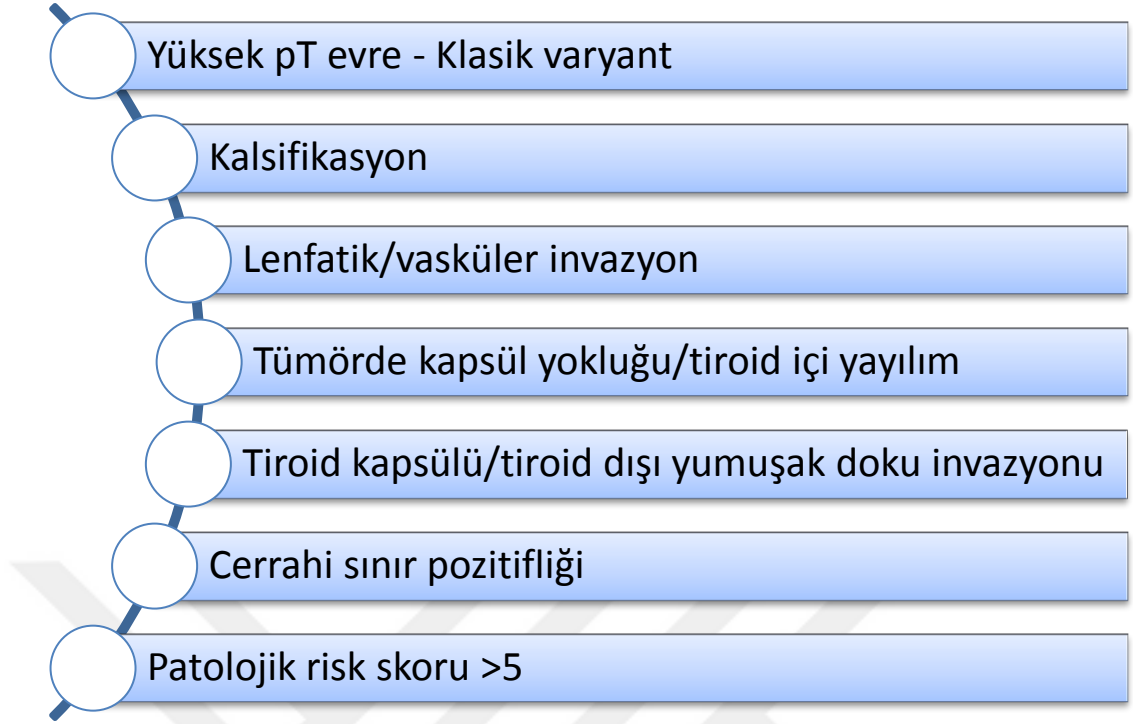
4.5.1. Demografik verilerin prognozla ilişkisi

- Kadın hastalarda kötü prognoz oranı (%9.1) erkek hastalara (%5) göre daha yüksektir. Ancak prognoz açısından cinsiyetler arasında anlamlı farklılık yoktur. (p=0.553)
- 45 yaş ve üzeri hastalarda kötü prognoz oranı (%10.9) 45 yaş altı hastalara göre daha yüksektir. Ancak prognoz açısından yaş grupları arasında anlamlı farklılık yoktur. (p=0.373)

4.5.2. Patolojik prognostik parametrelerin prognozla ilişkisi

- pT evre 3 olguların %46.7'si, pT evre 2 olguların %21.4'ü, pT evre 1 olguların ise %12.8'i kötü prognoz göstermiştir (p=0.005)
- Mikroskopik varyantlar arasında en yüksek kötü prognoz oranı klasik varyantta (%44.3) izlenmiştir (p=0.011).
- Tümör nekrozu görülen olguların tamamı iyi prognostik gruptadır. Ancak gruplar arasında nekroz açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.229).
- Mitotik indeksi düşük olgularda kötü prognoz oranı (%29.5) daha yüksektir. Ancak gruplar arasında mitoz açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır (0.274).
- Kalsifikasyon görülen olgularda kötü prognoz oranı (%37) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.017).
- Lenfatik invazyon görülen olgularda kötü prognoz oranı (%43.3) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.008).

- Vasküler invazyon görülen olgularda kötü prognoz oranı (%56) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0001$).
- Perinöral invazyon görülen olgularda kötü prognoz oranı (%45.5) daha yüksektir. Ancak gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p=0.113$).
- Tümör kapsülü olmayan olgularda kötü prognoz oranı (%39.1) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.004$). Tümör kapsülü olan olgularda, kapsül invazyonu gösteren ve göstermeyenler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p=0.535$).
- Tiroid kapsül invazyonu görülen olgularda kötü prognoz oranı (%42.3) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0001$).
- Yumuşak doku invazyonu görülen olgularda kötü prognoz oranı (%51.9) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0001$).
- Multisentrik olan ve olmayan olgular arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p=0.894$).
- Tiroid içi yayılım görülen olgularda kötü prognoz oranı (%40.4) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.001$).
- Cerrahi sınır pozitifliği olan olguların %50'si kötü prognostik seyir göstermiştir. Cerrahi sınırı negatif olan olgularda bu oran %17.8 olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.002$).
- Patolojik risk skoru 5'ten büyük olan olgularda, kötü prognozun daha sık olduğu (%47.4) görülmektedir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.016$).
- Çalışmamızda kötü prognoz ile ilişkilendirilen patolojik prognostik parametreler Şekil 5'te özetlenmiştir.



Şekil 5. Kötü prognozla ilişkili patolojik prognostik parametreler

4.5.3. Rutinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçlerin prognozla ilişkisi

- HBME-1 immünoekspresyonu gösteren olgularda kötü prognoz oranı (%28.7) daha yüksek olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.049$).
- CK19 ve Galectin-3 immünoekspresyonu ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- Ki-67 proliferasyon indeksi %5 ve üzerinde olan olgular, kötü prognostik grupta daha büyük paya sahiptir (%68). Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

4.5.4. BRAF v600E immünekspresyonunun prognozla ilişkisi

BRAF v600E nükleer ve sitoplazmik immünekspresyonu 3+ olarak değerlendirilen olgularda; lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak organ metastazı gibi kötü prognostik durumların daha sık olduğu (%33.4) izlenmiştir. Ancak BRAF v600E negatif olgularda da kötü prognoz oranı diğer gruba çok yakındır (%22.4). Diğer yönden bakıldığında, kötü prognostik grup içinde BRAF v600E negatif olguların oranı daha yüksektir (%60). BRAF v600E immünekspresyonu ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0.255$).

5. TARTIŞMA

Tiroid papiller karsinomu insidansı, SEER verilerine göre son 35 yılda 3 kat artmıştır. 1973 yılında 2.7/100000 olarak saptanan insidansın, 2008 yılında 11.2/100000'e ulaştığı bildirilmiştir¹. Bu artışın sebeplerinden biri de, radyolojik görüntüleme yöntemlerinin ve ince iğne aspirasyonu yönteminin yaygınlaşmasıdır. İnsidans artışının yaklaşık %50'sinin, papiller mikrokarsinom insidansı artışına bağlı olduğu, yeni tanıların %40 kadarını mikrokarsinomların oluşturduğu belirtilmektedir⁵⁴.

Papiller karsinom insidansı cinsiyete ve yaşa göre değişkenlik göstermektedir. A.B.D.'de, 1973-2003 yılları arasında papiller karsinom insidansı kadınlarda 11.5/100000, erkeklerde 4.8/100000, kadın/erkek oranı 2.4 olarak hesaplanmıştır¹. Papiller karsinom tanısı alan hastaların yaş ortalaması da geçen 3 dekat içinde artış göstermektedir. Hastaların yaş ortalaması 1975 yılında 37.8, 1985 yılında 41.6, 1995 yılında 43.7, 2005 yılında ise 46.8 olarak belirlenmiştir¹. Çalışmamızda papiller karsinom olgularının 24'ü erkek, 83'ü kadın, kadın/erkek oranı 3.4'tür. Hastaların yaş ortalaması 43.91 olarak hesaplanmış olup, bu veriler literatürle uyumludur.

5.1. Mikroskopik Varyantlar

Lam ve arkadaşlarının yayınladığı 1035 olgudan oluşan seride⁵⁵, olguların %46'sı klasik varyant, %27.8'i mikrokarsinom, %17.6'sı foliküler varyant, %1'den azı ise onkositik varyant tümörlerden oluşmaktadır. Nikiforov ve arkadaşlarının yayınında ise, mikrokarsinom oranı yaklaşık %40, foliküler varyant %20-30, tall cell varyant %5-10, solid varyant %1-3, diffüz sklerozan varyant %1-2, onkositik varyant da dahil olmak üzere diğerleri %1'in altında olarak belirtilmiştir⁶. 2011-2015 yılları arasını kapsayan serimizde ise;

olguların %45'i klasik varyant, %23'ü foliküler varyant, %22'si mikrokarsinom, %10'u onkositik varyant tümörler oluşturmaktadır. Serimizdeki onkositik varyant oranı literatürde önde gelen derlemelere göre yüksek olmakla birlikte; onkositik varyantı %1-11 arasında içeren yayınlar mevcuttur^{56, 57}.

Çalışmamızdaki olguların patolojik prognostik parametreler açısından değerlendirilmesinde; vasküler invazyon ($p=0.041$), tiroid kapsül invazyonu ($p=0.002$), tiroid çevresi yumuşak doku invazyonu ($p=0.0001$) ve tiroid içi yayılım ($p=0.0001$) en çok klasik varyant olgularda izlenmiştir. Bunların arasından vasküler invazyon, foliküler varyant tümörlerde daha çok görülen bir parametre olarak belirtilmekle²⁴ birlikte; vasküler invazyon için kullanılan kriterler çalışmalarda farklılık göstermektedir. Bir çok merkezde, lenfatik ve vasküler invazyon "lenfovasküler invazyon" adı altında birleştirilerek birlikte değerlendirilmektedir. Literatürdeki bir çok çalışmada^{24, 58}, vasküler invazyonun bağımsız bir kötü prognostik kriter olduğu, lenfatik invazyondan ayrı olarak değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır.

İngilizce literatürde onkositik varyant ile tümör nekrozu ve multisentrisite arasında ilişki gösteren yayına rastlanmamış olmakla birlikte; bizim çalışmamızda tümör nekrozu ($p=0.002$) ve multisentrisite ($p=0.291$) onkositik varyant olgularda daha yüksek oranda izlenmiş, bunlardan tümör nekrozu ile onkositik varyant arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik saptanmıştır. İyi diferansiye tiroid karsinomlarında tümör nekrozu nadir bir morfolojik bulgu olup⁵⁹; bir kısmı ince iğne aspirasyon biyopsi işlemi ile ilişkilendirilmektedir⁶⁰.

Tümör kapsülü varlığı; serimizdeki olgular içinde en çok foliküler varyantta (%92) izlenmiştir. Foliküler varyantta ve mikrokarsinomlarda tümör enkapsülasyonu sıklıkla görülen bir bulgu olup⁶; bu açıdan mikroskopik varyantlar arasında farklılık bildirilmemiştir.

Çalışmamızda; mikroskopik varyantlar arasında, mitotik aktivite ve kalsifikasyon açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

5.2. İmmünohistokimyasal Belirteçler

5.2.1. Rutinde kullanılan immünohistokimyasal belirteçler

Rutin olarak kullandığımız belirteçlerden HBME-1 immünoekspresyonu en çok mikrokarsinomlarda (%100) ve klasik varyantta (%91.7) saptanmıştır (p=0.001). HBME-1 immünoekspresyonu, foliküler varyantta daha az olmakla birlikte, papiller karsinom olgularında sıklıkla görülmektedir^{6, 30}.

Galectin-3 immünoekspresyonunun foliküler varyantta (%76) diğer varyantlara göre azaldığı izlenmiştir (p=0.0001). Galectin-3 immünoekspresyonu, foliküler varyantta daha az olmakla birlikte, papiller karsinom olgularının tamamına yakınında görülmektedir^{6, 30}.

Çalışmamızda, mikroskopik varyantlar arasında CK19 immünoekspresyonu ile Ki-67 proliferasyon indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Kjellman ve arkadaşlarının MIB-1 klonunu kullanarak yaptığı çalışmada, Ki-67 indeksinin tipik olarak %5'ten az (ortalama %1.9) olduğu belirtilmiştir³¹. Bölümümüzde Ki-67 immünohistokimyası için SP6 klonu kullanılmakla birlikte; olgularımızın %80.4'ü %5'ten daha düşük (ortalama %2.5) proliferasyon indeksi göstermiştir.

5.2.2 BRAF v600E immünoekspresyonu

BRAF v600E immünohistokimyasını değerlendiren çalışmalarda, bizim de çalışmamızda kullandığımız VE1 klonu kullanılmıştır. Bu çalışmalara değinmek gerekirse; Qiu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁶¹ BRAF v600E

immünekspresyonu, boyanma yüzdesi ve şiddeti gözetilmeksizin, negatif/pozitif olarak değerlendirilmiş; immünhistokimya yöntemi rt-PCR ve Sanger sekanslama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Jung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁶² BRAF v600E immünekspresyonu, boyanma yüzdesi gözetilmeksizin, negatif/pozitif olarak değerlendirilmiş; immünhistokimya yöntemi rt-PCR ve BRAF RNA in situ hibridizasyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Zagzag ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁶³, 3+ şiddette BRAF v600E immünekspresyonu, boyanma yüzdesi gözetilmeksizin pozitif kabul edilmiş; immünhistokimya yöntemi direkt sekanslama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ilie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁶⁴, tümör hücrelerinin %100'ünde 3+ şiddette BRAF v600E immünekspresyonu pozitif kabul edilmiş; immünhistokimya yöntemi direkt sekanslama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Özetle; literatürde BRAF v600E immünhistokimyasını moleküler yöntemlerle karşılaştıran çalışmalarda; immünhistokimya yönteminin sensitivitesi %89-100 arasında, spesifitesi ise %61-100 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda, boyanma yüzdesi gözetilmeksizin, 3+ şiddette BRAF v600E immünekspresyonu pozitif kabul edilmiş; immünhistokimya yöntemi rt-PCR sonuçları ile karşılaştırılmış; BRAF v600E immünhistokimyasının sensitivitesi %90.9, spesifitesi %88.8 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan rt-PCR sistemi, BRAF v600E dışında; v600D ve v600K mutasyonlarını tespit edebilmekte, mutasyon tipini ayırt etmeksizin kalitatif sonuç vermektedir. Serimizde immünhistokimyasal olarak BRAF v600E negatif iken rt-PCR ile BRAF mutasyonu saptanan 2 olguda; saptanan mutasyonun v600D veya v600K mutasyonu olabileceği göz önüne düşünülmüştür.

Papiller karsinom olgularımızda, 3+ nükleer ve sitoplazmik immünekspresyonu baz alarak yaptığımız değerlendirmede, BRAF v600E oranı %31.8'dir. Mikroskopik varyantlar ayrı ayrı ele alındığında; klasik varyantta %59.5, onkositik varyantta %9, mikrokarsinomlarda %26 oranında mutasyon görülmüştür. Foliküler varyant olgularda, adenom olgularında ve

normal tiroid örneklerinde mutasyon saptanmamıştır. Literatürde, BRAF v600E mutasyonu daha çok klasik varyant, tall cell varyant ve papiller karsinom zemininden gelişen az diferansiye/anaplastik karsinomlarda bildirilmiş⁶⁵ olup; farklı serilerde mutasyon oranı %35-%70 arasında değişmektedir. Bu geniş aralık, olasılıkla farklı serilerde farklı varyantların değişken oranlarına bağlıdır. Foliküler varyant olgularda BRAF v600E mutasyonu daha düşük oranda görülmektedir⁶⁶.

İnatümöral heterojenite, klinikopatolojik öneminin yanısıra, patogenezi açıklama konusunda da önemli bir kavramdır. BRAF v600E mutasyonu gösteren malign melanom, kolorektal adenokarsinom gibi tümörlerde olduğu gibi, papiller karsinomlarda da BRAFv600E mutasyonuna sahip hücrelerin heterojen dağıldığı güncel yayınlarda belirtilmektedir. Guerra ve ark.'nın yayınında⁶⁷, olguların bir kısmında primer tümörde BRAF v600E mutasyonu saptanmamasına rağmen, aynı olguların lenf nodu metastalında mutasyon saptanmıştır. BRAF v600E mutasyonunun subklonal bir alterasyon olduğu ve halihazırda başka genetik yolaklar ile gelişmiş papiller karsinomlarda de novo ortaya çıkabileceği savunulmuştur. de Biase ve ark.'nın yayınında⁶⁶ ise; küçük çaplı tümörlerde BRAF v600E mutasyonuna sahip hücrelerin oranı daha düşük iken, tümör çapı arttıkça mutasyona sahip hücre oranının arttığı, bu nedenle BRAF v600E mutasyonunun erken dönem genetik alterasyon olduğu öne sürülmüştür. İnatümöral heterojenite açısından aynı olgunun farklı tümör alanlarını, primer tümör ile aynı olgunun lenf nodu metastazını, primer tümör ile daha sonra gelişen nüks materyalini karşılaştıran Walts ve ark.'nın çalışmasında⁶⁸; primer tümör ile lenf nodu metastazı arasında %100 uyum, farklı iki tümör odağı arasında %92.3 uyum saptanmıştır. 2 olguda primer tümörün BRAF v600E mutant olduğu, ancak daha sonra gelişen nüks tümörde BRAF v600E mutasyonu görülmediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da; primer tümörde BRAF v600E mutant hücrelerin %80-90 oranında, yaygın dağılım gösterdiği izlenmiştir. Aynı olgulara ait lenf nodu metastazlarında ise, 2 olguda mutasyon izlenmezken; 2

olguda da primer tümörden daha düşük oranda mutant hücre izlenmiştir. Mutasyon içeren ve içermeyen subklonların varlığı; bu klonların farklı mutasyonlar içerebileceğini ve mutasyon spesifik tedavilere farklı yanıt verebileceğini düşündürmektedir. Bu açıdan, mevcut ise hastaya ait primer tümörün yanısıra lenf nodu metastazı, uzak metastaz veya nüks materyalinde de mutasyon analizinin kantitatif yöntemlerle araştırılması önerilebilir.

Çalışmamızda, BRAF v600E mutasyonu ile hastaların cinsiyeti ve yaşları arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Hasta yaşları 45'in altı – 45 ve üstü olarak iki ayrı grup halinde incelenmiştir. 67 ayrı çalışmayı değerlendiren güncel bir meta-analizde⁶⁹, cinsiyet bilgilerine ulaşılan 9704 hastayı içeren seride, cinsiyet ile BRAF v600E mutasyonu arasında ilişki bulunmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, yaş bilgilerine ulaşılabilen 5475 hastayı içeren örnekleme, mutasyonun görüldüğü olgularda yaş ortalamasının daha yüksek olduğu belirtilmiş, ancak yaş ortalamaları ile ilgili detay verilmemiştir. Shin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁷⁰ da, hasta yaşı ve BRAF v600E mutasyonu arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir.

Patolojik prognostik parametreler arasından yüksek pT evresi, lenfatik invazyon varlığı, perinöral invazyon, tümörde kapsül yokluğu, tiroid kapsül invazyonu, tiroid dışı yumuşak doku invazyonu, tiroid içi yayılım ile BRAF v600E mutasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Tarafımızca önerilen ve tüm bu parametreleri topluca skorlayan "Patolojik risk skoru" da BRAF v600E mutasyonu ile ilişkilidir. Bu skora göre 5'ten yüksek puan alan olgular arasında BRAF v600E mutasyonu sıklığı daha yüksektir.

Mitotik indeksi düşük olgularda BRAF v600E mutasyonu oranının daha yüksek olması, dikkat çekici bir bulgudur. Benzer şekilde, Ki-67 ile belirlenen proliferasyon indeksi %5'ten daha düşük olgularda, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, BRAF v600E mutasyonu daha sıktır. BRAF v600E mutasyonu ile mitotik indeksin ve Ki-67 proliferasyon indeksinin ilişkisini

araştıran bir yayın bulunmamaktadır. Ancak iyi diferansiye tiroid karsinomlarında, Ki-67 proliferasyon indeksi ve mitotik indeksin diğer neoplazilere göre çok daha düşük olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda olguların %36.4'ünde artmış mitotik indeks, %19.6'sında %5'in üzerinde Ki-67 proliferasyon indeksi tespit edilmiştir. Olgular arasındaki en yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi %15'tir. Ayrıca, artmış mitotik indeks ve %5'in üzerindeki Ki-67 proliferasyon indeksi ile patolojik prognostik parametreler veya lenf nou metastazı, lokal nüks, uzak metastaz olarak belirlenen kötü prognoz arasında anlamlı ilişki yoktur.

BRAF v600E mutasyonu ile anlamlı ilişkisini saptamadığımız parametreler ise; nekroz, kalsifikasyon, vasküler invazyon, tümör kapsülü invazyonu ve multisentrisite olarak sıralanmaktadır.

Önceki çalışmalarda, farklı histolojik bulguların ve bunların farklı kombinasyonlarının, BRAF v600E mutasyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (Tablo 14). Bunlar arasında dikkati çeken, tiroid dışı yumuşak doku invazyonunun literatürün büyük bölümünde ortak payda oluşudur. Virk ve ark.¹², Nam ve ark.⁷¹ ve Howell ve ark.⁷²'nin yayınlarında tiroid dışı yumuşak doku invazyonunun BRAF v600E mutasyonu ile ilişkisi vurgulanmıştır. Lokal agresif davranışın en somut göstergelerinden biri olan tiroid dışı yumuşak doku invazyonu, bizim çalışmamızda da BRAF v600E mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur.

Tablo 13. Literatürde BRAF v600E mutasyonu ile ilişkilendirilen klinik ve morfolojik parametreler

	Virk	Xing	Elisei	Pelttari	Kim	Lupi	Basolo	Nam	Howell	Namba	Wang
Genç hasta							♣				
Yaşlı hasta											♣
Erkek cinsiyet					♣						
Yüksek pT evre		♣			♣	♣	♣		♣	♣	♣
Multisentrisite			♣			♣	♣	♣			♣
Tiroid içi yayılım	♣		♣				♣				
Psammom cisimleri	♣										
Tiroid dışı yumuşak doku invazyonu		♣				♣	♣	♣	♣		♣
Lenf nodu metastazı		♣				♣	♣		♣		♣
Rekürrens		♣	♣		♣						
Uzak metastaz										♣	

Guerra ve ark.'nın yaptığı çalışmada⁷³, BRAF v600E mutasyonu görülen olgularda CK19 immünekspresyonunun daha sık olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, BRAF v600E mutasyonu ve Galectin-3 immünekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Literatürde BRAF v600E mutasyonunun HBME-1 immünekspresyonu ile ilişkisini değerlendiren bir yayın bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda, BRAF v600E mutasyonu ile; rutin pratikte kullandığımız CK19, Galectin-3 ve HBME-1 belirteçlerinin immünekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

5.2.3. h-TERT immünhistokimyası

Çalışmamızda h-TERT immünhistokimyası için Y182 kodlu, tavşanda üretilmiş, İmmünglobulin G formundaki monoklonal antikor kullanılmıştır. Üretici firma envanterinde; reaksiyonun esas yerleşim yerinin nükleus ve nükleolus olduğu; ancak hücrenin içinde bulunduğu siklus evresi, fosforilasyon durumu, DNA hasarı, oksidatif stres gibi faktörlere bağlı olarak, antikorun bağlandığı subünitin sitoplazmaya çıkabileceği ve bu sebeple sitoplazmik boyanmanın nükleer boyanmaya eşlik edebileceği belirtilmiştir. Literatürde, h-TERT antikorunun klonuna göre farklı değerlendirmeler yapan yayınlara bakıldığı zaman; Y182 klonunu kullanan çalışmaların⁵¹⁻⁵³, nükleer+sitoplazmik boyanmayı spesifik kabul ettiği, bir diğer h-TERT antikoru olan 44F12 klonunu kullanan iki çalışmanın^{48, 49} nükleer boyanma, yine 44F12 klonunu kullanan başka bir çalışmanın⁵⁰ ise nükleer veya nükleer+sitoplazmik boyanmayı spesifik kabul ettiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda Y182 klonu ile olgularda değişken oranlarda nükleer ve sitoplazmik boyanma görülmüş olup, normal tiroid örneklerinde ve adenom olgularında daha çok boyanma görülürken; papiller karsinom olgularında boyanma oranı çok daha düşüktür. Bu durum, normal dokudan maligniteye doğru ilerledikçe telomeraz aktivitesinin artacağı ve dolayısıyla h-TERT immünekspresyonunun daha sık görüleceği gerçeğiyle bağdaşmamıştır. Bu nedenle Y182 klonu ile elde edilen boyanma non-spesifik olarak kabul edilip; değerlendirme dışı bırakılmıştır.

5.3. Prognoz

Klinik takibine ulaşılabilen ve takip süresi ortalama 25.3 ay olarak hesaplanan 97 adet papiller karsinom olgusu içinde; hastalık nedeniyle ölüm izlenmemiş ve bu sebeple sağkalım analizi yapılamamıştır. Bu olgular; lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz gibi agresif davranış sergileme durumuna göre, “iyi prognozlu” ve “kötü prognozlu” olarak 2 gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Yaş ve cinsiyet gibi demografik veriler ile prognoz arasında ilişki saptanmamıştır. Howell ve ark.³⁶, BRAF v600E mutasyonu ve ileri yaşın (≥ 65) birlikte rekürrensi öngördüğünü bildirmiştir. Suman ve ark.⁷⁴ ise, ≤ 45 yaşın santral lenf nodu metastazı ile ilişkisini ortaya koymuştur. Görüldüğü üzere, demografik özelliklerin prognoz üzerindeki etkileri farklı çalışmalarda değerkenlik göstermektedir.

Çalışmamızda; lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz olarak tanımlanan kötü prognoz ile yüksek pT evresi ve klasik papiller morfoloji arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Patolojik prognostik parametreler arasından; kalsifikasyon, lenfatik invazyon, vasküler invazyon, tümörde kapsül yokluğu, tiroid kapsülü invazyonu, tiroid dışı yumuşak doku invazyonu, tiroid içi yayılım ve cerrahi sınır pozitifliği ile kötü prognoz arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Prognostik risk değerlendirmesi için önerdiğimiz patolojik risk skorunun 5’ten büyük olması da kötü prognozla ilişkilidir.

Rutinde kullandığımız immünohistokimyasal belirteçler arasından HBME-1’in ekspresyon kaybının, kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Rossi ve ark.’nın yayınında da⁷⁵, az diferansiye ve anaplastik tiroid karsinomlarında HBME-1 immünoekspresyon kaybının kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmektedir.

BRAF v600E mutasyonu ile kötü prognoz arasında ilişki olduğunu bildiren yayınlar, Wang ve ark.'nın 14 ayrı çalışmayı irdelediği meta-analiz⁶⁹ ile özetlenebilir. Ancak BRAF v600E mutasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olmadığını vurgulayan yayınlar da zaman içinde öne çıkmaya başlamıştır. Pelttari ve ark.⁷⁶, uzun takip süresi ile BRAF v600E mutasyonunun lenf nodu metastazı veya rekürrens ile ilişkili olmadığını belirtmektedir. Benzer şekilde Zheng ve ark.⁷⁷, mikrokarsinomlarda BRAF v600E mutasyonunun rekürrens ile ilişkili olmadığını; Nam ve ark.,⁷¹ BRAF v600E mutasyonunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olmadığını vurgulamaktadır. Bu çalışmalarda BRAF v600E mutasyonu ile kötü prognozla ilişkisi saptanmamasına rağmen, tiroid kapsül invazyonu ve tiroid dışı yumuşak doku invazyonu gibi kötü patolojik prognostik parametreler ile ilişki dikkati çekmektedir. Shin ve ark.'nın yayınında⁷⁰ da belirtildiği gibi; BRAF v600E mutasyonu kötü prognozla değil, kötü prognoza yol açabilecek tiroid dışı yumuşak doku invazyonu gibi morfolojik bulgular ile ilişkili görünmektedir.

Bizim çalışmamızda da, BRAF v600E immünekspresyonu ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Kötü prognoz olarak değerlendirdiğimiz lenf nodu metastazı, nüks ve uzak metastaz ayrı ayrı ele alındığında veya histolojik varyantlar ayrı ayrı ele alındığında da BRAF v600E mutasyonu ile ilişki saptanmamıştır. Kötü prognostik grupta bulunan olguların %60'ı BRAF v600E negatif iken, %40'ı BRAF v600E pozitifdir. Diğer yönden bakıldığında ise; BRAF v600E pozitif olgularda %33, BRAF v600E negatif olgularda %22.4 oranında kötü prognoz izlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları ile; papiller tiroid karsinomu olgularının prognozunu öngörmeye, morfolojik bulguların BRAF v600E mutasyonuna göre daha başarılı olduğu söylenebilir. Prognoz konusunda farklı serilerde farklı parametrelerin öne çıktığı literatürle birlikte değerlendirmek gerekirse; demografik özellikler, morfoloji ve genetik alterasyonların prognoz açısından birlikte değerlendirilmesi daha akılcı durmaktadır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada;

- ❖ VE1 klonu ile uygulanan immünohistokimya yönteminin, BRAF v600E mutasyonu tespitinde güvenilir bir yöntem olduğu görülmüştür.
- ❖ Olgu serimiz, iyi diferansiye papiller tiroid karsinomlarını yansıtır nitelikte, yeterli bir örneklemdir. Olgularımızda BRAF v600E mutasyonu oranı, literatürde belirtilen aralıklardadır.
- ❖ BRAF v600E mutasyonu ile; yüksek pT evresi, lenfatik invazyon, tiroid dışı yumuşak doku invazyonu gibi kötü morfolojik prognostik faktörler arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Ancak, lenf nodu metastazı, lokal nüks ve uzak metastaz gibi kötü prognostik durumlar ile anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- ❖ h-TERT immünohistokimyasında ortaya çıkan non-spesifik boyanma nedeniyle olgular telomeraz aktivasyonu yönünden değerlendirilememiştir.
- ❖ İyi diferansiye papiller tiroid karsinomlarında prognostik değerlendirme için morfolojik bulgular, BRAF v600E mutasyonuna göre daha değerli görünmektedir. Ancak, tedavi alternatifi gerektiren durumlarda, BRAF v600E mutasyonunun hem ilk tümör örneğinde; hem de daha sonra gelişen nüks ve/veya metastaz materyalinde kantitatif yöntemlerle araştırılması önerilebilir. Ayrıca, yeterli hücre bloğu elde edilmesi halinde, ince iğne aspirasyon materyalinde BRAF v600E mutasyonu analizi, uygulanacak cerrahi tekniğin kararlaştırılmasına katkıda bulunabilir.

7. REFERANSLAR

- [1] Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK: Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The oncologist* 2007, 12:20-37.
- [2] Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM: Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocrine pathology* 2007, 18:1-7.
- [3] Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, *The developing human: clinically oriented embryology*, 7th edition, Ed: Persaud TVN. pp. 168-172. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2003.
- [4] Mills SE, *Histology for pathologists*, 3rd edition. Ed: Mills SE. pp. 1185-1209. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2007.
- [5] Guyton AC, Hall JE. *Medical Physiology*, 12th edition, Ed: Guyton AC. pp. 858-869. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2010.
- [6] Nikiforov Y, Biddinger PW, Thompson LDR. *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*, 2nd edition. Ed: Nikiforov Y. pp.183-247. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2012.
- [7] Smith DL, Lamy A, Beaudenon-Huibregtse S, Sesboue R, Laosinchai-Wolf W, Sabourin JC, Labourier E: A multiplex technology platform for the rapid analysis of clinically actionable genetic alterations and validation for BRAF p.V600E detection in 1549 cytologic and histologic specimens. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2014, 138:371-8.
- [8] Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, Elisei R, Bendlova B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Clifton-Bligh R, Tallini G, Holt EH, Sykorova V: Association between BRAF V600E mutation

and recurrence of papillary thyroid cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015, 33:42-50.

[9] Niederer-Wust SM, Jochum W, Forbs D, Brandle M, Bilz S, Clerici T, Oettli R, Muller J, Haile SR, Ess S, Stoeckli SJ, Broglie MA: Impact of clinical risk scores and BRAF V600E mutation status on outcome in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2015, 157:119-25.

[10] Li F, Chen G, Sheng C, Gusdon AM, Huang Y, Lv Z, Xu H, Xing M, Qu S: BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *Endocrine-related cancer* 2015, 22:159-68.

[11] Dvorak K, Aggeler B, Palting J, McKelvie P, Ruskiewicz A, Waring P: Immunohistochemistry with the anti-BRAF V600E (VE1) antibody: impact of pre-analytical conditions and concordance with DNA sequencing in colorectal and papillary thyroid carcinoma. *Pathology* 2014, 46:509-17.

[12] Virk RK, Theoharis CG, Prasad A, Chhieng D, Prasad ML: Morphology predicts BRAF (V(6)(0)(0)E) mutation in papillary thyroid carcinoma: an interobserver reproducibility study. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2014, 464:435-42.

[13] Gonzalez-Suarez E, Flores JM, Blasco MA: Cooperation between p53 mutation and high telomerase transgenic expression in spontaneous cancer development. *Molecular and cellular biology* 2002, 22:7291-301.

[14] Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M, Lima J, Maximo V, Soares P: Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature communications* 2013, 4:2185.

[15] Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, Celestino R, Almeida A, Salgado C, Eloy C, Castro P, Prazeres H, Lima J, Amaro T, Lobo C, Martins MJ, Moura M, Cavaco B, Leite V, Cameselle-Teijeiro JM, Carrilho F, Carvalheiro M, Maximo V, Sobrinho-Simoes M, Soares P: TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in

differentiated thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2014, 99:E754-65.

[16] Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimspasic T, Ghossein RA, Fagin JA: Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013, 98:E1562-6.

[17] Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, Pai S, Bishop J: BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014, 32:2718-26.

[18] Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, Murugan AK, Guan H, Yu H, Wang Y, Sun H, Shan Z, Teng W, Xing M: TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2014, 99:E1130-6.

[19] Liao ZL, Tang XD, Lu MH, Wu YY, Cao YL, Fang DC, Yang SM, Guo H: Antitumor effect of new multiple antigen peptide based on HLA-A0201-restricted CTL epitopes of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Cancer science* 2012, 103:1920-8.

[20] Dosset M, Vauchy C, Beziaud L, Adotevi O, Godet Y: Universal tumor-reactive helper peptides from telomerase as new tools for anticancer vaccination. *Oncoimmunology* 2013, 2:e23430.

[21] Shaha AR, Shah JP, Loree TR: Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Annals of surgical oncology* 1996, 3:534-8.

[22] Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS: Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993, 114:1050-7; discussion 7-8.

- [23] Salvesen H, Njolstad PR, Akslen LA, Albrektsen G, Soreide O, Varhaug JE: Papillary thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors including an evaluation of the p-TNM staging system. *The European journal of surgery = Acta chirurgica* 1992, 158:583-9.
- [24] Falvo L, Catania A, D'Andrea V, Marzullo A, Giustiniani MC, De Antoni E: Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgery* 2005, 241:640-6.
- [25] Gardner RE, Tuttle RM, Burman KD, Haddady S, Truman C, Sparling YH, Wartofsky L, Sessions RB, Ringel MD: Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 2000, 126:309-12.
- [26] Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE: Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *American journal of clinical pathology* 2003, 120:71-7.
- [27] Akslen LA, LiVolsi VA: Prognostic significance of histologic grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2000, 88:1902-8.
- [28] Asioli S, Erickson LA, Righi A, Jin L, Volante M, Jenkins S, Papotti M, Bussolati G, Lloyd RV: Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: validation of the Turin proposal and analysis of IMP3 expression. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2010, 23:1269-78.
- [29] Sahoo S, Hoda SA, Rosai J, DeLellis RA: Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution. *American journal of clinical pathology* 2001, 116:696-702.
- [30] Casey MB, Lohse CM, Lloyd RV: Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3, and HBME-1. *Endocrine pathology* 2003, 14:55-60.

- [31] Kjellman P, Wallin G, Hoog A, Auer G, Larsson C, Zedenius J: MIB-1 index in thyroid tumors: a predictor of the clinical course in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2003, 13:371-80.
- [32] Asioli S, Bussolati G: Emerin immunohistochemistry reveals diagnostic features of nuclear membrane arrangement in thyroid lesions. *Histopathology* 2009, 54:571-9.
- [33] Coban I, Cakir A, Unal TD, Bassullu N, Karpuz V, Dogusoy GB, Alper M: Emerin expression in well differentiated epithelial lesions of thyroid: implications in papillary thyroid carcinoma diagnosis and predicting malignant behavior. *Pathology oncology research : POR* 2015, 21:357-66.
- [34] Bizzarro T, Martini M, Marrocco C, D'Amato D, Traini E, Lombardi CP, Pontecorvi A, Fadda G, Larocca LM, Rossi ED: The Role of CD56 in Thyroid Fine Needle Aspiration Cytology: A Pilot Study Performed on Liquid Based Cytology. *PloS one* 2015, 10:e0132939.
- [35] Dunderovic D, Lipkovski JM, Boricic I, Soldatovic I, Bozic V, Cvejic D, Tatic S: Defining the value of CD56, CK19, Galectin 3 and HBME-1 in diagnosis of follicular cell derived lesions of thyroid with systematic review of literature. *Diagnostic pathology* 2015, 10:196.
- [36] Howell GM, Carty SE, Armstrong MJ, Lebeau SO, Hodak SP, Coyne C, Stang MT, McCoy KL, Nikiforova MN, Nikiforov YE, Yip L: Both BRAF V600E mutation and older age (≥ 65 years) are associated with recurrent papillary thyroid cancer. *Annals of surgical oncology* 2011, 18:3566-71.
- [37] Niemeier LA, Kuffner Akatsu H, Song C, Carty SE, Hodak SP, Yip L, Ferris RL, Tseng GC, Seethala RR, Lebeau SO, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforov YE: A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma. *Cancer* 2012, 118:2069-77.
- [38] Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, Basolo F, Miccoli P, Pacini F, Pinchera A, Elisei R: BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both

thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocrine-related cancer* 2008, 15:511-20.

[39] Espadinha C, Santos JR, Sobrinho LG, Bugalho MJ: Expression of iodine metabolism genes in human thyroid tissues: evidence for age and BRAFV600E mutation dependency. *Clinical endocrinology* 2009, 70:629-35.

[40] Sherman SI: Cytotoxic chemotherapy for differentiated thyroid carcinoma. *Clinical oncology* 2010, 22:464-8.

[41] White PT, Cohen MS: The discovery and development of sorafenib for the treatment of thyroid cancer. *Expert opinion on drug discovery* 2015, 10:427-39.

[42] McFarland DC, Misiukiewicz KJ: Sorafenib in radioactive iodine-refractory well-differentiated metastatic thyroid cancer. *OncoTargets and therapy* 2014, 7:1291-9.

[43] Scott LJ: Lenvatinib: first global approval. *Drugs* 2015, 75:553-60.

[44] Hegazi M, Azadi A, Jain D, Redman R, Perez CA: Pharmacological and clinical profile of lenvatinib (E-7080) in the treatment of advanced, radioiodine-refractory, differentiated thyroid cancer. *Drugs of today* 2015, 51:689-94.

[45] Angell TE, Lechner MG, Jang JK, LoPresti JS, Epstein AL: MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014, 20:6034-44.

[46] Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, Pentlow KS, Zanzonico PB, Haque S, Gavane S, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Dominguez JM, Shen R, Tuttle RM, Larson SM, Fagin JA: Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *The New England journal of medicine* 2013, 368:623-32.

[47] Pyo JS, Sohn JH, Kang G: BRAF Immunohistochemistry Using Clone VE1 is Strongly Concordant with BRAF(V600E) Mutation Test in Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocrine pathology* 2015, 26:211-7.

- [48] Osawa N, Onoda N, Kawajiri H, Tezuka K, Takashima T, Ishikawa T, Miyauchi A, Hirokawa M, Wakasa K, Hirakawa K: Diagnosis of parathyroid carcinoma using immunohistochemical staining against hTERT. *International journal of molecular medicine* 2009, 24:733-41.
- [49] Yang CH, Hung WC, Wang SL, Kang WY, Chen WT, Huang YC, Su YC, Chai CY: Immunoexpression and prognostic role of hTERT and cyclin D1 in urothelial carcinoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2008, 116:309-16.
- [50] Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG: Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Brazilian oral research* 2011, 25:34-41.
- [51] Simsek BC, Turk BA, Ozen F, Tuzcu M, Kanter M: Investigation of telomerase activity and apoptosis on invasive ductal carcinoma of the breast using immunohistochemical and Western blot methods. *European review for medical and pharmacological sciences* 2015, 19:3089-99.
- [52] Liang H, Zhong Y, Luo Z, Huang Y, Lin H, Zhan S, Xie K, Li QQ: Diagnostic value of 16 cellular tumor markers for metastatic thyroid cancer: an immunohistochemical study. *Anticancer research* 2011, 31:3433-40.
- [53] Simsek BC, Pehlivan S, Karaoglu A: Human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal tumors: correlations with immunohistochemical expression and clinicopathologic features. *Annals of diagnostic pathology* 2010, 14:413-7.
- [54] Burgess JR, Tucker P: Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2006, 16:47-53.
- [55] Lam AK, Lo CY, Lam KS: Papillary carcinoma of thyroid: A 30-yr clinicopathological review of the histological variants. *Endocrine pathology* 2005, 16:323-30.

- [56] Herrera MF, Hay ID, Wu PS, Goellner JR, Ryan JJ, Ebersold JR, Bergstralh EJ, Grant CS: Hurthle cell (oxyphilic) papillary thyroid carcinoma: a variant with more aggressive biologic behavior. *World journal of surgery* 1992, 16:669-74; discussion 774-5.
- [57] Woolner LB, Beahrs OH, Black BM, Mc CW, Keating FR, Jr.: Classification and prognosis of thyroid carcinoma. A study of 885 cases observed in a thirty year period. *American journal of surgery* 1961, 102:354-87.
- [58] Mete O, Asa SL: Pathological definition and clinical significance of vascular invasion in thyroid carcinomas of follicular epithelial derivation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011, 24:1545-52.
- [59] Calangiu C, Simionescu C, Stepan A, Parnov M, Cercelaru L: The assessment of prognostic histopathological parameters depending on histological patterns of papillary thyroid carcinoma. *Current health sciences journal* 2014, 40:37-41.
- [60] Liu YF, Ahmed S, Bhuta S, Sercarz JA: Infarction of papillary thyroid carcinoma after fine-needle aspiration: case series and review of literature. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery* 2014, 140:52-7.
- [61] Qiu T, Lu H, Guo L, Huang W, Ling Y, Shan L, Li W, Ying J, Lv N: Detection of BRAF mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay. *Scientific reports* 2015, 5:9211.
- [62] Jung YY, Yoo JH, Park ES, Kim MK, Lee TJ, Cho BY, Chung YJ, Kang KH, Ahn HY, Kim HS: Clinicopathologic correlations of the BRAFV600E mutation, BRAF V600E immunohistochemistry, and BRAF RNA in situ hybridization in papillary thyroid carcinoma. *Pathology, research and practice* 2015, 211:162-70.
- [63] Zagzag J, Pollack A, Dultz L, Dhar S, Ogilvie JB, Heller KS, Deng FM, Patel KN: Clinical utility of immunohistochemistry for the detection of the

BRAF v600e mutation in papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2013, 154:1199-204; discussion 204-5.

[64] Ilie MI, Lassalle S, Long-Mira E, Bonnetaud C, Bordone O, Lespinet V, Lamy A, Sabourin JC, Haudebourg J, Butori C, Guevara N, Peyrottes I, Sadoul JL, Bozec A, Santini J, Capper D, von Deimling A, Emile JF, Hofman V, Hofman P: Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma: comparative analysis with three DNA-based assays. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2014, 24:858-66.

[65] Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE: BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003, 88:5399-404.

[66] de Biase D, Cesari V, Visani M, Casadei GP, Cremonini N, Gandolfi G, Sancisi V, Ragazzi M, Pession A, Ciarrocchi A, Tallini G: High-sensitivity BRAF mutation analysis: BRAF V600E is acquired early during tumor development but is heterogeneously distributed in a subset of papillary thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2014, 99:E1530-8.

[67] Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, Fugazzola L, Budillon A, Moccia T, Fenzi G, Vitale M: The primary occurrence of BRAF(V600E) is a rare clonal event in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012, 97:517-24.

[68] Walts AE, Pao A, Sacks W, Bose S: BRAF genetic heterogeneity in papillary thyroid carcinoma and its metastasis. *Human pathology* 2014, 45:935-41.

- [69] Wang Z, Chen JQ, Liu JL, Qin XG: Clinical impact of BRAF mutation in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical investigation* 2015.
- [70] Shin MK, Kim JW, Min SK, Lee DJ, Kim JH, Lee SC, Chung BW, Ju YS: Associations of the BRAF (V600E) mutation and p53 protein expression with clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas patients. *Oncology letters* 2015, 10:1882-8.
- [71] Nam JK, Jung CK, Song BJ, Lim DJ, Chae BJ, Lee NS, Park WC, Kim JS, Jung SS, Bae JS: Is the BRAF(V600E) mutation useful as a predictor of preoperative risk in papillary thyroid cancer? *American journal of surgery* 2012, 203:436-41.
- [72] Howell GM, Nikiforova MN, Carty SE, Armstrong MJ, Hodak SP, Stang MT, McCoy KL, Nikiforov YE, Yip L: BRAF V600E mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. *Annals of surgical oncology* 2013, 20:47-52.
- [73] Guerra A, Marotta V, Deandrea M, Motta M, Limone PP, Caleo A, Zeppa P, Esposito S, Fulciniti F, Vitale M: BRAF (V600E) associates with cytoplasmatic localization of p27kip1 and higher cytokeratin 19 expression in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine* 2013, 44:165-71.
- [74] Suman P, Wang CH, Abadin SS, Moo-Young TA, Prinz RA, Winchester DJ: Risk factors for central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: A National Cancer Data Base (NCDB) study. *Surgery* 2016, 159:31-40.
- [75] Rossi ED, Straccia P, Palumbo M, Stigliano E, Revelli L, Lombardi CP, Santeusano G, Pontecorvi A, Fadda G: Diagnostic and prognostic role of HBME-1, galectin-3, and beta-catenin in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 2013, 21:237-41.
- [76] Pelttari H, Schalin-Jantti C, Arola J, Loyttyneimi E, Knuutila S, Valimaki MJ: BRAF V600E mutation does not predict recurrence after long-term

follow-up in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2012, 120:380-6.

[77] Zheng X, Wei S, Han Y, Li Y, Yu Y, Yun X, Ren X, Gao M: Papillary microcarcinoma of the thyroid: clinical characteristics and BRAF(V600E) mutational status of 977 cases. *Annals of surgical oncology* 2013, 20:2266-73.

