



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Başkan: Prof. Dr. Aysim Büge ÖZ

Danışman: Doç. Dr. Tülin ÖZTÜRK

**EŞ ZAMANLI METASTATİK VE METASTATİK
OLMAYAN PAPİLLER TİROİD KARSİNOM
OLGULARINDA mi-RNA PROFİLLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Penbe Gül ERGÜN

İSTANBUL-2019



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)
koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: TTU-2019-33603

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve asistanlık eğitimim süresince boyunca bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Tülin Öztürk'e,

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ayşim Büge Öz olmak üzere bütün hocalarıma,

Bilgi ve tecrübelerinden faydalanma olanağı bulduğum tüm değerli uzmanlarıma,

Kendilerini tanıma şansı bulduğum ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Oğuz Öztürk'e,

Bu çalışma boyunca bana özveri ile destek olan Biyolog Begüm Ceviz (MSc)'e ve diğer Prof. Dr. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü çalışanlarına,

Berber çalışmaktan mutluluk duyduğum ve asistanlık süresince desteklerini her zaman hissettiğim, uyum içinde çalışma ortamı oluşmasını sağlayan asistan arkadaşlarım Özden, Gamze, Reha, Cansu T., Kerem, Cansu Y, Selçuk, Özce, Zehra, Zeynep, Deniz, Nil ve Şirin'e,

Birlikte çalışma olanağı bulduğum tüm Cerrahpaşa Tıp Fakültesi laborantlarına, sekreterlerine ve personellerine,

Her zaman ve her koşulda bana destek olan, sevgi ve güvenlerini her zaman hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Penbe Gül ERGÜN

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
RESİM LİSTESİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ	1
2.AMAÇ	2
3.GENEL BİLGİLER.....	3
3.1. TİROİD BEZİ EMBRİYOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	3
3.2. TİROİD HASTALIKLARI.....	5
3.2.1. Tiroidin Neoplastik Olmayan Hastalıkları (Tablo 1).....	5
3.2.1.1. Gelişim Anomalileri	5
3.2.1.2. Tiroiditler	6
3.2.1.2.1. Hashimoto Tiroiditi.....	6
3.2.1.2.2. Subakut Lenfositik Tiroidit.....	6
3.2.1.2.3. Granülomatöz(de Quervain) Tiroidit	6
3.2.1.2.4.Riedel Trioidit.....	7
3.2.1.3. Hiperplaziler	7
3.2.1.3.1. Nodüler Hiperplazi(Nodüler Guatr).....	7
3.2.1.3.2. Difüz(Non-toksik) Hiperplazi.....	8
3.2.1.3.3.Graves Hastalığı.....	8
3.2.2. Tiroid Bezinin Neoplastik Hastalıkları	9
3.2.2.1.Foliküler Adenom	10
3.2.2.2. Hurtle (Onkositik) Hücreli Tümörler.....	11
3.2.2.2.1. Hurthle Hücreli Adenom	11
3.2.2.2.2. Hurthle Hücreli Karsinom	12
3.2.2.3.Papiller Benzeri Nükleer Özellikleri Olan Noninvaziv Foliküler Tiroid Neoplazisi (NIFTP).....	12
3.2.2.4. Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK).....	14

3.2.2.4.1. Minimal İnvaziv FTK	15
3.2.2.4.2. Geniş İnvaziv FTK.....	15
3.2.2.5. Papiller Tiroid Karsinomu (PTK)	17
3.2.2.5.1. Foliküler Varyant Papiller Tiroid Karsinomu (FVPTK)	20
3.2.2.5.2. Papiller Mikrokarsinom	21
3.2.2.5.3. Enkapsüle Varyant PTK	21
3.2.2.5.4. Difüz Sklerozan Varyant PTK.....	22
3.2.2.5.5. Tall Cell Varyant PTK.....	23
3.2.2.5.6. Kolumnar Hücreli Varyant PTK.....	23
3.2.2.5.7. Kribriform-Morular Varyant PTK	24
3.2.2.5.8. Hobnail Varyant PTK	24
3.2.2.5.9. Fibromatöz/ Fasciit Benzeri Stroma İçeren PTK.....	25
3.2.2.5.10. Solid/Trabeküler Varyant PTK.....	25
3.2.2.5.11. Onkositik Varyant PTK	25
3.2.2.5.12. İğsi hücreli Varyant PTK.....	26
3.2.2.5.13. Berrak Hücreli Varyant PTK	26
3.2.2.5.14. Whartin-like Varyant PTK.....	26
3.2.2.6. Medüller Tiroid Karsinomu (MTK)	27
3.2.2.7. Anaplastik Tiroid Karsinomu(ATK)	29
3.2.2.8. Az Diferansiye Tiroid Karsinomu	30
3.3. MikroRNA (mi-RNA)	32
3.3.1. RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi (RISC) Yapısı	34
3.3.2. Tümör Supresör Gen ve Onkogen Olarak mi-RNA	35
3.3.3. mi-RNA'nın Tiroid Karsinomlarındaki Rolü	36
4. MATERİYAL VE METOD	38
4.1. mi-RNA Analizi.....	39
4.1.1. Kullanılan Materyaller	39
4.1.2. mi-RNA İzolasyonu	39
4.1.3. mi-RNA'ların ölçülmesi ve eşitlenmesi	40
4.1.4. cDNA Protokolü	40
4.1.5. mi-RNA Ekspresyon Tayini	40
4.2. İstatistiksel Analiz.....	41
5. BULGULAR.....	42
6. TARTIŞMA	56
7. SONUÇ	61
8. KAYNAKLAR	62

KISALTMALAR

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
PTK	Papiller Tiroid Karsinomu
FTK	Foliküler Tiroid Karsinomu
MTK	Medüller Tiroid Karsinomu
GNAS	Stimülator G protein'in alfa subuniti
TSHR	TSH Reseptörü
FA	Foliküler Adenom
NIFTP	Papiller Benzeri Nükleer Özellikleri Olan Noninvaziv Foliküler Tiroid Neoplazisi
İİAB	İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi
FVPTK	Foliküler Varyant Papiller Tiroid Karsinomu
MEN	Multipl Endokrin Neoplazi
CEA	Karsinoembriyonik antijen
VIP	Vazoaktif intestinal peptid
ATK	Anaplastik Tiroid Karsinomu
mi-RNA	MikroRNA
CK7	Sitokeratin 7
CK20	Sitokeratin 20
CK19	Sitokeratin 19
PPARG qRT-PCR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene Quantative reverse transcription PCR

RNA-seq	High-throughput sequencing
dPCR	Digital PCR
RISC	RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi
PI3K	Fosfoinositid-3 kinaz



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Tiroidin Neoplastik Olmayan Lezyonları.....	5
Tablo 2: Dünya Sağlık örgütü(DSÖ)2017 Tiroid Tümörleri Sınıflaması(10).....	9
Tablo 3: Tiroid foliküler hücre diferansiasyonunda saptanan yaygın immunhistokimya markerları(10).....	32
Tablo 4: Vakaların tanı dağılımı.....	42
Tablo 5: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-1.....	43
Tablo 6: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-2.....	44
Tablo 7: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-3.....	45
Tablo 8: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-4.....	46
Tablo 9: Tümör çapına göre nonmetastatik vakalar arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 10: Tümör çapına göre nonmetastatik vakalar ile metastatik lenf nodları arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 11: Tümör çapına göre metastatik vakalar ile metastatik lenf nodları arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 12: Tümör içinde fibrozise göre nonmetastatik vakalar arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması.....	49
Tablo 13: Tümör içinde fibrozise göre metastatik vakalar ve metastatik lenf nodları arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması.....	50
Tablo 14: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-146b açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	51
Tablo 15: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-221 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	52
Tablo 16: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-222 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	53

Tablo 17: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-21 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	54
Tablo 18: miR-21 ve miR-221 ekspresyon özelliklerine göre miR-222 ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	55
Tablo 19: miR-21 ve miR-221 ekspresyon özelliklerine göre miR-146b ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	55



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Tiroidin foliküler hücre kaynaklı tümörlerinde genetik değişiklikler	17
Şekil 2: mi-RNA biyogenezi.....	34
Şekil 3: Genel mi-RNA yolağı.....	34
Şekil 4: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-146b açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 5: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-221 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 6: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-222 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 7: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-21 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.....	54

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: Foliküler Adenom. a) Soliter iyi sınırlı nodül b)Normal tiroid parankimini taklit eden iyi diferansiye foliküller (HE x40).....	11
Resim 2: Hurthle Hücreli Adenom(HEx40)	11
Resim 3: NIFTP (HE x10, x40, x100)	14
Resim 4: a)Foliküler Adenom(HEx40) b)Minimal İnvaziv Foliküler Karsinom (HEx40)	15
Resim 5: Papiller tiroid karsinomu: a) Orphan Annie nükleus (100xHE) b) papilla (40xHE)	18
Resim 6: FVPTK a)HEx4 b)HEx10	21
Resim 7: Enkapsüle Varyant PTK a)HEx40 b)HEx100.....	22
Resim 8: Difüz Sklerozan PTK a)HEx20 b)HEx40	23
Resim 9: Tall Cell Varyant PTK (HEx40).....	23
Resim 10: Hobnail Varyant PTK a)HEx20 b)HEx60.....	25
Resim 11: Onkositik Varyant PTK a)Vaskuler invazyon(HEx10) b)HEx40.....	26
Resim 12: Whartin-like PTK a) HEx4 b)HEx10	27
Resim 13: Medüler Tiroid Karsinomu a)HEx40 b)HEx200.....	28
Resim 14: Anaplastik Tiroid Karsinomu (HEx200).....	30

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, eş zamanlı metastatik ve metastatik olmayan papiller tiroid karsinom olgularının mi-RNA profilleri açısından değerlendirilerek her iki gruptaki mi-RNA profil farklılıklarını geniş bir seride karşılaştırmak; papiller tiroid karsinomu olgularının tanı ve prognozunu belirlemede mi-RNA profillerini PCR yöntemiyle belirlemektir. Böylece parafin doku tiroid örneklerinde metastatik ve metastatik olmayan lezyonlara özgü mi-RNA paternlerini yüksek sensitive ile belirlenmesi mümkün olacaktır.

Materyal Method: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında 2014-2019 yılları papiller tiroid karsinom tanılı 96 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Her olguya ait parafin bloklar üzerinden RT PCR yöntemiyle miR-146b, miR-221, miR-222 ve miR-21 düzeyleri saptanmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda yer alan papiller tiroid karsinom tanılı 96 vakanın 17'si(%17.7) erkek, 79'u (%82.3) kadındır. Hastaların yaş ortalaması ise 41.7'dir. Tümör içinde fibrozis varlığı metastatik lenf nodu açısından anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tümör içinde fibrozis ile metastatik PTK'larda, metastatik olmayan PTK'larda ve metastatik lenf nodlarında mi-RNA ekspresyon profilleri ile ilişki saptanmamıştır. Metastatik olmayan tümörler, metastatik lenf nodları ve metastatik tümörler ile kıyaslanmıştır; ancak ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark elde edilememiştir ($p>0.05$). Fold change ile kıyaslandığında miR-221 açısından metastatik tümöre göre metastatik lenf nodunda artış belirgindir (p değeri=0.09). miR-21 açısından bakıldığında düşük ekspresyondan metastatik lenf nodunda metastatik tümöre göre anlamlılığa ulaşan bir artış izlenmiştir (p değeri=0.02). miR-21 ve miR-221 yüksek ekspresyon gösteren 17 vakanın 11'inde (%64) miR-222'nin de yüksek ekspresyonu saptanmıştır. miR-21 ve miR-221 yüksek ekspresyon gösteren 18 vakanın 16'sında (%88) miR-146b'nin yüksek ekspresyonu da izlenmiştir.

Sonuç: miR-21, miR-221, miR-222 ve miR-146b içeren mi-RNA paneli kullanılmış olup metastatik lenf nodlarında tümörlerine göre ekspresyona artışı gözlenmiştir. Bu nedenle PTK'larda lenf nodu metastazı açısından değerlendirmede bu panelin faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tiroid kanseri, Papiller tiroid karsinomu, mi-RNA, Real Time PCR

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study is to evaluate in terms of mi-RNA profiles simultaneous metastatic and non-metastatic papillary thyroid carcinomas by comparing mi-RNA profile differences in both groups in a large series and to determine the prognosis and diagnosis of papillary thyroid carcinoma cases by using PCR method. Thus, mi-RNA patterns specific to metastatic and non-metastatic lesions in paraffin tissue thyroid samples will be able to be detected with high sensitivity.

Material and method: Totally 96 cases diagnosed with papillary thyroid carcinoma between 2014-2019 in Istanbul University Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Medical Faculty Medical Pathology Department were included in the study.

miR-146b, miR-221, miR-222 and miR-21 levels were determined by RT PCR method on paraffin blocks of each case.

Results: In our study, 17 (17.7%) of the 96 cases with papillary thyroid carcinoma were male and 79 (82.3%) were female. The mean age of the patients was 41.7 years. The presence of fibrosis in the tumor was found to be significant in terms of metastatic lymph node ($p < 0.05$).

There was no association with mi-RNA expression profiles in metastatic PTCs, non-metastatic PTCs and metastatic lymph nodes with fibrosis within the tumor. Non-metastatic tumors were compared with metastatic lymph nodes and metastatic tumors; however, there was no significant difference in terms of expression levels ($p > 0.05$).

Compared to fold change, the increase in metastatic lymph node in the metastatic tumor was significant for miR-221 (p value = 0.09). In terms of miR-21, a significant increase was observed in metastatic lymph node from low expression compared to metastatic tumor (p value = 0.02). High expression of miR-222 was detected in 11 (64%) of 17 cases with high expression of miR-21 and miR-221. High expression of miR-146b was also observed in 16 (88%) of 18 cases with high expression of miR-21 and miR-221.

Conclusions: The mi-RNA panel containing miR-21, miR-221, miR-222 and miR-146b was used and increased expression in metastatic lymph nodes compared to tumors was observed. Therefore, it was concluded that this panel may be useful in the evaluation of lymph node metastasis in PTKs.

Key words: Thyroid cancer, Papillary thyroid carcinoma, mi-RNA, Real Time PCR

1.GİRİŞ

Tiroid bezinde iyi sınırlı benign adenomlardan agresif seyirli anaplastik karsinomlara kadar farklı özellikte çeşitli tümörler gelişmektedir. Solid nodül insidansı %1-10 arasında olup bunların %1'den azı ise maligndir. Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin malignitelerdir. Yıllık yeni kanser vakalarının %1-1.5'ini oluştururlar (9).Son 3 dekatta insidansı %2.4'den %9.4'e çıkmıştır (1).

Medüller tiroid karsinomu haricindeki çoğu tiroid karsinomları tiroid folikül epitel hücrelerinden köken alır. Bunların çoğunluğu iyi diferansiye lezyonlardır. Benzersiz klinik, moleküler ve biyolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Tiroid karsinomlarının %85'inipapiller tiroid karsinomu, %5-15'ini foliküler tiroid karsinomu, %5'ini medüller tiroid karsinomu ve %5'inden azını ise anaplastik tiroid karsinomu oluşturmaktadır (9).

Normal dokuya kıyasla tiroid tümörlerindeki benzersiz mi-RNA ekspresyon profili tanı ve tedavide pratiklik sağlayabilir. miR-146, miR-221, miR-222 overekspresyonu papiller tiroid karsinomu tanısında pratik bir yoldur. Tiroid kanserlerinin farklı tiplerinin prognozunu daha doğru bir şekilde belirlemede mi-RNA ekspresyon profilleri faydalı bir araç olabilir (1)

Bu çalışmada; papiller tiroid karsinom tanısı alan olgularda PCR yöntemiyle metastatik olan ve olmayan vakaların mi-RNA profilleri arasındaki farklılıklar araştırılacaktır.

2.AMAÇ

Bu çalışmanın amacı; eş zamanlı metastatik ve metastatik olmayan papiller tiroid karsinom olgularını mi-RNA profilleri açısından değerlendirmek ve her iki gruptaki mi-RNA profil farklılıklarını geniş bir seride karşılaştırmak; papiller tiroid karsinomu olgularının tanı ve prognozunu belirlemede mi-RNA profillerinin PCR yöntemiyle belirlenerek rutinde kullanılabilir olup olmadığını ortaya koymaktır.



3.GENEL BİLGİLER

3.1. TİROİD BEZİ EMBRİYOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Tiroid bezi iki lateral ve bir median primordia'dan gelişir. Median primordia, gelişen ön ve arka dilin birleşme yerinde farengeal duvarın ortasından köken alır. Bu nokta foramen caceum'dur. Median primordia, kalbin aortik kesesi ile bağlantılıdır. Aortik kese aşağı indiğinde median primordia kaudale doğru yer değiştirir. Kaudale yer değiştirme sırasında çevre dokudan gelen endodermal hücreler birikir. Lateral primordia anteriora doğru göç eder ve farenksten ayrılarak median lob ile birleşirler. Lateral primordia, tiroid gland volümünün 1/3'ünü oluşturur. Median primordiannın faringeal bağlantısı uzayan bir sap şeklinde tiroglossal duktusa dönüşür. Gestasyonel 6. haftada bu kanal kapanarak kaybolur. 7. haftada median tiroid, iki lateral lob ve istmustan oluşacak şekilde son olarak yerleşeceği yer olan trakea üzerine iner(2)

Tiroid bezi, larinks ve trakea ön yüzünde, C5 ve T1 vertebra hizasında, boyun alt ön kısmında krikoid kıkırdağın hemen altında yer almaktadır. Tiroid bezi istmus ile birleşmiş iki lobdan oluşmaktadır. Tiroglossal duktus epitelininanormal proliferasyonu sonucunda lümeni kapatması ile piramidal lob bazı bireylerde bulunabilmektedir (3). Yaş, cinsiyet, hormonal durum, iyot alım düzeyi ve fonksiyonel aktiviteye bağlı olarak tiroid bezi büyüklüğü değişebilmekte olup ortalama çapı 4 cm'dir. Yetişkin tiroidin normal ağırlığı 15-20 gr arasındadır. Fibröz septumların tiroid parankimine penetrasyonu ile lobüllere ayrılırlar. Her lobül yaklaşık 20-40 folikülden oluşmakta olup stroması kan damarları ve lenfatik açısından zengindir (4). Tiroidin kanlanması ise başta subclavia arterin dalı olan inferior tiroid arterlerden ve eksternal karotid arterin dalı olan inferior tiroid arterlerden sağlanır. Venöz dönüş internal juguler ve brakiosefalik venlere olmaktadır. Lenfatik drenaj ise perikapsüler lenf düğümleri, internal jugular lenf nodları, pretrakeal, paratrekeal, prelaringeal lenf düğümleri, retrofarengial ve retroözefagial lenf düğümlerine olur (5) (3).

Tiroid bezi histolojik olarak folikül epitel hücreleri, C-hücreleri ve stroma içermektedir. Tiroid bezi, her biri yaklaşık 20-40 folikül içeren lobüllerden oluşmaktadır. Histolojik olarak tiroidin temel ünitesi; bazal membran üzerine otumuş tek katlı epitelin izlendiği yuvarlak ya da oval görünümde izlenen foliküllerdir. Folikül lümeni folikül hücreleri tarafından sentezlenen kolloid içermektedir. Folikül epitel

hücrelerifonksiyonel durumlarına göre şekil ve boyut farklılıkları gösterirler (4) (5). Endotelioid, kolumnar veya küboid görünümde olabilirler. Bu hücrelerde eozinofilik sitoplazma ile bazalde yerleşen yuvarlak-oval nükleus, ince granüler kromatinli ve belirgin olmayan nükleol mevcuttur (4).

İnaktif tiroid bezin epitel hücreleri endotelioid, aktif hormon sekrete eden bezde ise yüksek kolumnargörünümdedir. Kolloid kullanımı nedeniyle folikül epitel hücrelerinin apikal kısımlarında vakuolizasyonoluşabilir. İnaktif bezde kolloid homojen, dens, eozinofilik izlenmekte olup aktif bezde ise tiroglobulinin kullanılması nedeniyle az miktarda, soluk eozinofilik görünümde olur (4).

Folikül epitel hücreleri tiroglobulin ve düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinler ile sitoplazmik olarak boyanırlar.EMA ile değişken derecede pozitiflik gösterirler. Normal folikül epitel hücreleri S-100 ile zayıf boyanabilirler. Ayrıca, normal folikül epitel hücreleri bazı transkripsiyon faktörlerini(TTF-1,PAX-8 gibi) , epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alfa (TGF α) ve epidermal growth factor receptor (EGFR) gibi büyüme faktörleri ve reseptörleri ile tiroidperoksidaz (TPO) eksprese ederler (4).

Parafoliküler C hücreleri ise tiroid glandının minör bir komponentidir. Toplam kitlenin %0.1'inden azını oluştururlar. Peptid hormon olan kalsitonini sentezleyerek nöroendokrin fonksiyon gösterirler. Bu hücreler foliküler duvarın periferinde, bazal membrana yakın foliküler lümene ulaşmayan kısımlarda ve interfoliküler stromada tek tek ya da küçük gruplar halinde olup soluk boyanırlar. Folikül hücrelerinden daha büyük ve soluk, zayıf eozinofilik sitoplazma görülür. Bu hücreler poligonal görünümde olup yuvarlak-oval nükleus, santral yerleşimli nükleolus içerirler. Primer (neoplastik) C-hücre hiperplazisi, RET onkogen mutasyonu ile ilişkili olarak MEN 2A ve 2B gibi ailesel hastalıklarda görülür.

Sekonder (fizyolojik) C-hücre hiperplazisi nonmedüller tümörlerde, lenfositik tiroiditlerde ve sekonder hiperparatiroidizmde görülebilir. Kalsitonin, CEA, kromogranin, sinaptofizin ve düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler ile C hücreleri immun pozitiflik gösterir (4).

3.2. TİROİD HASTALIKLARI

3.2.1. Tiroidin Neoplastik Olmayan Hastalıkları (Tablo 1)

Tablo 1: Tiroidin Neoplastik Olmayan Lezyonları

Gelişim anomalileri	<ul style="list-style-type: none">➤ Agenezi➤ Heterotopi veya ektopi➤ İstmus/Piramidal Lob anomalileri➤ Solid C hücre artıkları, brankial ve faringeal kese artıkları➤ Tiroit inklüzyonları➤ Metaplaziler (Skvamöz, Oksifilik)
Tiroiditler	<ul style="list-style-type: none">➤ HashimotoTiroiditi➤ Subakut Lenfositik Tiroidit➤ Granümatöz(de Quervain) Tiroidit➤ Riedel Tiroidit
Hiperplaziler	<ul style="list-style-type: none">➤ Nodüler hiperplazi (Nodüler guatr)➤ Difüz(Non-toksik) hiperplazi➤ Graves hastalığı
Diğer Lezyonlar	<ul style="list-style-type: none">➤ Malakoplaki➤ Histiositozis X

3.2.1.1. Gelişim Anomalileri

Tiroid gland agenezi sıklıkla unilateral lobar agenezi olarak görülmekte olup bazen istmusu da içermektedir. Tiroid hemiagenezi prevalansı %0.05 ile %0.2 arasındadır ve kadınlarda daha sık görülür(6).Tiroid gland heterotopisi oldukça nadirdir. Ektopik tiroid dokusu tiroid bezinin embriyolojik gelişim sırasındaki iniş yolları üzerinde görülebilir. En sık burada görülür(%90), bu lokalizasyonda lingual tiroid olarak adlandırılır (7). Bu vakaların %70'inde lingual tiroid tek tiroid dokusudur (2)(8).

Ayrıca tiroid dokusuna, sublingual ,mediastinal, larenks, trakea, over, vajina, sella tursika, aortik ark, kalp, perikard, özefagus, diyafram safra kesesi, retroperiton, inguinal bölgede de rastlanabilmektedir. Tiroidin en sık gelişimsel anomalisi tiroglossal kanal kistidir, konjenital boyun kitlelerinin en yaygın nedenidir. Tiroglossal duktusun persistansı ve kistik dilatasyonu sonucu orta hatta oluşur. Epitelle döşeli heterotopik tiroit dokusu ve kalıntıların izlendiği embriyonik traktus görülmektedir.

İntratiroidal inklüzyonlar; İntratiroidal paratiroid, timus, tükrük bezi dokusu, epitelyal kistler, ultimobrankiyal kalıntılar, demir ve lipofuksin gibi pigment ve kristaller, yağ, kas ve kıkırdak dokusu görülebilir(4)

3.2.1.2. Tiroiditler

3.2.1.2.1. Hashimato Tiroiditi

Tiroid glandı hasarıyla sonuçlanan otoimmün bir hastalıktır. İyot düzeyinin yeterli olduğu yerlerde tüm dünyada en yaygın hipotroidizm nedenidir.45-65yaş arasında ve kadınlarda daha sık görülür. Tiroid otoantijenlerine self toleransın bozulması sonucu oluşur. Tiroid epitel hücrelerinde apoptoz ile progresif kayıp ve bunun yerini alan tiroid parankiminde küçük lenfositler, plazma hücreleri ile iyi gelişmiş germinal merkezlerin seçildiği mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrozis izlenmektedir (9).

3.2.1.2.2. Subakut Lenfositik Tiroidit

Ağrısız tiroidit olarak da adlandırılır. Orta derecede hipertroidizme neden olur.Orta yaşlı yetişkinlerde ve kadınlarda sıktır. Postpartum %5 kadında görülen otoimmün tiroidit varyantı olan postpartum tiroidit ağrısızdır. Kanda dolaşan otoantikolar görülür. Vakaların 1/3'ünde hipotroidizm zamanla gelişebilir ve histolojik olarak Hashimato tiroiditini taklit edebilir (9).

3.2.1.2.3. Granümatöz(de Quervain) Tiroidit

40-50 yaş arasında ve kadınlarda erkeklerden 4 kat daha fazla oranda görülür. Viral enfeksiyonla tetiklendiği düşünülür. Hastaların çoğunda üst solunum sistemi enfeksiyonu öyküsü vardır. Yaz aylarında pik yapar. Ağrılıdır ve tiroid bezinde büyümeye neden olur. Patogenezi net değildir; viral antijenler sitotoksik T lenfositlerini stimule ederek tiroid folikülepitel hücrelerine zarar verirler. Histolojik değişiklikler

yamasaldır ve hastalık evresine bağlıdır. Erken dönemde; aktif inflamatuvar fazda, dağınık foliküller arasında nötrofillerve mikroabse formasyonu görülür. Geç dönemde; hasarlı foliküller ile lenfoid agregatlar, aktive makrofajlar, plazma hücreleri ve kolloid fagosite etmiş multinükleer dev hücreler görülür. Geç dönemde hasarlı bölgenin yerini kronik iltihabi hücreler ve kollagen alır (9).

3.2.1.2.4.Riedel Trioidit

Oldukça az görülür. Tiroid ve çevresindeki boyun dokularını etkileyen yaygın fibrozisle karakterizedir. Sert ve fikse tiroid kitlesi klinik olarak tiroid karsinomuna yol açabilir. Vücutta farklı bölgelerde (örneğin, retroperiton) yer alan fibrozis ile birlikte olabilir. Sistemik otoimmünIg-G4 ile ilişkili hastalığın yansıması olarak görülebilirler (9).

3.2.1.3. Hiperplaziler

3.2.1.3.1. Nodüler Hiperplazi(Nodüler Guatr)

Tiroid hormon sentezindeki eksiklik nedeniyle tiroid bezinde büyüme (guatr) en sık diyetle iyot alımındaki eksikliğe bağlı oluşur. Tiroid hormonu eksikliği nedeniyle artan TSH seviyesi tiroid folikül hücrelerinde hipertrofi ve hiperplaziye neden olur. Bu kompensatuvar artış ile çoğu hasta metabolik olarak ötroid kalmaya devam eder. Tekrarlayan hiperplazi epizodları ile irregüler büyüme görülür. Tiroid bezini çok fazla büyüttüğü için tiroid bezi neoplazileri ile karışabilir. Gland çok büyük olduğunda trakea, özefagus gibi orta hat yapılarına basıya neden olur. Sternum ve klavikula arkasına büyürse Planjuan (intratorasik) guatr adını alır (9).

Makroskobik olarak kahve renkte, jelatinöz kolloid içeren irregüler nodüller görülür. Tiroid kapsülüntakt görünümündedir. Daha eski lezyonlarda hemoraji, fibrozis, kalsifikasyon ve kistik değişiklikler görülür (5) (9)

Mikroskobik olarak ise kolloidden zengin nodülleri çevreleyen basık, inaktif epitel mevcuttur. Bazı nodüllerde epitel hiperplastik ya da selüler olabilir. Bazen papiller yapılanmalar görülmekte olup papiller karsinom ile karışabilirler (5) (9).

Büyüme yi sağlayan genetik anomaliler sonucunda ortaya çıktığı düşünölmektedir. Tiroid nodöllerinin bir kısmında TSH sinyal yolundaki proteinleri etkileyen aktive edici mutasyonlar saptanmıştır (9).

3.2.1.3.2. Difüz(Non-toksik) Hiperplazi

Nodölarite olmadan tiroid bezi büyümesidir. Genişleyen foliköller kolloidle dolduğu için koloidal guatr olarak da isimlendirilir. Endemik ve sporadik olarak görölebilir. Endemikguatr diyetle düşük seviyede iyot alımının olduğu coğrafik bölgelerde toplumun %10'undan fazlasında görölür. Sporadik guatr ise daha az görölür. Puberte ve genç erişkinlerde ve kadınlarda daha fazla görölür. Tiroid hormon sentezinde herediter enzimatik defekt sonucunda oluşabilir (dishormonogenetik guatr). Bazı vakalarda ise neden bulunamamıştır (9).

3.2.1.3.3.Graves Hastalığı

Endojen hipertroidinin en yaygın nedendir.20-40 yaş arasında ve kadınlarda erkeklerden 10 kat daha fazla görölür. Difüz tiroid bezi büyümesi ile hipertroidi, eksoftalmus ile sonuçlanan infiltratif oftalmopati, pretibial miksödem adı verilen lokalize infiltratif dermopati triadı ile klinikte karşımıza çıkar.

Tiroid proteinlerine karşı (özellikle TSH reseptörü) otoantikor üretimiyle karakterize otoimmün bir hastalıktır. Thyroid stimulating immunoglobulin (TSI) vakaların yaklaşık %90'ında mevcuttur.

Morfolojik olarak tiroid epitel hücrelerinin difüz hipertrofi ve hiperplazisi nedeniyle simetrik büyüme görölür. Kesitleri yumuşak ve etsidir. Histolojik olarak, tedavisiz vakalarda tiroid epitel hücreleri uzun ve normalden daha kalabalık görölebilir. Bu kalabalıklaşma bazen lümene uzanan küçük papillalar yapabilir, bazen lümeni doldurabilirler. Bupapillalar papiller tiroid karsinomlarında görölen fibrovasküler kor içermezler. Foliköler lümendeki kolloid açık renkte olup sınırları dişli görünümündedir. Lenfosit infiltrasyon ve germinal merkezler görölebilir(9).

3.2.2. Tiroid Bezinin Neoplastik Hastalıkları

Tablo 2: Dünya Sağlık örgütü(DSÖ)2017 Tiroid Tümörleri Sınıflaması(10)

Foliküler Adenom	Az Diferansiye Tiroid Karsinomu	Ektopik Timoma
Hiyalinize Trabeküler tümör	Anaplastik Tiroid Karsinomu	Timus Benzeri Diferansiyasyon Gösteren İgisi Hücreli Tümörler
Diğer Enkapsüle Foliküler Paternli Tümörler <ul style="list-style-type: none"> ➤ Malignite Potansiyeli Bilinmeyen Foliküler Tümör ➤ Malignite Potansiyeli Bilinmeyen İyi Diferansiye Tümör ➤ Papiller Benzeri Nükleer Özellikleri Olan Noninvaziv Foliküler Tiroid Neoplazisi (NIFTP) 	Skvamöz Hücreli Karsinom	İntratiroid Timik Karsinom
	Medüller Tiroid Karsinomu (MTK)	Hematolenfoid Tümörler <ul style="list-style-type: none"> ➤ Langerhans Hücreli Histiositoz ➤ Rosai-Dorfman Hastalığı ➤ Foliküler Dendritik Hücreli Sarkom ➤ Primer Tiroid Lenfoması
	Mikst Medüller ve Foliküler Tiroid Karsinomu	
	Mukoepidermoid Karsinom	
	Eozinofili İçeren Sklerozan Mukoepidermoid Karsinom	
Müsinöz Karsinom	Germ Hücreli Tümörler <ul style="list-style-type: none"> ➤ Benign Teratom (Grade 0 ya da 1) ➤ İmmatür Teratom (Grade 2) ➤ Malign Teratom (Grade 3) 	
Papiller Tiroid Karsinomu (PTK) <ul style="list-style-type: none"> ➤ Papiller karsinom ➤ Foliküler varyant PTK (FVPTK) ➤ Enkapsüle Varyant PTK ➤ Papiller mikrokarsinom ➤ Kolumnar hücreli varyant PTK ➤ Onkositik varyant PTK 	Paraganglioma ve Mezenkimal / Stromal Tümörler <ul style="list-style-type: none"> ➤ Paraganglioma ➤ Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri <ul style="list-style-type: none"> ✓ Schwannom ✓ Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri ➤ Benign Vasküler Tümörler <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hemanjiom ✓ Kavernöz Hemanjiom ✓ Lenfanjiom ➤ Anjiosarkom ➤ Düz Kas Tümörleri <ul style="list-style-type: none"> ✓ Leiomyom ✓ Leiomyosarkom ➤ Soliter Fibröz Tümör 	
Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK), NOS <ul style="list-style-type: none"> ➤ Minimal İnvaziv FTK ➤ Enkapsüle anjioinvaziv FTK ➤ Geniş İnvaziv FTK 		Sekonder Tümörler
Hurtle (Onkositik) Hücreli Tümörler		

Tablo 2’de Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ) 2017 tiroid tümörleri sınıflaması yer almaktadır.

3.2.2.1.Foliküler Adenom

Folikül epiteli kaynaklı solid kitlelerdir. Çoğu nonfonksiyoneldir, az bir kısmı tiroid hormonu üretir ve klinik olarak fark edilen tirotoksikoza neden olabilirler. Kadınlarda sık olup, görüntülemelerde soğuk nodül olarak izlenirler. Büyük lezyonlar çevre dokulara bası yapabilirler, ayrıca hızlı büyüyen adenomlarda kanama ve bu nedenle ağrı görülebilmektedir (9)(10).

Hormon üreten adenomlar (toksik adenom) TSH stimülasyonundan bağımsızdır. Toksik multinodüler guatr da olduğu gibi TSH reseptör sinyal yolunda somatik mutasyonlar patogeneizde yer alır. Sinyal sisteminin 2 komponenti olan TSH reseptörü (TSHR) ya da Gs'nin α -subuniti (GNAS)'in birinde kazanılan mutasyonlar ile foliküler hücrelerden TSH hormonundan bağımsız tiroid hormon sentezi başlar (tiroid otonomisi). Sonuçta hipertroidizm semptomları görülür ve görüntülemelerde sıcak nodül izlenir. Toksik tiroid nodüllerinin yaklaşık olarak yarısında TSH reseptör sinyal yolunda mutasyon mevcuttur. TSHR ve GNAS mutasyonu foliküler karsinomda nadirdir, bu nedenle toksik adenomlar ve toksik multinodüler guatrlar foliküler karsinoma yol açmazlar. Nonfonksiyone foliküler adenomlar (%20) RAS ya da PI3K mutasyonuna sahip olup foliküler karsinoma benzer şekilde PI3K ya da PAX8-PPARG füzyon geninde genetik değişiklikler saptanmıştır (9).

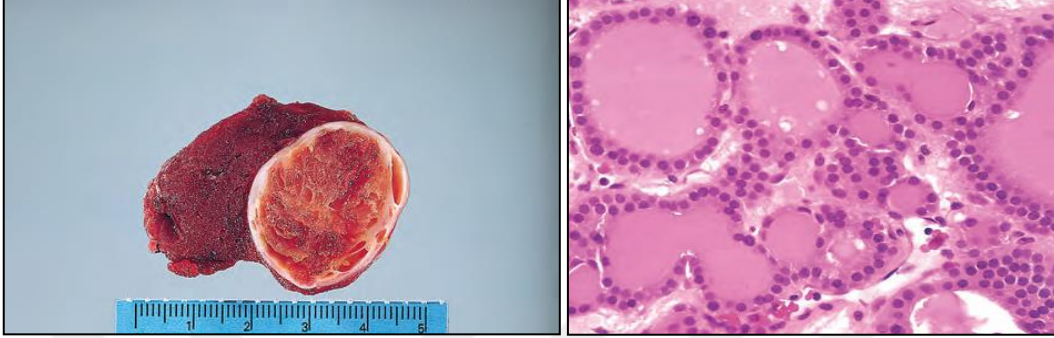
Adenomlar çevre tiroid parankiminden intakt bir kapsülle ayrılmış, belirgin sınırlı, enkapsüle, sferik, solid lezyonlardır. Kapsülde orta çaplı vasküler yapılar ve düz kas demetleri görülür. Kapsül invazyonu ve çevre dokuya invazyon görülmez. Foliküler adenomlar ortalama 3 cm çapta olup bazen büyüklükleri 10 cm çapa kadar ulaşabilirler. Kesit yüzlerinde çevre tiroid dokusuna bası yaptıkları görülür. Kolloid içeriğine ve adenom selüleritesine bağlı olarak renkleri gri-beyaz ya da kırmızı-kahve renkte olabilir (5) (9) (11).

Mikroskopik olarak kolloid içeren uniform görünümde, poligonal, nükleolleri belisiz ya da izlenmeyen, sitoplazma sınırları belirgin foliküler hücrelerden oluşur (Resim 1). Foliküler büyüme paterni çevre nonneoplastik tiroidden farklıdır. Neoplastik hücrelerde hücre şekil, boyut ve nükleer morfolojide hafif farklılıklar görülür, nadiren mitotik figür izlenir. Foliküler adenomun ayırıcı özelliği tümörü çevreleyen intakt, iyi forme kapsül varlığıdır. Foliküler karsinomdan ayırt etmek için kapsül bütünlüğünün dikkatli olarak incelenmesi önemlidir (9) . Özellikle büyük lezyonlarda kanama, miksoid değişiklikler, fibrozis, kalsifikasyon, metaplastik ossifikasyon ve kistik

değişiklikler gibi dejeneratif değişiklikler görülebilir. Bazen skuamöz metaplazi de görülmektedir (9) (10)

Adenomatoid nodül ile adenomun ayırımında enkapsülasyon, adenomda görülen uniform patern ve çevre dokudaki atrofi yardımcı olmaktadır (10)

Foliküler adenomlarda rekürrens görülmez. Prognozları çok iyidir (9)



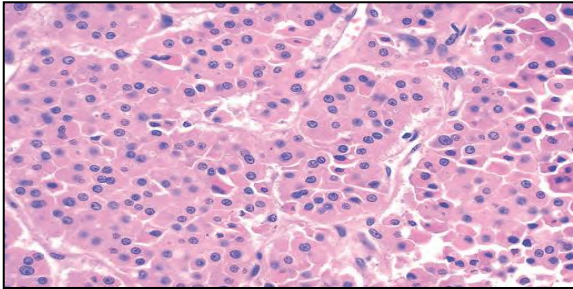
Resim 1: Foliküler Adenom. a) Soliter iyi sınırlı nodül b) Normal tiroid parankimini taklit eden iyi diferansiye foliküller (HE x40)

3.2.2.2. Hurtle (Onkositik) Hücreli Tümörler

3.2.2.2.1. Hurthle Hücreli Adenom

Erkeklerde ve yaşlılarda daha siktir. Ortalama görülme yaşı 57'dir. Ağrısız kitlelere neden olurlar. Genelde 2 cm'in üzerindedir. Nadiren 1 cm'in altındadır.

Tiroid parankiminden intakt bir kapsülle ayrılmış, belirgin sınırlı, enkapsüle, sferik, solid lezyonlardır. %75'den daha fazla onkositik hücre görülmelidir. Kesit yüzleri kırmızı-kahve renktedir. Neoplastik hücrelerde parlak, eozinofilik granüler sitoplazma ile büyük nükleus, belirgin nükleol görülür (Resim2). Kapsül ve damar invazyonu görülmez (10).



Resim 2: Hurthle Hücreli Adenom(HEx40)

3.2.2.2. Hurthle Hücreli Karsinom

Parankimden intakt bir kapsülle ayrılmış, belirgin sınırlı, enkapsüle, sferik, solid lezyonlardır. Neoplastik hücrelerde parlak, eozinofilik granüler sitoplazma ile büyük nükleus, belirgin nükleol görülür. Kapsül ya da damar invazyonu mevcuttur. Non-Hurthle tiroid karsinomlarına oranla daha yüksek evre, daha düşük sağkalım ve daha büyük boyutta tümörler görülmektedir (10).

3.2.2.3.Papiller Benzeri Nükleer Özellikleri Olan Noninvaziv Foliküler Tiroid Neoplazisi (NIFTP)

Foliküler büyüme paterni ile birlikte PTK benzeri nükleusa sahip folikül epitel hücrelerinden kaynaklanan non-invaziv ve oldukça düşük malignite potansiyeli olan tiroid neoplazisidir. Tamamen benign değildir.

Makroskobide iyi sınırlı, kapsüllü, soliter kitleler olarak görülmektedir. Kesit yüzeyi ise kolloid miktarı ile ilişkili olarak beyaz ve kahve rengi arasında değişmektedir.

NIFTP tanısını koymak için 4 histolojik özellik mevcut olmalıdır:

1. Komplet kapsülün varlığı veya çevre parankimden düzgün sınırla ayrılmış olma
2. Foliküler büyüme paterni varlığı
3. İnvazyon saptanmaması
- 4.PTK benzeri nükleer özellikler

Nükleer skor (2 ya da 3 olmalıdır) (Resim 3):

1.Nükleer membranda düzensizlikler (Nükleer groove, katlantılar, düzensiz sınırlar, psödoinklüzyon varlığı)

2. Kromatin özellikleri (Perifere yer değiştirme nedeniyle berraklaşma, buzlu cam görünümü)

3.Boyut ve şekil değişiklikleri (İrileşme, kalabalıklaşma, uzama, üstüste binme)

NIFTP Kriterleri ise;

1.Kapsül varlığı veya çevre parankimden düzgün sınırla ayrılma

2. Foliküler büyüme paterni varlığı (Aşağıdaki özelliklerin hepsi olmalıdır)

a. < %1 papilla

b. Psammom cisim izlenmemesi

c.< %30 solid, trabeküler, insüler büyüme paterni saptanması

3. PTK benzeri nükleer özellikler (Nükleer skor 2 veya 3 olmalıdır)

4.Tümör nekrozunun yokluğu

5. Mitoz < 3/10 BBA

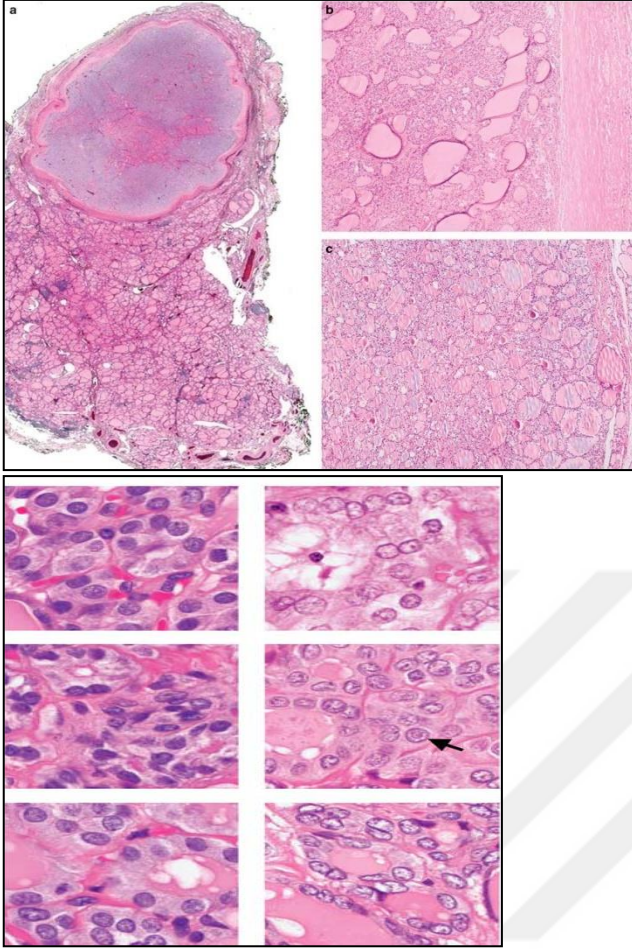
6.Kapsül invazyonu, lenfatik veya vasküler invazyon saptanmaması

Sitolojik incelemede NIFTP ve PTK arasında güvenilir şekilde bir ayırım yapılamaz.

NIFTP'lerin yaklaşık %80 inde klonal değişiklikler görülür. FA ve FTK ile benzerdir. Sıklıkla RAS mutasyonu görülür. Hiçbiri RET/PTC (ör.RET-CCDC6/RET-NCOA4) ya da BRAFV600E mutasyonu göstermez. PAX8/PPARG ve THADA füzyonları, E1F1AX ve BRAFK601E mutasyonları görülebilir. BRAFV600E, TERT, RET/PTC, ALK gibi beklenmeyen moleküler değişiklikler NIFTP tanısında dışlayıcıdır (12) (13) (14).

Bu hastalar cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilebilirler. Bu tanı için nodülün tamamı örneklenmeli, invaziv büyüme paterni izlenmemelidir. Cerrahi sınırlar negatif olarak değerlendirilmelidir.

Cerrahi rezeksiyon ile takip edilen hastalarda 15 yıl içinde nüks ve istenmeyen sonuçlar %1'in altındadır (10).



Resim 3: NIFTP (HE x10, x40, x100)

3.2.2.4. Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK)

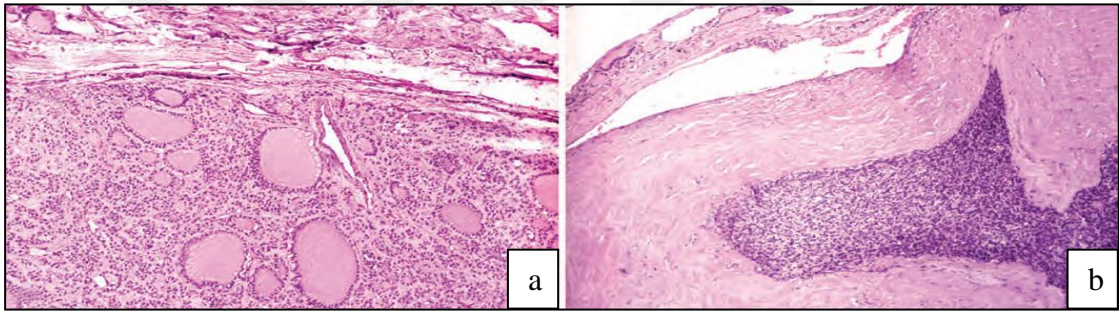
Primer tiroid karsinomlarının %5-15'ini oluşturmaktadır. Diyetle iyot alımı eksikliğini olduğu yerlerde daha sık olup bu bölgelerde tiroid kanserlerinin %25-40'ını oluşturmaktadır. Kadınlarda erkelerden 3 kat daha fazla görülür. 40-60 yaş arasında pik yapar.

Makroskopik olarak iyi sınırlı ya da geniş infiltratif görünümlü tek nodül şeklinde karşımıza çıkarlar. Keskin sınırlı lezyonlarda makroskopik olarak foliküler adenomdan ayırmak zordur. Büyük nodüllerde kapsül penetrasyonu ve çevre boyun yapılarına infiltrasyon görülebilir. Kesitleri gri, sarı veya pembe renkte olabilir. Santral fibrozis, kalsifikasyon gibi dejeneratif değişiklikler görülebilir.

Mikroskopik olarak çoğu foliküler karsinom kolloid içeren, uniform küçük foliküllerden oluşmaktadır (Resim 4). Patern ne olursa olsun papiller karsinomunun tipik nükleer özellikleri ve psammom cisimleri görülmez. Papiller karsinomun aksine foliküler karsinomda lenfatik yayılım nadirdir (9) (10).

3.2.2.4.1. Minimal İnvaziv FTK

Makroskopik değerlendirmede kapsüllü, iyi sınırlı, kesitleri gri-pembe renkli olarak izlenirler. Genelde 1-2 cm çaplıdır. Mikrofoliküler ve trabeküler patern hakimdir. Kapsülde tam kat invazyonu sınırlı bir alanda izlenir. İİAB yöntemi ile foliküler adenom ile minimal invaziv karsinom ayırıcı tanısını yapacak güvenilir bir sitolojik farklılık yoktur. Minimal invaziv karsinom tanısı için tüm tümör kapsülü kapsül invazyonu ve damar invazyonu açısından dikkatlice incelenmelidir (9) (10).



Resim 4: a) Foliküler Adenom (HEx40) b) Minimal İnvaziv Foliküler Karsinom (HEx40)

3.2.2.4.2. Geniş İnvaziv FTK

Genelde invazyonun belirgin olduğu, ekstratiroidal yumuşak dokulara yayılan tümörlerdir. Mikroskopik özellikleri ise minimal invaziv folliküler karsinoma benzemekte olup solid ve trabeküler büyüme paterni baskındır, ayrıca mitotik aktivite artmıştır. Ayırıcı tanıda az diferansiye tiroid karsinom açısından dikkatli olunmalıdır (9) (10).

3.2.2.4.3. Enkapsüle Anjioinvaziv FTK

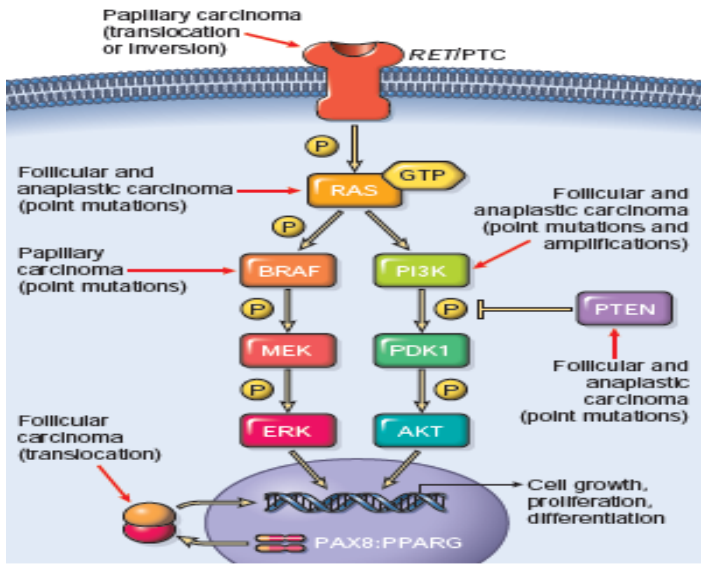
Mikroskopik özellikleri minimal invaziv folliküler karsinoma benzemektedir. Vasküler invazyon damar boyutundan bağımsız olup venlerde görülmektedir.

Intravasküler tümör hücreleri trombüs ya da fibrin içeren endotelle çevrili damarın duvarına tutunmalıdır. Yaygın damar invazyonu kötü prognozla ilişkilidir.

Berrak hücreli varyant FTK, tüm tiroid malignitelerin %1'inden azında görülür. Tümörde %50'den fazla berrak hücre vardır. Tümör hücreleri yuvarlak, oval ve küçük nükleusludur. Belirgin nükleer berraklaşma, pleomorfizm ve groove görülmez. Sitoplazmadaki berraklaşma mitokondri ve golgi kompleksinin hipertrofi ve dilatasyonu veya tiroglobulin, müsin, lipid ya da glikojen birikmesi sonucunda olur. TSH'a bağlı overstimulasyon bu fenotipin gelişmesinde rol oynar. Bu tümörlerde böbrek orijinli berrak hücreli karsinom metastazı, medüller tiroid karsinomu ve paratiroid karsinomu dışlanmalıdır (10).

İleri yaş, çok sayıda metastaz, büyük tümör boyutu, yaygın vasküler invazyon, kapsül dışına yayılım, az diferansiye tümör alanlarının varlığı kötü prognozu gösterir (5).

Foliküler karsinomlarda görülen en önemli moleküler değişiklikler anöploidi, RAS nokta mutasyonları ve PAX8-PPAR γ translokasyonudur. FTK'da PTK'nın aksine tirozin kinaz sinyal yolu reseptörünün PI3K/AKT aktivasyonu veya RAS aktivasyonu görülür. RAS aktivasyonunun hem MAPK hem PI3K yolunu aktive etmesi beklenir. FTK'nın 1/3-1/2'sinde RAS ya da PI3K kodlayan gen olan PI3K geninde nokta mutasyon ile fonksiyon artışı, PI3K amplifikasyonu ya da bu yolağın negative regülatörü ve tumor supresör geni olan PTEN'de mutasyona neden olarak fonksiyon kaybının izlendiği mutasyonlar görülmektedir (Şekil 1). Bu mutasyonlar foliküler karsinom ve ona fonksiyonel olarak benzer foliküler tümörlerde görülür. Benign adenomdan foliküler karsinoma ve anaplastik karsinoma geçişte RAS ve PI3K mutasyonlarının prevalansında progresif artış görülür. Bu durum foliküler tümörlerin ortak histogenezi ve moleküler gelişimini göstermektedir. İnaktif PTEN mutasyonu FTK'ların %10'unda görülür. FTK'nın 1/3-1/2'sinde (2;3)(q13;p25) translokasyonu görülür. Bu translokasyon ile tiroid gelişiminde önemli olan Pax-8 geni ile terminal diferansiye hücrelerde nükleer hormon reseptör geni içeren peroxisome proliferator-activated receptor gene (PPARG) füzyonu oluşur. TERT mutasyonu ise FTK'larda %20 oranında görülür. Aktive TSHR mutasyonları da özellikle hiperfonksiyone FTK'larda görülür (9) (10) (15) (16)



Şekil 1: Tiroidin foliküler hücre kaynaklı tümörlerinde genetik değişiklikler

3.2.2.5. Papiller Tiroid Karsinomu (PTK)

Tiroid karsinomlarının %85'ini oluştururlar. Radyasyon maruziyeti ile ilişkilidir. Obezite, diyabet, sigara ve alkol kullanımı, diyetle iyot alım eksikliği önemli çevresel faktörlerdir. 25-50 yaş arasında sıktır. Kadınları erkeklerden 3 kat daha fazla etkiler. Klinik olarak asemptomatik ağrısız tiroid kitlesi görülür. Ses kısıklığı, disfaji, öksürük, dispne ileri evrelerde görülür. %20 hastada disfaji görülür (9) (10).

Sintigrafide soğuk, hipofonksiyone nodül olarak görülür, nadiren sıcak nodül olabilir. Sonografik incelemede ise hipoekoik/izoekoik, düzensiz sınırlı, mikrokalsifikasyon içeren solid nodül görülür (10).

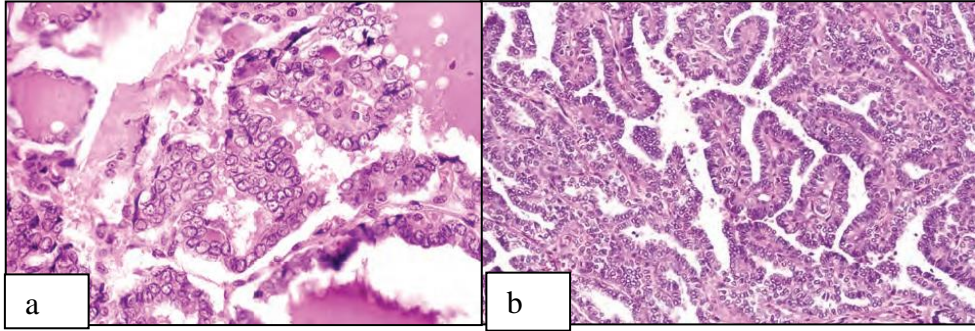
Makroskobik değerlendirmede soliter ya da multifokal olabilir. Bazıları iyi sınırlı ya da kapsüllü iken bazıları çevre parankimi infiltre edebilir. Kesit yüzeyi sert, granüler görünümündedir. Tümör boyutu değişken olup ortalama 2-3 cm çapındadır. Tümör fibrozis ve kalsifikasyon içerebilir, kistik alanlar görülebilir.

Mikroskobik incelemede tek ya da çok katlı küboid epitelle çevrili fibrovasküler koron izlendiği dallanan papillalar görülür (Resim 5). Papilla uzun, düz ya da dallanmış olabilir. Papilla kuru gevşek bağ dokusu ve ince duvarlı kan damarları içerir. Bu papillalar hiperplazi alanında görülenlerden farklı olup daha komplekstir ve yoğun fibrovasküler kor içerirler.

PTK'nın nükleer özellikleri; boyut ve şekil değişiklikleri, membran düzensizlikleri, kromatin özellikleri olmak üzere üç grupta toplanabilir. Boyut ve şekil

değişikliği olarak nükleer genişleme, uzama ve üst üste binme görülebilir. Nükleer konturlar düzensizdir. Nükleer membran kalınlaşır. Nükleus ince, dağınık kromatin içermekte olup açık ya da boş görünüm kazanır, buzlu cam ya da Orphan Annie nükleusu adı verilir(Resim 5). Sitoplazmik invaginasyon nedeniyle intranükleer inklüzyon (psödoinklüzyon) ve intranükleer groove görülür.

Papilla yokluğunda PTK tanısı nükleer özelliklerine göre yapılır. Tümör hücrelerindeki nükleer özellikler tümör çevresindeki normal tiroid dokusu ile kıyaslanarak en iyi şekilde değerlendirilebilir. PTK'da sitoplazma genelde hafifçe eozinofiliktir. Klasik PTK'da mitotik figürler nadirdir veya yoktur. Fokal alanda solid veya trabeküler büyüme paterni görülebilir, PTK'nın nükleer özellikleri olduğu için bu tümörler undiferansiye veya az diferansiye tümör olarak değerlendirilmemelidir (9) (10).



Resim 5: Papiller tiroid karsinomu: a) Orphan Annie nükleus (100xHE) b) papilla (40xHE)

Konsantr kalsifiye yapılar psammom cisim olarak isimlendirilir ve papilla kuru ile birlikte sıklıkla görülür. Özellikle papiller büyüme paternli tümörlerde siktir. Psammom cisim FTK ve MTK'da görülmez. Fokal veya yaygın skuamöz metaplazi PTK'da yaygındır, %20-40 vakada görülür. Belirgin fibröz stroma özellikle ilerli evrede sık görülür. Sekonder kistik değişiklikler yaygındır (9) (10).

PTK hücrelerinde Tiroglobulin, Pax-8 ve Sitokeratinler ile (Pansitokeratin, CK7, CAM 5.2, AE1/ AE3) immun reaksiyon görülür. Bu hücreler CK20, Kalsitonin ve nöroendokrin markerlar ile negatiftir. Galectin-3, HBME-1, CK19 ve CITED1 immunboyalari ile PTK'nın benign lezyonlardan ayriminda mikroskopik özelliklerin yanında kullanılabilir. Membranöz HBME-1 boyaması daha spesifiktir, tipik olarak klasik PTK'da görülür, FVPTK'da daha az sıklıkla görülür. Galectin-3 ise nükleer ve sitoplazmik boyanmalıdır, çoğu klasik PTK'larda görülür. Ayrıca Hashimoto tiroiditi

gibi benign reaktif hücrelerde de görülebilir. CK19 ise en az spesifik tümör markeri olarak değerlendirilir(10).

Lenfatik invazyon siktir, ancak kan damarı invazyonu yaygın değildir. İzole servikal lenf nodu metastazının varlığının prognoz üzerinde önemli etkisi yoktur, prognoz genelde iyidir. Servikal lenf noduna metastaz vakaların yarısına yakınında görülür. Tanı anında hematogen metastaz görülen az sayıda vakada metastaz genelde akciğerde görülür (9) (10).

PTK'da prognoz çok iyidir, 10 yıllık yaşam %95'in üzerindedir. %5-20 hastada lokal, bölgesel rekürrens, %10-15 hastada uzak metastaz görülür. Yaş (>40), ekstratiroidal invazyonun varlığı ve uzak metastaz kötü prognostik faktörlerdir (9).

PTK vakalarının çoğunda genetik mutasyon MAPK sinyal yolu aktivasyonuna neden olurlar. Nokta mutasyonları vakaların %75'inde görülür (BRAF V600E ve NRAS mutasyonu gibi), %25 vakada gen füzyonları görülmektedir, tekrar sayısındaki değişikliklerin %7 vakada tümörojenik rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer organlardaki karsinomlara kıyasla papiller karsinom daha az sayıda mutasyon içermekte olup daha stabil bir genoma sahiptir. Klasik PTK ve tall cell varyant PTK'da görülen BRAF V600E mutasyonu PTK'daki en yaygın mutasyondur, kodon 600'de valin-glutamat değişikliği ile oluşur. Daha az sıklıkla BRAF değişiklikleri K601E nokta mutasyonu, AKAP9-BRAF füzyonu ve kodon 600 çevresinde insersiyon ve delesyonlar şeklinde görülebilir. BRAF mutasyonunun varlığı kötü prognostik faktördür. BRAF mutasyonu kolon kanserleri, melanom, hairy cell lösemide de görülebilir.

RAS geninde (NRAS, HRAS, KRAS) mutasyon da PTK'da yaygındır. Bunların çoğu FVPTK'dır. NIFTP'de de RAS mutasyonu görülebilir. EIF1AX mutasyonu da FVPTK'da sık görülen diğer bir mutasyondur. Kromozomal yeniden düzenlenme ile PTK'da en sık olarak RET geninde füzyon oluşur ve RET/PC rearrangement olarak adlandırılır. Bunun dışında sırasıyla NTRK3, NTRK1 ve ALK genlerinde füzyona yol açan yeniden düzenlenme PTK'da sık olarak görülür. Yeniden düzenlenme genç hastalarda radyasyon ile ilişkili papiller karsinomlarda yaygındır. PTK'nın progresyonu AKT1, PI3K ve TP53 gibi genlerdeki mutasyonların birikimiyle oluşur. TERT mutasyonu (C228T ve C250T) ileri evre PTK'larda görülür ve yüksek rekürrens riski, uzak metastaz ve tümöre bağlı mortaliteyle ilişkilidir. PTK'nın tümör profili değişebilir. Son yıllarda BRAF V600E mutasyonu sabit kalmış veya klasik PTK'larda hafif

yükselmiştir, RAS mutasyonunda ise keskin bir yükseliş vardır, RET/PC rearrangement ise düşme eğilimindedir.

Gen ekspresyon profillerine göre PTK'lar BRAF V600E-benzeri ve RAS-like benzeri olmak üzere iki gruba ayrılır. BRAF V600E-benzeri tümörler, klasik papiller morfoloji gösterir (Klasik PTK veya tall cell varyant PTK), BRAF V600E mutasyonu ya da RET/PC, NTRK1/3 füzyonu gibi yeniden düzenlemeler siktir, MAPK sinyal yolağında aktivasyon artar, foliküler hücre fonksiyon ve metabolizmasını içeren 16 genin ekspresyonuna dayanarak belirlenen tiroid diferansiyasyon skorları düşüktür ve heterojen moleküler profile sahiptir.

RAS-like tümörler ise foliküler büyüme paterni gösterirler ve %80'inden fazlası kapsüllüdür. RAS mutasyonu, EIF1AX mutasyonu ve V600E dışındaki BRAF mutasyonları siktir, MAPK sinyal yolağında düşük derecede aktivasyon, yüksek tiroid diferansiyasyon skorları, homojen moleküler profil görülür.

PTK'da genelde öploid DNA görülür ve kromozomal değişiklikler az miktarda görülür. Anöploid; tall cell varyant, yüksek-grade özelliği ve agresif hastalıkla ilişkilidir.

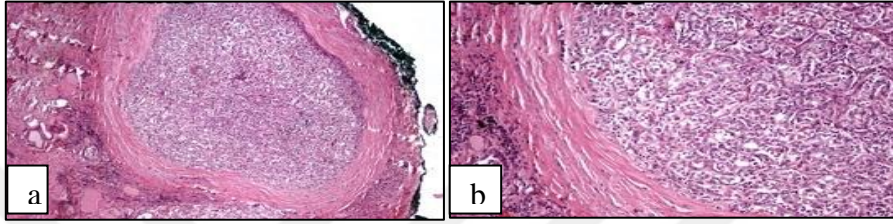
PTK'ların yaklaşık %5'i otozomal dominant geçişli 5q21'de lokalize APC geninde germ-line mutasyonun görüldüğü familyal adenomatöz polipozis sendromu ile ilişkilidir. Bu hastaların %1-2'sinde tiroid karsinomu gelişir(PTK ve özellikle kribriform-morular varyant). PTK ilişkili diğer herediter kanser sendromları Carney kompleksi ve Werner sendromudur (9) (10).

PTK'nın çok sayıda histolojik varyantı vardır. En sık olanı Foliküler varyant papiller tiroid karsinomudur (FVPTK).

3.2.2.5.1. Foliküler Varyant Papiller Tiroid Karsinomu (FVPTK)

Bu tümörlerin neredeyse tamamı foliküler büyüme paternine sahiptir, fakat PTK'nın nükleer özelliklerini gösterirler (Resim 6). Bu tümörler enkapsüle ve infiltratif olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Enkapsüle olanlar daha iyi prognoza sahiptir. Genetik değişiklikler klasik PTK'ya göre bazı farklılıklar göstermektedir.RET/PTC rearrangement daha azdır, BRAF mutasyonu farklı spektrumdadır ve daha azdır, RAS mutasyonu oldukça yüksektir. Nadiren bazı FVPTK'larda (makrofoliküler varyant)

nodüler hiperplaziye benzer kistik dilate neoplastik foliküller görülebilir. Bazı vakalarda normal foliküller arasında neoplastik foliküller dağınık olarak görülebilir. Difüz/multinodüler varyant adı verilen bazı FVPTK'larda ise nodül yapısı oluşmadan tüm tiroid glandında difüz tutulum olabilir. Papiller tiroid karsinom grubunda yer almalarının nedeni, klasik PTK benzeri servikal lenf nodu metastazı yapabilmeleri, nodal metastaz bölgelerinde sıklıkla papiller yapı göstermeleri, foliküler karsinomlardan daha çok papiller karsinoma benzer keratin tiplerini eksprese etmeleri olarak gösterilebilir.



Resim 6: FVPTK a)HEX4 b)HEX10

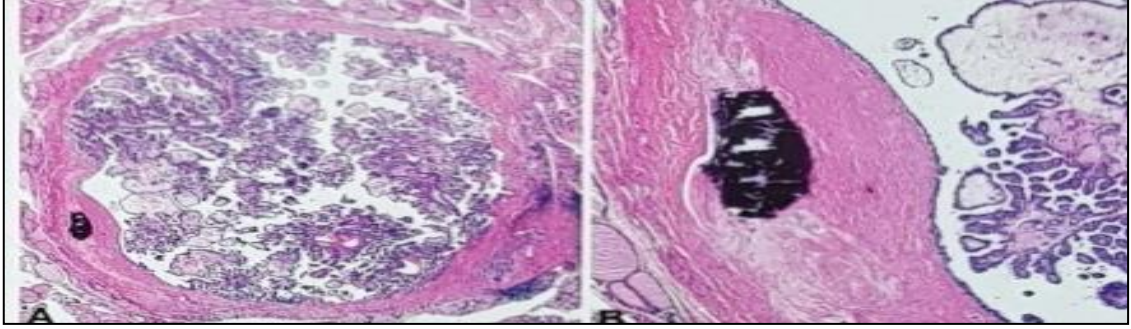
3.2.2.5.2. Papiller Mikrokarsinom

Tümör boyutu 1 cm'in altındadır. Bu varyanta okült sklerozan karsinom, okült papiller karsinom ve non-enkapsüle sklerozan tümör isimlere verilmiştir. Son zamanlarda ise papiller mikrotümör ismi önerilmiştir. Çeşitli serilerde otopsi materyallerinde insidansı %5.6-35.6 arasındadır. Boyutları küçük olduğu için bu tümörler makroskopik değerlendirmede fark edilemeyebilir. Mikroskopik olarak irregüler, skar benzeri görünümü vardır. Neoplastik hücreler periferde daha yoğun olarak izlenmektedir. Bazı tümörler kalın bir fibröz kapsülle tamamen çevrili olabilir, fokal kalsifikasyon görülebilir. PTK'nın tipik nükleer özellikleri, fibrozis, psammom cisimleri, bazen iyi forme papillalar saptanır. Prognoz çok iyidir. Bir seride hastada takiplerinde uzak metastaz görülmemiştir. BRAF mutasyonu olan vakalarda malign davranış gösterebilirler (10).

3.2.2.5.3. Enkapsüle Varyant PTK

Bu varyant kapsamındaki tümörler PTK benzeri sitolojik ve yapısal özelliklere sahip olup tamamen fibröz bir kapsülle çevrilidir.(Resim 7). Kapsül intakt olabilir, fokal

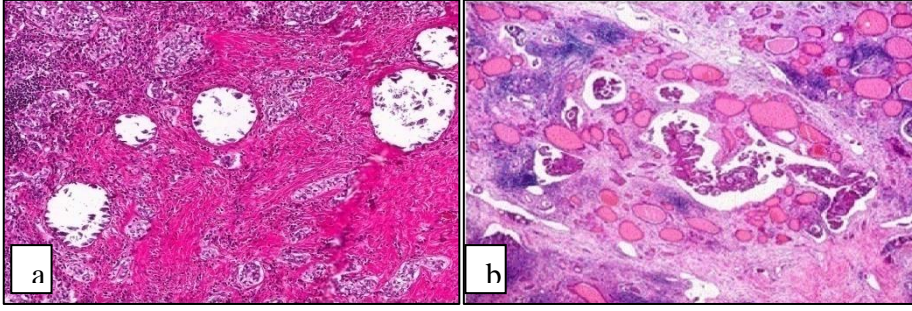
olarak tümör infiltrasyonu görülebilir. Tüm PTK vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturur. Prognosu çok iyidir. Bölgesel lenf nodu metastazı görülebilir, ancak hematogen metastaz nadirdir. Ayırıcı tanıda papiller hiperplazili foliküler adenom yer alır, PTK benzeri nükleer değişikliklerin yokluğu ile ayrılır (10).



Resim 7: Enkapsüle Varyant PTK a)HEx40 b)HEx100

3.2.2.5.4. Difüz Sklerozan Varyant PTK

Kadınlarda, 2. ve 3.dekadda daha sık görülen nadir bir varyanttır. Klinik olarak difüz büyümüş tiroid glandı ile başvururlar. Serum antitiroglobulin yüksekliği ve antimikrozomal antikorlar nedeniyle Hashimoto tiroiditini taklit edebilirler, sert olması nedeniyle Riedel tiroiditini taklit edebilir. Histolojik olarak zeminde kronik lenfositik tiroiditin izlendiği, çok sayıda psammom cisminin görüldüğü tüm glandda ya da tek lobülü difüz olarak tutan yoğun skleroz görülür (Resim 8). Tümör adaları solid olup skuamöz metaplazi içerebilir. Tümör hücreleri intratroidal lenfatik boşlukları yoğun olarak infiltre eder ve ekstratroidal yayılım eğilimi mevcuttur. Değişken oranda Tiroglobulin, TTF-1 ve CK-19 ile immun reaktivite görülür. RET/PTC rearrangement sıklıkla vardır, ancak BRAF mutasyonu nadirdir. Klasik PTK'ya kıyasla yüksek oranda ekstratroidal yayılım, servikal lenf nodu metastazı ve uzak metastaz görülmektedir. Uzak metastaz öncelikle akciğer olmak üzere %10-15 oranında vardır. Hastalısız yaşam süresi daha kısadır. Daha genç yaşta hastaları etkilemesinin olumlu etkisine bağlı olarak 10 yıllık hastalığa spesifik yaşam oranı %93'tür (10).

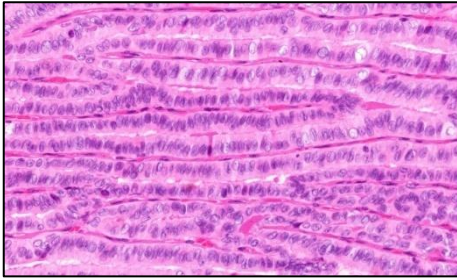


Resim 8: Difüz Sklerozan PTK a)HEx20 b)HEx40

3.2.2.5.5. Tall Cell Varyant PTK

Onkositik benzeri (abondan, eozinofilik) sitoplazma izlenen, boyu genişliğinin 2 ya da 3 katı olan tümör hücreleri içermektedir. PTK'nın tipik nükleer özellikleri vardır, psödoinklüzyonlar kolaylıkla seçilir (Resim 9). Tanı için tall cell hücrelerinin tüm tümör hücrelerinin %30'una eşit veya %30'undan fazla olması gerekir. Yaşlı hastalarda görülür.

Ekstratiroidal yayılım ve metastaz sıklığı klasik PTK'dan fazla olduğu için agresif varyant olarak değerlendirilir. Sadece tall-cell alanlar içerse ve ekstratiroidal yayılım olmasa bile prognoz PTK'dan daha kötüdür. Radyoaktif iyot tedavisine dirençli tiroid karsinomu grubundadır. Sıklıkla BRAF mutasyonu ve TERT promotor mutasyonu sıklıkla bulunur (10).



Resim 9: Tall Cell Varyant PTK (HEx40)

3.2.2.5.6. Kolumnar Hücreli Varyant PTK

Psödostratifiye kolumnar hücrelerin izlendiği nadir bir varyanttır. Klasik PTK'nın nükleer özellikleri yoktur. Psödostratifiye epitelle döşeli papilla veya gland benzeri boşluklar görülür. Tümör hücrelerinde endometrioid ya da intestinal adenokarsinomu andıran açık sitoplazma ve subnükleer vakuolüzyon görülebilir. CDX-2 ile immunreaktivitesi metastatik kolon karsinomu ayırımını zorlaştırır, ancak

TTF-1 pozitifdir. Prognoz sitolojik özelliklerinden çok enkapsülasyon veya infiltratif yapıya bağlıdır. İyi sınırlı tümörler indolent biyolojik davranış gösterirken, yaygın ekstratiroidal invazyon varlığı kötü prognozu gösterir (10).

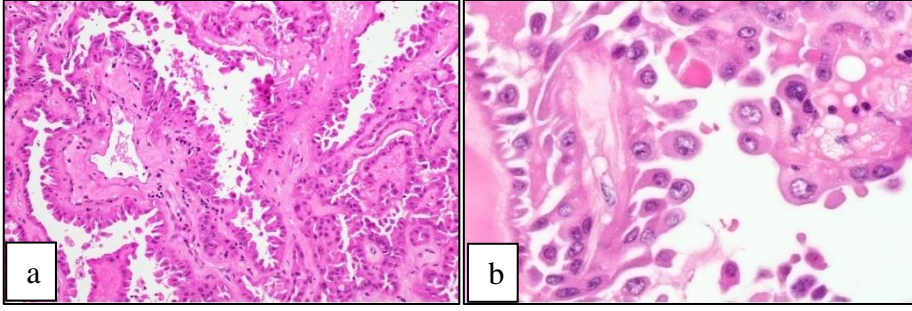
3.2.2.5.7. Kribriform-Morular Varyant PTK

Familiyal adenomatöz polipozis sendromunun bir parçası veya sporadik olarak görülebilir. Özellikle kadınlarda görülür. Sporadik vakalar soliter iken familiyal adenomatöz polipozis sendromuyla ilişkili olanlar multifokaldir. Sıklıkla enkapsüledir. Genelde kribriform, foliküler, papiller, trabeküler, solid büyüme paterni ile yuvarlak skuamatoid yapılar (morula) karışık halde izlenir. Kapsüler veya vasküler invazyon sıklıkla görülür. Papillalar kolumnar hücre ile döşeli olup kolloid sıklıkla yoktur. Çekirdekler berrak değildir, değişken derecede groove ve psödoinklüzyon içerir. Morula biotin birikimi sonucunda berrak nükleus içerebilir. Bu varyantta TTF-1 yamalı pozitifdir, Tiroglobulin ise sıklıkla fokal ve zayıf pozitifdir. Nükleer beta-catenin boyanması bu varyantın karakteristik özelliğidir. Bir vakada fokal nöroendokrin diferansiasyon tanımlanmıştır (10).

3.2.2.5.8. Hobnail Varyant PTK

%30'tan fazla tümör hücresinde hobnail özelliklerin görüldüğü nadir varyanttır. Eozinofilik sitoplazmalı, apikal lokalize nükleusların görüldüğü, belirgin nükleollü, nükleus/sitoplazma oranının düşük olduğu ve selüler kohezyon kaybının izlendiği foliküler hücrelerle çevrili kompleks papiller ve mikropapiller yapıların izlendiği nadir bir varyanttır (Resim 10).

Hobnail özelliklerle birlikte foliküler ya da küme yapmış büyüme paterni olabilir. Psammom cisimler mevcuttur ancak çok sayıda değildir. Nekroz, mitoz, atipik mitoz, anjiolenfatik invazyon ve ekstratiroidal yayılım yaygındır. Rekürrens, lenf nodlarına ve uzak organlara metastaz sıktır. Neoplastik hücreler klasik PTK'ya benzer immunohistokimyasal özellikler gösterirler; TTF-1 sıklıkla pozitifdir, Tiroglobulin değişken oranlarda pozitifdir, p53 ile çekirdeklerin %25'inden fazlasında pozitif boyanma izlenir. Ortalama ki-67 proliferasyon indeksi %10'dur. En yaygın genetik değişiklik BRAF V600E mutasyonu olup bunu TP53 mutasyonu takip eder (10).



Resim 10: Hobnail Varyant PTK a)HEx20 b)HEx60

3.2.2.5.9. Fibromatöz/ Fasciit Benzeri Stroma İçeren PTK

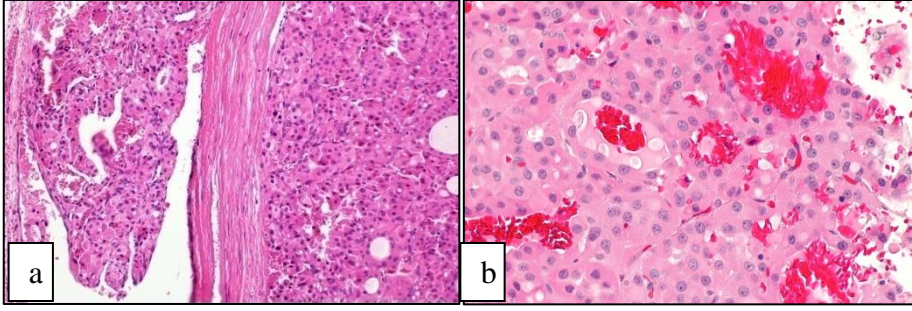
Nodüler fasciit, fibromatozis ve diğer proliferatif myofibroblastik hastalıkları taklit eden abondan ve selüler stroma içeren nadir PTK vakalarıdır (10).

3.2.2.5.10. Solid/Trabeküler Varyant PTK

Solid ve trabeküler büyüme paterninin görüldüğü odaklar PTK'da sık değildir. Bu patern pediatrik tümörlerde daha siktir. Tümörün tamamında veya neredeyse tamamında diğer varyantların hiçbiri görülmediğinde 'solid varyant' terimi kullanılır. Solid, trabeküler ya da insüler bir görünüm vardır. Papiller karsinomların %1-3'ünü oluşturmaktadır. Genç hastalarda görülür ve sıklıkla iyonize radyasyon maruziyeti öyküsü vardır. Sıklıkla akciğer metastazı görülür. Mortalite oranı yetişkinlerde biraz daha yüksektir (%10). Pediatrik ve radyasyonla ilişkili vakalarda sıklıkla RET/PTC3 füzyonu ile birlikte, yetişkinlerde görülmez. Bu varyant benzer büyüme paterni görülen fakat PTK'nın nükleer özelliklerini göstermeyen, nekroz ve yüksek mitotik aktivitenin görüldüğü az diferansiye tiroid karsinomlarından ayrılmalıdır. Bazı çalışmalarda yetişkinlerde görülen solid varyantı baskın olan PTK'ların klasik PTK'lardan daha agresif prognozu olduğu saptanmıştır, ancak diğer çalışmalarda ise bu agresif davranış saptanmamıştır (10).

3.2.2.5.11. Onkositik Varyant PTK

Saf formu oldukça nadirdir. Onkositik hücre sitolojisi gösteren papiller tümörler sıklıkla enkapsüle fakat invaziv görünümde olurlar(Resim 11). Tall cell varyant PTK'dan bu varyantın ayrımı yapılmalıdır (10).



Resim 11: Onkositik Varyant PTK a) Vasküler invazyon (HEx10) b) HEx40

3.2.2.5.12. İğsi hücreli Varyant PTK

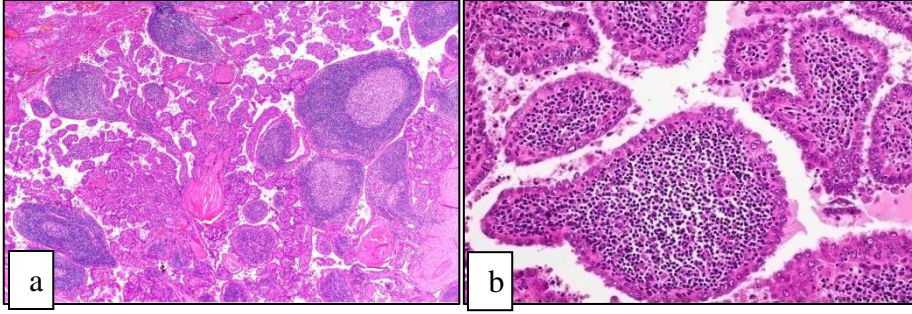
Bazen papiller tiroid karsinomlarında fokal alanlarda iğsi hücreli metaplazi görülebilir. Bu alanlar tümörün %5 ile %95'ini oluşturabilir. Bu hücreler epitelyal orijinli olup sitokeratin ve TTF-1 ile boyanırlar. İğsi hücreler hemoraji ve hemosiderin ile birlikte değildir, bölgesel dağılım göstermezler. Bu özellikleri ile İİAB sonrası görülen reaktif değişikliklerden ayırt edilirler. Anaplastik karsinomdan ayırımında ise sakin iğsi hücre morfolojisi, mitoz ve nekrozun yokluğu yardımcı olur (10).

3.2.2.5.13. Berrak Hücreli Varyant PTK

Oldukça nadir bir varyanttır. Sıklıkla onkositik sitolojinin izlendiği tümör hücreleri ile birlikte görülür. Bu varyant berrak hücreli medüller karsinomdan, intratiroidal paratiroid proliferasyonundan ve metastatik renal karsinomundan ayırt edilmelidir. TTF-1, Kromogranin ve Sinaptofizin gibi nöroendokrin markerlar ve EMA bu ayırmda yardımcı olabilen immunhistokimya boyalarıdır (10).

3.2.2.5.14. Whartin-like Varyant PTK

Bu varyantta yer alan tümörler iyi sınırlı olup nadiren enkapsüledir. Tükrük bezi kaynaklı Whartin Tümörü benzeri histolojik özellikler gösterirler. Papillayı çevreleyen tümör hücreleri eozinofilik ve geniştir. Papilla korunda ise belirgin lenfoplazmositik infiltrasyon vardır (Resim 12). Sıklıkla zeminde kronik lenfositik tiroidit (Hashimoto tiroiditi) vardır, bu nedenle tümör gözden kaçabilir. Bazılarının santrali kistik görünümündedir. Bu patern metastatik lenf nodlarında da görülür. Bu varyantın prognozu klasik PTK'da görülen aynı boyut ve evredeki tümörlere benzerdir (10).



Resim 12: Whartin-like PTK a) HEx4 b)HEx10

3.2.2.6. Medüller Tiroid Karsinomu (MTK)

Tüm tiroid tümörlerinin %2-3'ünü oluşturur. %70 sporadik olup kadınlarda biraz sıktır. Sporadik vakalar 5-6. dekatta daha yaygındır, kalıtsal olan vakalar ise biraz daha genç yaştaadır. %30'u ise kalıtsaldır ve RET protoonkogeninde otozomal dominant geçişli germ-line mutasyon görülür (MEN 2A, MEN2B, ailesel MTK).

C hücrelerinin normalde yoğunlaştığı tiroid lobunun üst ve orta bölgelerinde sıktır. Çoğu hastada sintigrafide soğuk olarak saptanan ağrısız tiroid kitlesi görülür. Tiroid nodülü mevcut olduğunda %70 hastada servikal lenf nodu metastazı mevcuttur, %10 hastada ise uzak metastaz vardır. Yaygın lokal tümör büyümesine bağlı olarak üst hava yolu hasarı ve disfaji gelişebilir. Serum kalsitonin seviyesi tümör büyüklüğü ile orantılıdır, <%1 vakada ise sekresyonu görülmez. CEA ise bu hastaların takibinde kullanılan en önemli markerdir, özellikle düşük kalsitonin seviyesinde yardımcıdır. Bazı vakalarda serotonin, ACTH ve vazoaktif intestinal peptid (VIP) gibi diğer polipeptid hormonların salınımı görülebilir (9) (10).

Makroskopik olarak büyüklüğü 0.1 cm ile tüm lobu kaplayacak büyüklük arasında değişken aralıkta görülür. Sporadik vakalarda tek, keskin sınırlı, kapsül izlenmeyen, gri-sarı renkli 2-3 cm çapta lezyon görülür. Kalıtsal vakalarda ise bilateral ve multisentriktir. Familial sendromlu hastalara yapılan profilaktik tiroidektomi materyallerinde tümör makroskopik olarak görülemeyebileceği için tamamı incelenmelidir. 1 cm'nin altındaki tümörler medüller tiroid mikrokarsinomu olarak isimlendirilir.

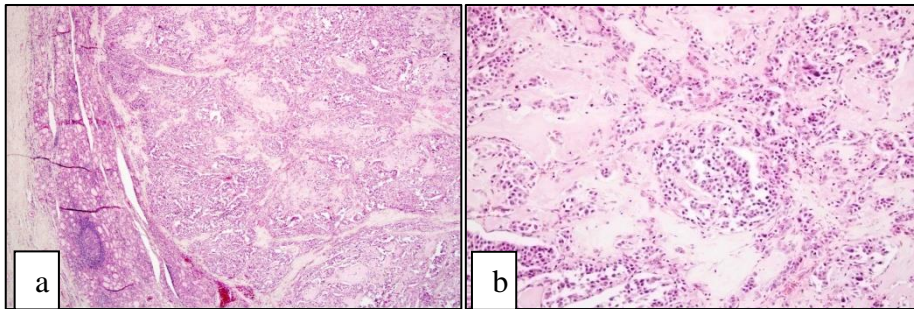
Mikroskopik olarak çeşitli histolojik görünümler saptanabilir. Solid, trabeküler, insüler büyüme paterni izlenebilir. Tümör hücre çekirdeğinin boyutları değişken olup,

oval, iğsi, poligonal veya plazmositoid şekilli olabilirler. Nükleuslar genelde kaba kromatin ve küçük nükleolus içerirler. Orta derecede pleomorfizm vardır. Çoğu tümörde mitotik aktivite düşüktür. Sitoplazma ince granüler görünümde ve eozinofiliktir. Bazı vakalarda müsin pozitif vakuoller ve psammom benzeri cisimler görülebilir. Vakaların %90'ında stromal amiloid depozitleri görülür (Resim 13). MTK'da ise kalsitonin ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid genelde pozitiftir. TTF-1, kromogranin ve sinaptofizin çoğu vakada pozitiftir. Pax-8 değişken ve zayıf boyanır. Tümör hücrelerinde tiroglobulin negatiftir. CEA ise çoğu vakada pozitiftir (10).

Tümör hücrelerinin stromadan artifisyel olarak ayrı gruplar oluşturduğu psödopapiller patern sıklıkla görülür. Foliküler varyant, iğsi hücreli varyant, dev hücreli varyant, berrak hücreli varyant, onkositik varyant, melanotik varyant, skuamöz varyant, küçük hücreli varyant bu tümörlerde görülebilen diğer paternlerdir.

Sporadik vakalarda %40-60 somatik RET mutasyonu görülür. MEN2B hastalarının %98'inde germ-line mutasyon olarak görülen ekzon 16'da M918T mutasyonu, sporadik vakalarda en yaygın somatik mutasyondur. Papiller karsinomda görülen RET /PTC translokasyonu gibi kromozomal yeniden düzenlemeler MTK'da görülmez. RAS ailesine ait mutasyonlar sporadik MTK'larda değişken oranlarda mevcuttur. RAS ve RET mutasyonu yokluğunda RET füzyonu (MYH13-RET) sporadik MTK'larda görülebilir. ALK füzyonları (GFPT1-ALK VE EML4-ALK) bu tümörlerde bazı vakalarda izlenmiştir (9) (10).

Ekstratiroidal yayılım, postoperatif yüksek kalsitonin seviyeleri kötü prognozla ilişkilidir. RET mutasyonu prognozda önemlidir. RET M918T mutasyonu olan vakalar daha agresiftir. RAS mutasyonu olan sporadik MTK'ların RAS mutasyonu olmayanlardan daha az agresif olduğu görülmüştür (10).



Resim 13: Medüler Tiroid Karsinomu a)HEx40 b)HEx200

3.2.2.7. Anaplastik Tiroid Karsinomu(ATK)

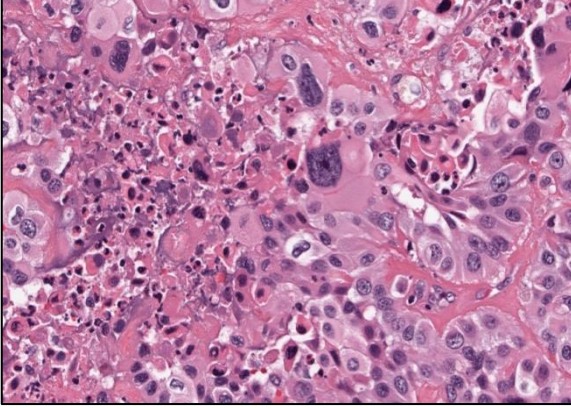
Tiroid tümörlerinin %5'inden azını oluştururlar. Hastalar hızlı büyüyen sert, fikse geniş infiltratif boyun kitleleri ile başvururlar. Ağrı, ses kısıklığı, nefes darlığı ve disfaji yaygın semptomlardır. ATK'lar de novo gelişebilirler ya da yaygın olarak iyi diferansiye papiller veya foliküler karsinomun dediferansiasyonu sonucunda oluşurlar. Yaklaşık %30-40 hastada uzak metastaz mevcuttur, metastaz sıklıkla akciğer, kemik ve beyinde görülür. Tüm anaplastik tümörler evre IV olarak değerlendirilirler (9) (10).

Makroskobik olarak büyük, infiltratif kitleler görülür. Kesit yüzleri açık kahve renkte etsi kıvamda olup hemoraji ve nekroz alanları görülür.

Mikroskobik incelemede sarkomatoid, dev hücreli ve epitelyal olmak üzere üç patern görülebilir. Bunların kombinasyonu da olabilir. Sarkomatoid formda, yüksek grade pleomorfik sarkomda görülen özellikleri taşıyan malign işsi hücreler görülür. Epiteloid formda geniş, eozinofilik sitoplazmalı, skuamöz, koheziv tümör hücre tabakaları görülür. Dev hücreli formu oluşturan hücreler oldukça pleomorfik malign hücreler olup çok çekirdekli olabilirler (Resim 14). ATK'da akut iltihabi hücre infiltrasyonu, tümörü infiltre eden makrofajlar, kemik ve kıkırdak gibi heterolog elemanlar ile osteoklast benzeri multinükleer dev hücreler görülür. Anaplastik tiroid karsinomunda immunhistokimyasal incelemede TTF-1 ve tiroglobulin genelde negatiftir. Vakaların yarısında Pax-8 pozitifdir. Pozitif sitokeratin ekspresyonu epitelyal kökenli oluşunu destekler, fakat sitokeratinin negatif olması tanıyı dışlamaz. Lenfoma ve melanomdan ayırmada CD45 ve diğer lenfoid markerlar ile melanositik markerlar kullanılır (10).

En sık görülen genetik değişiklik TP53 mutasyonudur, vakaların %30-70'inde görülür. Vakaların %20'sinde BRAFV600E mutasyonu, %20'sinde RAS geninde değişiklikler (NRAS, KRAS veya HRAS), %10-20'sinde PI3K mutasyonu ve %10-15'inde PTEN mutasyonu görülür. ATK'da epigenetik ve mikroRNA değişiklikleri de raporlanmıştır. TP53 geninde inaktivasyon ve β -catenin aktive edici mutasyon anaplastik karsinomun agresif davranışıyla ilişkilidir (9)(10).

ATK'nın prognozu kötüdür, %90'ın üzerinde mortalitesi vardır. Çoğu vakada ölüm agresif büyüme ve boyundaki vital yapılara kompresyon nedeniyle 1 yıl içinde görülür (9)(10).



Resim 14: Anaplastik Tiroid Karsinomu (HEX200)

3.2.2.8. Az Diferansiye Tiroid Karsinomu

Az diferansiye tiroid karsinomu foliküler hücre yönünde sınırlı diferansiasyonun izlendiği bir foliküler hücreli neoplazidir. Morfoloji ve davranış olarak anaplastik karsinom ve diferansiye karsinomlar (papiller ve foliküler) arasındadır. Tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %1.8'ini oluştururlar. Hastaların ortalama tanı yaşı 55-63 olarak saptanmıştır. Kadınlarda erkeklere oranla bir miktar daha fazla görülür. Uzun süreli guatr varlığı, iyot eksikliği etyoloji ile ilişkilidir. Radyasyon maruziyeti ile ilişki saptanamamıştır. Bazı tümörler foliküler karsinom veya papiller karsinomda (özellikle FVPTK'da) diferansiasyon kaybı sonucu gelişmektedir, diğerleri de novo gelişir.

Hastalar genelde büyük, tek tiroid kitlesi ile başvururlar. %15 vakada uzak metastaz vardır. Ultrasonografik incelemede homojen ve hipoekojen görünürler. Genelde sintigrafide soğuk olarak görülüp PET (+) olarak değerlendirilirler.

Vasküler invazyon %60-90 vakada görülür. %15-65 vakada bölgesel lenf nodu metastazı görülür. Uzak metastaz ise %40-70 hastada en sık akciğer ve kemik olmak üzere görülmektedir.

Makroskobik değerlendirmede ortalama tümör boyutu 5 cm'dir. Solid görünümde olup gri-kahve renktedir. Nekroza ait yumuşak ve sarı renkte alanlar görülebilir. Tümör bazen kısmen kapsüllü olarak saptanabilir. Tümör kapsülüne uzanım sıktır ve cerrahi sınırlar genelde pozitifdir. Ekstratiroidal yayılım anaplastik karsinomdan daha az oranda görülür (10).

Mikroskobik olarak bu antitenin prototipik formu olan insüler karsinomda mikrofolikül içeren solid adalar ve tabakalar görülür. Tümör hücreleri küçük, uniform, yuvarlak, oval ve hiperkromatik nükleus içerirler. Kıvrımlı nükleus varlığı papiller karsinomu taklit edebilir.

Mitoz yaygındır. Yaygın nekroz izlenebilir. Diğer tümörlerde de mitoz ve nekroz görülür, fakat hücreler daha büyük ve pleomorfiktir. Bunlar genelde solid ve/veya trabeküler büyüme patterni gösterirler. 2006 yılında bu tümörün histopatolojik tanısına algoritmik yaklaşım için Turin kriterleri kabul edilmiştir:

1. Foliküler hücre kaynaklı olduğunun saptanması
2. Solid, trabeküler veya insüler büyüme paterni
3. PTK'nın klasik nükleer özelliklerinin olmaması.
4. Aşağıda sıralanan üç özellikten en az birinin varlığı; kıvrımlı nükleus, $\geq 3/10$ BBA, tümör nekrozu (10).

Artmış mitoz ve nekrozun varlığı kötü prognozu gösterir. Ayırıcı tanıda medüller tiroid karsinomu, paratiroid karsinomu ve tiroid bezine karsinom metastazı yer alır (10).

Tiroid karsinogenesinde erken dönemde RAS ailesinde mutasyon, BRAF mutasyonu ve ALK füzyonu saptanırken geç dönemde tümör dediferansiasyonu TP53, TERT, CTNNB1 ve AKT1 mutasyonu ile ilişkilidir. Az diferansiye tiroid karsinomunda mutasyon yükü, iyi diferansiye papiller karsinom ve anaplastik tiroid karsinomu arasındadır.

≥ 45 yaş, ≥ 5 cm tümör boyutu, ekstratiroidal yayılım varlığı, uzak metastaz, tümör nekrozu, RAS geninde mutasyon ve miR-150 ekspresyonunda azalma kötü prognozu gösterir (10). Normal tiroid folikül hücrelerinde sitokeratinler, tiroglobulin, TTF-1, Pax-8, bcl-2, p21 ve p27 ile immun pozitiflik mevcuttur, ancak p53 ve siklin D1 ile immun reaksiyon görülmez. Ayrıca, ki67 proliferasyon indeksi %3'ün altındadır. İyi diferansiye tiroid karsinomlarında sitokeratinler, tiroglobulin, TTF-1, Pax-8 ve bcl-2 ile immun pozitiflik mevcut olup p21, p27 ve siklin D1 ile değişken oranda pozitiflik izlenmiştir. P53 negatiftir. Ki-67 proliferasyon indeksi %10'un altındadır. Az diferansiye tiroid karsinomlarında tiroglobulin pozitifliği düşer, sadece perinükleer boyanma görülebilir. Ki-67 proliferasyon indeksi %10-30 arasındadır. Anaplastik tiroid karsinomlarında tiroglobulin, TTF-1, bcl-2, p21 ve p27 genelde negatif olup ki-67 proliferasyon indeksi %30'un üzerindedir (Tablo 3). Az diferansiye tiroid karsinomlarında yüksek molekül ağırlıklı keratinler pozitifdir (CK7 genelde pozitif, CK20 ise negatiftir. Bazı vakalarda CK7 ekspresyon kaybı da görülebilir).

Tablo 3: Tiroid foliküler hücre diferansiasyonunda saptanan yaygın immunhistokimya markerları(10)

	Sitokeratinler	Tiroglobulin	TTF-1	Pax-8	Ki-67	Bcl-2	P53	Siklin D1	P21 ve p27
Normal tiroid foliküler hücreleri	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<%3	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif
İyi diferansiye tiroid karsinomu	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<%10	Pozitif	Negatif	Değişken Pozitiflik	Değişken Pozitiflik
Az diferansiye tiroid karsinomu	Pozitif	Pozitiflik seviyesinde azalma	Pozitif	Pozitif	%10-30	Genelde Pozitif	Fokal Pozitif	Pozitif	Fokal pozitif
Anaplastik tiroid karsinomu	Pozitif (fokal/zayıf/heterojen)	Negatif (fokal/zayıf olabilir)	Genelde Negatif	Genelde Pozitif	>%30	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif

3.3. MikroRNA (mi-RNA)

mi-RNA, tek sarmallı 19-23 nükleotidli küçük RNA'lardır. Sinyal iletimi, hücre diferansiasyonu, regülasyon gibi biyolojik ve metabolik yolların önemli bir parçasıdır. mi-RNA'lar kodlamayan RNA'lardır, DNA'dan transkripte olan ancak proteine dönüşümü yapılmayan genler ile kodlanmaktadır. mi-RNA'lar gen ifade kontrolünü hedef genin mRNA'sına düşük özgüllükte bağlanarak mRNA yıkımı ve translasyonun inhibisyonuna neden olarak yapar (73)

Gen ekspresyonunu düzenleyen en önemli moleküllerden biri olup tüm insan genomunun 1/3'ü mi-RNA'lar ile hedeflenebilir. Disregülasyonu ise tümör oluşumu ve gelişiminde önemlidir. (1).

İlk olarak 1993 yılında Lee ve ark. tarafından keşfedilmiştir (69), mi-RNA terimi ise ilk defa 2001'de kullanılmaya başlamıştır (70). mi-RNA ve kanser ilişkisini ise, 2002 yılında Calin ve ark. göstermiştir. Andy Fire ve Craig Mello, RNA interferans çalışması ile mi-RNA'nın çalışma prensipleri belirtilmiş olup 1998 yılında yayınlamıştır, ardından 2006 yılında Nobel tıp ödülünü kazanmıştır (71). Günümüze kadar yaklaşık 2000'den fazla mi-RNA keşfedilmiştir (72).

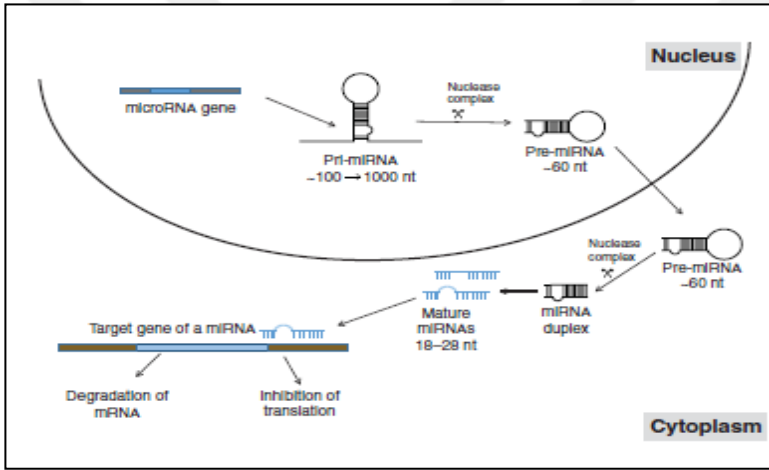
mi-RNA, mRNA'dan daha stabildir ve plazma/serumda kolaylıkla saptanabilir. mi-RNA frozen doku, formalin fiksasyonlu dokular, İİAB, kan plazma/ serum ve idrar gibi birçok doku spesmeninde stabil kalır. RNA ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalarda, formalin fiksasyonlu dokularda elde edilen başarılı amplifikasyonlar küçük fragmanlarla sınırlı kalmıştır. Lisa Arzt ve ark. FineFix, RCL-2 ve HOPE olmak üzere üç formalinsiz alternatif fiksatif kullanarak yaptıkları moleküler çalışmada, formalin ile karşılaştırıldığında, alternatif fiksasyonun ve fiksasyonsüresinin elde edilen mi-RNA miktarını etkilemediğini saptamıştır (65). Önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (66,67,68). Formalin fiksasyonu RNA degradasyonuna yol açmaktadır, fakat ortaya çıkan fragmanlar saptanabilmekte olup boyutlarının küçük oluşu nedeni ile miRNA'ların formalin fiksasyonundan negatif olarak etkilenmedikleri belirtilmektedir.

Dört metotla mi-RNA ekspresyonu analiz edilebilir: Mikroarray, Quantative reverse transcription PCR(qRT-PCR), High-througput sequencing(RNA-seq), Digital PCR (dPCR) (36).

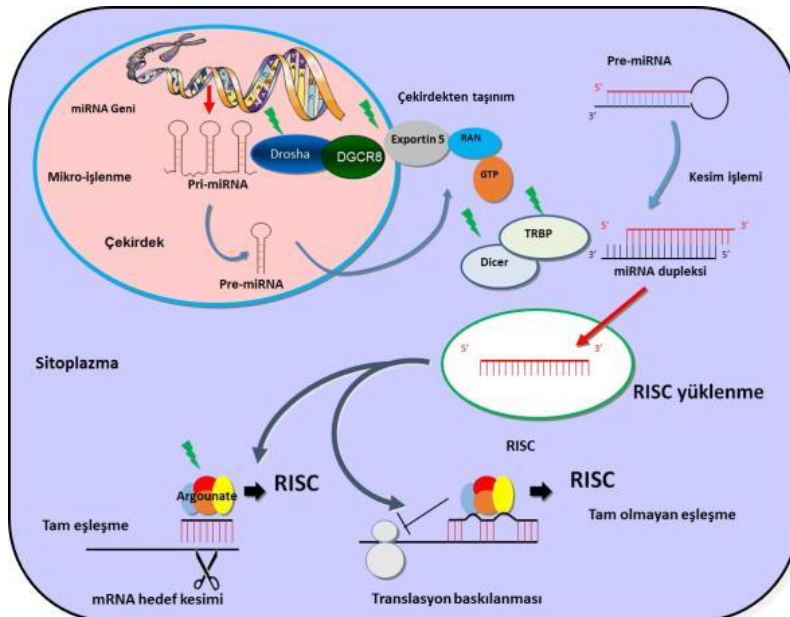
mi-RNA'lar tüm genomda kodlanırlar. mi-RNA'lar uzun birincil transkript (pri-miR) şeklinde edilebilirler; fakat sıklıkla sıklıkla protein kodlayan genlerin intronlarında yer alırlar (49, 75). Endojen DNA'dan RNA polimeraz II ile başında MGpppG kepi ve poliadenilat kuyruğu olan pri-miRNA transkriptlerinin nükleusta reaksiyonu ile mi-RNA transkripsiyonu başlar. RNA polimeraz III (Drosha) enzim kompleksi ile pri-mi-RNA transkriptinden kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan mikroprosesör yardımıyla pre-mi-RNA oluşur (76). Pre-mi-RNA ortalama 60-70 nükleotid içermekte olup sitoplazmaya RAN-GTP ve Exportin 5 ile aktırılır. Pre-mi-RNA'dan Dicer adlı bir RNaz III enzimi ile mi-RNA dupleks'i oluşturulur. Bu dupleks 21-24 nükleotid içermektedir (77). Olgun diziyeye kesilecek olan iplik mi-RNA, RNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RISC)'de Argonaute'a yüklenir. mi-RNA'nın 2-8 nükleotidlik çekirdek dizisi hedef mRNA ile tam olarak eşlendiğinde, hedef mRNA'ya sıklıkla kodlama sekansı veya açık okuma çerçevesindeki bölgelerden bağlanarak mRNA'nın destabilizasyonu ile translasyon indüklenir; fakat tam olarak eşlenmediği zaman hedef mRNA'ya genelde 3'UTR bölgesinden bağlanarak translasyon baskılanmaya neden olur (78, 79, 80) (Şekil 3).

3.3.1. RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi (RISC) Yapısı

Matür mi-RNA, RISC yapısının bir komponenti olarak mRNA'ya tam ya da kısmen bağlanarak mRNA'dan protein sentezini önler. Pre-mi-RNA, sitoplazmada yer alan bir endonükleaz olan Dicer ile matür mi-RNA'ya dönüşür. Ayrıca, Dicer mi-RNA'nın asıl fonksiyonundan sorumlu olan RISC yapısının oluşumunu başlatmaktadır. Matür mi-RNA, RISC yapısına tek zincir halinde katılır. Matür mi-RNA, RISC yapısında yer alan ve hedefi kesen endonükleazlar olan Argonaute ailesi proteinleri aracılığıyla işlevini gerçekleştirir. mi-RNA'lar yalnızca hedefi bulup RISC yapısını bu hedefe yönlendirirler, fakat translasyonu baskılayan RISC yapısında yer alan diğer proteinlerdir.



Şekil 2: mi-RNA biyogenezi



Şekil 3: Genel mi-RNA yolağı

3.3.2. Tümör Supresör Gen ve Onkogen Olarak mi-RNA

mi-RNA gen ekspresyonunu iki şekilde etkiler: mRNA'nın bölünmesi ve translasyonun baskılanması (Şekil 2). Tamamlayıcı mi-RNA yeterliyse mRNA bölünür. Yeterli değilse translasyon baskılanır. mi-RNA, mRNA translasyonunda upregulasyonun parçasıdır. Hücre döngüsünde translasyon aktivasyon ve baskılanması sırasında mi-RNA değişebilir. Spesifik mi-RNA overekspresyonunda tümör supresör gen azalması, spesifik mi-RNA downregulasyonunda onkogen ekspresyon artışı olur (1)

Bazı kanserlerde ekspresyonu azalan mi-RNA'lar tümör baskılayıcı mi-RNA'lar, ekspresyonu artan mi-RNA'lar ise onkogenik mi-RNA'lar olarak değerlendirilmektedir. Tümör baskılayıcı mi-RNA'ların azalan ekspresyonu, onkogen ekspresyonlarında artışa ve tümör gelişmesine yol açar. mi-RNA ekspresyon artışı ya da azalması tümör oluşumuna yol açabileceği için bunlara 'onkomir' adı verilmiştir.

Tümör supresör görevi olan mi-RNA'nın delesyonu veya azalması ile tümör oluşur. Bu miRNA'nın biyogenezi sırasında delesyonu veya azalması ile matür mi-RNA hedef mRNA'ya bağlanamayacağından ilgili translasyon gerektiği yerde durdurulamaz ve onkoproteinler oluşur. Sonuç olarak proliferasyon artışı, invazyon, angiogenez, apoptozisin durması, hücre diferansiasyonu azalması ile tümör gelişir.

Onkogenik görevi olan mi-RNA'nın ekspresyon artışı ile artmış mi-RNA düzeyi, mi-RNA ile hedef mRNA arasında yer alan tümör supresör ilişkisini bozarak tümör gelişimine neden olabilir. Ayrıca artmış olgun mi-RNA, hedef mRNA'ya açık okuma çerçevesinden bağlanarak promotorbölgesini harekete geçirip onkogen oluşumunu indükleyebilir.

miRNA-kanser ilişkisi Calin ve ark. tarafından kronik lenfositik lösemili (KLL) hastaların %50' sinde 13q14 bölgesinde delesyon saptanan moleküler çalışma ile gösterilmiştir. Bu bölgede miR-15a ve miR-16-1 genleri tespit edilmiş olup KLL hastalarının %68'inde miR-15a ve miR-16-1 ekspresyonunda azalma saptanmıştır (74). Lenfomalarda bulunan özellikle upregulasyonu sağlayan mi-RNA'lar, farelerde 50 gün içinde tümör geliştirerek yaklaşık iki hafta sonra mortaliteye neden olmuşlardır (81). Farklı bir çalışmada, iki tip mi-RNA'nın mRNA'ya bağlanarak gen aktivitesine etki eden proteinlerin sentezini engelleyerek hücre çoğalmasını düzenleyen E2F1 proteininin inhibisyonu gösterilmiştir (82).

Normal büyüme, proliferasyon, diferansiasyon ve apoptozis, düzenli mi-RNA transkripsiyonu ile hedef mRNA'ya bağlanma sonucunda protein translasyonunun baskılanması ile gerçekleşir.

mi-RNA kodlayan 217 genin etkinliği ölçülerek farklı kanser tipleri için ayırt edici sonuçlar bulunmuştur. Kanserlerde mi-RNA profillemesi ile kanserlerin sınıflaması ve özgün tedavi planlanması açısından yardımcı olabileceği gösterilmiştir (83).

3.3.3. mi-RNA'nın Tiroid Karsinomlarındaki Rolü

Normal dokuya kıyasla tiroid kanserlerinde mi-RNA'ların %32'si upregüle olurken, %38'i ise downregüle olur. Aynı tiroid hücresi kaynaklı farklı tip tiroid kanserlerinde mi-RNA ekspresyon profili önemli derecede değişkendir.

Normal dokuya kıyasla tiroid tümörlerindeki benzersiz mi-RNA ekspresyon profili tanı ve tedavide kolaylık sağlayabilir.

Tiroid kanserlerinin farklı tiplerinin prognozunu daha doğru bir şekilde belirlemede mi-RNA ekspresyon profilleri yardımcı olabilir. PTK, benign ve normal doku ayırımında kan dolaşımındaki miR-146b ekspresyonunun kullanışlı serolojik marker olabileceği gösterildi (35).

Paskas ve ark. benign/ malign ayırımını belirlemek için 62'si benign 120 vakanın İİAB materyallerinde 4 markerlı panel (BRAFV600E mutasyonu, miR-221, miR-222, galectin-3 protein) kullanmıştır. %73.5 sensitivite ve %89.8 spesifite elde etmiştir (37). Panebianco ve ark. İİAB de malign/ benign ayırımına karar verilemeyen 118 PTK vakasında doğru tanıyı sağlayan istatistiksel bir model geliştirdi. İki mi-RNA ve iki gen içeren panel kullanıldı: miR-146b ,miR-222, KIT, TC1 (38).Stokowy ve ark. İİAB de karar verilemeyen mutasyon negatif tiroid nodüllerini daha iyi sınıflayabilmek için 44 İİAB spesmeni kullanarak iki mi-RNA markerı tanımlamıştır: miR-484, miR-148b-3p. %89 sensitivite ve %87 spesifite elde edilmiştir (39).

Nikiforova ve ark. çeşitli tiroid tümörlerine ait 62 İİAB örneğinde; miR-146b, miR-155, miR-187, miR-197, miR-221, miR-222 ve miR-224'de 2 katın üzerinde overekspresyon saptamışlardır. Kanser saptama sensitivitesi %100, spesifite %94'tür(19).Kitano ve ark.154 İİAB örneğinde; miR-7, -126, and -374a and let-7g

değerlendirilmiştir. Benign/malign ayrımında sadece miR-7 gerçekten yeterli görülmüş. Sensitivite %100, spesifite %20, pozitif prediktif değer %25, negatif prediktif değer %100'tür (44). Sitolojide karar verilemeyen 120 IIAB vakasında; miR-221/222 kümesi ile BRAF V600E mutasyonu ve galectin-3 protein ekspresyonu değerlendirilmiş ve postoperatif histopatolojik tanı ile karşılaştırılmıştır. %73.5 sensitivite, %89.8spesifite ve %75.7 doğruluk elde edilmiştir (37). Başka bir çalışmada serumda tirod karsinomlarında miR-181a-5p diğer karsinomlara (meme, akciğer,kolon) ve kontrol grubuna göre önemli yükselme görülmüştür (47).

Keutgen ve ark. tiroid nodüllerinde benign/malign ayrımında sitolojide karar verilemeyen, 14'ü sonradan histopatolojik değerlendirme ile malign tanısı alan 29 vakada; miR-222, miR-328, miR-197 ve miR-21 içeren panel kullanarak %86 doğruluk oranına ulaşmıştır (52). Mazeh ve ark. 11' i sitolojide karar verilemeyen 77 IIAB vakasında; miR-21, miR-31, miR-146b, miR-187, miR-221 and miR-222 kullanarak tiroid nodüllerinde benign/malign ayrımında %90 doğruluk, %100 spesifite elde edilmiştir (53).

Çalışma grubunda Bethesda I-VI kategoride 95 IIAB vakası ile-kontrol grubundan 59 IIAB vakası dahil edilerek yapılan bir çalışmada miR-7, miR-126, miR-374a and miR-let-7g kullanarak %100 sensitivite, %20 spesifite, %25 pozitif prediktif değer, %100 negatif prediktif değer görülmüştür (54).

Shen ve ark. karar verilemeyen 60 IIAB vakasında; miR-146b, miR-221, miR-187 (upregulasyonu) ile miR-30d (downregulasyonu) değerlendirilmiş olup 56/60 vakada histopatolojik tanı ile uyumlu sonuç elde edilmiştir. Tanısal doğruluk %93.3'tür. Ancak, 30 AUS/FLUS kontrol IIAB grubunda tanısal doğruluk düşüktür; bu grupta malign PTK saptama %94.4, malign FTK saptama %62.5 olarak görülmüştür (55).

Dettmer ve ark. miR-23b seviyesi tiroid karsinom rekurrensinde bağımsız ve önemli faktör olarak saptamıştır ve miR-150 tiroid karsinom ile ilişkili ölümlerle bağlantılı olarak bulunmuştur (57).

miR-144 tiroid kanserlerinde downregüle olur. miR-144 tiroid kanserlerinde tümör supresör gen gibi davranır ve terapotik potansiyeli vardır (1).

4.MATERYAL VE METOD

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında 2014-2019 yılları papiller tiroid karsinom tanılı 96 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Tiroidektomi materyallerinde papiller tiroid karsinomu tanısı alan olgulara ait bloklar çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaya ait tümörlü bloğun tükenmemesi için İİAB'ye ait hücre blokları ve küçük biyopsi materyalleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Her vakaya ait HE boyalı kesitler iki araştırmacı tarafından ilk tanıyı bilmeksizin yeniden değerlendirilmiştir. Parafin bloklar kullanılarak yapılacak olan RT PCR işlemi Prof. Dr. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

miR-146b, miR-221, miR-222, ve miR-21'i içeren panel kullanılmıştır. Eş zamanlı metastatik olan ve olmayan papiller tiroid karsinom olguları çalışmaya dahil edilmiştir. Her olguya ait arşivimizde bulunan parafin bloklar üzerinden RT PCR yöntemiyle mi-RNA profillerinin saptanması için parafine gömülü tümöral alanlar izole edilmiştir. Doku deparafinize edildikten sonrakit protokolüne uygun olarak mi-RNA izolasyonu miRNeasy FFPE kit kullanılarak gerçekleştirilmiş olup ardından MiRcury LNA RT Kit kullanılarak cDNA elde edilmiştir. Hedef mi-RNA'lar uygun primer ve probalar yardımıyla, RT PCR'da analiz edilmek üzere çoğaltılmıştır. Hedef mi-RNA'lar internal kontrol SNORD 48 ile normalize edilerek ΔCT değerleri bulunmuştur. Gruplar arası değişim ise $\Delta\Delta CT$ değerlerinin hesaplanması ardından $2^{-\Delta\Delta CT}$ işlemi sonucu kat değişimi olarak belirlenmiştir. Örneklerin %10'u randomize olarak seçilmiş ve tekrarları yapılmıştır.

Olguların yaş, cinsiyet, materyalin alınma şekli, tümör lokalizasyonu, tümörün histolojik tipi, saptanan en büyük tümör çapı, tiroid kapsül invazyonu, tümör kapsül invazyonu varlığı, nekroz varlığı, tümör içinde ve dışında lenfosit infiltrasyonu, tümör içinde ve dışında fibrozis varlığı, ekstrapiroidal yayılım, damar invazyonu, cerrahi sınırlar, multisentrite, C hücre hiperplazisi, lenf nodu diseksiyonunda metastatik lenf nodu sayısı, metastatik lenf nodlarında perinodal invazyon, evre, miR-146b, miR-221, miR-222, miR-21 ekspresyon profilleri değerlendirilmiştir.

4.1. mi-RNA Analizi

4.1.1. Kullanılan Materyaller

- Ksilen
- Deparafinizasyon ön yıkama solüsyonu
- Absolü alkol
- Tüp (2×50), toplama tüpleri (2×50)
- 1.5 ml'lik ependorf (DNase, RNase Free)
- 0.5 ml'lik ependorf (DNase, RNase Free)
- 96 Well PCR Plate (USA Scientific)
- PCR Plate Film (USA Scientific)
- DNase, RNase Free Water
- MiRNeasy FFPE Kit (50) toplam 2 adet; ürün kodu:217504 (Qiagen)
- MiRcury LNA RT Kit toplam 2 adet; ürün kodu: 339340 (Qiagen)
- MiRcury LNA MiRNA PCR assay toplam 5 adet; ürün kodu:339306 (Qiagen)
- MiRcury LNA Green PCR Kit toplam 2 adet; ürün kodu: 339346 (Qiagen)
- Light Cyclor 480 II (Roche)
- Nanodrop 2000 (Thermo Fisher)

4.1.2. mi-RNA İzolasyonu

Formalin fiksasyonlu parafin bloklarından elde edilen doku örnekleri öncelikle steril iğne ucu ile kazınarak 1,5 ml ependorf tüplere alındı. Ardından tüm doku örnekleri hassas terazi ile 25 mg doku miktarı olacak şekilde tartılarak farklı tüplere alındı. Dokuların üzerine 150 ul Buffer PKD eklenerek vortekslendi. 3 dakika 56°C de inkübe edildikten sonra 10 saniye vortekslendi ve 13.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Örneklerin üzerine 10 ul proteinaz K eklenerek pipetaj yapıldı. 15dakika 56°C ardından 15 dk 80°C' de inkübasyon sonrası örnekler yeni tüpe aktarılarak 3 dakika buz üzerinde bekletildi. 15 dk 13.000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni tüpe aktarıldı. 10 ul DNAase I ve 16 ul DNA Booster bufferı örnekler üzerine eklenerek iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra 320 ul RBC Buffer eklendi ve 1120 ul %100 Etanol konularak iyice pipetaj yapıldı. Sonrasında kolonlara 700 ul transfer edildi ve 10 000 g' de 15 sn santrifüj edildi. Bütün örnek tükenene kadar işlem tekrar edildi.

500 ul RPE buffer kolona eklenerek 10 000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Tekrar 500 ul RPE buffer kolona eklenerek 10 000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar yeni 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne geçirilerek 5 dk 13.000 g'de santrifüj edildi. Son olarak 20 ul RNAase free su eklenerek 1 dk 13.000 g'de santrifüj yapıldı. Sonuçta elde edilen mi-RNA -80 °C'de saklandı.

4.1.3. mi-RNA'ların ölçülmesi ve eşitlenmesi

RNA örnekleri -80 °C'den çıkartılarak çözündürüldü. İzole edilen total mi-RNA konsantrasyonları Nanodrop 2000 (Thermo Fisher) cihazında ölçüldü. 260 nm'deki OD oranı hesaplanarak RNA'nın saflık derecesi bulundu. RNA saflığı 260/230 değerinin 2.0+- 0.2 aralığında olan örnekler çalışmaya dahil edildi ve örnekler bir sonraki aşamada kullanılmak üzere 5ng/ul'ye eşitlendi.

4.1.4. cDNA Protokolü

cDNA için MiRcury LNA RT Kit ile protokole uygun reaksiyon gerçekleştirildi. Bunun için;

- 5x miRCURY RT Reaction Buffer 2 ul
- RNAase Free water 4,5 ul
- 10x miRCURY RT Enzyme Mix 1 ul
- Synthetic RNA Spike-ins 0,5 ul
- RNA template 2 ul

Reaksiyon karışımı örnek sayısına uygun olarak hazırlandı. 60 dk 42°C, 5 dk 95°C protokolde PCR cihazına konularak Revers Transkriptaz reaksiyonu gerçekleştirildi. İşlem sonrası cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

4.1.5. mi-RNA Ekspresyon Tayini

Reaksiyon karışımı miRcury LNA mi-RNA PCR Assay kiti ile protokole uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

- 2x miRCURY SYBR Green Master Mix 5 ul
- ROX Reference Dye 0,5 ul
- PCR primer mix 1 ul
- cDNA template 0,5 ul
- RNase-free water 1 ul

Sonrasında hedef miRNA'ların ekspresyonları Roche Light Cycler 480 II cihazı ile tayin edilmiştir.

4.2. İstatistiksel Analiz

Yaptığımız çalışmada istatistiksel yöntem olarak SPSS programı kullanılarak Student T ve Ki Kare testleri ve diğer gerekli istatistik testler kullanılmıştır. P değeri 0.05'ten küçük durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar, uygun istatistiki yöntemler ile analiz edilmiş olup ve tümörün metastatik olan/olmayan ayrımının yapılmasında kullanılacak mi-RNA profilleri çıkartılmıştır.



5.BULGULAR

Çalışmamızda yer alan 96 vakanın 73'ü klasik tipte PTK, 8'i FVPTK, 6'sı onkositik varyant PTK, 1'i Whartin like varyant PTK, 1'i kribriform morular varyant PTK, 1'i hobnail varyant PTK, 6'sı tall cell varyant PTK tanılıdır (Tablo 4). Bunların 17'si(%17.7) erkek, 79'u (%82.3) kadındır. Hastaların yaş aralığı 10 ve 71 arasında olup yaş ortalaması ise 41.7'dir.

PTK tanılı 4 vakada da lenf nodu diseksiyonu yapılmış olup lenf nodu metastazı saptanmamıştır..Vakaların 4 tanesi hazır blok revizyonu olup lenf nodu diseksiyonunda metastatik lenf nodu saptanmış vakalardır, diğer 92 vaka ise bölümümüz arşivine aittir.

Tablo 4: Vakaların tanı dağılımı

	PTK	PTK+LN	
Klasik PTK	33 (%34.3)	40 (%41.6)	73 (%76.04)
FVPTK	4 (%4.1)	4 (%4.1)	8 (%8.3)
Onkositik varyant PTK	4 (%4.1)	2 (%2.08)	6 (%6.2)
Whartin like varyant PTK	0 (%0)	1 (%1.04)	1 (%1.04)
Kribriform morular varyant PTK	0 (%0)	1 (%1.04)	1 (%1.04)
Hobnail varyant PTK	1 (%1.04)	0(%0)	1(%1.04)
Tall cell varyant PTK	6 (%6.2)	0(%0)	6 (%6.2)
Total			96 (%100)

Erkek hastaların 8'inde lenf nodu metastazı saptanmış, ancak 9'unda metastaz izlenmemiştir. 79 kadın hastanın 40'ında lenf nodu pozitif olup 39'unda metastaz görülmemiştir (Tablo 5).

Cinsiyet, tümör kapsülü varlığı, tümör kapsül invazyonu, tümör lokalizasyonu, tümör çapı, ekstrasitroidal yayılım, lenfatik invazyon, damar invazyonu, multisentrite açısından metastatik ve metastatik olmayan PTK'larda anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 8).

Tümör içinde fibrozis varlığı metastatik lenf nodu açısından anlamlı bulunmuştur (Tablo 7) ($p < 0.05$).

Tablo 5: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-1

		Cinsiyet				Total
		Erkek	Kadın			
Grup	PTK	9 (%9.3)	39 (%40.6)			48 (%50)
	PTK+ LN	8 (%8.3)	40 (%41.6)			48 (%50)
Total		17	79			96 (%100)
		Sağ lob	Sol lob	Istmus	Bilateral	Total
Grup	PTK	16 (%16.6)	9 (%9.3)	15 (%15.6)	8 (%8.3)	48 (%50)
	PTK+ LN	15 (%15.6)	15 (%15.6)	13 (%13.5)	5 (%5.2)	48 (%50)
Total		31 (%32.2)	24 (%25)	28 (%29.1)	13 (%13.5)	96 (%100)
		Tümör çapı				Total
		1 cm altı	1 cm ve üzeri			
Grup	PTK	7 (%7.2)	41 (%42.7)			48 (%50)
	PTK+ LN	8 (%8.3)	40 (%41.6)			48 (%50)
Total		15 (%15.6)	81 (%84.3)			96 (%100)

Tablo 6: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-2

		Tümör kapsülü					Total
		tamamı kapsüllü	Yok	Kısmen kapsüllü			
Grup	PTK	8 (%8.3)	33 (%34.3)	7 (%7.2)			48 (%50)
	PTK+ LN	2 (%2.08)	35 (%36.4)	11 (%11.4)			48 (%50)
Total		10 (%10.4)	68 (%70.8)	18 (%18.7)			96 (%100)
		Tümör kapsülü varsa kapsül invazyonu					Total
		Tümör kapsülü yok	Tümör kapsülü var, kapsül invazyonu yok	Tümör kapsülü var, fokal invazyon var			
Grup	PTK	36 (%37.5)	9 (%9.3)	3 (%3.1)			48 (%50)
	PTK+ LN	30 (%31.2)	16 (%16.6)	2 (%2.08)			48 (%50)
Total		66 (%68.7)	25 (%26.04)	5 (%5.2)			96 (%100)

Tablo 7: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-3

		Tümör içinde lenfosit infiltrasyonu					Total
		Var	Yok				
Grup	PTK	11 (% 11.4)	37 (% 38.5)				48 (%50)
	PTK+ LN	12 (% 12.5)	36 (% 37.5)				48 (%50)
Total		23 (% 23.9)	73 (% 76.04)				96 (% 100)
		Tümör dışında lenfosit infiltrasyonu					Total
		Var	Yok				
Grup	PTK	19 (% 19.7)	29 (% 30.2)				48 (%50)
	PTK+ LN	23 (% 23.9)	25 (% 26.04)				48 (%50)
Total		42 (% 43.7)	54 (% 56.2)				96 (% 100)
		Tümör içinde fibrozis					Total
		Var	Yok				
Grup	PTK	7 (% 7.29)	41 (% 42.7)				48 (%50)
	PTK+ LN	29 (% 30.2)	19 (% 19.7)				48 (%50)
Total		36 (% 37.5)	60 (% 62.5)				96 (% 100)

Tablo 8: Klinik parametrelere göre vakaların dağılımı-4

		Ekstratiroidal yayılım					Total
		İnvazyon yok	Fokal invazyon var	Yaygın invazyon var			
Grup	PTK	36 (%37.5)	12 (%12.5)	0 (%0)			48 (%50)
	PTK+ LN	31 (%32.2)	13 (%13.5)	4 (%4.16)			48 (%50)
Total		67 (%69.7)	25 (%26.04)	4 (%4.16)			96 (%100)
		Lenfatik invazyon					Total
		Var	Yok				
Grup	PTK	4 (%4.16)	44 (%45.8)				48 (%50)
	PTK+ LN	4 (%4.16)	44 (%45.8)				48 (%50)
Total		8 (%8.3)	88 (%91.6)				96 (%100)
		Damar invazyonu					Total
		Var	Yok				
Grup	PTK	5 (%5.2)	43 (%44.7)				48 (%50)
	PTK+ LN	5 (%5.2)	43 (%44.7)				48 (%50)
Total		10 (%10.4)	86 (%89.5)				96 (%100)
		Multisentrite					Total
		Var	Yok				
Grup	PTK	18 (%18.7)	30 (%31.2)				48 (%50)
	PTK+ LN	17 (%17.7)	31 (%32.2)				48 (%50)
Total		35 (%36.4)	61 (63.5)				96 (%100)

Tümör çapı 1 cm altındaki tümörler, 1 cm ve üzerindeki tümörler ile kıyaslandığında miR-21, miR-221, miR-146b, miR222 açısından anlamlı fark bulunmamıştır, ancak 1 cm altındaki grup küçüktür (Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

Tablo 9: Tümör çapına göre nonmetastatik vakalar arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması

		miR-146b Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	2 (%4.2)	2 (%4.2)	4 (%8.5)	8 (%17)
	1 cm ve üzeri	11 (%23.4)	1 (%2.1)	27 (%57.4)	39 (%82.9)
Total		13 (%27.6)	3 (%6.3)	31 (%65.9)	47 (%100)
		miR-221 Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	1 (%2.2)	0 (%0)	7 (%15.9)	8 (%18.1)
	1 cm ve üzeri	10 (%22.7)	2 (%4.5)	24 (%54.5)	36 (%81.8)
Total		11 (%25)	2 (%4.5)	31 (%70.4)	44 (%100)
		miR-222 Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	5 (%12.1)	1 (%2.4)	2 (%4.8)	8 (%19.5)
	1 cm ve üzeri	11 (%26.8)	6 (%14.6)	16 (%39)	33 (%80.4)
Total		16 (%39)	7 (%17)	18 (%43.9)	41 (%100)
		miR-21 Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	2 (%4.1)	2 (%4.1)	4 (%8.3)	8 (%16.6)
	1 cm ve üzeri	11 (%22.9)	12 (%25)	17 (%35.4)	40 (%83.3)
Total		13 (%27)	14 (%29.1)	21 (%43.7)	48 (%100)

Tablo 10: Tümör çapına göre nonmetastatik vakalar ile metastatik lenf nodları arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması

		miR-221 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	6 (%13)	1 (%2.1)	1 (%2.1)	8 (%17.3)
	1 cm ve üzeri	25 (%54.3)	5 (%10.8)	8 (%17.3)	38 (%82.6)
Total		31 (%67.3)	6 (%13)	9 (%19.5)	46 (%100)
		miR-21 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	3 (%6.6)	2 (%4.4)	3 (%6.6)	8 (%17.7)
	1 cm ve üzeri	14 (%31.1)	6 (%13.3)	17 (%37.7)	37 (%82.2)
Total		17 (%37.7)	8 (%17.7)	20 (%44.4)	45 (%100)
		miR-146b PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	3 (%6.5)	2 (%4.3)	3 (%6.5)	8 (%17.3)
	1 cm ve üzeri	15 (%32.6)	5 (%10.8)	18 (%39.1)	38 (%82.6)
Total		18 (%39.1)	7 (%15.2)	21 (%45.6)	46 (%100)

Tablo 11: Tümör çapına göre metastatik vakalar ile metastatik lenf nodları arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması

		miR-221 met PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	6 (%13)	1 (%2.1)	1 (%2.1)	8 (%17.3)
	1 cm ve üzeri	25 (%54.3)	5 (%10.8)	8 (%17.3)	38 (%82.6)
Total		31 (%67.3)	6 (%13)	9 (%19.5)	46 (%100)
		miR-222 met PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	5 (%12.1)	1 (%2.4)	1 (%2.4)	7 (%17)
	1 cm ve üzeri	15 (%36.5)	7 (%17)	12 (%29.2)	34 (%82.9)
Total		20 (%48.7)	8 (%19.5)	13 (%31.7)	41 (%100)
		miR-21 met PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör çapı	1 cm altı	3 (%6.6)	2 (%4.4)	3 (%6.6)	8 (%17.7)
	1 cm ve üzeri	14 (%31.1)	6 (%13.3)	17 (%37.7)	37 (%82.2)
Total		17 (%37.7)	8 (%17.7)	20 (%44.4)	45 (%100)

Tümör içinde fibrozis ile metastatik PTK'larda, metastatik olmayan PTK'larında ve metastatik lenf nodlarında mi-RNA ekspresyon profilleri ile ilişki saptanmamıştır (Tablo 12, Tablo 13).

Tablo 12: Tümör içinde fibroze göre nonmetastatik vakalar arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması

		miR-146b Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	10 (%21.2)	1 (%2.1)	17 (%36.1)	28 (%59.5)
	Yok	3 (%6.3)	2 (%4.2)	14 (%29.7)	19 (%40.4)
Total		13 (%27.6)	3 (%6.3)	31 (%65.9)	47 (%100)
		miR-221 Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	9 (%20.4)	1 (%2.2)	17 (%38.6)	27 (%61.3)
	Yok	2 (%4.5)	1 (%2.2)	14 (%31.8)	17 (%38.6)
Total		11(%25)	2(%4.5)	31 (%70.4)	44 (%100)
		miR-222 Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	13 (%31.7)	5 (%12.1)	9 (%21.9)	27 (%65.8)
	Yok	3 (%7.3)	2 (%4.8)	9 (%21.9)	14 (%34.1)
Total		16 (%39)	7 (%17)	18 (%43.9)	41 (%100)
		miR-21 Tümörler arası			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Düşük eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	10 (%20.8)	9 (%18.7)	10 (%20.8)	29 (%60.4)
	Yok	3 (%6.2)	5 (%10.4)	11 (%22.9)	19 (%39.5)
Total		13 (%27)	14 (%29.1)	21 (%43.7)	48(%100)

Tablo 13: Tümör içinde fibroze göre metastatik vakalar ve metastatik lenf nodları arasında mi-RNA profillerinin karşılaştırılması

		miR-146b PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	12 (%26)	5 (%10.8)	12 (%26)	29 (%63)
	Yok	6 (%13)	2 (%4.3)	9 (%19.5)	
Total		18 (%39.1)	7 (%15.2)	21 (%45.6)	46 (%100)
		miR-221 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	23 (%50)	2 (%4.3)	3 (%6.5)	28 (%60.8)
	Yok	8 (%17.3)	4 (%8.6)	6 (%13)	
Total		31 (%67.3)	6 (%13)	9 (%19.5)	46 (%100)
		miR-222 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Düşük eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	14 (%34.1)	4 (%9.7)	8 (%19.5)	26 (%63.4)
	Yok	6 (%14.6)	4 (%9.7)	5 (%12.1)	
Total		20 (%48.7)	8 (%19.5)	13 (%31.7)	41 (%100)
		miR-21 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Düşük eks	
Tümör içinde fibrozis	Var	11 (%24.4)	5 (%11.1)	13 (%28.8)	29 (%64.4)
	Yok	6 (%13.3)	3 (%6.6)	7 (%15.5)	
Total		17 (%37.7)	8 (%17.7)	20 (%44.4)	45 (%100)

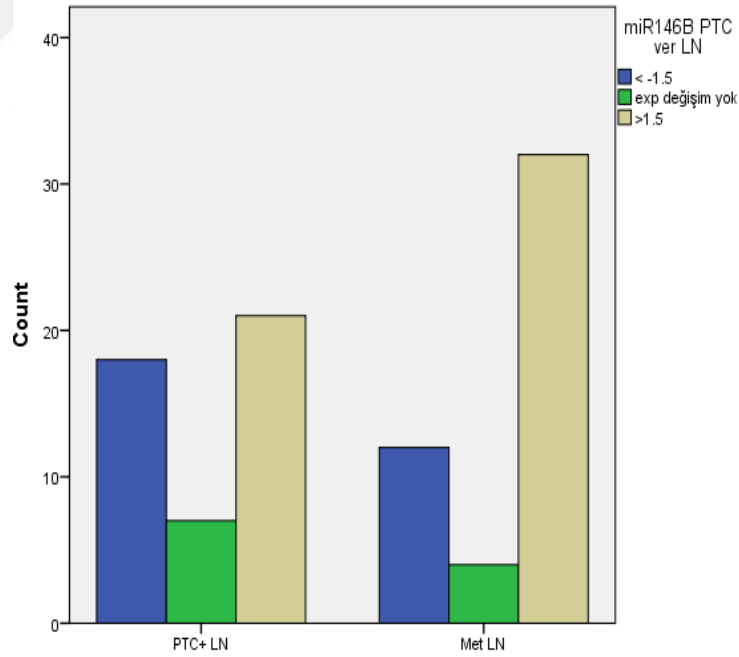
Erkek ve kadın cinsiyeti arasında tümör ve lenf nodu açısından bakıldığında mi-RNA yüksek ekspresyonu açısından anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

Metastatik olmayan tümörler, metastatik lenf nodları ve metastatik tümörler ile kıyaslandığında gruplar arasında ekspresyon profilleri açısından anlamlı fark elde edilememiştir ($p>0.05$).

Lenf nodu metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları kıyaslandığında miR-146b için metastatik lenf nodlarında düşük ekspresyonlu olanlar değişip 1.5 kattan daha yükseğe geçmektedir. Ki-kare değeri 4.26'dır, ancak anlamlılığa ulaşmamaktadır (Tablo 14, Şekil 4) (p=0.119).

Tablo 14: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-146b açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

		miR-146b PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Grup	PTK+ LN	18 (%19.1)	7 (%7.4)	21 (%22.3)	46 (%48.9)
	Met LN	12 (%12.7)	4 (%4.2)	32 (%34)	48 (%51)
Total		30 (%31.9)	11 (%11.7)	53 (%56.3)	94 (%100)

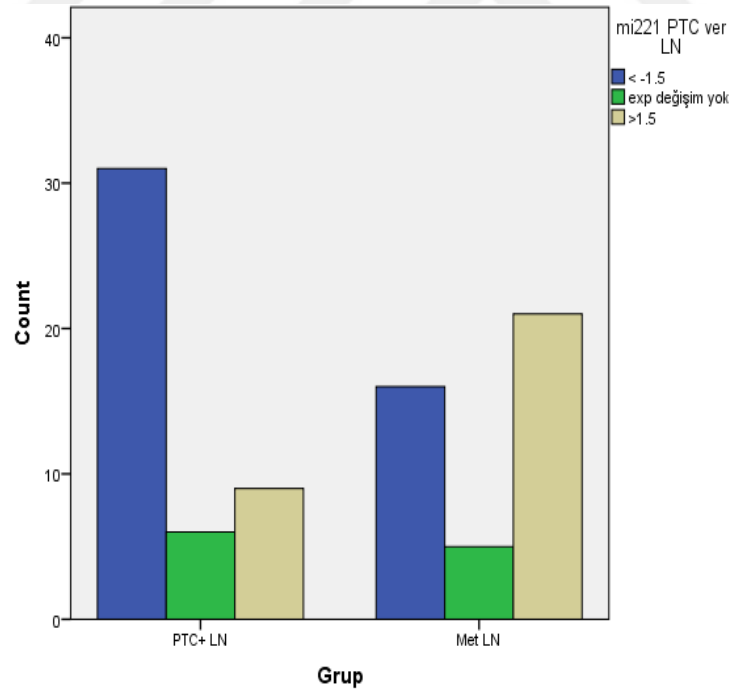


Şekil 4: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-146b açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

miR-221 açısından değerlendirildiğinde lenf nodu metastatik tümöre göre metastatik lenf nodunda düşük ekspresyondan artış belirgindir (Tablo 15, Şekil 5). Ki-Kare değeri 9.51 ve p değeri = 0.09.

Tablo 15: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-221 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

		miR-221 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Grup	PTK+ LN	31 (%35.2)	6 (%6.8)	9 (%10.2)	46 (%52.2)
	Met LN	16 (%18.1)	5 (%5.6)	21 (%23.8)	42 (%47.7)
Total		47 (%53.4)	11 (%12.5)	30 (%34)	88 (%100)

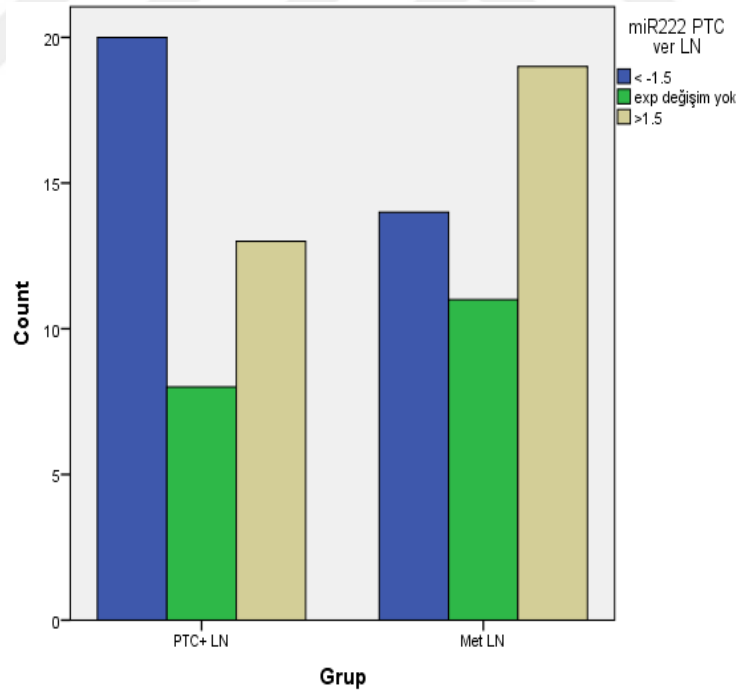


Şekil 5: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-221 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

miR-222 açısından ise metastatik lenf nodunda metastatik tümöre göre düşük ekspresyondan bir miktar artış olmasına rağmen anlamlılığa ulaşmamaktadır (Tablo 16, Şekil 6). Ki-kare değeri 2.55, p değeri= 0.27.

Tablo 16: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-222 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

		miR-222 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Grup	PTK+ LN	20 (%23.5)	8 (%9.4)	13 (%15.2)	41 (%48.2)
	Met LN	14 (%16.4)	11 (%12.9)	19 (%22.3)	44 (%51.7)
Total		34 (%40)	19 (%22.3)	32 (%37.6)	85 (%100)

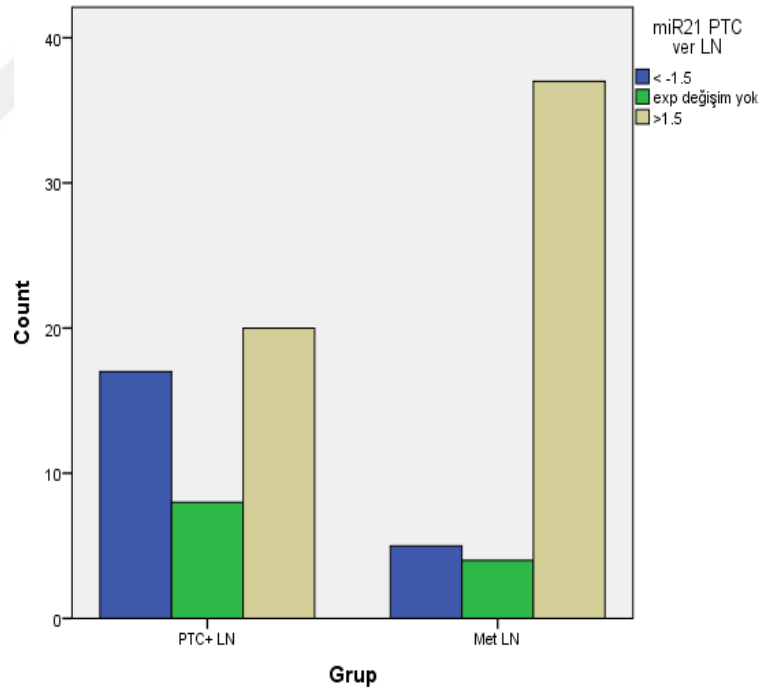


Şekil 6: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-222 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

miR-21 açısından bakıldığında metastatik lenf nodunda metastatik tümöre göre düşük ekspresyondan anlamlığa ulaşan bir artış izlenmiştir (Tablo 17, Şekil 7). Ki-kare değeri 12.94, p değeri=0.02.

Tablo 17: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-21 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

		miR-21 PTK ver LN			Total
		Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
Grup	PTK+ LN	17 (%18.6)	8 (%8.7)	20 (%21.9)	45 (%49.4)
	Met LN	5 (%5.4)	4 (%4.3)	37 (%40.6)	46 (%50.4)
Total		22 (%24.1)	12 (%13.1)	57 (%62.6)	91 (%100)



Şekil 7: Metastatik tümörler ile metastatik lenf nodları arasında miR-21 açısından ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

Tümör metastazı ile miR-221 ve miR-21'de ekspresyon artışı izlenmiş, ancak miR-222 ve miR-146b açısından anlamlı artış saptanmamıştır.

miR-21 ve miR-221 yüksek ekspresyon gösteren 17 vakanın 11'inde (%64) miR-222'nin yüksek ekspresyonu saptanmıştır (Tablo 18).

Tablo 18: miR-21 ve miR-221 ekspresyon özelliklerine göre miR-222 ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

	miR-222 PTK ver LN			Total
	Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
miR-21 ve miR-221 düşük eks	30 (%37.5)	15 (%18.7)	18 (%22.5)	63 (%78.7)
miR-21 ve miR-221 yüksek eks	3 (%3.7)	3 (%3.7)	11 (%13.7)	17 (%21.1)
Total	33 (%41.2)	18 (%22.5)	29 (%36.2)	80 (%100)

miR-21 ve miR-221 yüksek ekspresyon gösteren 18 vakanın 16'sında (%88) miR-146b'nin yüksek ekspresyonu da izlenmiştir (Tablo 19).

Tablo 19: miR-21 ve miR-221 ekspresyon özelliklerine göre miR-146b ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

	miR146b PTK ver LN			Total
	Düşük eks	Eks değişim yok	Yüksek eks	
miR-21 ve miR-221 düşük eks	27 (%30.6)	11 (%12.5)	32 (%36.3)	70 (%79.5)
miR-21 ve miR-221 yüksek eks	2 (%2.2)	0 (%0)	16 (%18.1)	18 (%20.4)
Total	29 (%32.9)	11 (%12.5)	48 (%54.5)	88 (%100)

6.TARTIŞMA

Papiller karsinomlarının mi-RNA ekspresyon profilleri çeşitli tümör alt tiplerinde spesifik profil izlendiği için ayırt edicidir. miR-146b, miR-221 ve miR-222 sıklıkla upregüle olur. mi-RNA analizi prognostik bilgi sağlamak açısından yararlıdır. miR-21, tall cell varyant PTK'da epigenetik değişikliklere uğrayarak overeksprese olur ve bu tümörün daha agresif olan klinik davranışına katkı sağlar (10).

Beş mi-RNA seti (miR-146, miR-221, miR-222, miR-21, miR-181a) PTK da overeksprese olur. Özellikle miR-146, miR-221, miR-222 malign dokularda 11 ile 19 kat daha fazladır. miR-146, miR-221, miR-222 disregülasyonunun PTK oluşum ve gelişiminde anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir (1).

miR-146, miR-221, miR-222 overekspresyonu PTK tanısında pratiklik sağlayabilir. Chou ve ark. miR-146, miR-221, miR-222 eksprese eden 100 PTK vakasındaki ekstratroidal invazyonun, mi-RNA ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olarak bulmuştur. BRAF mutasyonlu ve yüksek riskli tümörlerde miR-146b'nin oldukça yüksek eksprese edildiği görülmüştür (46). Song ve ark. mikroarray ve qRT-PCR yöntemleri ile normal doku ve PTK dokuları kullanarak PTK spesmenlerinde miR-96 upregülasyonu bulunmuştur (49). Gu ve ark. miR-145'in PTK'da overekspresyonunu saptamıştır (50). Yip ve ark. agresif ve nonagresif PTK da; miR-146b, miR-221, miR-222, miR-155, miR-31 upregülasyonu, miR-1, miR-34b, miR-130b, miR-138 downregülasyonu elde etmiştir (51). Pallante ve ark. spesifik mikroarray analiz ile PTK vakalarında miR-221, miR-222 ve miR-146b overekspresyonu izlenmiştir (52). Diğer bir çalışmada çeşitli tiroid nodüllerinde parafin bloklarda in situ hibridizasyon yöntemiyle miR-146b-5p and miR-21 ekspresyonu değerlendirilmiş olup miR-146b-5p overekspresyonu PTK 'da %89, FVPTK'da ise %41 oranında bulunmuştur. miR-21 overekspresyonu PTK 'da %79, FVPTK'da %34 oranında bulunmuştur (53). Yu ve ark 245 serum örneğinde; let-7e, miR-151-5p ve miR-222 ekspresyonunu değerlendirmiş olup benign nodül ve normal dokulara göre PTK'da önemli oranda yükselme saptamıştır. Sensitivite %87.8, spesifite %88.4'tür (54). Diğer bir çalışmada serumda miR-146b and miR-155, miR-221 ve miR-222 değerlendirilmiştir. PTK'da tümör boyutuna orantılı olarak ve benign gruba göre daha yüksek ekspresyon görülmüştür.

miR-146b için %61.4 sensitivite ve %57 spesifite, miR-155 için % 74.3 sensitivite ve %63.2 spesifite elde edilmiştir (55)

Bir çalışmada miR-146b-5p and miR-21 overekspresyonunun PTK'da kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterildi (53). Diğer bir çalışmada miR-146b-5p and miR-221/222 kümeleri'nde kapsül/vasküler invazyon ve lenf nodu metastazı olan vakalarda yüksek ekspresyon saptandı (56).

miR-9 ve miR-21 ekspresyon seviyesi tümör hücrelerinin metastaz potansiyeli ile ilişkili olduğu düşünülmekte olup nodal metastaz saptamada iyi bir prediktör olabilirler (27) (57).

Çeşitli araştırmalarda miR-146b, miR-221, miR-222, miR-155, miR-31 upregülasyonunun ve miR-1, miR-34b, miR-130b ve miR-138 downregülasyonunun PTK'da daha agresif davranışla ilişkili olduğu bulunmuştur (51) (58). Sonderman ve ark. miRNA-9 ve miR-21'i PTK rekurrensinde prognostik marker olarak gözlemlemiştir (57).

25 PTK vakası ve 25 normal tiroid dokusunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, PTK'da normal dokulara kıyasla miR-221-5p, miR-222-5p, miR-34a-5p, miR-146b-5p, miR-21-5p ve miR-31-5p upregülasyonu; miR-181-5p ve miR-138-5p downregülasyonu görülmüştür (59).

Lenf nodu metastazı olan ve metastazı olmayan PTK vakalarının mi-RNA profillerini karşılaştıran çalışmalar da mevcuttur. Lenf nodu metastazı olan hastalarda Lee ve ark. Real time PCR ile miR-146b ve miR-222 de upregülasyonu (60), Peng ve ark. mikroarray ile miR-136-5p ve miR-199a-5p upregülasyonu ile miR-513b ve miR-1243 downregülasyonu (61), Sun ve ark. real time PCR ile miR-221 ve miR-222 upregülasyonu (62), Yang ve ark. mikroarray ile miR-146b-5p, miR-221 ve miR-222 upregülasyonu ve miR-16-1 ve miR-613 downregülasyonu (63), Acibucu ve ark. real time PCR ile miR-146b, miR-221 ve miR-222 upregülasyonu (56), Deng ve ark. real time PCR ile miR-146b-5p upregülasyonu (64), Yu ve ark. DNA sekanslama ile miR-151-5p ve miR-222 upregülasyonu (54), Wang ve ark. mikroarray ile miR-451, miR-1202, miR-2861 upregülasyonu ve miR-542-5p, miR-564, miR-664 downregülasyonu (65) saptamıştır.

Dört mi-RNA (miR-192, miR-197, miR-328 ve miR-346) FA'dan daha fazla olarak FTK'da overeksprese edilir. Bu mi-RNA'lar ile diğer tiroid neoplazileriyle ilişkili saptanmamış olup FTK'ya spesifik oldukları düşünülmektedir (66).

Nikiforova ve ark. çalışmasında klasik FTK'da miR-155, miR-187, miR-221, miR-222, miR-224 overeksprese edildiğini, onkositik varyant FTK'da miR-183, miR-187, miR-197, miR-221, miR-222 ve miR-339 overeksprese edildiğini saptamıştır (41). Rossing ve ark. çalışmasında FTK ve FA'da miR-150 ve miR-107'nin normal dokudan farklı eksprese edildiği görülmüştür (67). Jikuzono ve ark parafin bloklardan elde edilen miRNA çalışmasında metastatik FTK'da miR-221/222 kümelerinin ekspresyonu boyunca miR-10b ve miR-92a'nın önemli derecede upregüle olduğu izlenmiştir (68).

miR-146b, miR-221, miR-22 upregülasyonu anaplastik tirod karsinomlarında sıklıkla görülür (68). Vison ve ark mikroarray method kullandığı 10 ATK'da miR-26a, miR-30a-5p, miR-30d, miR-125b'de önemli downregülasyon saptamıştır (69). Başka bir çalışmada let-7 ve miR-200 ailesinde azalma ile miR-221, miR-222, miR-125a-3p de overekspresyon görülmüştür (70). Başka bir çalışmada ATK'da miR-21, miR-146b, miR-221, miR-222'de overekspresyon görülürken miR-26a, miR-138, miR-219, miR-345'de downregülasyon saptandı (71). miR-138 downregülasyonu güçlü bir şekilde ATK ile ilişkili olup diagnostik marker olarak kullanılabilir (72).

Takakura ve ark ATK'da yedi mi-RNA da overekspresyon saptadı: miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92-1 (73). miR-19a ve miR-19b overekspresyonu PTEN downregülasyonundan sorumlu olabileceği düşünülmekte olup ve ATK'da yüksek ekspresyon gözlenmiştir (74) (75). Braunn ve ark. ATK'da PTK ve FTK ya kıyasla miR-30 ve miR-200 önemli derecede downregülasyon saptamıştır (70).

Ulusal Kanser Enstitüsü miR-200 overekspresyonu ile E-cadherin/vimentin oranı arasında bağlantı olduğunu gösterdi. miR-200 overekspresyonu tümör hücrelerinde E-cadherin upregülasyonunu sağlar ve tümör hücrelerinin motilitesini ve invazyonunu azaltır (76).

Nikiforova ve ark. MTK'da normal dokuya kıyasla 142.2-32.3 kat farkla miR-323, miR-370, miR-129, miR-137, miR-10a, miR-124a, miR-224, miR127, miR-9 ve miR-154'de upregülasyon saptamıştır (41). Abraham ve ark. 12 heretider MTK ve 7

sporadik MTK'nın yer aldığı mi-RNA mikroarray çalışmasında; miR-183 ve miR-375 overekspresyonunun, lateral lenf nodu metastazında önemli potansiyel prognostik biyomarker olarak değerlendirmiştir (77). Mian ve ark. MTK'da RT-PCR ile 9 mi-RNA overekspresyonu saptadı: miR-21, miR-127, miR-154, miR-224, miR-323, miR-370, miR-9, miR-183, miR-375 (78). Hudson ve ark. geniş mi-RNA array çalışmasında miR-375 ve miR-10a overekspresyonu saptanırken; miR-455'te ise downregülasyon görülmüştür (79). Bir çalışmada miR-21, miR-127, miR-154, miR-224, miR-323, miR-370, miR-9, miR-183, miR-375 değerlendirilmiş ve MTK'da 4.2-13 kat overekspresyon saptanmıştır. miR-224 upregülasyonu MTK'da daha iyi sağkalımla ilişkili prognostik marker olarak değerlendirilmiştir. miR-127 ise somatik RET mutasyonlu MTK'da, wild tip RET izlenen MTK'a kıyasla daha düşük seviyelerde görülmüştür (78).

Santarpia ve ark. primer MTK ile lenf nodu metastazlı MTK vakalarını mi-RNA array ile analiz etmiştir. Metastatik MTK da bazı mi-RNA larda aberran ekspresyonlar saptanmıştır. RT-PCR ve in situ hibridizasyon ile confirmasyon sağlandı. Metastatik tümör mi-RNA'larında 10 önemli ekspresyon ve disregülasyon saptanmıştır, bunlar miR-10a, miR-200b/-200c, miR-7, miR-29c downregülasyonu, miR-130a, miR-138, miR-193a-3p, miR-373, miR-498 upregülasyonu olarak değerlendirilmiştir (80).

Diğer bir çalışmada normal dokuya kıyasla MTK'da 10 mi-RNA grubu (miR-9, miR-10a, miR-124a, miR-127, miR-129, miR-137, miR-154, miR-224, miR-323, miR-370) upregülasyonu izlenmiştir (41).

Çalışmamızda eş zamanlı metastatik olan ve olmayan papiller tiroid kansinomlarında metastatik lenf nodlarında mi-RNA ekspresyon profil farklılıkları cinsiyet, tümör çapı, kapsül invazyonu, tümör içinde fibrozis, lenfatik invazyon, damar invazyonu gibi klinik parametrelerle kıyaslanarak değerlendirilmiştir. RT-PCR yöntemiyle mi-RNA ekspresyon profilleri elde edilmiştir.

Metastatik ve metastatik olmayan tümör grupları arasında mi-RNA profilleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

1 cm altı ve 1 cm üzeri çapa sahip tümörler mi-RNA ekspresyon profilleri açısından karşılaştırılmıştır. 1 cm altındaki tümörlerde miR-21 eksprese ediyorsa metastaz yapma ihtimali yüksektir, ancak 1 cm altında çapa sahip vaka grubu küçük olduğundan anlamlı sonuç elde edilememiştir.

Tümör içinde fibrozis varlığı metastatik lenf nodu varlığı açısından anlamlı bulunmuş, ancak miRNA ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır. Diğer klinik parametreler ile anlamlı bir fark elde edilememiş olsa da lenf nodu metastazı saptanan PTK vakalarında miR-21, miR-221, miR-146b ve miR-222 açısından 1.5 katın üzerinde ekspresyon artışının izlendiği anlamlı farklılıklar görülmüştür. Özellikle miR-21 ve miR-221 eş zamanlı pozitif olan vakalarda aynı zamanda miR-146b ve miR-222 profillerinde ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu nedenle miR-21, miR-221, miR-222 ve miR-146b içeren dörtlü panel kullanımı metastatik lenf nodlarını değerlendirmede uygun bir yöntem olarak değerlendirilebilir.



7.SONUÇ

Eş zamanlı metastatik ve metastatik olmayan papiller tiroid karsinomlarında mi-RNA ekspresyon profilleri RT-PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Klinik özellikler ile mi-RNA ekspresyon profilleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Metastatik ve metastatik olmayan tümör grupları arasında mi-RNA ekspresyonları açısından anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

Metastatik lenf nodlarında, çalışılan 4 mi-RNA'da (miR-21, miR-221, miR-222 ve miR-146b) düşük ekspresyondan yüksek ekspresyona doğru artış gözlenmiştir. Bu nedenle PTK'larda lenf nodu metastazı açısından değerlendirmede bu panelin faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda vaka sayısı kısıtlıdır. Ancak, mi-RNA'ların tanı, prognoz ve özellikle metastaz açısından kullanılacak parametreler olarak değerlendirilmesi ve mi-RNA konusunda bilgi birikiminin artışına yol gösterecek olan çalışmalara yön vermesi açısından önemlidir.

8.KAYNAKLAR

1. Pishkari S., Paryan M., Hashemi M., Baldini E., Mohammadi-Yeganeh S. The role of microRNAs in different types of thyroid carcinoma:a comprehensive analysis to find new miRNA supplementary therapies. *Journal of Endocrinological Investigation*,2018; 41(3), 269-283.
2. Tewfik T.L., Yoskovitch A. Congenital malformations, neck. *E Medicine*. June 28, 2003.
3. Moore K.L., Dalley F.A., Agur A.M.R. *Clinically Oriented Anatomy* 7. Ed. 2014. : Lippincott Williams and Wilkins.
4. Mills S.E.*Histology for Pathologist*. 4. Ed. 2012. (1185-1202): Lippincott Williams and Wilkins
5. Rosai, Juan. *Surgical Pathology* . 10. edisyon (2011), (488-533): Mosby Elsevier
6. Sthapak E., Gajbe U.L., Wanjari S.P., Upadhyaya V.D., Kumar B. Thyroid Agenesis: A Case Report with Review of Literature. *World J Endoc Surg* , 2012; 4(3), 99-101.
7. Auckland A.K., B.S., R.T.,R.D.M.S. Heterotopic Thyroid.*JDMS*,March/April 2004; 20, 120–123
8. Kay D.J., Goldsmith A.J. Embryology of the thyroid and parathyroids. *E Medicine*, June 28, 2003.
9. Kumar V, Abbas A.K., Aster J.C. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease* 2015.(1082-1100); Saunders
10. Llyod R. V., Osamura R.Y., Klöppel G., Rosai J.*WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs* (4th Edition).2017 (65-143). IARC Press,Lyon.
11. Baloch Z. W., LiVolsi V. A. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist.*American journal of clinical pathology*,2002; 117(1), 143-150.
12. Seethala R.R.; Baloch Z.W., Barletta J.A., Khanafshar E., Mete O., Sadow P.M., LiVolsi V.A., Nikiforov Y.E., Tallini G., Thompson L.D. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features: a review for pathologists. *Modern Pathology*,2018;31, 39–55.
13. Parente D.N., Kluijfhout W.P., Bongers P.J., Verzijl R., Devon K.M., Rotstein L.E., Goldstein D.P., Asa S.L., Mete O., Pasternak J.D. Clinical Safety of Renaming Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Is NIFTP Truly Benign? .*World J Surg*, 2018 Feb;42(2), 321-326
14. Nikiforov Y.E., Seethala R.R., Tallini G., Baloch Z.W., MD, Basolo F., Thompson L.D., Barletta J.A., Wenig B.M., Al Ghuzlan A., Kakudo K., Giordano T.J. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors . *JAMA Oncol*, 2016; 2(8), 1023–1029.
15. Chia W. K., Sharifah N. A., Reena R. M. Z., Zubaidah Z., Clarence-Ko C. H., RafieM. K.Fluorescence in situ hybridization analysis using PAX8 and PPARG specific probes reveals the presence of PAX8-PPARG translocation and 3p25 aneusomy in follicular thyroid neoplasms. *Cancer genetics and cytogenetics*, 2010; 196,7-13.
- 16.Sobrinho-Simões M., Preto A., Rocha A. S., Castro P., Máximo V., Fonseca E., Soares P. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Archiv*, 2005; 447(5),787-793.
17. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., et al.MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2005;102(39),13944-49.

18. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993; 75(5), 843-54.
19. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 2001; 294(5543), 797-99.
20. MiRBase Website. Manchester University: Homo sapiens miRNAs 2010.
21. Kwak P.B., Iwasaki S., Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, 2010 ; 101(11), 2309-15.
22. Arzt L., Kothmaier H., Quehenberger F., Halbwedl I., Wagner K., Maierhofer T., Popper H.H. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies. *Exp Mol Pathol*, 2011; 91(2), 490-495.
23. Lassalle S., Hofman V., Marius I., Gavric-Tanga V., Brest P., Havet K., Butori C., Selva E., Santini J., Mograbi B., Hofman P. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid*, 2009; 19(11), 1239-48.
24. Ma Z., Lui W.O., Fire A., Dadras S.S. Profiling and discovery of novel miRNAs from formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma and nodal specimens. *J Mol Diagn* , 2009; 11(5), 420-9.
25. Doleshal M., Magotra A.A., Choudhury B., Cannon B.D., Labourier E., Szafranska A.E. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* , 2008; 10(3), 203-11.
26. Celano M., Rosignolo F., Maggisano V., Pecce V., Iannone M., Russo D., Bulotta S. MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma. *Hindawi International Journal of Genomics Volume* , 2017; Article ID 6496570, 11 pages.
27. Wo'jcicka A., Kolanowska M., Jaz'dz'ewski K. MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology*, 2016; 174, 89–98.
28. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* , 2004; 10(2), 1957–66.
29. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003; 425(6956), 415-9.
30. Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H., Ketting R.F., Hannon G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 2004; 432(7014), 231-5.
31. Hitit M., Kurar E., Güzeloğlu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 2015; 10(3), 211-218.
32. Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*; 2005; 123(4), 631-40.
33. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Croce C.M., et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(24), 15524-9.
34. He L., Thomson J.M., Hemann M.T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005; 435(7043), 828–33.
35. O' Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., et al. C-myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* , 2005; 435 (7043), 839–43.

36. Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Ebert B.L., Mak R.H., et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005; 435 (7043), 834–8.
37. Chou C.K., Liu R.T., Kang H.Y. MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18(3), 636.
38. Paskas S., Jankovic J., Zivaljevic V. et al. Malignant risk stratification of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology based on molecular testing. *Cancer Cytopathology*, 2015; 123 (8), 471-79.
39. Panebianco F., Mazzanti C., Tomei S. et al. The combination of four molecular markers improves thyroid cancer cytologic diagnosis and patient management. *BMC Cancer*, 2015; 15, 918.
40. Stokowy T., Wojtas B., Jarzab B. et al. Two-miRNA classifiers differentiate mutation-negative follicular thyroid carcinomas and follicular thyroid adenomas in fine needle aspirations with high specificity. *Endocrine*, 2016; 54 (2), 440–447.
41. Nikiforova M.N., Tseng G.C., Steward D., Diorio D., Nikiforov Y.E. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2013; 93(5), 1600–1608 .
42. Kitano M., Rahbari R., Patterson E.E., Steinberg S.M., Prasad N.B., Wang Y., Zeiger M.A., Kebebew E. Evaluation of candidate diagnostic microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples. *Thyroid*, 2012; 22(3), 285–291.
43. Ferracin M., Lupini L., Salamon I., Saccenti E., Zanzi M.V., Rocchi A., Da Ros L., Zagatti B., Musa G., Bassi C., et al. Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. *Oncotarget*, 2015; 6(16) , 14545–14555.
44. Keutgen X.M., Filicori F., Crowley M.J., et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res*, 2012, ; 18(7), 2032–8.
45. Maze H., Levy Y., Mizrahi I. et al. Differentiating benign from malignant thyroid nodules using micro ribonucleic acid amplification in residual cells obtained by fine needle aspiration biopsy. *J Surg Res*, 2013; 180(2), 216–21.
46. He H., Jazdzewski K., Li W., Liyanarachchi S., Nagy R., Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Franssila K., Suster S., et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102(52), 19075–19080.
47. Boufraquech M., Klubo-Gwiezdzinska J., Kebebew E. MicroRNAs in the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016 October ; 30(5), 603–619.
48. Dettmer M.S., Perren A., Moch H., et al. MicroRNA profile of poorly differentiated thyroid carcinomas: new diagnostic and prognostic insights. *J Mol Endocrinol*, 2014; 52(2), 181–9.
49. Song H.M., Luo Y., Li D.F., Wei C.K., Hua K.Y., Song J.L., et al. MicroRNA-96 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and regulating AKT/FOXO1/Bim pathway in papillary thyroid carcinoma cells . *Int J Clin Exp Pathol*, 2015; 8(9), 9889–900.
50. Gu Y., Li D., Luo Q., Wei C., Song H., Hua K., et al. MicroRNA-145 inhibits human papillary cancer TPC1 cell proliferation by targeting DUSP6 . *Int J Clin Exp Med* , 2015; 8(6), 8590–8598 .
51. Yip L., Kelly L., Shuai Y., Armstrong M.J., Nikiforov Y.E., Carty S.E., et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2011; 18(7), 2035–41.

52. Pallante P., Visone R., Ferracin M., Ferraro A., Berlingieri M.T., Troncone G. et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 2006; 13(2), 497–508.
53. Guo Z., Hardin H., Montemayor-Garcia C., Asioli S., Righi A., Maletta F., Sapino A., Lloyd R.V. In situ hybridization analysis of miR-146b-5p and miR-21 in thyroid nodules: Diagnostic implications. *Endocrine Pathology*, 2015; 26, 157–163.
54. Yu S., Liu Y., Wang J., Guo Z., Zhang Q., Yu F., Zhang Y., Huang K., Li Y., Song E. et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2012; 97, 2084–2092.
55. Lee Y.S., Lim Y.S., Lee J.C., Wang S.G., Park H.Y., Kim S.Y., Lee B.J. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer. *Oral Oncology*, 2015; 51(1), 77–83.
56. Acibucu F., Dokmetas H.S., Tutar Y., Elagoz S., Kilicli F. Correlations between the expression levels of micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the clinicopathologic parameters in papillary thyroid cancers. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2014; 122(3), 137–143.
57. Sondermann A., Andreghetto F.M., Moulatlet A.C., da Silva Victor E., de Castro M.G., Nunes F.D., Brandao L.G., Severino P. MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2015; 32(6), 521–530.
58. Chou C.K., Yang K.D., Chou F.F., et al. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013; 98(2), 196–205.
59. Hu Y., Wang H., Chen E., Xu Z., Chen B., Lu G. Candidate microRNAs as biomarkers of thyroid carcinoma: a systematic review, meta-analysis and experimental validation. *Cancer Medicine*, 2016; 5(9), 2602–2614.
60. Lee J.C., Zhao J.T., Clifton-Bligh R.J., et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer*, 2013; 119(24), 4358–65.
61. Peng Y., Li C., Luo D.C., et al. Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules*, 2014; 19, 11586–99.
62. Sun Y., Yu S., Liu Y., et al. Expression of miRNAs in papillary thyroid carcinomas is associated with BRAF mutation and clinicopathological features in Chinese patients. *Hindawi Int J Endocrinol*, 2013; Article ID 128735, 10 pages.
63. Yang Z., Yuan Z., Fan Y., et al. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. *Mol Med Rep*, 2013; 8(5), 1353–8.
64. Deng X., Wu B., Xiao K., et al. MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3. *Cell Physiol Biochem*, 2015; 35(1), 71–82.
65. Wang Z., Zhang H., Zhang P., et al. Upregulation of miR-2861 and miR-451 expression in papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. *Med Oncol*, 2013; 30(2), 577.
66. Weber F., Teresi R.E., Broelsch C.E., Frilling A., Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2006; 91(9), 3584–3591.
67. Rossing M., Borup R., Hønao R., Winther O., Vikesaa J., Niazi O., Godballe C., Kroghdal A., Glud M., Hjort-Sørensen C. Down-regulation of microRNAs controlling

- tumourigenic factors in follicular thyroid carcinoma. *J Mol Endocrinol*,2012; 48(1), 11–23.
68. Leenhardt L., Bernier M.O., Boin-Pineau M., Devolx B.C., Marechaud R., Niccoli-Sire P., Nocaudie M., Orgiazzi J., Schlumberger M.H., Wemeau J.L., et al.Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur J Endocrinol*,2004; 150(2), 133–139.
69. Visone R., Pallante P., Vecchione A., Cirombella R., Ferracin M., Ferraro A., Volinia S., Coluzzi S., Leone V., Borbone E., et al.Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*,2007; 26(54), 7590–7595.
70. Braun J., Hoang-Vu C., Dralle H., Hüttelmaier S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene*,2010; 29(29), 4237–4244.
71. Wu D., Ding J., Wang L., Pan H., Zhou Z., Zhou J., Qu P. MicroRNA-125b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer. *Oncol Lett*, 2013; 5(3), 829–834.
72. Schwertheim S., Sheu S.Y., Worm K., Grabellus F., Schmid K.W. Analysis of deregulated miRNAs is helpful to distinguish poorly differentiated thyroid carcinoma from papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res*, 2009; 41(6), 475–481.
73. Takakura S., Mitsutake N., Nakashima M., Namba H., Saenko V.A., Rogounovitch T.I., Nakazawa Y., Hayashi T., Ohtsuru A., Yamashita S. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci*, 2008; 99(6), 1147–1154.
74. Bruni P., Boccia A., Baldassarre G., Trapasso F., Santoro M., Chiappetta G., Fusco A., Viglietto G. PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. *Oncogene*, 2000; 19(28),3146–3155.
75. Frisk T., Foukakis T., Dwight T., Lundberg J., Höög A., Wallin G., Eng C., Zedenius J., Larsson C. Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002; 35(1), 74–80.
76. Park S.M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*, 2008; 22(7), 894–907.
77. Abraham D., Jackson N., Gundara J.S., Zhao J., Gill A.J., Delbridge L., Robinson B.G., Sidhu S.B. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res*, 2011; 17(14),4772–4781.
78. Mian C., Pennelli G., Fassan M., Balistreri M., Barollo S., Cavedon E., Galuppini F., Pizzi M., Vianello F., Pelizzo M.R. MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid*,2012; 22 (9), 890–896.
79. Hudson J., Duncavage E., Tamburrino A., Salerno P., Xi L., Raffeld M., Moley J., Chernock R.D. Overexpression of miR-10a and miR-375 and downregulation of YAP1 in medullary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*,2013; 95(1), 62–67.
80. Santarpia L., Calin G.A, Adam L., Ye L., Fusco A., Giunti S., Thaller C., Paladini L., Zhang X., Jimenez C., et al. A miRNA signature associated with human metastatic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 2013; 20(6), 809–823.