

T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Patoloji Anabilim Dalı

TİROİD PAPİLLER KARSİNOM, PAPİLLER MİKROKARSİNOM
VE TİROİD PAPİLLER KARSİNOMUN LENF NODU
METASTAZINDA APOPTOZ VE HÜCRE SİKLUSU İLE İLİŞKİLİ
BELİRLEYİCİLERİN (p16, p21, p27, p53, BCL-2, BAX, BCL-XL
VE SİKLİN D1) DOKU MİKROARRAY YÖNTEMİYLE
SAPTANMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Gizem AKKAŞ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Peyker TEMİZ

Manisa, 2011

T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Patoloji Anabilim Dalı

TİROİD PAPİLLER KARSİNOM, PAPİLLER MİKROKARSİNOM
VE TİROİD PAPİLLER KARSİNOMUN LENF NODU
METASTAZINDA APOPTOZ VE HÜCRE SİKLUSU İLE İLİŞKİLİ
BELİRLEYİCİLERİN (p16, p21, p27, p53, BCL-2, BAX, BCL-XL
VE SİKLİN D1) DOKU MİKROARRAY YÖNTEMİYLE
SAPTANMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Gizem AKKAŞ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Peyker TEMİZ

Manisa, 2011

Patoloji eğitim hayatım ve tez hazırlığım boyunca desteği, bilgisi, sevgisi ve sabrıyla bana hep destek olan, varlığını hep arayacağım ve emeklerini daima minnetle anacağım sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Peyker Temiz'e, gereksinim duyduğum her durumda yardım ve desteğini sunan, meslek hayatımdaki katkısını asla unutmayacağım Prof. Dr. Aydın İşısağ'a, asistanlık eğitimim ve tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimi yanı sıra teknolojinin tüm olanaklarını bize sunan, saygı ve hayranlıkla anımsayacağım Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na, bilgisi yanında enerjisi ve hayata pozitif bakışıyla kendisinden çok şey öğrendiğim Doç Dr. Semin Ayhan'a, çalışkanlığı, azmiyle ve disipliniyle her zaman önümüzde örnek bir tablo oluşturan, eğitimime katkılarını azımsayamayacağım Doç.Dr.Nalan Neşe'ye, birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım, her zaman yakınlarında olmak isteyeceğim başta Arş. Gör. Dr. Fazilet Uğur Duman olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, arşiv görevlimizden başlayarak laboratuvarımızda görevli tüm teknisyen arkadaşlarıma, tezimin istatistiksel değerlendirmesinde yardımcı olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Beyhan Cengiz Özyurt'a, ayrıca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim, zor zamanlarımda hep yanımda olan biricik aileme teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gizem Akkaş

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
1. Tiroid papiller karsinom	3
i. Genel özellikler	3
ii. Tiroid papiller karsinomun mikroskopik alt tipleri	11
iii. Tiroid papiller karsinomda prognoz	19
2. Tiroid papiller karsinomda TNM sınıflaması	21
3. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazı	22
4. p16	23
5. p21	24
6. p27	25
7. p53	25
8. Bcl-2, Bax, Bcl-xL	27
i. Bcl-2	27
ii. Bax	27
iii. Bcl-xL	28
9. Siklin D1	28
10. Doku mikroarray yöntemi	29
III. GEREÇ VE YÖNTEM	32
IV. BULGULAR	40
V. TARTIŞMA	67
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
VII. ÖZET	78
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	80
IX. KAYNAKLAR	82

KISALTMALAR

ADK.....	Az diferansiye karsinom
ADTK.....	Az diferansiye tiroid karsinomu
AJCC.....	American Joint Committee on Cancer (Amerikan Birleşik Kanser Komitesi)
AK.....	Anaplastik karsinom
ATK.....	Anaplastik tiroid karsinomu
BHV.....	Berrak hücreli varyant
BT.....	Bilgisayarlı tomografi
CDK.....	Siklin bağımlı kinaz
DDTK.....	Dediferansiye tiroid karsinomu
DMA.....	Doku mikroarray
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
DSV.....	Diffüz sklerozan varyant
DTK.....	Diferansiye tiroid karsinomu
EV.....	Enkapsüle varyant
FA.....	Foliküler adenom
FAP.....	Familyal adenomatöz polipozis
FISH.....	Fluoresan in situ hibridizasyon
FK.....	Foliküler karsinom

FN.....	Foliküler neoplazm
FV.....	Foliküler varyant
GH.....	Graves hastalığı
HT.....	Hashimoto tiroiditi
HTA.....	Hyalinize trabeküler adenom
İHK.....	İmmunohistokimya
İİAB.....	İnce iğne aspirasyon biopsisi
KDTK.....	Kötü diferansiye tiroid karsinomu
KHV.....	Kolumnar hücreli varyant
KTPK.....	Klasik tiroid papiller karsinom
KV.....	Kribriform varyant
MK.....	Medüller karsinom
MR.....	Magnetik rezonans
MV.....	Makrofolliküler varyant
OV.....	Onkositik varyant
PDKB.....	Parafin doku kor biopsisi
PDMA.....	Parafin doku mikroarray
pTNM.....	Postoperatif tümör-nod-metastaz sistemi
RB.....	Retinoblastom duyarlılık proteini
SCC.....	Skuamöz hücreli karsinom

SV..... Solid varyant
TCV..... Tall cell varyant
TGF-B..... Transforme edici büyüme faktörü beta
TPK..... Tiroid papiller karsinom
TPKFV..... Tiroid papiller karsinom folliküler varyant
TPK-LNM.... Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazı
TPMK..... Tiroid papiller mikrokarsinom
TRK..... Tirozin reseptör kinaz
TSH..... Tiroid stimulan hormon
US..... Ultrason
WBV..... Warthin benzeri varyant

GİRİŞ

Toplumda görülme sıklığı hızla artan tiroid neoplazmları, tüm kanserlerin %1'ini, endokrin sistem kanserlerinin ise en yaygın türünü oluşturur. Tiroid papiller karsinomlar (TPK), tiroid neoplazmalarının yaklaşık %80'ini oluşturur. Tüm kanserden ölümlerin %0.2'sinden sorumludur. Çernobil nükleer kazasının etkilerini yakından yaşamış bir ülke olan Türkiye'de, özellikle kadınlarda, artan sayıda tiroid papiller karsinom olgusu saptanmaktadır.

Tiroid lezyonlarında p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 gibi hücre siklusu düzenleyicileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış olsa da literatürde bunların hepsini bir bütün olarak değerlendiren, geniş boyutlu bir çalışma yer almamaktadır. Ülkemizin yaklaşık 30 yıl önce uğradığı yoğun radyoaktivitenin etkileri yeni yeni ortaya çıkmaktayken bu belirleyicilerin karsinogenezdeki rolü bir kez daha önem kazanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan doku mikroarray (DMA) yöntemi aynı anda çok sayıda dokuyu inceleyen, daha hızlı, daha ekonomik ve daha nitelikli sonuçlar sağlayan yeni bir yöntemdir ve Türkiye'de henüz rutin kullanıma girmemiştir.

Bu çalışmada TPK, TPMK ve bunların lenf nodu metastazlarında (TPK-LNM) apoptoz ve hücre siklusuna ilişkin, birbirleriyle bağlantılı bu belirleyicileri geniş bir spektrumla inceleyerek bu gen ürünlerinin patogenezdaki rolünü belirlemek ve ileri bir yöntem olan DMA yöntemini bu araştırmada uygulayarak laboratuvarımızda kullanılabilir hale getirmek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Tiroid neoplazmları ilk olarak 1974 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sınıflanmış, 1988'de tekrar gözden geçirilmiştir. Son olarak DSÖ tarafından 2004 sınıflamasında ele alınmış, önceki sınıflamada yer almayan az diferansiye karsinom (ADK) ana başlıklara eklenirken, onkositik karsinom ve onkositik adenom ayrı bir kategori olmaktan çıkarılıp folliküler adenom (FA), folliküler karsinom (FK) ve TPK'un alt grupları olarak değerlendirilmiştir (1-6).

Tiroid bezinde iyottan tiroksin ve triyodotironin sentezleyen folliküler hücreler, kalsitonin sekrete eden parafoliküler C hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve bağışıklık sistemi hücreleri bulunur (1-3,5,6). Tiroid kanserlerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan papiller ve folliküler karsinomlar yani diferansiye tiroid karsinomları (DTK) ile anaplastik karsinom (AK) folliküler hücrelerden kaynaklanır (5). DSÖ sınıflamasına göre tiroid neoplazmları şu şekilde sıralanmaktadır (1-6):

Tiroid kanserleri

Papiller karsinom
Folliküler karsinom
Az diferansiye karsinom
Undiferansiye (anaplastik) karsinom
Skvamöz hücreli karsinom
Mukoepidermoid karsinom
Eozinofilili sklerozan mukoepidermoid karsinom
Müsinöz karsinom
Medüller karsinom
Mikst medüller ve folliküler karsinom
Timus benzeri diferansiyasyonlu iç hücreli tümör
Timus benzeri diferansiyasyon gösteren karsinom

Tiroid adenomu ve ilişkili tümörler

Folliküler adenom
Hyalinizan trabeküler tümör

Diğer tiroid tümörleri

Teratom
Primer lenfoma ve plazmasitom
Ektopik timoma
Anjiosarkom
Düz kas tümörleri
Periferik sinir kılıfı tümörleri
Paragangliom
Soliter fibröz tümör
Folliküler dendritik hücre tümörü
Langerhans hücre histiyositozu
Sekonder tümörler

TİROİD PAPİLLER KARSİNOM

DSÖ'nün tanımına göre belirgin nükleer özellikler taşıyan folliküler epitel hücreleri kökenli malign epiteliyal tümördür (1-3,5,6).

GENEL ÖZELLİKLER

EPİDEMİYOLOJİ:

TPK; tiroid neoplazmalarının yaklaşık %80'ini oluşturur (1-6). Tüm kanserden ölümlerin %0.2'sinden sorumludur (6).

Yaş ve Cinsiyet:

Kadınlarda erkeklerden daha fazla görülür (K/E=4/1) (1-89). Hastaların çoğu 20-50 yaş arasındadır (1-3,6). TPK, 15 yaştan önce nadir olmasına karşın en yaygın pediatrik tiroid malignitesidir. Nadir konjenital olgular da bildirilmiştir (1,6).

İnsidens:

TPK sıklığı dünyada giderek artmaktadır (1-6). İnsidens oranı her 100.000 kişide 0.5-1 arasındadır (5). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1980'de 10.000 hasta bildirilmişken, bu oran 2004'te 22.000'e ulaşmıştır. İnsidensteki bu artmaya rağmen, mortalite oranı azalmaktadır (1). Türkiye'de değişik çalışmalarda büyük çoğunluğu TPK olmak üzere tiroid kanseri insidensi kadınlarda (yüzbinde) 4.0-8,44 arasında değişmekteyken erkeklerde 1, her iki cinse birlikte bakıldığında 2.5'dir. Mortalite oranı kadınlarda yaklaşık (yüzbinde) 1.6, erkeklerde 0.5, her iki cinse birlikte bakıldığında 1.1'dir. İzmir bölgesinde tiroid kanseri sıklığı cinse bakılmaksızın (yüzbinde) 4.3-9.29, kadınlarda 9.0-15.18, erkeklerde 1.2 olarak bildirilmektedir (7-10).

ETYOLOJİ:

Eksternal Radyasyon:

- TPK etyopatogenezinde sorumlu tutulan en önemli faktör, baş-boyun bölgesi veya toraksa uygulanan radyasyondur (1-6,11-17). Çernobil nükleer patlamasına (26.04.1986) bağlı radyoaktif iyodin maruziyetinden sonra sonra Belarus'ta ve Ukrayna'da, özellikle

çocuklarda, TPK ve TPMK insidansının 6-500 kat arttığı bildirilmiştir (1,6,11-17). Yine Hiroşima'da atılan atom bombasından sonra TPK ve TPMK artmıştır (1,5,17).

- Radyasyona maruziyet ile tümör gelişimi arasındaki ortalama süre, değişken olmakla birlikte, ortalama 20 yıl olarak bildirilmiştir (5,6).
- Özellikle çocuklardaki TPK gelişiminde radyoaktivitenin rolü daha belirgindir (3,5,6). Çocuk olguların %10'unda baş-boyun bölgesine radyasyon maruziyeti öyküsü vardır (3,5,6,11,15).
- Radyasyona maruz kalmış bölgelerdeki hastalarda gelişen TPK'ların çoğu, ektrakapsüler yayılım ve vasküler invazyon gibi agresif histolojik özellikler göstermiştir (5,6,12,15).
- Eksternal radyasyonun, olguların %5-10'unda %60-85 oranında RET gen yeniden düzenlenimi (özellikle RET/PTC3) yaparak, daha az oranda ise BRAF mutasyonu ile kansere yol açtığı öne sürülmüştür (1,3,5,6).

1. İyot: TPK, iyot alımının yeterli ya da fazla olduğu bölgelerde eksik olan bölgelere göre daha fazla görülür. FK için ise tam tersi söz konusudur. Güney Amerika ve Avrupa'daki endemik guatr bölgelerinde diyete iyot eklenmesi FK oranını düşürürken, TPK oranını artırmıştır (1-3,5).

2. Otoimmün hastalıklar: Fokal veya diffüz tiroiditler, özellikle de Hashimoto tiroiditi (HT) ile tiroid kanserinin ilişkisi konusunda, sonuçları birbiriyle çelişkili çok sayıda olgu serisi yayınlanmıştır (1-6,18,19). İzlemler sırasında bu hastalarda malign lenfoma daha fazla saptansa da (6, 20) TPK ve HT birlikteliği de az değildir (6,21). Kronik tiroiditteki atipik folliküler epitelde RET/PTC gen yeniden düzenlenimi gösterilmiştir (6,22). TPK'un Graves hastalığı (GH) ile ilişkisi ise tartışmalıdır. Bazı çalışmalar GH'ında TPK insidansının arttığını söylerken, bazıları tersini savunmaktadır (6).

3. Hormonal ve reproduktif faktörler: TPK, kadınlarda erkeklerden daha sık görülmektedir (1-6). Bu durumun, neoplastik tiroid epitelinde östrojen reseptörü varlığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (6,23). Östradiol, antiapoptotik sinyal yolunun kullanımını artırarak hücre proliferasyonunu uyarırken, ilginç şekilde tamoksifenle bu etki tersine çevrilmektedir (6,24).

Artmış parite, ilk gebelik yaşının geç olması, fertilité sorunları ve oral kontraseptiflerin riski artırdığı gösterilmiştir (6,24).

4. Genetik sendromlar: Familyal adenomatöz polipozis koli (FAP), Cowden sendromu, nonpolipozis kolon kanser sendromu, Peutz–Jeghers sendromu ve ataksia telenjektazili hastalarda TPK tanımlanmıştır (1,5,6,25,26). FAP hastalarının %1-2'sinde tiroid karsinomu görülmektedir, bunların da %95'ten fazlası TPK morfolojisindedir (6). TPK'un özellikle kribriform varyantının (KV) FAP ve Gardner sendromuyla birlikteliği fazladır (1). FAP'de olan APC gen mutasyonu ya da heterozigosite kaybı, familial TPK'da görülen RET/PTC1 aktivasyonu ile yakın ilişkidir (6, 27). Cowden sendromunda meme ve tiroid karsinom gelişme riski fazladır (6,28).

5. Tiroid ve paratiroid adenomu/hiperplazisi: Nadiren TPK, tiroidin benign nodülleri ve adenomlarından kaynaklanır (1-6). Bazı araştırmacılar, TPK ve paratiroid adenomu/ hiperplazisi birlikteliğini boyun bölgesine uygulanan eksternal radyasyonla ilişkilendirmektedir (6).

GENETİK:

RET/PTC gen yeniden düzenlenimi (rearrangement):

RET protoonkogeni 10q11.2 kromozomunda yerleşmiştir ve tirozin kinaz aktivitesi olan bir transmembran proteini kodlar (1,3,6). Normalde nöral krest orijinli hücrelerde eksprese edilir, böbrek ve gastrointestinal sistemin nöronal gelişiminde önemlidir (6). Normal tiroidde yalnızca C hücrelerinde eksprese edilip, folliküler hücrelerde eksprese edilmez (6).

RET/PTC gen yeniden düzenlenimi, TPK'da saptanan en yaygın genetik değişikliktir (1,3,6,29,30). Sporadik TPK'da ortalama insidansı %20-30, çocuk ve genç erişkindeki tümörlerde %45-60, radyasyon ilişkili tümörlerde %50-80'dir (1). RET/PTC ekspresyonu TPK'un tipik nükleer özelliklerinin oluşmasına yol açar (6). Son çalışmalarda HTA, HT, hiperplastik nodül ve FA gibi bazı benign lezyonlarda saptanan RET/PTC ekspresyonu, sözü geçen lezyonlarda görülen buzlu cam görünümlü hücrelerin varlığını açıklamaktadır (6,31).

Tiroid follikül hücrelerinde gözlenen RET/PTC gen yeniden düzenlenimi beş farklı formda ortaya çıkmaktadır. Bunlar içerisinde en önemlileri RET/PTC1, RET/PTC2 ve RET/PTC3 olup en yaygın tip RET/PTC1'dir. RET/PTC3 ise özellikle eksternal radyasyon alımı ile ilişkilidir (1,3,5,6). RET/PTC1 klasik tip TPK, TPMK ve diffüz sklerozan varyant (DSV)'ta daha yaygınken, RET/PTC3 solid varyant (SV), folliküler varyant (FV) ve tall cell varyant (TCV) larda daha sıktır (1,3,5).

RET/PTC ekspresyonunun daha agresif tümörlerde olduğunu söyleyen yayınlar olduğu gibi, bunun tersini söyleyen çalışmalar da vardır (6,32).

TRK (tirozin reseptör kinaz) gen yeniden düzenlenimi (rearrangement):

TRK gen yeniden düzenlenimi, TPK'ların yaklaşık olarak %10'unda bulunur (1,5). Kromozom 1q22'de bulunan TRK geninin tirozin kinaz domaininin, tropomyozin (TPM3) veya kromozom 1q'da lokalize TPR geni veya kromozom 3'te bulunan TFG genine füzyonundan kaynaklanır (1). Bunlar genelde benzer sıklıkta iken TRK-TPM3, radyasyonla ilişkili TPK'da en çok karşılaşılan tiptir (1).

RAS mutasyonu:

RAS protoonkogenini aktive eden nokta mutasyonu, tüm TPK'larının en az %10'unda görülmüştür. TPKFV'ta oran %43' kadar çıkabilmektedir (1,5). En çok N-RAS kodonu etkilenmiştir (1, 6).

BRAF mutasyonu:

BRAF geninde timinin adenine transversiyonuna yol açan nokta mutasyonu, TPK'un %29-69'unda (1,5), kötü diferansiye tiroid kanserinin %13'ünde, anaplastik tiroid kanserinin %10'unda saptanmıştır (6). Yine TPK'un TCV, Warthin benzeri varyant (WBV), onkositik varyant (OV)'ında daha sık, FV'ta daha nadir görülmüştür (5).

Beta-Catenin ve APC mutasyonu:

Beta-cateninin kodladığı CTNNB1 geninde görülen mutasyon ve nadiren somatik APC mutasyonu FAP ile ilişkili kribriform varyant (KV)'ta bulunmuştur (1,5).

YERLEŞİM:

TPK, olağan yerleşimli tiroid dokusunda olabileceği gibi ektopik tiroid dokusunda, teratomlarda (struma ovarii) ve tiroglossal duktus kistinde de geliŐebilir (1,5,33,34).

KLİNİK:

Hastaların bir kısmı tiroid kitlesi ve servikal lenfadenopati ile gelirken çoğu rastlantısal olarak radyolojik değerlendirme sırasında farkedilir. Büyük olan kitlelerde disfaji, stridor ve öksürük, laringeal sinir hasarı olabilir (1-6).

TİROİD FONKSİYON TESTLERİ:

Tiroidin fonksiyonel kapasitesini değerlendirmek için önemli olan bu testler TPK tanısına yardımcı değildir (1,2).

RADYOLOJİ:

Tiroid Sintigrafisi: Serum TSH değeri düşük olan tiroid nodüllü hastalarda nodülün fonksiyon durumunu saptamak için tiroid sintigrafisi yapılır (1-3). Sintigrafide nodülde iyot alımının olmaması (hipofonksiyone- soğuk nodül) malignite lehinedir (1,2).

Ultrason: Ultrason (US) inceleme, kitlenin boyutunu, kistik ya da solid olduğunu değerlendirmede önemlidir (1-3). US'da sınır düzensizliği, hipoekojenite, diffüz mikrokalsifikasyonların varlığı maligniteyi düşündürür (1). US ve ince iğne aspirasyon biopsisi (İİAB) tanı koymada en yararlı yöntemlerdir (1-3,6).

Diğer Görüntüleme Yöntemleri: Radyoaktif iyot taramaları, bilgisayarlı tomografi (BT) ve magnetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemleri, yaygın semptomatik tümörü olan yaŐlı hastalarda, aşırı lokal yayılımı ve çevre dokulara fiksasyonu olan hastalarda, özellikle tümör sınırlarını değerlendirip cerrahinin başarısını artırmak için kullanılır (1,2).

MAKROSKOPİ:

TPK, tiroid parankimine, kapsülüne, çevre yağ ve kas dokusuna, özofagus, larinks ve trakeaya invazyon gösterebilen, sınırları düzensiz, çoğu solid, bir

kısmı kistik nodüler lezyon şeklindedir. Boyutları 1 mm'den çevre dokulara yayılan büyük kitlelere dek değişiklik gösterir. Multifokalite yaygındır (%65) (1-3,5,6). Belirgin kistik değişiklikler %10'unda görülür (3). Bazen TPK metastazları belirgin kistik değişiklik göstererek brankial yarık kisti ve benign kistlerle karışabilir (5,35). Yüzde 10'dan az olgu tamamen kapsüllü olabilir (5,6). Distrofik kalsifikasyon yaygındır hatta bazen osteoid metaplazi görülür. Kanama, nekroz olabilir. Kesit yüzü gri-beyaz renkli, elastik kıvamdadır (1-3,5,6).

MİKROSKOPİ:

Klasik tipte TPK (KTPK), karakteristik nükleer özellikler taşıyan oval, kübik, geniş ya da elonge hücrelerin üstüste binmeler gösterdiği bir tümördür (1-3,5,6). Büyüme paterni daha çok papiller olmakla birlikte, solid, trabeküler, mikro-makrofolliküler, mikroglandüler, kribriform olabilir (1,6). Fibrovasküler korların bulunduğu geniş, dallanmış, kompleks, tek ya da çok sıralı hücrelerin döşediği papiller yapılar görülür. Papiller yapılar hemen daima folliküler yapılarla birlikte. Folliküler yapılar sıklıkla düzensiz ve tubulerdir. Tümör kistik olabilir ve bu kisti skuamöz metaplazi gösteren epitel döşeyebilir. Skuamöz diferansiyasyon, TPK'ların yaklaşık yarısında görülür (1-3,5,6).

TPK'da nükleusların bazı karakteristik özellikleri vardır. Bu özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Üst üste binme özelliğine sahip, para dizisi gibi dizilmiş, normal tiroisit nükleusundan daha büyük ve daha oval, berrak, camsı, açık, içi adeta boşalmış, soluk buzlu cam görünümü ya da Orphan Annie nükleusu denilen tipik görünüme sahip nükleuslardır (1-6). Bu görünümün formalin fiksasyon artefaktına bağlı olduğu düşünülmektedir, frozen kesitlerde bu görünüme rastlanmamaktadır (5,36). Buzlu cam görünümlü şeffaf nükleuslar, tüm TPK'ların %80'inden fazlasında görülmektedir (1-6). Benzer görünüm HT, FA ve diffüz hiperplazilerde fokal olarak, nadiren FK'larda diffüz olarak görülebilir (1-3,5,6,36).
- Nükleer membran oldukça kalındır (1-3,5,6).
- Nükleol kenara itilmiştir, görülmez (1-6)

- Sitoplazmik membranın nükleusa doğru invajinasyonu sonucu oluşan intranükleer psödoinklüzyonlar, olguların % 80-85'inde görülür. İntranükleer psödoinklüzyonlar, frozen kesitlerde ve İİAB preparatlarında daha iyi değerlendirilir. Patognomonik değildir, genellikle az sayıdaki tümör hücresinde görülür (1-6).
- Nükleusun uzun eksenine paralel yarık şeklinde izlenen nükleer oluklar (nuclear groove), nükleer membranın kıvrımlanmasından oluşur. Bu özellik neredeyse tüm TPK'larda, en azından fokal olarak bulunur (1-6). Sitolojik preparatlarda da izlenebilir (1-3,5,6,37). Patognomonik değildir; Hurtle hücreli tip başta olmak üzere bazı folliküler neoplazmlarda (FN), hyalinize trabeküler adenomda (HTA), kötü diferansiye tiroid karsinomunda (KDTK) ve tiroid orjinli olmayan bazı adenokarsinomlarda da görülebilir (1, 2,4-6,38).
- Mitoz azdır veya yoktur (1-3,5,6).

TPK'da histolojik derecelendirme (grade) kullanılmaz, olguların %95'den fazlası derece I niteliğindedir. Solid büyüme paterni, mitoz, nekroz, sitolojik atipi ile karakterli kötü diferansiasyon alanları ve anaplastik differansiasyon hem tümörün kendisinde hem de rekürrensinde bulunabilir (6).

Stroma ödemli, hyalinize, skleroze, dezmoplastik olabilir. Fibrozis değişken oranlardadır (1-3,5,6). Yoğun hyalin fibrozisin, TPK'un (olguların %89'unda) FK'dan (olguların %18'inde) ayırımında önemli bir özellik olduğu söylenmiştir (5,39). Stroma lenfosit, köpüksü histiyosit, plazma hücresi, hemosiderin ve nadiren yağ dokusu içerebilir. Saçılmış lenfositler tümörün invaziv kenarlarında yaygındır (1-3,5,6,40). Nadiren bu yangısal popülasyon çok yoğun olabilir fakat invaziv tümör dokusu içinde sınırlıdır ve öncül bir kronik tiroidit olduğu anlamına gelmez (6). Bazı folliküllerin lüminal aralığında ve papillalarda multinükleer histiyositlerin olması tanısız önem taşır (%46 olguda); çünkü bu bulgu benign lezyonlarda çok nadirdir (5).

Oval, konsantrik laminer kalsifikasyon şeklindeki Psammom cisimleri olguların yaklaşık yarısında görülür. Varlığı şiddetle TPK'ü düşündürür (1-6). Psammom cisimleri papillalardaki solid tümör yuvaları içerisinde, lenfatik aralıkta ve tümör stromasında olabilir (1-3,5,6). Psammom cisimlerinin

servikal lenf nodunda görülmesi de TPK'un güçlü göstergesidir (1,6). Psammom cisimcikleri, Hurtle hücreli neoplazmda ve HTA'da yaygın olarak bulunan, kolloid içerisindeki kalsifiye psammom benzeri cisimciklerden ayrılmalıdır. Bu cisimcikler folliküler lümen içerisinde yerleşme eğilimindedirler (5,6).

TPK multifokal olabilir. Başlangıçta multifokal tümör odaklarının ayrı ayrı primerler olmasından çok intratiroidal lenfatik yayılım sonucu ortaya çıktığı düşünülürken RET/PTC ve heterozigosite kaybı ile ilgili çalışmalar, multifokal TPMK'ların ayrı ayrı primerler olduğu görüşünü öne çıkarmıştır (6).

Damar invazyonu TPK'un %7'sinde görülür (6). Mikroskopik olarak vasküler invazyonun görülmesi, hematojenik yayılım ve bunu izleyen artmış metastaz riskinin işaretidir (6,41). Özellikle bölgesel LNM'ı olan hastalarda bez içi lenfatik tutulumları yaygındır (1,2,6,42).

İNCE İĞNE ASPİRASYON BİOPSİSİ VE SİTOPATOLOJİ:

Cerrahi girişim öncesinde TPK tanısını koymada en etkili yöntemdir. Soliter tiroid nodüllerinin değerlendirmesine İİAB ile başlanmalıdır (1-3,6). Sadece TPK değil, primeri çok küçük olan ya da palpe edilemeyen TPK'ların, palpabl metastatik servikal lenf nodlarının tanısına da yardımcıdır (1).

TPK'a ait İİAB yaymalarında, tek sıralı tabakalar veya üç boyutlu kümeler halinde papiller doku fragmanları izlenir (1,2). Bu papiller yapılar düzenli dış kontürlere ve nükleer palizadlanmaya sahip, dallanmış görünümündedir (1). Tümör hücreleri genellikle kübik olmakla birlikte kolumnar, poligonal, içsi veya skuamöz morfolojidedir. Buzlu cam görünümü net değerlendirilemez. Geniş, düzensiz kontürlere, ince veya tozsu kromatine sahip, küçük nükleol içeren nükleuslar izlenir. Bu nükleusların içinde oluklanmalar ve intranükleer psödoinklüzyonlar yaygındır. Kondanse kolloid, multinükleer dev hücreler ve psammom cisimleri olabilir (1,2).

İMMUNOHİSTOKİMYA:

TPK'u, immunohistokimyasal (İHK) olarak diğer follikül kaynaklı tiroid lezyonlarından ayırmayı amaçlayan çok sayıda yaygın bulunmaktadır. Bu konuda sitokeratin-19, HBME-1 ve galektin-3 öne çıksa da bu boyaların

hiçbiri TPK için spesifik olmayıp bazı benign tiroid lezyonlarında (nodüler guatr, folliküler adenom, lenfositik tiroidit ve iğne aspirasyonu yapılan reaktif alanlarda) da boyanır. CK 19 negatifliği, tipik TPK nükleer özellikleri varlığında tanıyı ekarte ettirmez. Bu yüzden bu boyaların panel olarak uygulanması önerilmektedir (1-3,6).

Çoğu TPK, TTF-1 ve tiroglobulin ile pozitif boyanma gösterir. Ancak skuamöz diferansiyasyon alanlarında TTF-1 ve tiroglobulin negatiftir (5). Tiroglobulin ve TTF-1, metastatik bir odağın primerinin tiroid olduğunu ve lenf nodundaki kistik metastazı tanımayı sağlar (1-6).

Kromogranin ve sinaptofizin negatiftir (1-6).

RET boyanması RET/PTC gen yeniden düzenlenimini gösterir (1-5,6) Metastaz yapmış TPK'lar tipik olarak p27 kaybı, siklin D1 upregülasyonu gösterirken, metastazı olmayan TPK'lar p27 pozitif, siklin D1 negatiftir (1).

Yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin, S100, vimentin, EMA, CA-125, RET, HLA-DR, kan grup antijenleri, östrojen reseptörleri, CD15, CD57 (Leu7), CITED1, fibronektin-1, platelet derive growth faktör (PDGF), claudin-1, involukrin, tiroid peroksidaz, HER2/neu, ICAM1 ve insülin-like growth factor protein-6 (IGFBP-6)'nın değişik oranlarda ekspresyonu görülmüştür fakat hiçbiri spesifik değildir (1,3-6,43-45).

LeuM1 ve EMA pozitifliği, E-cadherin ekspresyon kaybı, RB proteinin düşük seviyede ekspresyonu, p53 pozitifliği kötü prognostik göstergelerdir (1-3,6,43-45).

TİROİD PAPILLER KARSİNOMUN MİKROSKOPİK ALT TIPLERİ

TPK'un, klasik tipten farklı morfolojik özelliklere sahip bazı alt tipleri mevcuttur (1-4):

1. Papiller mikrokarsinom (okkült papiller karsinom) (TPMK)
2. Foliküler varyant (FV)
3. Makrofolliküler varyant (MFV)
4. Onkositik varyant (OV)
5. Berrak hücreli varyant (BHV)
6. Diffüz sklerozan varyant (DSV)

7. Tall cell varyant (TCV)
8. Kolumnar hücreli varyant (KHV)
9. Solid varyant (SV)
10. Kribriform varyant (KV)
11. Warthin benzeri varyant (WBV)
12. Enkapsüle varyant (EV)
13. Diğer:
 - İğsi hücreli varyant
 - Lipomatöz stromalı varyant
 - Fasiitis benzeri stroma gösteren varyant
 - Miksoid varyant

Tiroid Papiller Mikrokarsinom:

DSÖ'nün 1988 sınıflamasına göre, en büyük boyutu 1 cm ya da daha küçük olan TPK için kullanılan terimdir (1-6). Bazı araştırmacılar bu büyüklüğün 1.5 cm'e kadar olduğunu kabul etmişlerdir (6). 2004 DSÖ sınıflaması bu tanımlamayı daraltarak rastlantısal olarak bulunan 1 cm.den küçük tümörleri bu sınıflamaya almış, klinik bulgu veren küçük boyutlu TPK'ları tanımlamadan çıkartmıştır (1,5).

Bu tümör için kullanılan okkült PK, okkült sklerozan karsinom, küçük PK, kapsülsüz sklerozan tümör gibi farklı isimlendirmeler mevcuttur (1,3,5,6).

TPMK, TPK'un en yaygın formudur. Finlandiya'da otopsi serilerinin 1/3'ünden fazlasında ve TPK ile ilişkisiz olarak yapılan tiroidektomi materyallerinin %24'ünden fazlasında TPMK odağı saptanmıştır (1).

TPK'dan farklı olarak erkeklerde yaygınlığı daha fazladır (3). Klinik olarak sıklıkla sessiz olmasına rağmen, hastalar nadiren LNM ve uzak metastaz ile gelirler (1,5,6,46). Özellikle multifokal olma eğiliminde olan familial formlarında LNM ve uzak metastaz eğilimi yüksektir (6,47).

Çocuklarda daha agresiftir (1,2,6). TPK'un, özellikle çocuklarda, eksternal radyasyonla en yakın ilişki gösteren alt tipi TPMK'dur (6).

Boyutunun küçüklüğünden dolayı makroskopik incelemede atlanabilir. Tümör genellikle tiroid kapsülüne yakın yerleşimli, sert, tebeşirimsi beyaz bir lezyon olarak görülür (1-3,5,6). TPMK'ların %75'i kapsülsüz ve sklerozedir,

lezyon çevre tiroid dokusuna infiltre olabilir. Nadiren özellikle boyutu 5 mm.den küçük olanlar kapsüllü olabilir (1,5,6).

Geniş serilerde tümör çapı ile histolojik özellikleri arasında korelasyon bulunmuştur. Boyutu 1 mm.den küçük tümörler stromal sklerozdan yoksundurlar; 2 mm.den büyük olanlar ise belirgin dezmoplastik stroma gösterirler (6). Çapı 0,5 cm'den küçük tümörler genellikle folliküler yapıda ve belirgin sınırlıdır. 0,5 cm'den büyük tümörler papiller yapıda ve sıklıkla infiltratiftir (1,6).

Küçük çaplı TPMK odaklarının intraglandüler metastazdan ayrımı güç olabilir (1,2,6). İntravasküler yerleşim, kapsül ve skleroz yokluğu, yıldızlı büyüme paterni yokluğu intraglandüler metastazı destekler (2).

Literatürde lenf nodu metastazı hatta akciğer metastazı yapmış TPMK olguları bildirilmiştir (6,46). Nadiren sentinel LNM ile gelirler. Bu nadir lezyonlarda p27 kaybı ve siklin D1 upregülasyonu önemlidir (1).

Foliküler varyant:

Küçük ya da orta büyüklükte, papiller konfigürasyonu olmayan düzensiz şekilli folliküllerden oluşur. Makroskopik olarak kapsüllü, kapsülsüz veya kısmen kapsüllüdür. Mikroskopik olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (1,2,5,6):

Diffüz FV: Tiroid glandı diffüz olarak tümör ile infiltredir (1,3,6).

Nadirdir. Daha genç hastalarda görülür ve daha agresiftir. LNM ve uzak metastaz daha yaygın olup, prognozu kötüdür (1,5,6).

Enkapsüle FV: Tümör çevresinde kapsül varlığıyla karakterli varyanttır (1,3,5,6). TPKFV'ların 1/3'ü kapsüllüdür (6). Mikroskopik olarak folliküler patern gösterir ve papiller karsinomun tipik nükleer özelliklerini taşır (1,3,5,6). Bunlar, nükleer özellikleri yama tarzında içerdiğinden kolaylıkla adenomatöz nodül ya da FA yanlış tanısı alabilir (6,48). Bazı kapsüllü nodüller ise çok az miktarda tipik nükleer özellikleri gösterir. Bunların klinik önemi belirsizdir. Bu tümörlere "malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiyel tümör" denilmesi önerilmiştir fakat bu öneri henüz yaygın kabul görmemiştir (1,3,6). Papiller karsinomun tipik nükleer özellikleri yanı sıra İHK ile lezyonların düşük ve yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinlerle ve HBME-1 ile pozitif boyanması, folliküler neoplazmlardan ayrımına yardımcı olur (1-3,6).

Bu tümörler, kapsüllü olsa bile tiroid içi yayılımı bakımından PK'un infiltratif karakterini göstermektedir (1,5,6).

Foliküller içinde değişik oranlarda eozinofilik kolloid bulunur. İntrafolliküler multinükleer dev hücreler sıktır. Stromal skleroz ve psammom cisimleri ise nadirdir (1,3,6,48,49).

EFV'in prognozu mükemmeldir (1,2,5,6). Bu tümörlerde çok nadiren LNM ve uzak metastaz olabilir (6,48,49).

Alt tiplere bakılmaksızın bir bütün olarak değerlendirildiğinde TPKFV'in prognozu, klasik tip TPK'a benzer (1,6,49). Bölgesel LNM yapma eğilimi klasik tipten daha düşüktür. Ancak boyun dışına uzak metastaz, klasik tip TPK'a göre daha yüksek orandadır (6,49).

Makrofolliküler varyant:

MFV tanısının konabilmesi için, histolojik olarak tümördeki folliküllerin 200 mikrondan geniş çaplı olması ve bu follikül yapılarının kesit alanının %50'sinden fazlasını oluşturması gerekmektedir (1,5,50,51). Çoğu kapsüllü olduğundan koloidal veya hiperplastik nodül veya makrofolliküler adenom ile karışır. MFV'da folliküllerin periferinde vakuolizasyon gösteren kolloid gözlenir. Kolloidle dolu folliküllerin periferinde değişik oranlarda genellikle atipik hücrelerle döşeli papiller yapılar izlenir (2). Çoğu follikülü döşeyen hücreler hiperkromatik nükleusluken bazılarında tiroid papiller karsinomun tipik nükleer özellikleri izlenir (1-3,5,6,50,51).

LNM oranı düşüktür (1,5,51). Nadiren DDTK ve ATK'na dönüşebilir (5,51).

Onkositik varyant:

Makroskopik olarak kızıl kahverengi, nadiren gri-beyaz renkli, kapsüllü, kistik değişiklikler içermeye eğiliminde, büyük boyutlara ulaşan bir lezyondur. İyi sınırlıdır veya kapsüllüdür. Bazen kapsül invazyonu olabilir. Mikroskopik olarak papiller ya da folliküler patern gösterebilir. Lezyonların %75'inden fazlasında dallanmış papiller yapılar bulunur (1,2). Papiller yapıların ince fibrovasküler korlarında veya makro ve mikrofolliküllerde değişik oranlarda belirgin eozinofilik, granüler sitoplazmalı, onkositik hücreler bulunur (1-3,5). Bu hücreler genellikle poligonaldır fakat kolumnar da olabilir. Nükleuslar,

tiroid papiller karsinomun tipik nükleusları şeklindedir. Lenfositik infiltrasyon yaygındır (1-3). Psammom cisimleri nadiren bulunur. Dejeneratif değişiklikler yaygındır(1,2).

Bu varyantta RB ve E2F-1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu görülür (3, 52).

Prognozu KTPK gibidir (1-3,5,6).

Berrak hücreli varyant:

Papiller konfigürasyon içeren alanlar yanısıra folliküler patern de gösterebilen berrak hücrelerden zengin bir varyanttır (1). Bazen berrak ve onkositik hücreler birlikte görülür. Berrak hücre değişikliğinin onkositik hücrelerdeki dejenerasyondan ve glikojen birikiminden kaynaklandığı düşünülmüştür (2,5). Berrak hücrelerde müsin varlığı alcian blue pozitifliği ile gösterilir (1).

Metastatik renal hücreli karsinomdan ve medüller karsinomdan kolloidin varlığı yanı sıra İHK ile TTF-1, tiroglobülin pozitifliği, kalsitonin negatifliği ile ayrılabilir (1,2).

Tedavi ve prognozu KTPK ile aynıdır (1,2).

Diffüz sklerozan varyant:

Nadirdir, yaklaşık olarak tüm TPK'ın %3'ünü oluşturur (3,6). Genellikle genç hastalarda görülür (6). Çernobil nükleer felaketinden sonra çocuklarda görülen TPK'un %10'unu oluşturur (6,54).

Tümör içermeyen alanlarda kronik lenfositik tiroidit görülebilir ve bazı hastalar otoimmün tiroid hastalıklarının serolojisine sahiptir (1,3). Diğer otoimmün hastalıklar eşlik edebilir (1,6).

Belirgin baskın bir kitle formasyonundan çok tiroidin bir ya da iki lobu genellikle diffüz olarak tutulur (1,3,6). Histolojik olarak kümeler halinde papiller karsinom odakları, bazen de folliküler paternli adalar, ileri derecede vasküler invazyon ve çevre dokulara infiltrasyon, aşırı fibrozis, çok sayıda psammom cisimleri, yaygın skuamöz metaplazi, lenfoid follikül oluşturan lenfositik infiltrasyon, lenfatikler içinde tümör embolüsleri görülür. Tipik nükleer özellikler vardır (1,3,6). Bu özelliklerin herbiri klasik tip TPK'nda görülebilmekle birlikte DSV'ta bütün özelliklerin bir arada olması beklenir (6).

Prognoz kötüdür. Hemen tamamında tanı sırasında servikal LNM vardır. Ekstrakapsüler yayılım, uzak ve nodal metastazların varlığı sıktır (1,3,6). Akciğer metastazı %25'inde vardır (1). TPK'a göre yaşam süresi daha kısa olmasına karşın mortalite oranları yine de düşüktür. İyi bir cerrahi, LN diseksiyonu ve radyoiodin tedavisi ile prognozun KTPK kadar iyi olabileceğini söyleyen çalışmalar vardır (6).

Tall cell varyant:

Tüm TPK'ın yaklaşık olarak %10'unu oluşturur. İleri yaş hastalarda (ort. 50-57 yaş) görülür. Erkeklerde daha sıktır (1,3,5,6). Tümörün boyutu genellikle 6 cm.den büyüktür (2, 5,6,54).

Bu nadir varyantta tümör hücrelerinin boyları, genişliklerinin en az 3 katı olmalıdır (1,2,5,6,54,55). Papiller, trabeküler ve kordon benzeri patern baskınken folliküler yapılar nadiren görülür (1,2,6,54). Daha çok intersellüller sınırları keskin ve belirgin, asidofilik sitoplazmalı, yaygın nükleer oluklanmalar, psödoinklüzyonlar taşıyan berrak nükleuslu, elonge, tek sıralı hücrelerin döşediği papiller yapılar şeklinde görülür (5,6,54,55). Papiller yapılar içerisinde ve etrafında belirgin lenfositik infiltrat görülür. Bazı tümörlerin kronik tiroidit zemini belirgindir (6). Bazıları içsi hücreli skuamöz hücreli karsinom (SCC) ve andiferansiye karsinoma dediferansiye olabilir (5,6,55,56).

Bazı yayınlara göre TCV tanısı koymak için lezyonun %50'sinden fazlasının, bazılarına göre ise %70'inden fazlasının sözedilen kriterleri taşıması gerekmektedir (6,2).

KTPK'dan daha agresiftir (rekürrens: %18-58; mortalite %9-25) (1,3,5,6,56). Lokal rekürrens ile trakeaya invazyon olabilir ve bu komplikasyon ölümcül olabilir (5,6,56). Nekroz, mitotik aktivite, ekstratiroidal yayılım (%42-82), uzak metastaz ve ileri yaşta görülme oranı KTPK'dan daha fazladır ve bunlar kötü prognoz göstergeleridir (2,5,6,57).

İHK ile TCV'ın LeuM1 (CD15), EMA ve c-Met pozitifliği göstermesi, yüksek p53 boyanma oranı (TCV'ta %61, KTPK'da %11) ve üçte birinde RET/PTC3 translokasyonu ve BRAF mutasyonunun bulunması agresiflik göstergeleridir (5,3).

Kolumnar hücreli varyant:

KHV, TPK'un nadir bir formudur. Kadın ve erkekte eşit oranda görülür(1-3,5,6,58) .

Makroskopik olarak, tümör büyük çapta (6 cm'den büyük) ve kapsülsüzdür (2,5,6).

Mikroskopik olarak, dar kolloid içersinde papiller yapılar belirgindir; folliküler, trabeküler ve solid alanlar da görülebilir (1-3,5,6,58). Bazen folliküller elonge olabilir, tubuler yapılar oluşturabilir; metastatik bir adenokarsinomla karışabilir (1,2,5). Papiller yapıları, nükleusları hiperkromatik, psödostratifiye, uzun kolumnar hücreler döşer. Sitoplazma dar ve soluktur; supranükleer ya da subnükleer vokuolizasyon içerir ve erken sekretuar endometriuma benzer (1-3,5,6,58). TPK'un tipik nükleer özellikleri pek görülmemektedir. Psammom cisimcikleri nadirdir. Skuamöz metaplazi olabilir. Mitoz sıklıkla izlenir. Nekroz az bir olguda izlenmiştir. Arada içsi hücreler, mikropapiller yapılar ve mikrofoliküller görülebilmektedir (2,5,6). Nadiren TCV'la beraber görülür (3).

Belirgin kötü bir klinik gidişle diğer TPK'larından ayrılır . Agresif cerrahi ve radyoablatif tedavi gerektirir. Tiroid dışı yayılım, LNM ve uzak metastaz oldukça sıktır (1,2,5,6,62). Çoğu hasta 5 yıl içinde yaşamını kaybetmektedir (5,6,58). Bu lezyon papiller karsinom sınıflamasının içine dahil edilse de bu agresif davranışından dolayı TPK varyantı olarak kabul edilmesi tartışmalıdır (6,58).

Solid varyant:

Birçok TPK'da genellikle dar kolloid içersinde yuvarlak şekilli solid adalar görülebilir. Ancak SV tanısı koyabilmek için, tümörün %50'sinden fazlasının solid büyüme paterni göstermesi gereklidir (5,6,59). Hücreler KTPK'a benzer (1,2,6). Eğer solid büyüme paternine belirgin nükleer polimorfizm ve nekroz eşlik ederse KDTK düşünölmelidir (1).

SV, çoğunlukla çocuklarda görülür ve Çernobil feleketinden sonraki TPK'ın %30'undan fazlasında görölmüştür (5,60). Olguların yaklaşık yarısı baş-boyun bölgesine eksternal radyasyon öyküsü olan çocuklardır (1,6,60). Vasküler invazyon ve ekstratiroidal yayılım olguların 1/3'ünde görülür (1).

Prognozu, bazı araştırmacılara göre klasik tip TPK'a benzer; bazı araştırmacılara göre ise daha kötüdür (1,5,6).

Kribriform varyant:

Histolojik olarak fokal papiller yapılar, uzun kolumnar hücreler, kolloid içermeyen kribriform patern, solid ve isi hücreli hücreler ve skuamoid morller izlenir (1,3,5,61). Fokal olarak papiller karsinomun tipik nükleer özellikleri izlenirken çoğu alanda nükleuslar hiperkromatiktir (1,5). Çoğu tümörde tiroglobulin fokal pozitifdir (1).

Genellikle multifokaldır ve genç kadınlarda görülür. Tipik olarak FAP ve Gardner sendromlu olgularda izlenir. Tek sporadik olgular da olabilir (1,3,5,61). Fakat hem familial hem sporadik formlar çok nadirdir. Bu hastalarda APC gen analizi FAP tanısını erken yakalamak için önerilmektedir. Somatik RET/PTC gen yeniden düzenlenimi gösterilmiştir (3,5). İHK olarak beta-katenin ve biotin değerlidir (3,5,61).

Prognozu iyidir (1,3,5,61).

Warthin benzeri varyant:

Mikroskopik olarak tükrük bezinin Warthin tümörüne benzer. Histolojik olarak papiller yapıları döşeyen eozinofilik sitoplazmalı hücreler yanı sıra stroma içerisinde germinal merkezler içeren belirgin lenfositik infiltrasyon görülür (5,6,62,63). Bazı hücrelerde tipik TPK nükleer özellikleri seçilir. Stromadaki lenfositik infiltrasyon ve eozinofilik hücreler nedeniyle en sık TCV'la karışır (5,62). Özellikle invaziv kenarlarında TCV'a geçiş de görülebilir (6).

Eozinofilik değişikliklerin zemindeki tiroiditle ilişkili olduğu düşünülür. Tümör stromasında IGF-1 saptanmasının tümör gelişiminde önemli olabileceği dşnlmştr (62). Malign folliküler epitel hücrelerinde HLA tip II antijeninin ekspresyonunun, tümörü infiltre eden lenfositlere yanıt olarak geliştiği gösterilmiştir (63).

Klinik gidiş, klasik tip TPK'a benzer (5,6,62,63).

Enkapsüle varyant:

Tüm TPK'lar içindeki sıklığı % 8-13'tür. EV, makroskopik olarak tamamen kapsüllü olup, adenoma benzemektedir (6). Bazı olgularda kapsülde fokal invazyon görülebilmektedir. Mikroskopik olarak kapsül ve TPK'un sitolojik

özelliklerini içeren folliküler yapılar veya tümüyle papiller yapılardan oluşmaktadır (3,6). TPK'un sitolojik özelliklerini gösteren alanlarda RET/PTC gen yeniden düzenlenimi gösterilmiştir (3). Bazen kapsül invazyonu yapmaksızın LNM oluşturmaktadır. LNM'ları, TPK'larinkinden daha azdır (6).

TPKEV'ta prognoz mükemmeldir, uzak metastaz veya tümöre bağlı ölüm insidansı hemen hemen sıfırdır (3,6).

TİROİD PAPİLLER KARSİNOMDA PROGNOZ

TPK'da prognoz mükemmeldir. 10 yıllık yaşam %90'ın üzerinde, genç hastalarda %98'in üzerindedir (1,3,6).

Tümör evrelemesinde yaygın olarak kabul edilen sistem postoperatif tümör-node-metastaz (pTNM) sistemidir. Bu sistem International Union Against Cancer (UICC) ve American Commission on Cancer (AJCC) tarafından kabul edilmiştir (1-3,5,6).

Prognozu etkileyen faktörler:

1. Yaş: En önemli prognostik faktörlerden biridir. 50 yaş üzerindeki olgularda, daha genç olanlara göre prognoz daha kötüdür (1-3,5,6). TPK'a bağlı ölümlerin hemen hemen çoğu 40 yaşından sonra görülmektedir (3,5,6).
2. Cinsiyet: Kadınlarda prognoz çoğu serilerde erkeklere göre daha iyi bulunmasına karşın, bazı serilerde belirgin fark görülmemiştir (1-3,5).
3. Tiroid dışı yayılım: Prognozu kötü yönde etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Makroskopik olarak tiroid dışı yayılım tespit edilen olgularda, prognoz daha kötü seyretmektedir (1,3,6).
4. Mikroskopik alt tipler: Morfolojik alt gruplar anlatılırken konu içinde ayrı ayrı prognozları belirtilmiştir. DSV, TCV, SV, KHV, trabeküler ve dediferansiye varyantta prognoz kötüdür (1-3,5,6)
5. Tümör çapı: Tümör çapı ile prognoz arasında ters bir orantı vardır yani tümör çapı büyüdükçe prognoz kötüleşir (1,3,5,6). Tümör boyutu 1-1.5 cm. ise çok iyi, 4 cm.i geçtiğinde ise kötüdür (5,64).

6. Kapsül ve sınırlar: Kapsüllü ve/veya ekspansif büyüme paterni gösteren tümörlerde prognoz diğerlerine oranla daha iyi seyretmektedir (1,3,5,6).
7. Multisentrisite: Birden fazla tümör odağı içeren olgularda, metastaz insidansının yüksek olduğu ve yaşam süresinin daha kısa olduğu belirtilmektedir (1,3,6).
8. Servikal LNM, prognozu kötüleştirmezken ekstrakapsüler yayılım büyük olasılıkla uzak metastazın ve kötü prognozun göstergesidir (1,3,5,6).
9. Uzak metastaz: Akciğer ve kemik gibi uzak metastazlar %5-7 arasında görülür (1-3,5,6). Multipl metastazların olmasına rağmen yaşam süresi radyoaktif iyot tedavisiyle uzatılabilir (5,6).
10. Az diferansiye, skuamöz veya anaplastik alanlar: Olguların % 5'inden daha azında görülmektedir. Bu komponentlerin olması prognozu kötü yönde etkilemektedir (1,3,6).
11. Radyasyon: Daha önce radyasyonla karşılaşma öyküsü olanlar ile radyasyon öyküsü olmayan olgular arasında prognoz açısından fark görülmemiştir (1,3,6). Bazı çalışmalarda ise radyasyon öyküsü olan olguların daha agresif gidişli oldukları vurgulanmaktadır (6).
12. DNA ploidi: TPK'nın büyük bir kısmında DNA diploid, % 20'sinde anöploid veya az bir kısmında nondiploiddir (6). TPK'un agresif davranışı ile anöploidi arasında korelasyon olduğu belirtilmektedir (1,3,6). Multiploidi kötü prognostik , anöploidi ise özellikle 60 yaş üzerinde kötü prognostiktir (5,65).
13. Histolojik özellikler: Bu parametrenin prognozla kesin bir ilişkisi olduğu düşünülmemektedir. Fakat tam olarak uygulanabilir olması için standardize edilmesi ve nekroz, mitoz gibi kriterlerin varlığının daha kesin tanımlanması gerekmektedir (3). Bazı yayınlarda atipi, mitoz, nekroz, vasküler invazyon gibi bulguların kötü prognostik etkisi olduğu vurgulanmaktadır (5,66). Belirgin atipi, trabeküler büyüme paterni, kötü prognostik faktörken stromal kemik formasyonu ve kronik tiroidit zemini iyi prognostik faktörlerdir (5,67-69).

14. RET/PTC ekspresyonu: RET/PTC ekspresyonunun prognoza etkisi değişkindir. RET/PTC1 daha sessiz tümörlerde izlenirken, RET/PTC3 daha agresif gidişli tümörlerde görülür (1,6).
15. İHK: EMA ve Leu-M1 pozitifliğinin, p53 immunreaktivitesinin, E-cadherin ekspresyon kaybının daha agresif klinik gidiş ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (3,5). S-100 pozitif histiyositlerin yoğunluğu iyi prognostik faktördür (5).
16. Rb protein: Rb protein ekspresyonunun rekürrenste etkili olduğu düşünülmektedir (3,5).
17. Papiller ve folliküler yapıların oranları, fibrozisin varlığı veya yokluğu, solid alanların varlığı veya yaygınlığı, skuamöz metaplazinin olması, psammom cisimciklerinin varlığı ve küçük damar dansitesi olması prognozu etkilememektedir (5,6).

TİROİD PAPİLLER KARSİNOMDA TNM SINIFLAMASI (1-3,4-6)

Primer Tümör (T)

TX	Primer tümör değerlendirilememiş
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
T1	Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha küçük ve tiroide sınırlı
T2	Tümörün en büyük boyutu 2 cm'den büyük- 4 cm'den küçük ve tiroide sınırlı
T3	Tümörün en büyük boyutu 4 cm'den büyük ve tiroide sınırlı veya tümör herhangi bir çapta ve minimal tiroid dışı yayılım var (örneğin sternotiroid kas veya tiroid çevresi yumuşak doku)
T4a	Tümör herhangi bir çapta ve tiroid kapsülünü aşarak subkutan yumuşak dokuyu, larinks, trakea, özofagus ya da rekürren laringeal siniri invaze etmiş
T4b	Tümör prevertebral fasya veya karotid arter veya mediastinal damarları invaze etmiş

Bölgesel Lenf Nodu (N)

NX	Bölgesel lenf nodu metastazı değerlendirilememiş
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı var
N1a	Level IV lenf nodu (Pretrakeal, paratrakeal, prelaringeal/ Delphian lenf nodu) metastazı var
N1b	Unilateral veya bilateral veya servikal veya superior mediastinal lenf nodu metastazı var

Uzak Metastaz (M)

MX	Uzak metastaz değerlendirilememiş
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

EVRE GRUPLARI

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

TİROİD PAPİLLER KARSİNOMUN LENF NODU METASTAZI

Bölgesel LNM, TPK'un yaygın bir semptomudur (>%50). Bazı tümörlerde (%20) ise okült primer tümör söz konusu olup lenf nodu metastazı tek

başlangıç semptomu olabilir (1,3,5,6,70,72). DSV'ta hemen tamamında tanı sırasında servikal LNM vardır (1,6).

TPMK'da tümör büyüklüğünün LNM'nı etkilediği, LNM'ında kapsül invazyonunun kötü prognostik faktör olduğu öne sürülmektedir (70).

Boyunda baskın olarak iki bölge en sık metastaz alır: santral (pretrakeal, paratrakeal, prelaringeal ve peritiroid lenf nodlarını kapsar) ve lateral bölge (71-73). Yapılan araştırmalarla tiroide en yakın olan santral lenf nodlarının lateraldekilerden daha fazla ve daha önce tutulduğu saptanmıştır. Lateral bölgedekiler daha kolay palpe edilirler ve US (özellikle de İİAB ile kombine edilirse) bunların saptanmasında en yararlı araçtır (70,72).

Çoğu cerrahide santral LN çıkarılmaktadır. Primer tümör boyutu 3 cm'den büyükse veya ekstratiroidal yayılım varsa profilaktik lateral LN diseksiyonu önerilmektedir (72).

LNM, hasta yaşam süresini etkilemeyen bağımsız negatif prognostik faktör olarak kabul edilmekle birlikte prognozu etkilemediğini söyleyen çalışmalar da vardır (1,6,74-79).

TPK-LNM'ların yaklaşık olarak %40'ı (bildirilen oranlar %21-50 arasında değişmektedir) kistik dejenerasyona uğrayabilir ve benign bir kistik lezyonu taklit edebilir (1,5,6,71-79). Kistik alan, küçük soliter veya periferde multipl olabileceği gibi nadiren nodal metastazın tamamı kistik olabilir (1,71,72). Histolojisi papiller, mikst ve folliküler olabilir (6).

p53, bcl-2, siklin D1, p21'in TPK-LNM'da pozitif olduğu, siklin D1 pozitifliğinin ve p27 negatifliğinin LNM'na yatkınlık oluşturduğu (80), VEGF-D'nin TPK-LNM'da önemli olduğu ileri sürülmektedir (81).

p16

p16, 9p21 kromozomu üzerinde INK4a lokusunda kodlanır. p16INK4a CDK4'e bağlanmak için siklinD ile yarışır ve siklin D-CDK4 kompleksinin Rb'yi fosforilleme yeteneğini inhibe ederek hücre siklusunun geç G1 fazında durmasına yol açar (4,82).

Bu loküsteki delesyonlar ve mutasyonlarla ilişkili araştırmalarda bu genin kodladığı p16 proteininin malignite gelişiminde rol oynadığı

saptanmıştır (4,82). p16INK4a insan kanserlerinde sıklıkla hipermetilasyon ile inaktive olur veya mutasyona uğrar (4). Meme, over karsinomu, melanom, küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda, serviks ve özofagusun skuamöz hücreli karsinomlarında, yüksek dereceli astrositomda, primer pankreas adenokarsinomu ve T hücreli akut lenfoblastik lösemide p16 pozitifliği bulunmuştur (82-88).

Non-neoplastik lezyonlarda veya normal tiroid dokusunda p16 ile boyanma izlenmezken TPK'da ve FK'da p16 pozitifliği bulunmuştur. Kötü diferansiye tiroid karsinomunda p16 pozitifliği saptanmamıştır. Tam olarak açıklanamasa da p16'nın tümör gelişiminin erken evrelerinde görev aldığı düşünülmektedir. p16 ekspresyonu, diferansiye tiroid karsinomlarında, ekstrapireoidale tümör yayılımı ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (89-91).

p21

p21/Waf1 geni 6p21.2 kromozomunda yerleşmiştir ve 164 aminoasitlik bir proteini kodlar. p53'ün uyardığı p21/Waf1, G1/S kontrol noktasında CDK4'ü de içeren çok sayıda CDK'ı inhibe eder (92,93).

Tümörlerde saptanan artmış p21 ekspresyon düzeyi, proliferasyon hücrelerin veya DNA hasarına cevap veren, genetik olarak stabil olmayan hücrelerin varlığını göstermektedir. Meme kanserlerinde, melanomlarda, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında, gliomlarda ve akciğer kanserlerinde p21 ekspresyon düzeyinde artış gözlenmektedir. p21 ve p53'ün beraber kullanılıp değerlendirildiği çalışmalarda, prognostik etkilerinin birbirine zıt nitelikte olduğu görülmüştür (82,94,95). p21 seviyelerinin azalması ve p53 aşırı ekspresyonunu, özofagus, uterus, mide ve akciğer kanserlerinde iyi prognoz göstergesi iken, meme kanserinde kötü prognozu simgeler (82,95).

p21'in TPK-LNM'da yüksek oranda pozitiflik gösterdiği ileri sürülmüştür (92-100). Hasta yaşam süresinde p21'in önemli olmadığını belirten çalışmalar olduğu gibi tümör agresifliğinde önemli olduğunu, fatal seyreden hastalarda daha yüksek bulunduğunu öne süren yayınlar da vardır (97-99). ATK ve KDTK'unda iyi diferansiye TK'dan daha yüksek olduğu gözlenmiştir (100).

p27

Kromozom 12p13 üzerine yerleşmiş olan tümör süpressör gen p27, G0 ve erken G1 fazında siklinD1/CDK kompleksini inhibe eder. Bu inhibisyonlar, fosfo-Rb proteinin inaktivasyonunu ve G1'den S fazına geçişi engeller (4,101-106).

p27, SV40 virüsü, insan E1B adenovirüs veya E6 papilloma virüsleriyle onkojenik etki kazanabilir (101).

p27 ekspresyon kaybı, kolorektal karsinom, meme, prostat, bazı lenfoid maligniteler, over yüzey epitelyum tümörleri, malign melanom, serviks neoplazileri, özofagus adenokarsinomu, hipofiz, paratiroid ve adrenal tümörleri gibi pek çok tümörde gösterilmiştir ve kötü prognoz göstergesidir (101-103).

Normal tiroid dokusu ve multinodüler guatrda tümöral dokulardan daha yüksek p27 pozitifliği bildirilmiştir. Papiller hiperplazi olgularında TPK'a göre daha güçlü pozitiflik bulunmuş; benign ve malign papiller proliferasyonların ayırımında yardımcı olabileceği öne sürülmüştür. FA olgularında FK ve TPKFV'ından daha yüksek p27 pozitifliği gözlenmiştir (80,104-105).

p27 ekspresyon kaybının tiroid kanserlerinde tümör agresifliğini, kötü diferansiyasyonu ve metastaz kapasitesini gösterdiği bildirilmiştir (81,102). p27'nin tiroid kanserlerinde sağkalım ya da LNM oranları üzerine bir etkisi bulunamamıştır (81,104-105).

Son çalışmalar, benign tiroid lezyonlarında görülen nükleer p27 boyanma özelliğiyle karşılaştırıldığında, tiroid malignitelerinde ek olarak görülen sitoplazmik boyanmanın p27 ile ilişkili siklinD3 ekspresyonu ve yüksek CDK2 aktivitesi ile bağlantılı olduğunu öne sürmektedir (106,107).

p53

p53 tümör süpresör geni, 17. kromozomun kısa kolunun 13.1 bölgesine lokalizedir. Görevi, DNA replikasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü düzenlemektir. p53 geni, 375 aminoasitten oluşan ve nükleer bir fosfoprotein yapısındaki p53 proteinini kodlar (4,82).

Hücrede DNA hasarı oluştuğunda post-translasyonel modifikasyonlar ile p53 stabil hale gelir, nükleusta birikir. Biriken “wild” tip p53, DNA’ya bağlanıp hücre siklusunun G₁ fazını durdurur. Wild” tip p53 proteininin yaşam süresi oldukça kısadır (6–30 dakika) ve normal hücrelerde saptanabilecek düzeye ulaşmaz. Mutasyona uğramış ya da inaktive olmuş p53 içeren hücrelerde ise bölünme sırasında duraklama ya da apoptoz gerçekleşemeyeceği için hasarlı DNA replikasyona uğrar, mutasyon genomda kalıcı hale gelir. p53’ün fonksiyon kaybı, diğer mutasyonlara da predispozisyon sağlar ve sonuçta malign klonlar üretilir (4,82).

Mutasyonlar dışında, bazı DNA virüslerinin (SV 40, adenovirüs, human papilloma virus) transforme edici proteinleri ile bazı onkogenlerin ürünleri de “wild” tip p53’e bağlanarak inaktivasyon sağlarlar. Ayrıca p53’ün mutant formlarının da “wild” tip p53’ü inaktive ettiği bilinmektedir. Mutasyona uğramış p53’ün zaman zaman onkogen gibi davrandığı ve hücreleri transforme ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (4,82).

Görülme sıklığına göre sıralanacak olursa kolon, meme, akciğer, özofagus, over, pankreas, deri ve mide maligniteleri, baş-boyun, mesane ve prostat kanserleri ile sarkomları, hepatosellüler karsinom, beyin, adrenal, endometrium tümörleri, mezotelyomalar, böbrek karsinomları, hematolojik maligniteler, karsinoid tümörler, malign melanom, paratiroid tümörleri ve servikal kanserlerde; ayrıca özofagus, meme, bronş ve larinks displazilerinde p53 birikimleri saptanmıştır. Li-Fraumeni sendromunda p53 mutasyonları genetik geçiş gösterir. (4,82).

p53 ile normal tiroid dokuları ve benign tiroid lezyonları boyanmazken ATK ve KDTK’nda daha sık olmak üzere tüm tiroid karsinomlarının %15’inde p53 mutasyonu görülür (106-108). Çernobil nükleer faciası sonrasında Belarus’taki TPK’lu ve TPK-LNM’lı hasta popülasyonunda p53 mutasyonunun arttığı ve RET/PTC pozitif TPK’da daha fazla görüldüğü saptanmıştır (60,109). p53 mutasyonları, tümörün radyoterapiye ve kemoterapiye direnç kazanmasıyla ya da tümörlerde kötü prognozla, kısa yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur. Bazı yayınlarda TPK’da tümör büyüklüğü, ekstatiroidal yayılım,

LNM ve yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiş (105,110,111); bazı yayınlarda ise etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (112).

p53 gen mutasyonu ile İHK p53 boyanmasının aynı oranda olacağı düşünülse de, TPK ve FK'da da İHK olarak mutasyona göre daha yüksek pozitiflik saptanmıştır (106,109,111).

TPK'da p53'ün nükleer ve nükleus çevresinde yoğunlaşan sitoplazmik boyanma paterni olmak üzere iki farklı boyanma paterni tanımlanmıştır (95,146).

Bcl-2, Bax, Bcl-xL

Hücre sağkalımında etkili olan apoptoz düzenleyici genlerin neoplastik hücrelerin gelişiminde de rolü vardır (4).

Bcl-2, en az 20 üyesi bulunan bir majör hücre içi apoptoz yolağı regülatörüdür (4,112,113). Bcl-2 ailesinin en önemli üyeleri iç mitokondri membranında bulunan transmembran proteinleridir. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, ve Mcl-1 apoptozu engellerken Bax, Bak, Bok, Noxa, PUMA, bcl-xLs, bim, Bad, Bmf, ve Bik proapoptotik rol oynar (112-114). Hücrelerde apoptoz emri verildiğinde mitokondrial membrandaki bcl-2 ve/veya bcl-xL kaybolur. Bcl-2 ve bcl-xL'in yerini aynı protein ailesinden bak, bax ve bim gibi proapoptotik bireyler alır (4).

Bcl-2

Bcl-2 lenfomalar, akciğer kanserleri, meme ve tiroid karsinomalarında pozitif bulunmuştur (115).

Bcl-2, özellikle perinükleer olarak yoğunlaşan sitoplazmik bir boyanma paterni gösterir. Normal tiroid dokusunda, hiperplazilerde, iyi diferansiye TK'nda ve TPK'da bcl-2 pozitifliği gözlenmiştir. Ekspresyonunun azalması, dediferansiyasyon ve agresiflikle ilişkili bulunmuştur. Bcl-2 pozitifliği TPK ve TPMK'da benzerdir. Lenf nodülü tutulumu, kapsül invazyonu ve tümör büyüklüğü ile bcl-2 boyanması arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ve prognozda önemli olmadığı bildirilmiştir (115-120).

Bax

Bax, monomerik sitozolik proteindir ve proapoptotik fonksiyonu vardır (4,82,112-114,118-122).

Bax ile İHK'sal olarak TPK'da sitoplazmik boyanma görülür. Normal tiroositleri ise hiçbir zaman boyamaz. Bax ekspresyonunun TPK'da yüksek olduğunu gösteren çalışmalar yanı sıra iyi diferansiye TK'da boyanmanın saptanmadığı çalışmalar da vardır. Tümörlerde bax ekspresyon kaybının kısa yaşam süresi ve azalmış kemoterapi yanıtı ile ilişkisi olduğu öne sürülmektedir (118-120).

Bcl-xL

Bcl-xL, bcl-2'nin homoloğudur ve iki izoformu vardır. Bcl-xL, 241 aminoasitten oluşan formu ve bcl-xLs 178 aminoasitten oluşan formudur. Bcl-xL hücre ölümünü bloke ederken bcl-xLs, bcl-2'yi inhibe eder ve hücre ölümünü indükler (113-115,122).

Normal tiroid folliküler hücrelerinde negatif olan bcl-xL, folliküler hücrelerden gelişen tiroid karsinomlarında ekprese edilir Bcl-xL overekspresyonu LNM ve uzak metastaz gibi prognostik faktörlerle ilişkili bulunmuştur (121,122).

Siklin D1

Dinlenme halindeki hücreler büyüme faktörleriyle uyarıldığında Siklin D hücre siklusunda ilk artan siklidir. Bu artış, G1 fazının ortasında görülür. D1, D2 ve D3 olmak üzere 3 formu olan Siklin D, CDK4'e bağlanıp aktive (4). SiklinD-CDK4 kompleksi hücre siklusu için anahtar rol oynayan Rb proteinini fosforiller ve hücre replikasyonunu uyarır (4).

Siklin D1, 11q23 kromozomuna yerleşmiş pozitif bir hücre siklus düzenleyicisidir (123).

Siklinler içinde onkogeneze önemli olanlar siklin A ve siklin D'dir (123-129). Siklin D1 ekspresyonu baş- boyun kanserleri, meme kanseri gibi tümörlerde pozitif bulunmuştur ve kötü klinik seyir ile ilişkilidir (124).

Nükleer boyanma özelliği gösteren siklin D1, normal tiroid hücrelerinde boyanmaz. Hiperplastik lezyonlardaki boyanması ile ilgili bulgular çelişkilidir. FA, FK,TPK ve Hurtle hücreli karsinomda da pozitiflik gösterilmiştir. KDTK'larında iyi diferansiye olanlara göre sıklığı daha fazladır. Agresif tümör davranışı, yüksek LNM ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu öne süren yayınlar vardır (124-129).

DOKU MİKROARRAY YÖNTEMİ

DMA çok sayıda dokunun tek bir preparatta görülmesini sağlayan son zamanlarda kullanımı yaygınlaşan bir yöntemdir. Bu yöntem çok sayıda doku örneğinde, immunohistokimya, H&E, histokimya, in situ hibridizasyon, fluoresan in situ hibridizasyon (FISH), in situ PCR, RNA veya DNA ekspresyon analizi, TUNEL incelemesine olanak sağlar. Bu sonuçları değerlendiren tarama programıyla da İHK profili ve değerlendirme standardize edilmiş olmaktadır (130-138).

İlk defa 1965'te Lilie, DMA'i tanımlamaya başlamıştır (130). Battifora, 1986'da çok sayıda tümör içeren doku bloğu (multitumour tissue block) ve 1990'da bunun modifikasyonu olan dama tahtası doku bloğunu (checkerboard tissue block) tanımlamıştır (131,132). Daha sonra 1998'de Kononen ve ark. tarafından 1000-10000 tane silindirik parafin doku kor biopsisinden (PDKB) oluşan bloklarla karakterli parafin doku mikroarray (PDMA) yöntemi geliştirilmiştir (133,134). Bu yöntem, şu anda da geçerli ve kullanımda olan 0.6 mm-2 mm çapta yuvalardan oluşan, seçilmiş doku alanlarının bloklandığı; DNA, RNA ve çok sayıda proteinin varlığını saptamaya yönelik hazırlanmış preparatların baştan sona görüntülenmesini sağlayan yöntemdir (150-134).

Temelde, DMA yönteminin yapılandırılması için basit olarak, 1- Verici parafin doku blokları, 2- bir çeşit zımba gibi düşünüleebilecek doku punch aleti veya metal spacer aleti ve 3- Alıcı delikler içeren parafin bloklar gereklidir (155-137).

DMA tekniği ile,

1. Tek bir preperat üzerinde bulunan çok sayıda doku örneğinin incelenmesini ve çok sayıda farklı belirteçin DNA ve protein düzeyinde analizini sağlayan multi-tümör incelemeleri,
2. Özellikle tanısal amaçlı veya terapötik hedef olarak potansiyel yararlılığı araştırılan hedef gen için kullanılan ve özellikle beyin, kalp, karaciğer ve kemik iliği gibi vital organların normal dokularının ele alındığı çalışmalar,
3. Özel bir hastalığın ya da tümörün farklı evrelerini içeren dokuların ele alındığı progresyon çalışmaları,
4. Klinik izlem bilgileri elde edilen tümörlerin örneklerinin birarada değerlendirildiği, klinik verilerle DMA bulgularının korele edildiği prognoz çalışmaları,
5. Hücre dizileri veya ksenogreftler için kullanılan, optimal hücre dizisini seçmeye yarayan deneysel (eksperimental) çalışmalar,
6. Frozen dokuların kullanıldığı, RNA ve protein analizinde yararlanılan krio-mikroarray çalışmaları yapılabilir (136-140).

Doku mikroarray yönteminin avantajları:

1. Çok fazla doku örneğini az sayıda preperat üzerinde, daha kısa zamanda, daha ekonomik olarak değerlendirmeyi sağlar.
2. İstatistiksel önemi olan yeni bir belirleyici, çok fazla miktarda doku örneğinde, aynı anda, tek bir uygulamada, hızlı bir şekilde çalışılır.
3. İntakt dokular, hücre kültür materyalleri ve hücre dizileri (line) DMA'de kullanılabilir. Bu şekilde semikantitatif protein ya da gen ekspresyonu değerlendirmesi sağlar.
4. Mini DMA 16-25 kor içerir. Bunlar İHK, FISH ve diğer bazı testlerin internal kontrolü olarak kullanılabilir. Pahalı antikorların küçük dokularda kullanılması ve tek bir preperatta olması, tek tek yapılan eksternal büyük kontrol dokularına göre maliyeti düşürür.
5. DMA, patoloji laboratuvarında nadir görülen ve kısıtlı olan doku örneklerinden en üst düzeyde yararlanabilmeyi sağlar. Standart bir bloktan 50-100 kesit yapılabilirken, DMA bloğunda yer alan 200-300

kor biopsiden 1000 kesit yapılabildiği düşünülürse, elde edilecek materyal binlerce kat artar.

6. DMA, dış etken çeşitliliğini ortadan kaldırılıp doku örneklerinin aynı koşullarda boyanmasına olanak verdiği için daha güvenilir veriler sağlar. Laboratuvarlar arası farkın azalması, İHK, floresan ve mRNA in situ hibridizasyonun standardizasyonuna katkıda bulunur.
7. Orijinal doku örneğinin (kor biopsinin alındığı parafin blok) korunmasını sağlar (139-142).

Doku mikroarray yönteminin dezavantajları:

1. En önemli kısıtlılığı doku örneklerinin oldukça küçük boyutlarda olmasıdır.
2. Heterojen tümörlerdeki fokal değişiklikler değerlendirilemez. Bunun önüne geçmek için her olgudan en az 1 mm genişliğinde 2 kor almak veya 0.6 mm genişliğinde 3 kor örnek almak gerekmektedir. İki milimetrelilik tek bir örnek alınması, teorikte çok sayıda küçük biopsi örnekleri alınmasından daha iyi gibi görünse de pratikte bu pek doğru değildir. Doku kısıtlılığını gidermede kullanılacak diğer bir yöntem, çalışmaya alınan tümör olgu sayısını artırmaktır.
3. Hedeflenen alan, dokuda küçük odaklar halindeyse (örneğin tümöre eşlik eden lenfoid hücreler, tümör stroması, lenf nodunda metastatik tümör odağı gibi) kor biopsinin alımı sırasında bu odaklara denk gelmeme riski vardır. Bu tarz çalışmalarda kor biopsi genişliğini en az 2 mm tutmak gerekmektedir.
4. Formalinle fiske dokularda DNA, RNA ve protein yapıları iyi değerlendirilemez. Bu yüzden bu tür araştırmalarda dokuların taze, -70 °C'de dondurulmuş olması, kimyasal fiksatif kullanılmamış olması gerekir.
5. Birçok dokunun tek bir preparat üzerinde olması uygulama sürecindeki herhangi bir hatadan tüm dokuların etkilenmesi anlamına gelir.
6. Dökülme, katlanma, karşılaşılan diğer problemlerdir.
7. DMA tekniğinin uygulanabilmesi için gereken düzeneğin oluşturulması maliyeti yüksek bir iştir (138-142).

GEREÇ VE YÖNTEM

OLGULAR

Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan 2006-2010 yılları arasında tiroidektomi materyalinde ya da konsültasyon amacıyla gönderilmiş bloklarda tanı almış 34 TPK, 22 TPMK, 12 TPK-LNM ele alındı ve kontrol grubu olarak 20 AN olgusu çalışmaya eklendi. Olguların yaş, cinsiyet, lezyon çapı, yerleşimi gibi bilgileri klinik istem formlarından ya da dosyalarından elde edilerek kaydedildi.

Olgulara ait hematoksil-eozin (HE) boyalı preparatlar tekrar değerlendirilerek tanıları doğrulandı. Lezyonu temsil eden, en çok doku içeren preparat ve parafin blok seçildi.

DOKU MİKROARRAY BLOKLARININ VE KESİTLERİNİN HAZIRLANMASI

1. Seçilen HE boyalı preparatlar üzerinde mikroskop altında lezyonun yeri işaretlendi. Aynı alan, preparata ait parafin blok üzerinde de işaretlendi.
2. DMA yöntemine geçiş aşamasında, önce mikroarray yöntemine uygun bloklar elde etmek için gereken özel parafin hazırlandı. Bu parafinin hazırlanmasında rutinde kullanılan normal parafin yanı sıra balmumuna benzer (wax) (Merck® ürün no:1115449020) bir çeşit parafin kullanıldı. Bu iki parafin, karışım oranı wax/parafin=1/10 olacak şekilde karıştırılıp wax'ın erime noktası olan 64°C'de eritildi.
3. DMA aleti (3DHISTECH Manuel TMA Kit), DMA bloğunda 24 adet (6 satır, 4 sütun) 2 mm çapında çukur yuva oluşturmak için hazırlanan özel bir düzendir. Önce parçaları biraraya getirilerek düzener yapılandırıldı. Sonra DMA aletinin üzerine blok oluşturmak için bu aletle uyumlu çerçeve biçimli özel kaset yerleştirildi.

4. Daha önceden hazırlanan, etüvde saklanan erimiş parafin taşmayacak ölçüyle kaset yerleştirilen alet üzerine döküldü. Oluşturulan blok, DMA aleti ve kasetle birlikte 0°C de 1 dk donması için (buzdolabının buzluğunda) bekletildi. Parafin donduktan sonra cihaz üzerindeki vidalar sıkıştırılarak bloğun DMA aletinden ayrılması sağlandı. Böylece üzerinde 24 adet boş yuva bulunan bir blok elde edildi.
5. DMA için kullanılacak örneğin alınacağı, lezyon alanı işaretlenmiş bloklardan DMA aletinin bir parçası olan ve zımba benzeri bir görev yapan punch kaleminin butonuna basarak 2 mm'lik hedef dokular alındı. Her bir doku DMA blokları üzerindeki çukurlara sırayla gömüldü. Bu işlem sırasında kalemin butonuna basılı olarak DMA bloğuna girip kalemin ucu çukura iyice yerleştikten sonra butondan parmağımızı çekmek suretiyle doku yerleştirildi.
6. Çalışmamızda öncelikle 24 çukurun merkezinde bulunan 4x4'lük bir ekim alanı tercih edildi ve herbir blokta 16-18 doku olacak şekilde gömme işlemi yapıldı. Bu sırada olguya ait protokol no, dokunun yerleştirildiği koordinatlar belirtilecek şekilde şema ile kaydedildi (örn. 17.blok, X2-Y4). Yerleşim oryantasyonunu kaybetmemek için gömmenin başlangıç noktası kurşun kalemle işaretlendi ve bu alana fazladan bir doku örneği gömüldü.
DMA için blok hazırlanması ve dokuların gömülmesi Resim 1.de gösterildi.
7. Daha kolay kesit alabilmek ve dökülme oranını minumuma indirmek için blok kenarlarındaki fazla parafin, bistüri yardımıyla traşlanıp bloklara kare şekli verildi. Yüzeyini düzlemek amacıyla üzerine lam konan blok, 1 dk etüvde bekletildikten sonra çıkarılıp donmadan lamdan yavaşça ayrıldı. Kesilecek yüzü yukarıda kalacak şekilde (dokuların kayıp seviye farkı oluşturmasına engel olmak amacıyla) donması için birkaç saat buzlukta bekletildi.
8. Bloktan keserken ve sudan preparat üzerine alırken işarete denk düşen başlangıç alanının sağ üst köşeye denk gelmesine özen gösterildi.

9. Her bir preparattan HE boyamak üzere 1 kesit ve lizinli lama 10 kesit alındı.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

DMA bloklarından elde edilen 4 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü özel lamlar üzerine alındı. Lamlar 60°C'lık etüvde 1 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu.

Tüm preparatlar boyama işlemi için tam otomatik immunhistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmarck, XT) yerleştirildi. İHK boyamaları için cihaz ile uyumlu immunhistokimyasal kit (DAB substrat sistem, AEC detection kit, EZ prep, LCS, SSC solüsyonları, RBS, amplifikasyon, proteaz, blok solüsyonları, Mayer hematoksilen) kullanıldı.

Elde edilen tüm bloklara aşağıdaki tabloda (Tablo 1) ayrıntıları verilen p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 immunhistokimyasal boyaları uygulandı. Amplifikasyon sadece p21 ve bcl-2 proteinine yönelik olan antikorlarda uygulandı. İHK boyamaların her birinde, pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

Boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamlar deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

Hazırlanan İHK boyalı preparatlar, bilgisayar ortamında analiz edilmeye olanak verecek dijital görüntü oluşturmak üzere tarama işleminden geçirildi. Bu işlem, hizmet alımı yoluyla Macaristan'ın Budapeşte kentindeki 3DHISTECH Kft firmasından temin edildi.

Tablo 1. Primer antikora ilişkin İHK boyama yöntemi ayrıntıları

Primer Antikor	Ambalaj	Katalog no	LOT	Marka	Dilüsyon oranı ve İnkübasyon süresi
Purified Mouse Anti-human p16 (INK4)	7 ml kullanım a hazır		5153 9	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/25 40 dk
Mouse Anti-Human p21Waf1 Monoclonal Antibody (Clone SPM306)	0.1 ml konsantr e	E6330	1003 24	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/50 1 saat
Rabbit Anti-Human p27Kip1 polyclonal Antibody	0.1 ml konsantr e	E2600	9073 0C	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/100 12 dk
Rabbit Anti-human p53 monoclonal antibody (Clone SP5)	0.1 ml konsantr e	M3050	9092 5A	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/100 48 dk
Rabbit Anti-bcl 2 alpha Polyclonal antibody	1 ml konsantr e	E17980	9092 5	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/200 44 dk
Rabbit Anti-Bax Monoclonal antibody (Clone SP47)	0.1 ml	M3470	9070 9A	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/50 32 dk
Rabbit Anti-Human bcl-xL Polyclonal Antibody	0.1 ml konsantr e	E3370	9100 6C	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/200 16 dk
Rabbit Anti-Human Cyclin D1 Monoclonal antibody (Clone SP4)	1 ml konsantr e	M3040	1003 05C	Spring Bioscience, Pleasonton, CA, ABD	1/100 32 dk

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm değerlendirmeler bilgisayar ortamında 3DHISTECH TMA Module 1.14 programının Panoramic Viewer 1.14 ve DensitoQuant 1.14 uygulamaları eşliğinde yapıldı. Kişisel bilgisayara 3DHISTECH TMA Module 1.14 programının kurulması ve çalışabilmesi için programla birlikte satın alınan özel dongle (USB güvenlik cihazı) gerekmektedir.

Program yüklendikten sonra dijital ortamdaki preparat (slide) görüntülerini işlemek üzere yeni bir proje dosyası açıldı. Bu dosyadaki verilerin işlenebileceği excel belgesi yaratıldı. Bu excel belgesinde tüm preparatların ismi, blok no, örnek no ve örneğin alındığı doku ve olguya ait protokol no, tanı, yaş, cins gibi tanımlayıcı veriler ile taranan preparatlarda yer alan dokulara ait koordinatların yer aldığı tablolar oluşturuldu.

Sitoplazmik boyanma yapan bcl-2, bcl-xL, bax ve TPK'da nükleer boyanma yanı sıra sitoplazmik boyanması da tanımlanmış olan p53, DensitoQuant 1.14 uygulaması ile değerlendirildi. Bunun için 3DHISTECH Pannoramic Viewer 1.14 uygulamasında HE ve İHK boyalı preparat görüntüleri ile dokulara oryantasyon sağlandı. Grid yardımıyla her bir dokuya ardışık numaralandırma yapıldı. Lezyon içermeyen veya artefaktların baskın olduğu dokular değerlendirme dışı bırakıldı.

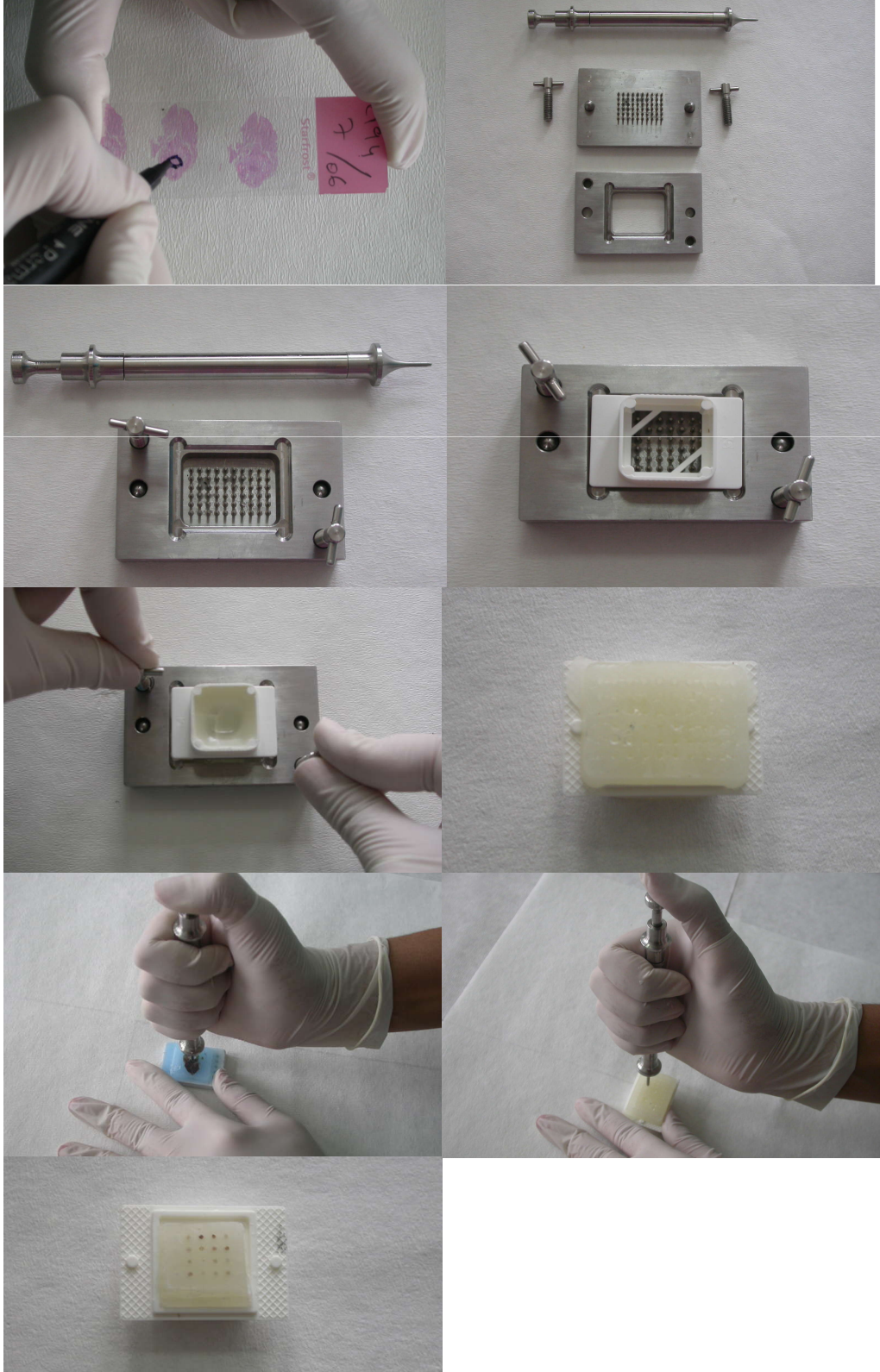
Doku görüntüsünün bir baştan diğer başa, bir bütün olarak ele alınarak analiz edilmesi, tiroid dokusunda tümöre komşu geniş kolloid alanlarının ya da hyalinize, ödemli dejenerasyon alanlarının bulunması; TPK-LNM örneklerinde ise araştırılan tümör yanı sıra lenfoid dokunun bulunması nedeniyle tercih edilmedi. Bunun yerine her görüntü üzerinde boyanmanın en yoğun olduğu üç alan işaretlendi. Bu alanların eşit boyutta olmasına, lezyonu temsil etmesine dikkat edildi. Her üç alan için 3DHISTECH DensitoQuant1.14 uygulaması ile ölçüm yapıldı ve en yüksek değer temel alındı. Bu ölçümde boyanma yüzdesi, negatif alan yüzdesi yanı sıra boyanmanın hafif, orta, şiddetli olmak üzere yoğunluğu, aynı doku üzerinde farklı yoğunlukta boyanan alanların oranı yüzde olarak elde edildi.

Nükleer boyanma yapan p16, p21, p27 ve siklin D1'in değerlendirmesi için gereken NuclearQuant 1.14 alt programı, şu an kullanılan 3DHISTECH software donanımında bulunmadığı için bu sayımlar iki ayrı patolog tarafından kör olarak dijital görüntü üzerinde x100 ve x400 büyütmelemlerde yapıldı. Ardışık 200 hücre içeren üç alan sayıldı ve en yüksek değer temel alındı. Araştırmacılar arasında uyumsuzluk gösteren sayımlar, birlikte bir kez daha tekrarlandı. Elde edilen sayımlar yüzde değer olarak kaydedildi. Nükleer boyanmaların yoğunluk derecesi ise yine 3DHISTECH DensitoQuant 1.14 uygulaması ile bilgisayar ortamında yapıldı.

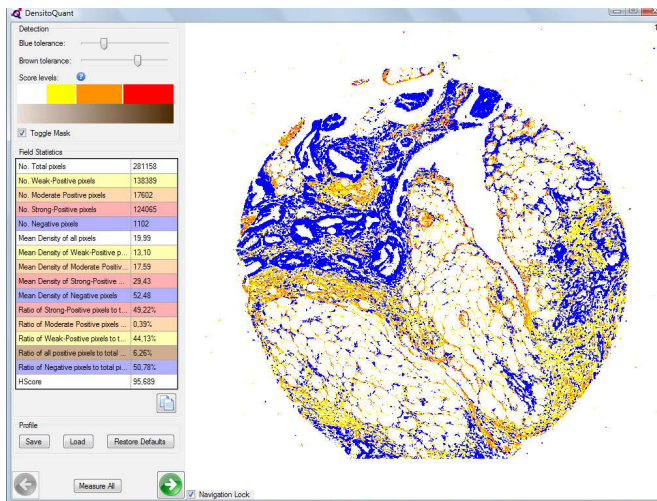
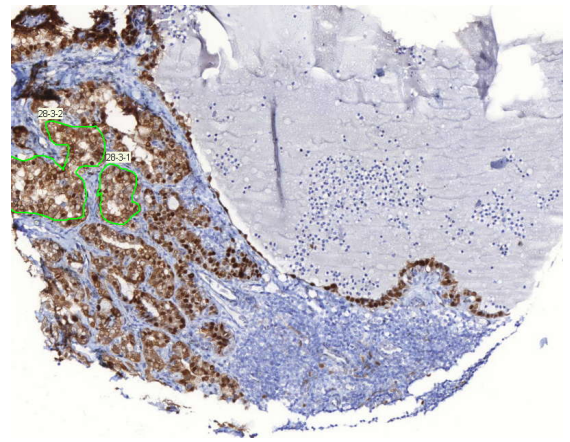
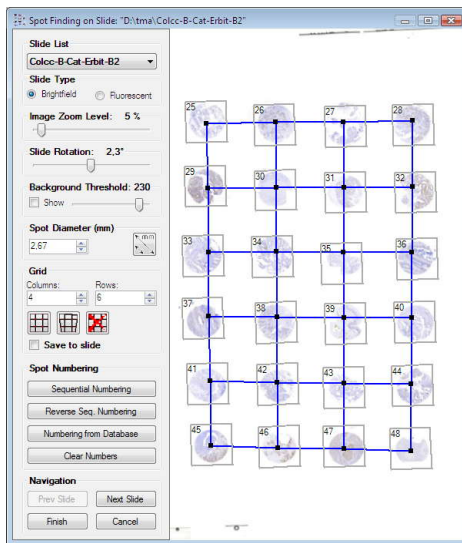
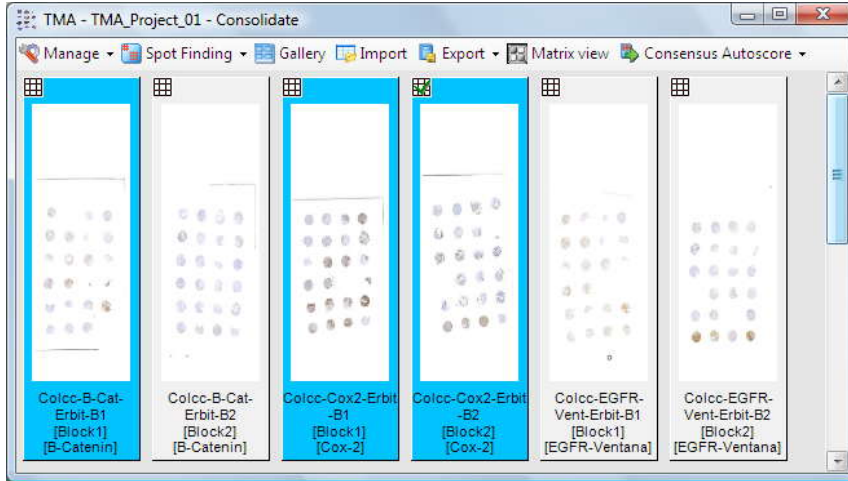
3DHISTECH Pannoramic Viewer 1.14 ve 3DHISTECH DensitoQuant 1.14 uygulamaları ile İHK boyamaların ölçümü Resim 2'de gösterildi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde kişisel bilgisayarda çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 15.0 versiyonu kullanıldı. Korelasyonun araştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon analizi, farklı serilerin anlamlılığının sınanmasında Kruskal-Wallis testi, Mann-Whitney testi, Wilcoxon testi ve Ki-kare testi kullanıldı. Sonuçlar $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Resim 1. HE boyalı prepartta lezyon alanının işaretlenmesi ve DMA bloğunun hazırlanması.



Resim 2. 3DHISTEC TMA Module 1.14 programının Pannoramic Viewer 1.14 ve DensitoQuant1.14 uygulamalarına örnekler

BULGULAR

Bu çalışmada 34 TPK, 22 TPMK, 12 TPK-LNM yanı sıra 20 AN olgusu p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 İHK boyanması açısından incelendi.

YAŞ VE CİNSİYET

TPK olgularının onyıllara göre yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 2'de gösterildi. Olguların en genci 24, en yaşlısı 72 yaşında idi (ort. $45.76 \pm 12,39$). En büyük olgu grubunun altıncı onyılıda bulunduğu görüldü. Olguların 29'u kadın, 5'i erkek idi.

Tablo 2. TPK olgularının yaş ve cinsiyet dağılımı

ONYIL	OLGU SAYISI		TOPLAM	TOPLAM (%)
	Kadın	Erkek (%)		
0-9	0	0	0	0
10-19	0	0	0	0
20-29	2	2	4	11,8
30-39	9	0	9	26,5
40-49	5	1	6	17,6
50-59	10	1	11	32,3
60-69	2	1	3	8,9
70-79	1	0	1	2,9
TOPLAM	29 (%85,3)	5 (14,7%)	34	100

TPMK olgularının 17'si kadın, 5'i erkek hasta idi. Bunların yaşları 28 ile 62 arasında değişmekte olup (ort. $45,59 \pm 9,77$), en büyük olgu grubunun beşinci onyılıda bulunduğu görüldü. (Tablo 3).

Tablo 3. TPMK olgularının yaş ve cinsiyet dağılımı.

ONYIL	OLGU SAYISI		TOPLAM	TOPLAM (%)
	Kadın	Erkek		
0-9	0	0	0	0
10-19	0	0	0	0
20-29	1	0	1	4,5
30-39	4	1	5	22,7
40-49	6	2	8	36,5
50-59	5	2	7	31,8
60-69	1	0	1	4,5
TOPLAM	17 (%77,3)	5 (%22,7)	22	100

TPK-LNM olgularının 8'i kadın, 4'ü erkek idi. Yaşları 28 ile 74 arasında olup (ort. $48,41 \pm 12,22$) olguların büyük çoğunluğunun altıncı dekatta yer aldığı görüldü. (Tablo 4).

Tablo 4. TPK-LNM olgularının yaş ve cinsiyet dağılımı

ONYIL	OLGU SAYISI		TOPLAM	TOPLAM (%)
	Kadın	Erkek		
0-9	0	0	0	0
10-19	0	0	0	0
20-29	0	1	1	8,33
30-39	3	0	3	25
40-49	1	0	1	8,33
50-59	4	2	6	50
60-69	0	0	0	0
70-79	0	1	1	8,33
TOPLAM	8 (%66,7)	4 (%33,3)	12	100

AN olgularının 15'i kadın, 5'i erkek idi. Yaşları 21 ile 59 arasında olup (ort. 44,00±11,25) olguların büyük çoğunluğunun altıncı dekada olduğu görüldü. (Tablo 5).

Tablo 5. AN olgularının yaş ve cinsiyet dağılımı

ONYIL	OLGU SAYISI		TOPLAM	TOPLAM (%)
	Kadın	Erkek		
0-9	0	0	0	0
10-19	0	0	0	0
20-29	2	0	2	10
30-39	3	0	3	15
40-49	5	2	7	35
50-59	5	3	8	40
TOPLAM	15 (%75)	5 (%25)	20	100

Tüm grupların yaş dağılımı incelendiğinde, 20 yaş altında olgu bulunmadığı, genellikle olguların altıncı dekada kümelenildiği saptandı. Gruplar arasında yaşlar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P>0.05$).

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA SONUÇLARI

Uygulanan 8 adet İHK belirleyicilerin olgu gruplarına göre boyanma yüzdelerinin ortalaması Tablo 6'da topluca gösterildi:

Tablo 6. Tanı gruplarına göre İHK boyanma yüzdelerinin ortalamaları

İHK Belirleyici	TPK	TPMK	TPK-LNM	AN
Bcl-2	88,28±13,83	58,11±41,61	59,32±24,71	85,22±12,19
Bax	26,95±29,70	8,66±15,21	17,27±27,66	3,88±7,26
Bcl-xL	78,89±23,49	92,36±8,30	87,89±7,32	94,24±7,88
p53	23,86±26,85	8,39±12,27	18,58±28,20	1,38±2,00
p16	3,23±3,44	3,09±2,44	12,08±9,87	1,05±1,35
p21	48,08±26,19	47,95±32,75	65,41±29,34	9,75±10,81
p27	1,47±1,61	0,95±1,98	0,00±0,00	3,10±9,21
Siklin D1	34,08±27,35	53,86±27,59	72,50±16,58	16,65±17,03

İmmünohistokimyasal Belirleyicilerin Birbirlerine Göre Korelasyonu

Olgu bazında İHK boyanmaları temel alındığında, her bir belirleyicinin boyanma yüzdesi ve yoğunluğu arasında değişen derecelerde pozitif korelasyon saptandı. Ayrıca

- p53 ile bax boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede ($r=0,73$)
- p16 ile siklin D1 boyanma yüzdeleri arasında orta derecede ($r=0,36$)
- p16 ile p21 boyanma yüzdeleri arasında orta derecede ($r=0,30$)
- p21 ile siklin D1 boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede ($r=0.64$)

pozitif korelasyon bulundu.

Bcl-2 Boyanma Özellikleri

Bcl-2'nin tümöral hücrelerde ve benign nodülün tirositlerinde sitoplazmik boyanma yaptığı saptandı. Tümör alanlarına komşu yangı hücrelerinde ve metastatik lenf nodu örneklerinin lenfoid elemanlarında güçlü boyanma gözlemlendi.

TPK'ların tümü bcl-2 ile boyanmıştı. Olguların 16'sı (%47) güçlü, 17'si (%50) orta derecede, 1'i (%3) zayıf pozitif olarak değerlendirildi (Resim 1-2).

TPMK grubunda 7 (% 31,8) olguda bcl-2 boyanması gözlenmezken olguların 8'i (36,4) güçlü, 7'si orta derecede (%31,8) pozitif boyanma göstermekteydi.

TPK-LNM olgularının 1'i (%8.3) negatifken boyanan olguların 5'i (%41.7) güçlü, 6'sı (%50) orta derecede pozitiflik göstermekteydi (Resim 3).

AN grubunda boyanmayan lezyon yoktu. Olguların 9'u (%45) güçlü, 11'i (%55) orta derecede boyanma gösterdi (Resim 4).

Olgu gruplarındaki bcl-2 boyanma oranları Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. Tanı gruplarına göre bcl-2 boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	0	16(%47)	17 (%50)	1 (%3)
TPMK	7 (%31,8)	8 (%36,4)	7 (%31,8)	0
TPK-LNM	1 (%8,3)	5 (%41,7)	6 (%50)	0
AN	0	9(%45)	11(%55)	0

Bcl-2 ile boyanma yoğunluğu tüm gruplarda yüksekti. TPK ve TPMK grupları arasında hem bcl-2 boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). AN ile diğer tüm gruplar arasında, TPK ve TPK-LNM grubu arasında bcl-2 boyanma yüzdesi açısından anlamlı fark izlenirken ($P<0.05$). boyanma yoğunluğu açısından fark görülmedi ($P>0.05$).

Bax Boyanma Özellikleri

Bax ile neoplastik ya da non-neoplastik tiroistlerde sitoplazmik boyanma gözlemlendi.

TPK'ların 11'inde (%32,4) bax ile boyanma görülmedi. Olguların 2'si (%5,8) güçlü, 12'si (%35,3) orta derecede, 9'u (%26,5) zayıf pozitiflik göstermekteydi (Resim 5-6).

TPMK grubunda 12 (% 54,6) olguda boyanma gözlenmezken olguların 1'i (%4,5) güçlü, 8'i orta derecede (%36,4), 1'i (%4,5) zayıf boyanma göstermekteydi.

TPK-LNM olgularından 7'sinde (%58.4) boyanma görülmedi. Olguların 1'i (%8.3) güçlü, 4'ü (%33.3) orta derecede pozitiflik göstermekteydi (Resim 7).

AN grubunda 14 (%70) lezyon negatifken güçlü boyanma gösteren lezyon da görülmedi. Olguların 5'i (%25) orta derecede, 1'i (%5) zayıf boyanma gösterdi (Resim 8).

Olgu gruplarındaki bax boyanma oranları Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8. Tanı gruplarına göre bax boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	11(%32,4)	2(%5,8)	12 (%35,3)	9 (%26,5)
TPMK	12 (%54,6)	1 (%4,5)	8 (%36,4)	1 (%4,5)
TPK-LNM	7 (%58,4)	1 (%8,3)	4 (%33,3)	0
AN	14 (%70)	0	5 (25)	1 (%5)

Buna göre TPK'lar dışındaki tüm lezyonların yarıdan fazlası bax ile boyanmamıştı. Boyanma yoğunluğu. hiçbir grupta yüksek değildi. TPK ve AN grupları arasında hem boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu

istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı ($P<0.05$). TPK ve TPMK arasında ise boyanma yüzdesi açısından fark gözlemlendi ($P<0.05$). Diğer karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$).

Bcl-xL Boyanma Özellikleri

Bcl-xL'nin tüm lezyonlarda sitoplazmik boyanma yaptığı saptandı.

TPK'ların 1'i (%2.9 dışında tümü bcl-xL ile boyanmıştı. Güçlü boyanan 11 (%32,4), orta derecede boyanan 18 (%52,9), zayıf boyanan 4(%11,8) olgu saptandı (Resim 9-10).

TPMK grubunda boyanmayan lezyon yoktu. Olguların 21'i (%95,4), güçlü, 1'i (%4,6) orta derecede boyanma göstermişti.

TPK-LNM olgularının tümü boyanmıştı. Olguların 8'i (%66,7) güçlü, 4'ü (%33,3) orta derecede pozitiflik göstermişti (Resim 11).

AN grubunda boyanmayan lezyon yoktu. Olguların 14'ü (%70) güçlü, 6'sı (%30) orta derecede boyanma gösterdi (Resim 12).

Olgu gruplarındaki bcl-xL boyanma oranları Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. Tanı gruplarına göre bcl-xL boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	1 (2,9)	11(%32,4)	18 (%52,9)	4 (%11,8)
TPMK	0	21 (%95,4)	1 (%4,6)	0
TPK-LNM	0	8 (%66,7)	4 (%33,3)	0
AN	0	14(%70)	6 (%30)	0

Bcl-xL ile boyanma yüzdesi ve yoğunluğu tüm gruplarda yüksekti. TPK ve TPMK grupları arasında, TPK ve AN grupları arasında, TPMK ve TPK-LNM grupları arasında hem bcl-xL boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). TPK ve TPK-LNM grupları arasında, TPMK ve AN grupları arasında yalnız yoğunluk açısından anlamlı fark saptanırken, AN ve TPK-LNM grubu arasında yalnızca boyanma yüzdesi açısından fark bulundu ($P<0.05$).

p53 Boyanma Özellikleri

p53, tüm olgu gruplarında nükleer boyanma yanı sıra baskın olarak sitoplazmik boyanma yapmıştı. Lezyonların çoğunda diffüz, az bir kısmında fokal boyanma saptandı. Aynı doku içerisinde boyanma yoğunluğu alandan alana hafif değişkenlik gösterse de genel olarak homojendi.

TPK'ların 26'sı (%76,5) p53 ile boyanırken 8'i (%23,5) negatifti. Boyanma gösteren olguların 11'i (%32,4) güçlü, 13'ü (%38,3) orta derecede, 2'si (%5,8) zayıf pozitif olarak değerlendirildi (Resim 13-14).

TPMK grubunda 4 (% 18,2) olguda p53 ile boyanma gözlenmezken 18 (%91,2) olgu pozitif. Olguların 4'ü (% 18,2) güçlü, 12'si orta derecede (%54,5) ve 2'si (%9,1) zayıf pozitif boyanma göstermekteydi.

TPK-LNM olgularının 4'ü (%33,3) negatifken boyanan 8 (%66,7) olgunun 2'si (16,7) güçlü, 6'sı (%50) orta derecede p53 boyanması göstermekteydi (Resim 15).

AN'lerin 12 (%60)'sinde boyanma saptanmadı. Güçlü boyanan 1 (%5), orta derecede boyanan 6 (%30) ve zayıf boyanan 1 (%5) olgu vardı (Resim 16).

p53 boyanma oranları Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. Tanı gruplarına göre p53 boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	8 (%23,5)	11 (%32,4)	13 (%38,3)	2 (%5,8)
TPMK	4 (%18,2)	4 (%18,2)	12 (%54,5)	2 (%9,1)
TPK-LNM	4 (%33,3)	2 (%16,7)	6 (%50)	0
AN	12 (%60)	1 (%5)	6 (%30)	1 (%5)

Buna göre TPK ve TPMK gruplarında boyanma değerlerinin yoğunluk ve yüzde açısından yüksek olduğu gözlemlendi. En az sayıda ve en zayıf boyanan grup AN idi. AN grubu ile diğer tüm gruplar arasında p53 boyanma yüzdesi ve yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($P < 0.05$). TPK ve TPMK grubu arasında, TPK ve TPK-LNM grubu arasında, TPMK ve TPK-LNM grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($P > 0.05$).

p16 Boyanma Özellikleri

p16, İHK olarak nükleer boyanma yapan bir belirteç olmasına karşın tiroid lezyonlarında paranükleer sitoplazmik boyanmalar da görülmektedir.

Çalışmamızdaki olgu gruplarında, baskın olarak da onkositik hücrelerde, nükleer ve sitoplazmik p16 boyanmaları görülmüş, ancak yalnızca nükleer olanlar pozitiflik olarak kabul edilmiştir.

TPK'ların 5'inde (%14.7) boyanma gözlenmezken olguların 3'ü (%8,8) orta derecede, 26'sı (%76,5) zayıf p16 boyanması gösterdi (Resim 17-18).

TPMK grubunda 4 (% 18,1) olgu negatifti. Olguların 8'i (36,4) orta derecede, 10'u zayıf (%45,5) boyanma gösterdi.

TPK-LNM olgularının 3'ü (%25) negatifiken boyanan olguların 4'ü (%33,3) güçlü, 5'i (%41,7) orta derecede pozitiflik göstermekteydi (Resim 19).

AN grubunda boyanmayan 11 (%55) lezyon vardı. Kalan 9 olgu (%45) zayıf boyanma gösterdi (Resim20).

Olgular grubundaki p16 boyanma oranları Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11. Tanı gruplarına göre p16 boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	5(%14.7)	0	3 (%8,8)	26 (%76,5)
TPMK	4 (% 18,1)	0	8 (%36,4)	10 (%45,5)
TPK-LNM	3 (%25)	4 (%33,3)	5 (%41,7)	0
AN	11 (%55)	0	0	9 (%45)

p16 ile boyanma yoğunluğu tüm gruplarda genellikle orta ya da zayıf yoğunlukta idi. AN grubunda boyanan lezyonlar yarıdan az olup bu boyanma da zayıf nitelikteydi. TPK ve TPMK grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken TPK-LNM grubu ile diğer tüm gruplar arasında boyanma yüzdesi ve yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (P<0.05).

p21 Boyanma Özellikleri

p21 ile neoplastik ya da non-neoplastik tirostlerde nükleer boyanma görüldü.

TPK'ların 1'i (%2,9) dışında hepsinde boyanma saptandı. Tümörlerin 29'unda (%85,4) güçlü boyanma görülürken 3'ünde (%8,8) orta derecede, 1'inde (%2,9) zayıf p21 boyanması görüldü (Resim 21-22).

TPMK grubunda 2 (% 9,1) olgu negatifti. Olguların 9'unda (%40,9) güçlü, 11'inde (%50) orta yoğunlukta boyanma saptandı.

TPK-LNM olgularının tümü boyanmıştı. Bunlardan 10'u (%83,3) güçlü, 2'si (%16,7) orta derecede pozitiflik göstermekteydi (Resim 23).

AN grubunda boyanmayan 3 (%15) lezyon vardı. Olguların 4'ü (%20) güçlü, 13 (%65) orta yoğunlukta p21 boyanması gösterdi (Resim 24).

Olgu gruplarındaki p21 boyanma oranları Tablo 12'de gösterildi.

Tablo 12. Tanı gruplarına göre p21 boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	1(%2,9)	29 (%85,4)	3 (%8,8)	1(%2,9)
TPMK	2 (% 9,1)	9 (%40,9)	11 (%50)	0
TPK-LNM	0	10 (%83,3)	2 (%16,7)	0
AN	3 (%15)	4 (%20)	13 (%65)	0

TPK ve TPK-LNM lezyonlarının büyük çoğunluğunda gözlenen p21 boyanması, oldukça güçlü nitelikteydi. Boyanma yoğunluğu tüm gruplarda genellikle orta ya da zayıf yoğunlukta idi. AN grubunda ise çok daha az ve yoğunluğu düşük bir boyanma özelliği gözlemlendi. TPK ve TPMK gruplarındaki p21 boyanması, yoğunluğu farklı olmakla birlikte yüzde değer olarak benzer nitelikteydi. Tüm gruplar birlikte ele alındığında p21 boyanma yüzdesi ve yoğunluğu önemli derecede anlamlı bulundu ($p=0.000$). AN grubu, malign lezyonları içeren diğer 3 gruba karşılaştırıldığında önemli derecede anlamlı bir fark dikkati çekti ($p=0.000$). TPK ve TPMK grupları ile TPK-LNM grubu arasında da yüzde ve yoğunluk farkı vardı ($P<0.05$).

p27 Boyanma Özellikleri

p27, tüm olgu gruplarında nükleer boyanma yanı sıra sitoplazmik boyanma da yapmıştı. Nükleer boyanmalar gerçek pozitiflik olarak kabul edildi. Lenf noduna ait alanlarda güçlü ve diffüz nükleer boyanma saptandı.

TPK'ların 15'i (%44,1) negatifken 1'i (%2,9) güçlü, 3'ü (%8,9) orta derecede, 15'i (%44,1) zayıf pozitif olarak değerlendirildi (Resim 25-26).

TPMK grubunda 16 (% 72,7) olgu negatifken olguların 2'si (% 9,1) orta derecede ve 4'ü (%18,2) zayıf boyanma gösterdi.

TPK-LNM grubunda olguların hiçbiri boyanmadı (Resim 27).

AN'lerin 15'inde (%75) boyanma saptanmadı. Orta derecede boyanan 4 (%20) ve zayıf boyanan 1 (%5) olgu vardı (Resim 28).

p27 boyanma oranları Tablo 13'de gösterildi.

Tablo 13. Tanı gruplarına göre p27 boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	15 (%44,1)	1 (%2,9)	3 (%8,9)	15 (%44,1)
TPMK	16 (%72,7)	0	2 (%9,1)	4 (%18,2)
TPK-LNM	12 (%100)	0	0	0
AN	15 (%75)	0	4 (%20)	1 (%5)

Genel olarak tüm gruplarda p27 boyanma oranı ve yoğunluğu düşüktü. Olguların çoğunda hiçbir boyanma görülmedi. TPK-LNM grubunda boyanan örnek yoktu. Tüm gruplar birarada değerlendirildiğinde hem p27 boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($P<0.05$). En çarpıcı fark, TPK-LNM ile TPK grupları arasında yine yüzde ve yoğunluğu içerecek şekilde bulundu ($P<0.05$).

Siklin D1 Boyanma Özellikleri

Siklin D1, nükleer boyanma yapan bir belirteçtir. Grupların hepsinde nükleer boyanma seçilirken bazı olgularda, özellikle onkositik hücrelerde, buna ek olarak paranükleer sitoplazmik boyanma da izlendi. Nükleer boyanmalar gerçek pozitiflik sayıldı.

TPK'ların 2'sinde (%5,8) boyanma görülmedi. Güçlü boyanan 14 (%41,2) ve orta derecede boyanan 14 (%41,2) zayıf boyanan 4 (%11,8) lezyon vardı (Resim 29-30).

TPMK grubunda 1 (% 4,5) olgu boyanma göstermezken 11 (%50) olgu güçlü, 9 olgu (%41) orta derecede ve 1olgu (% 4,5) zayıf boyanmıştı.

TPK-LNM olgularının 6 sı (%50) güçlü, 6'sı (%50) orta yoğunlukta boyanmıştı (Resim 31).

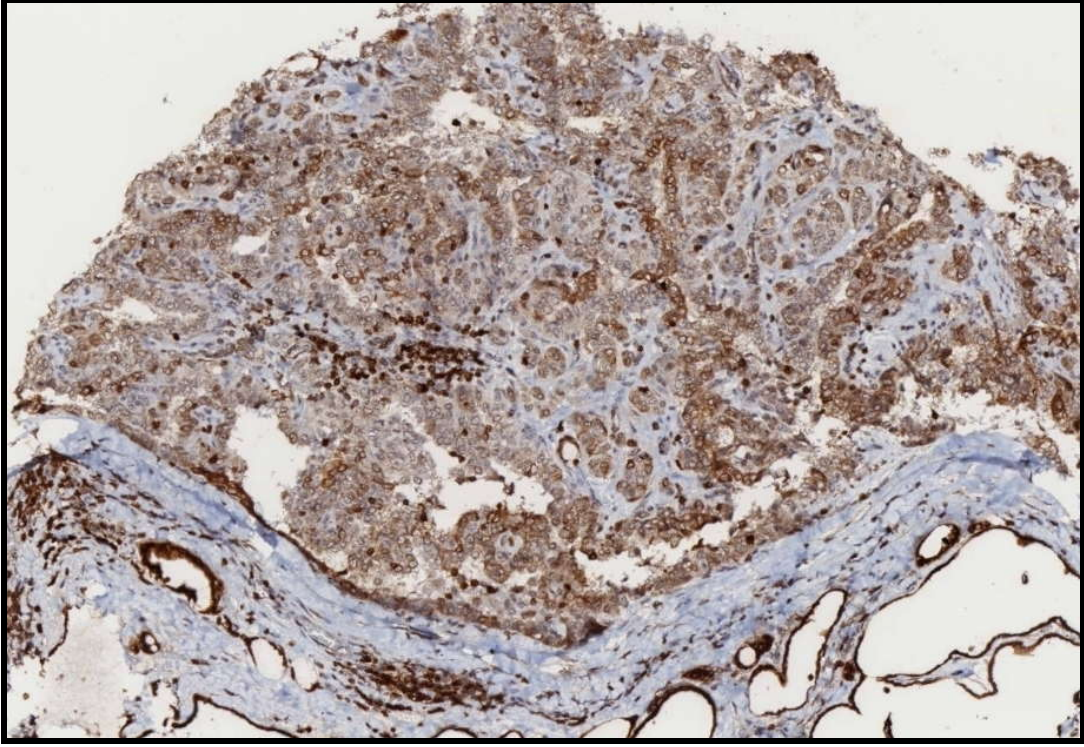
AN grubunda güçlü boyanan 1 (%5), orta derecede boyanan 16 (%80) ve zayıf boyanan 3 (%15) olgu vardı (Resim 32).

Siklin D1 boyanma oranları Tablo 14'de gösterildi.

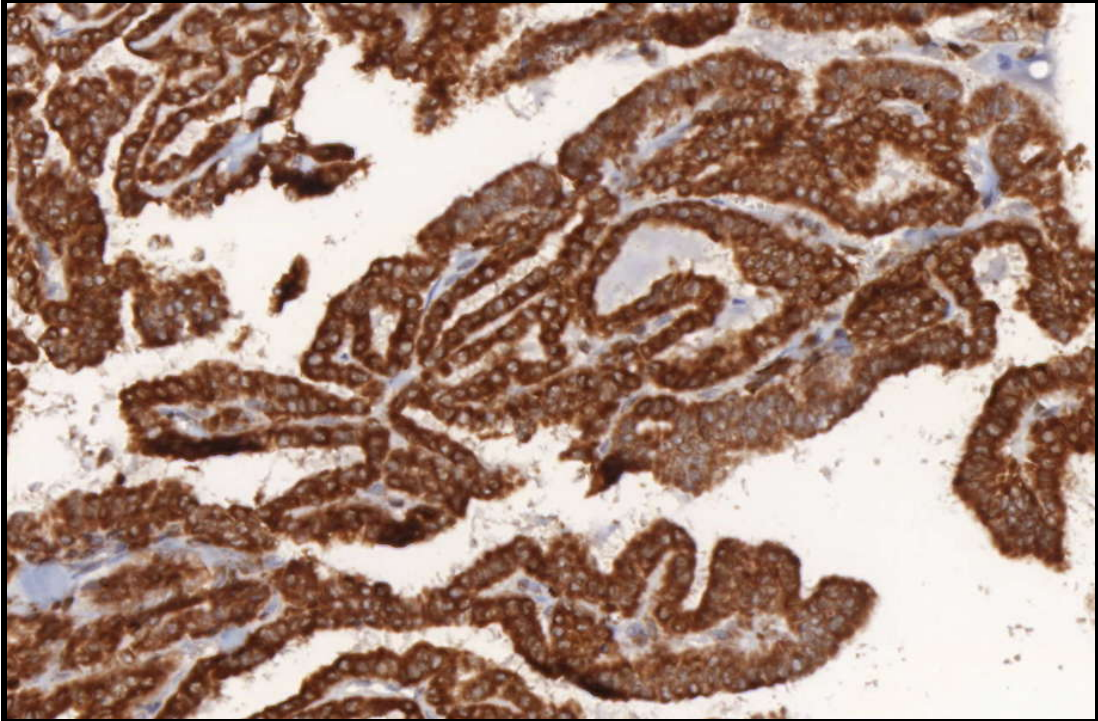
Tablo 14. Tanı gruplarına göre siklin D1 boyanma oranları

	Negatif	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
TPK	2 (%5,8)	14 (%41,2)	14 (%41,2))	4 (%11,8)
TPMK	1 (%4,5)	11 (%50)	9 (%41)	1 (%4,5)
TPK-LNM	0	6 (%50)	6 (%50)	0
AN	0	1 (%5)	16 (%80)	3 (%15)

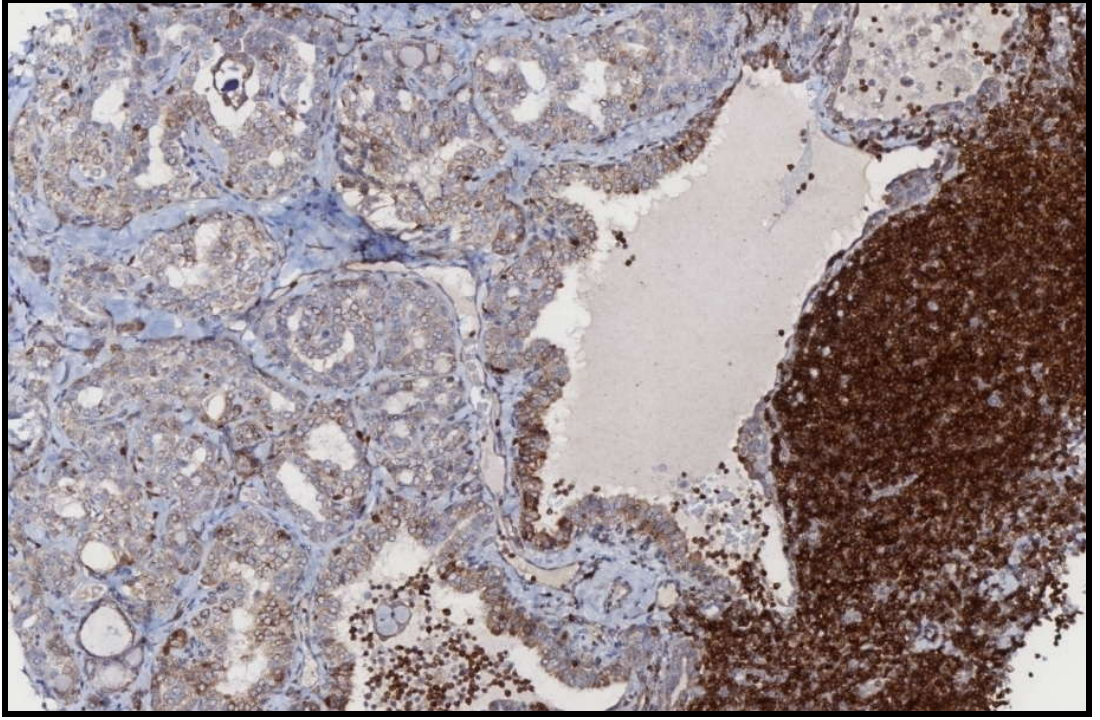
En yüksek boyanma yüzdesi TPK-LNM grubundayken en düşük olan AN idi. Tüm grupların siklin D1 boyanması birarada değerlendirildiğinde hem boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($P<0.05$). Ayrıca, TPK grubu ile diğer gruplar arasında yoğunluk açısından fark olmamakla birlikte boyanma oranı açısından anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). AN grubu ile diğer gruplar arasında ise hem yüzde, hem yoğunluk farkı dikkati çekti ($P<0.05$). TPMK ile TPK-LNM grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($P<0.05$).



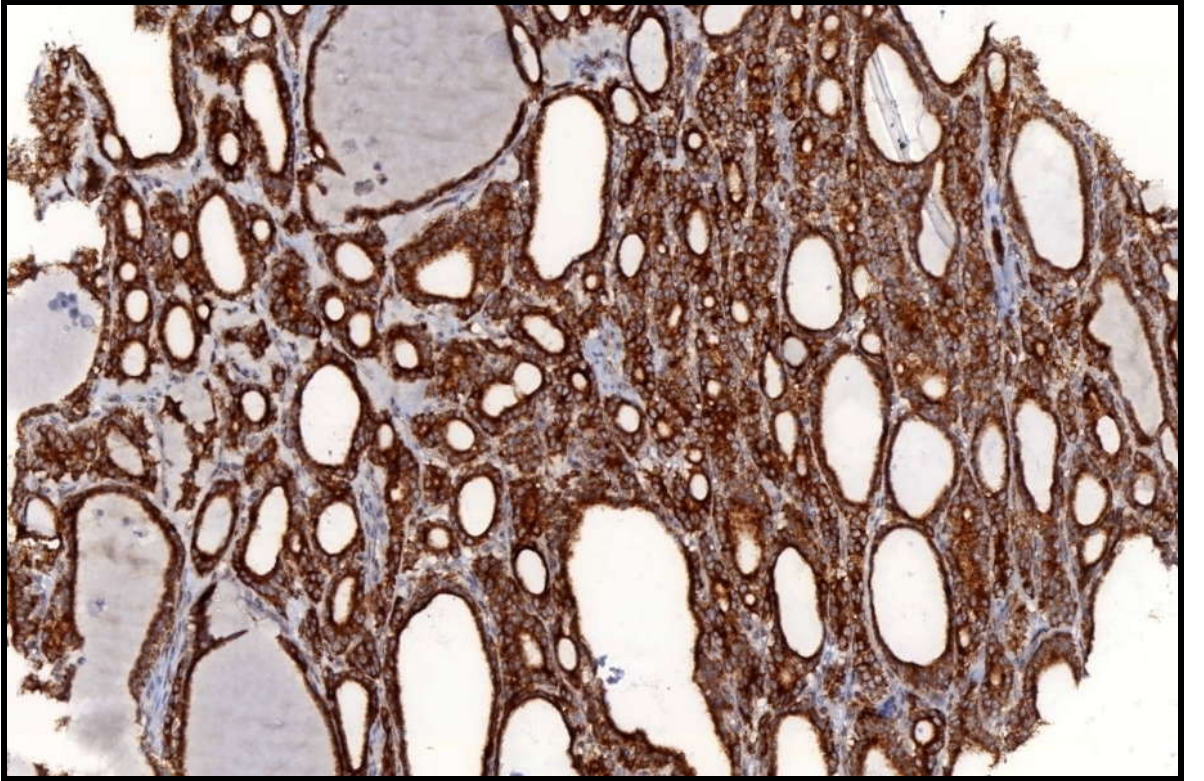
Resim 1. Tiroid papiller karsinomda sitoplazmik bcl-2 boyanması(x100)



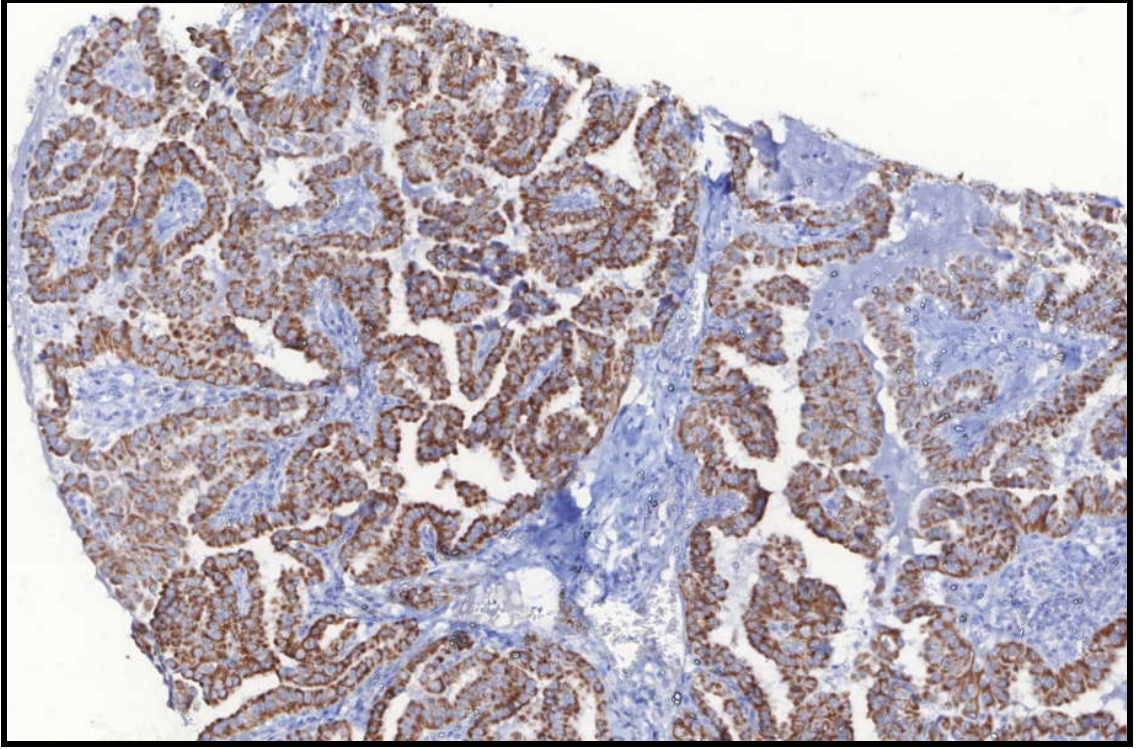
Resim 2. Tiroid papiller karsinomda sitoplazmik bcl-2 boyanması(x200)



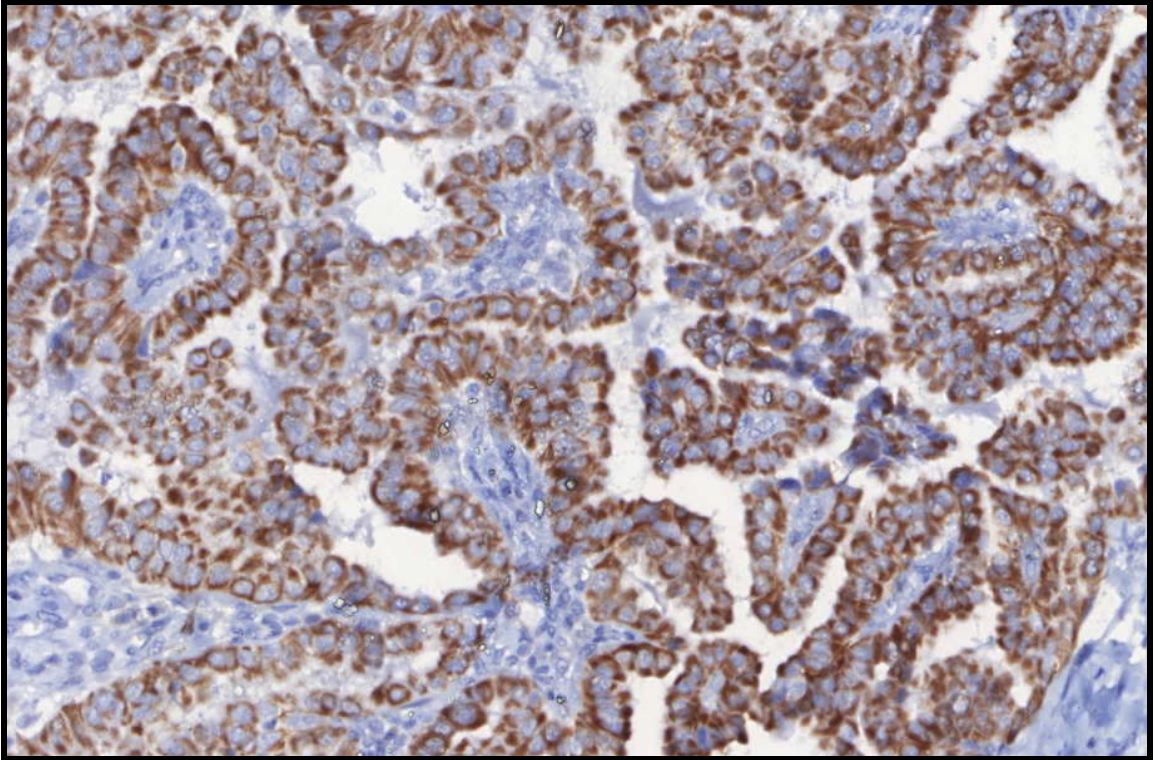
Resim 3. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında sitoplazmik bcl-2 boyanması (x100)



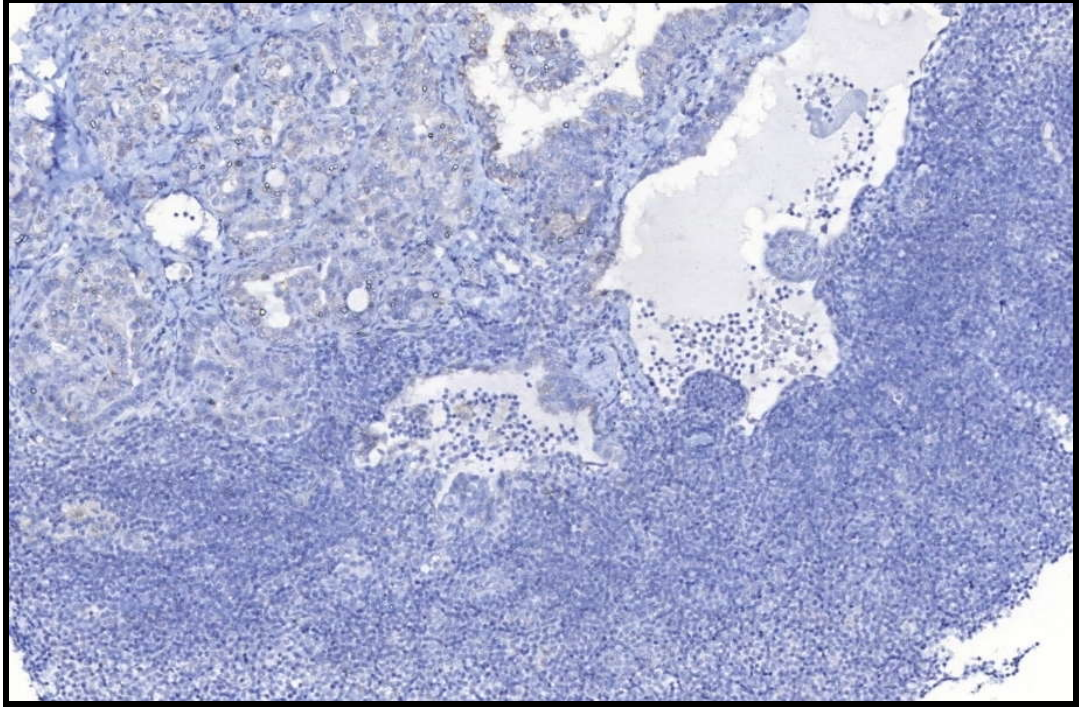
Resim 4. Adenomatöz nodülde sitoplazmik bcl-2 boyanması(x100)



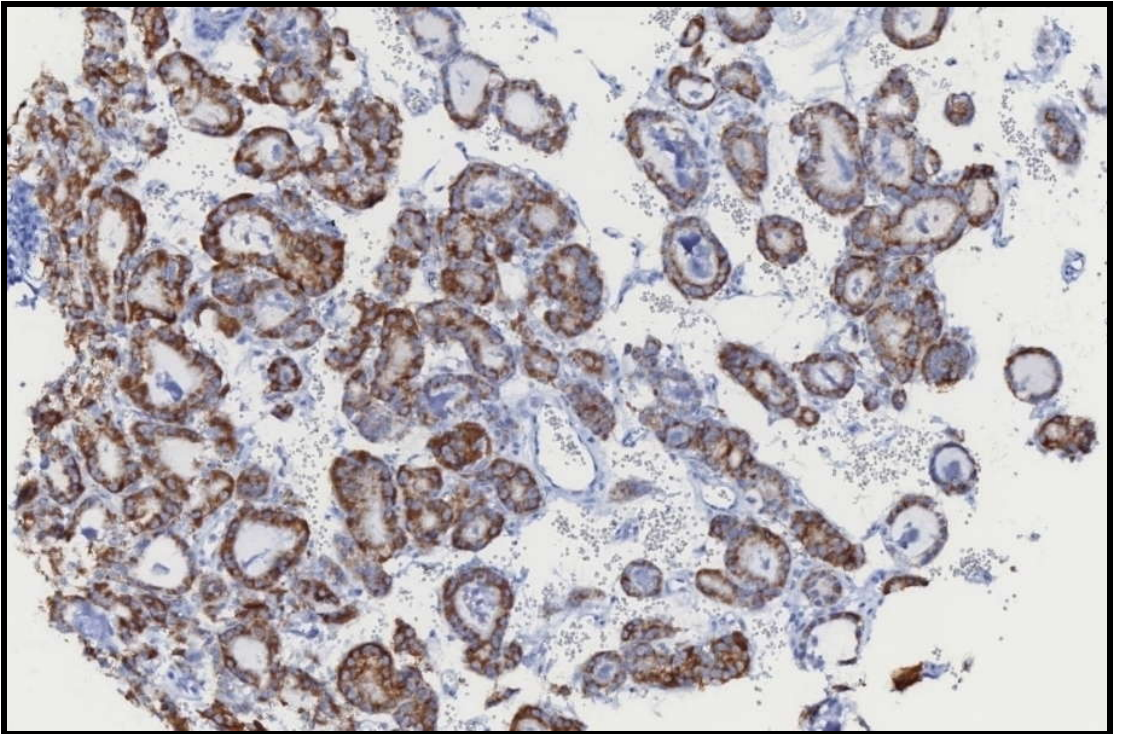
Resim 5. Tiroid papiller karsinomda sitoplazmik bax boyanması(x100)



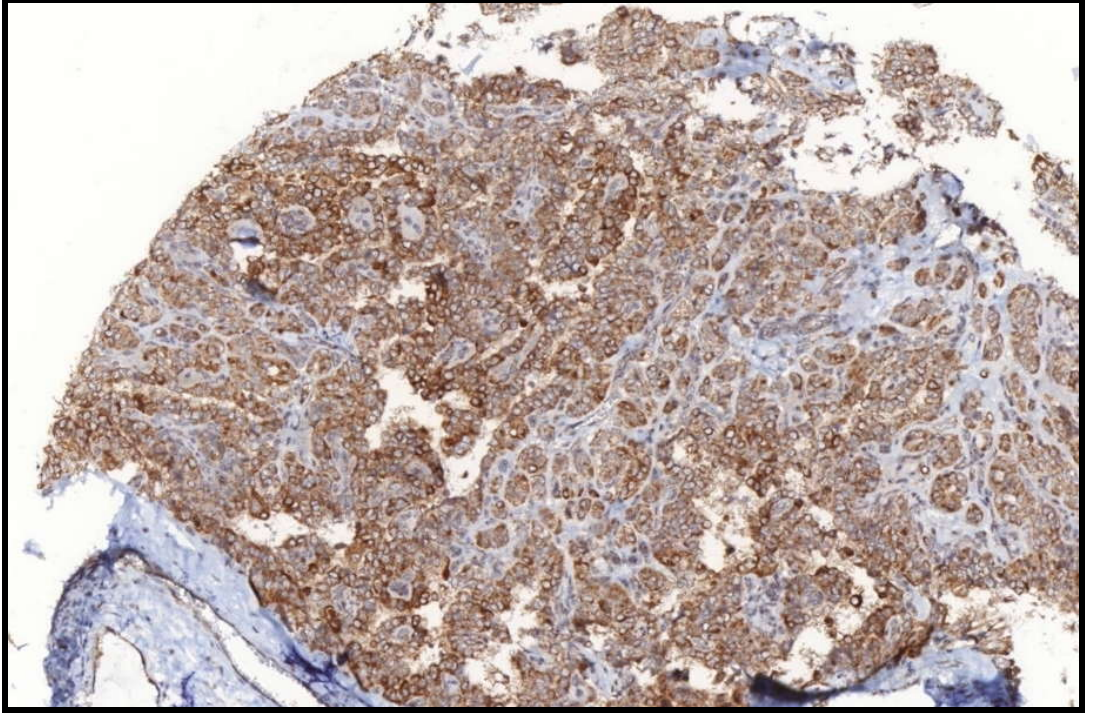
Resim 6. Tiroid papiller karsinomda sitoplazmik bax boyanması(x200)



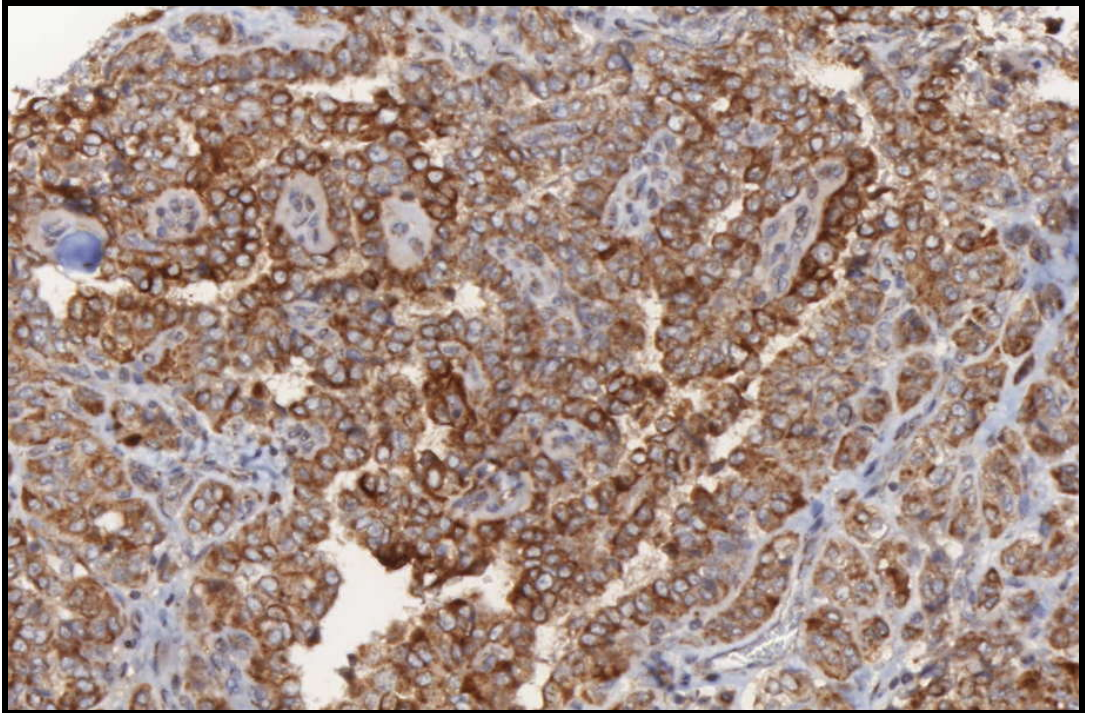
Resim 7. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında sitoplazmik bax boyanması(x100)



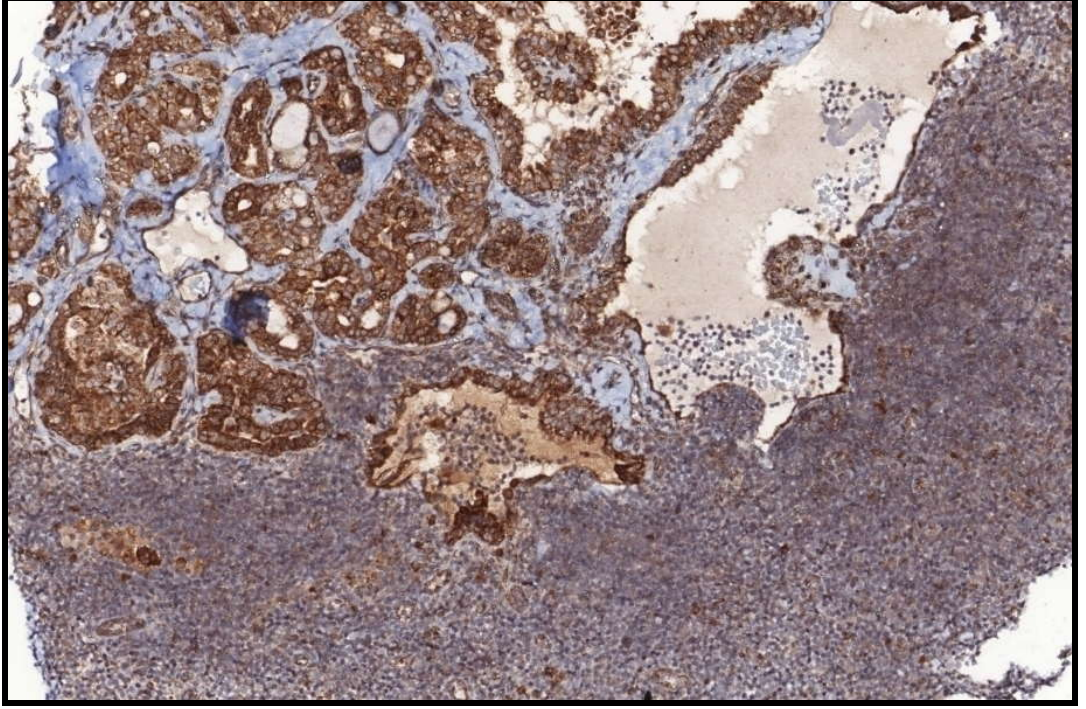
Resim 8. Adenomatöz nodülde sitoplazmik bcl-2 boyanması(x100)



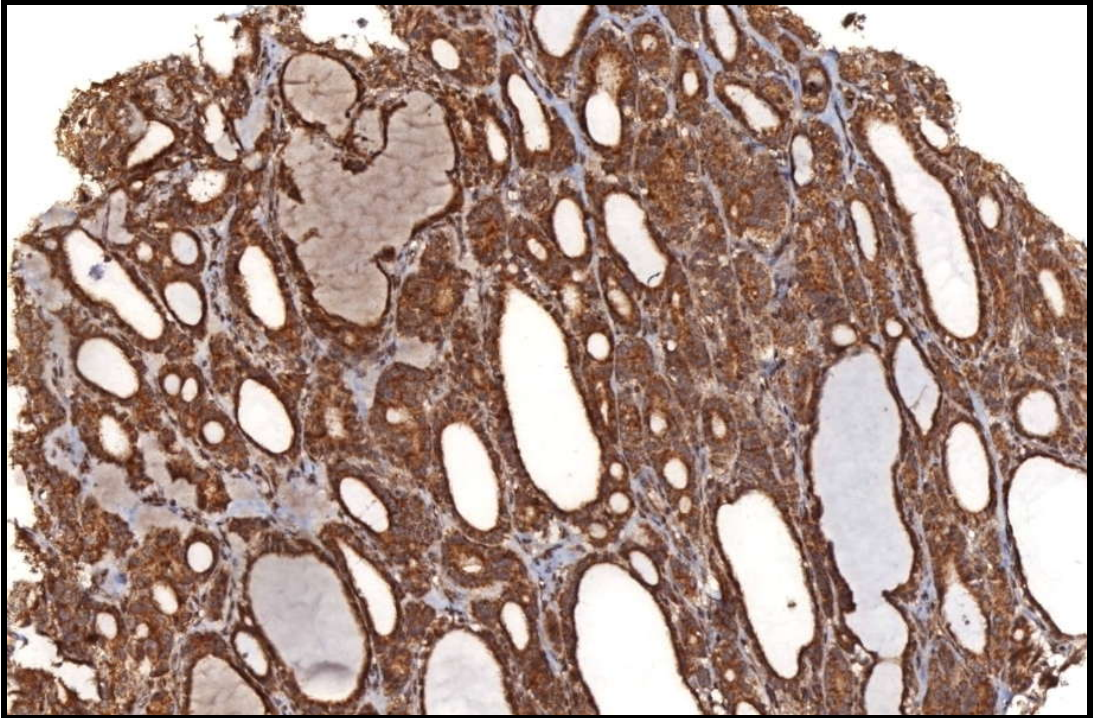
Resim 9. Tiroid papiller karsinomda sitoplazmik bcl-xL boyanması (x100)



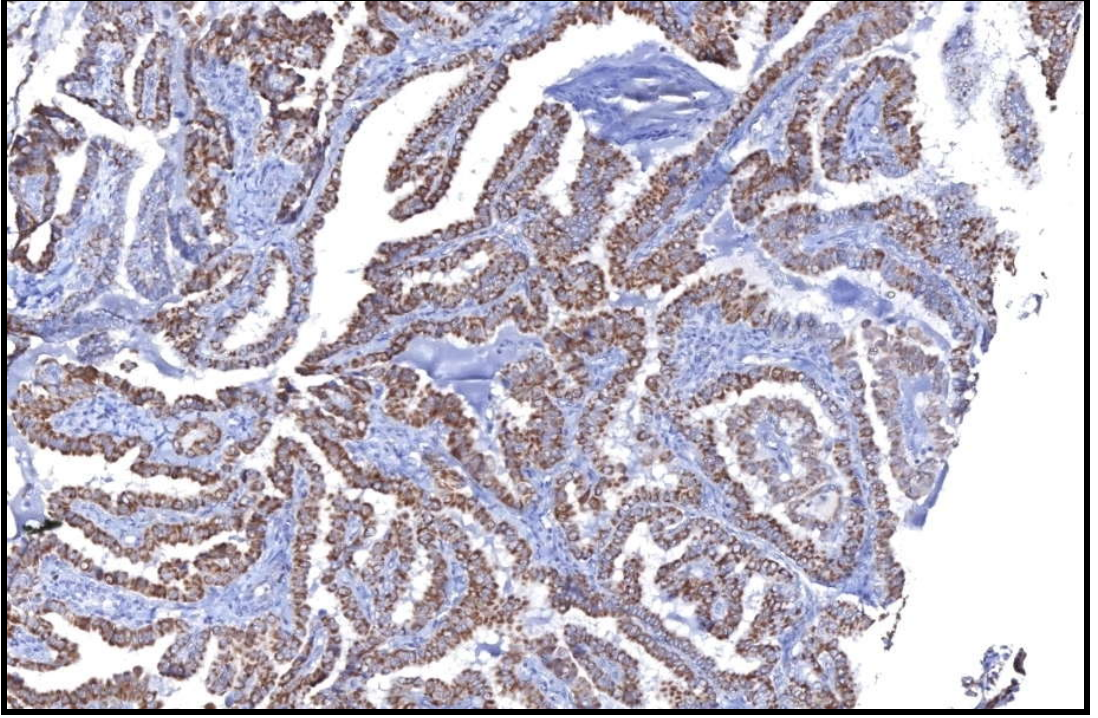
Resim 10. Tiroid papiller karsinomda sitoplazmik bcl-xL boyanması (x200)



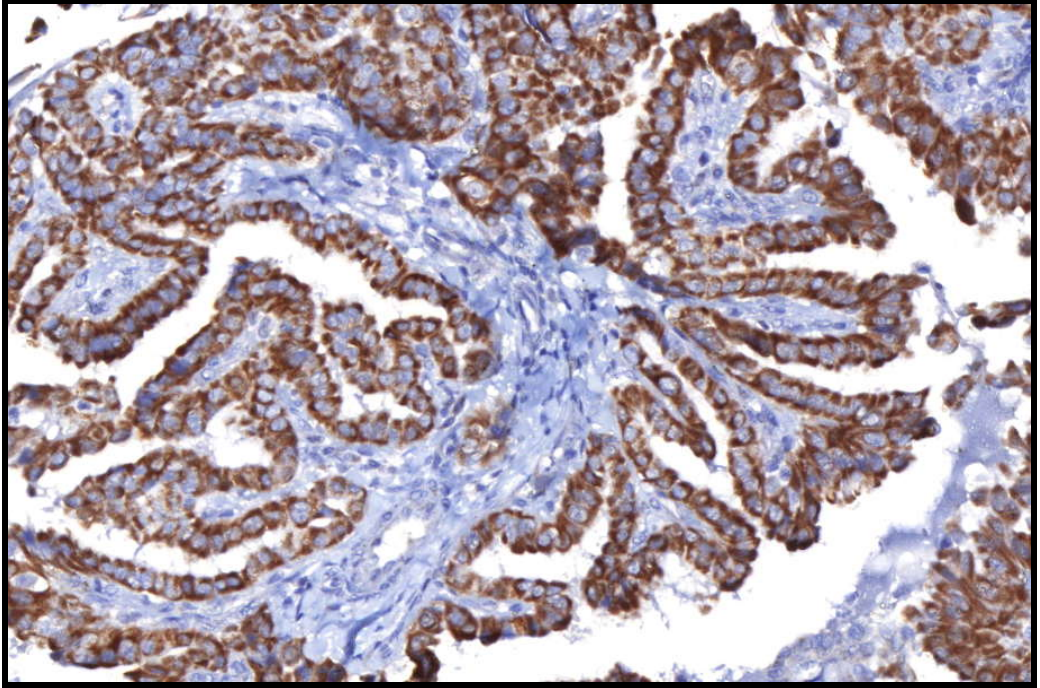
Resim 11. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında sitoplazmik bcl-xL boyanması (x100)



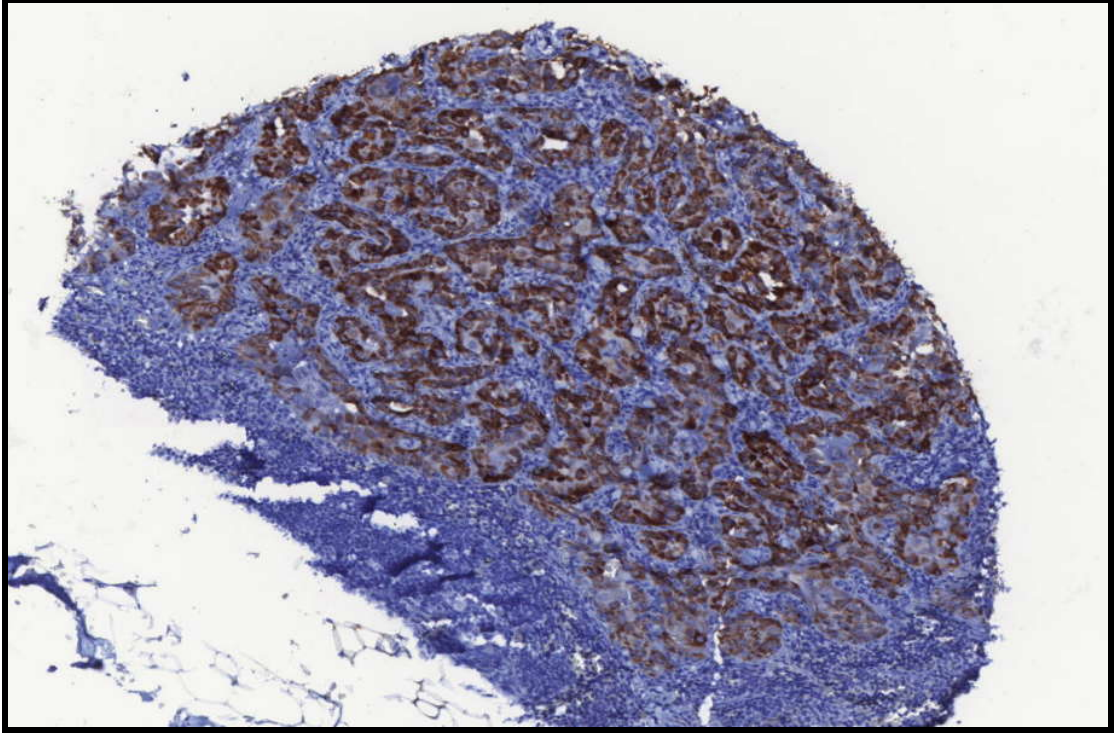
Resim 12. Adenomatöz nodülde sitoplazmik bcl-x boyanması (x100)



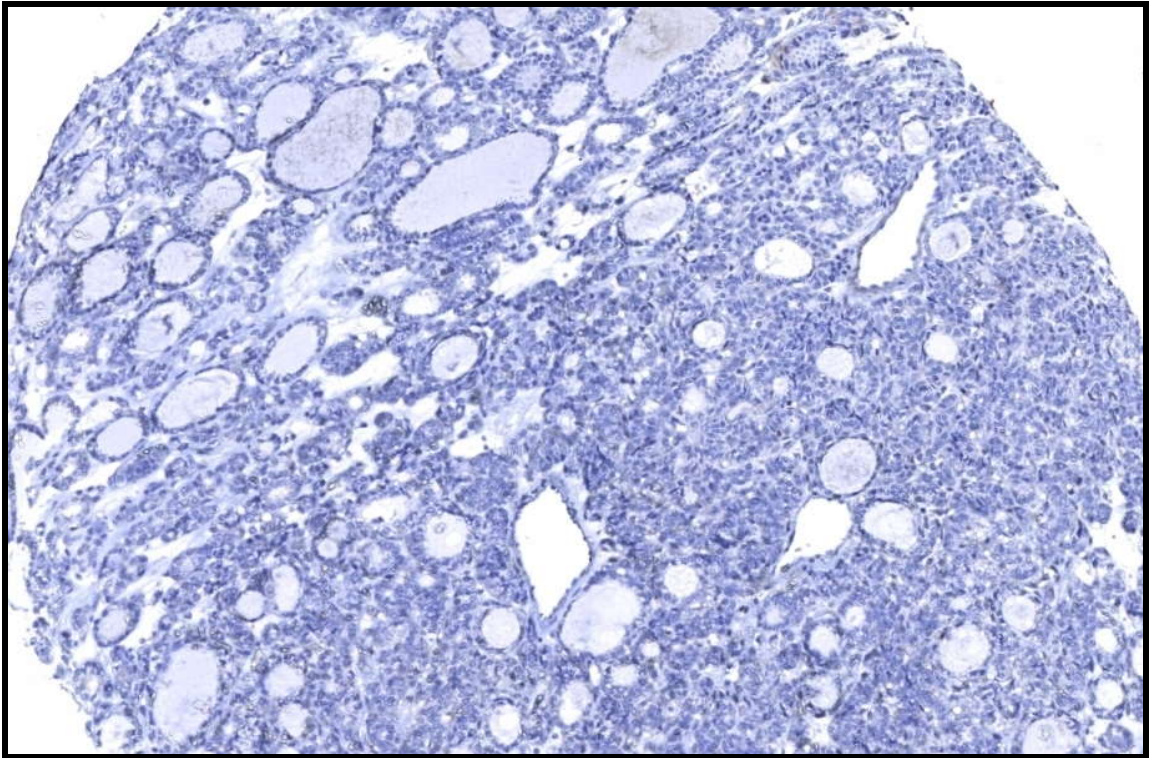
Resim 13. Tiroid papiller karsinomda nükleer ve sitoplazmik p53 boyanması (x100)



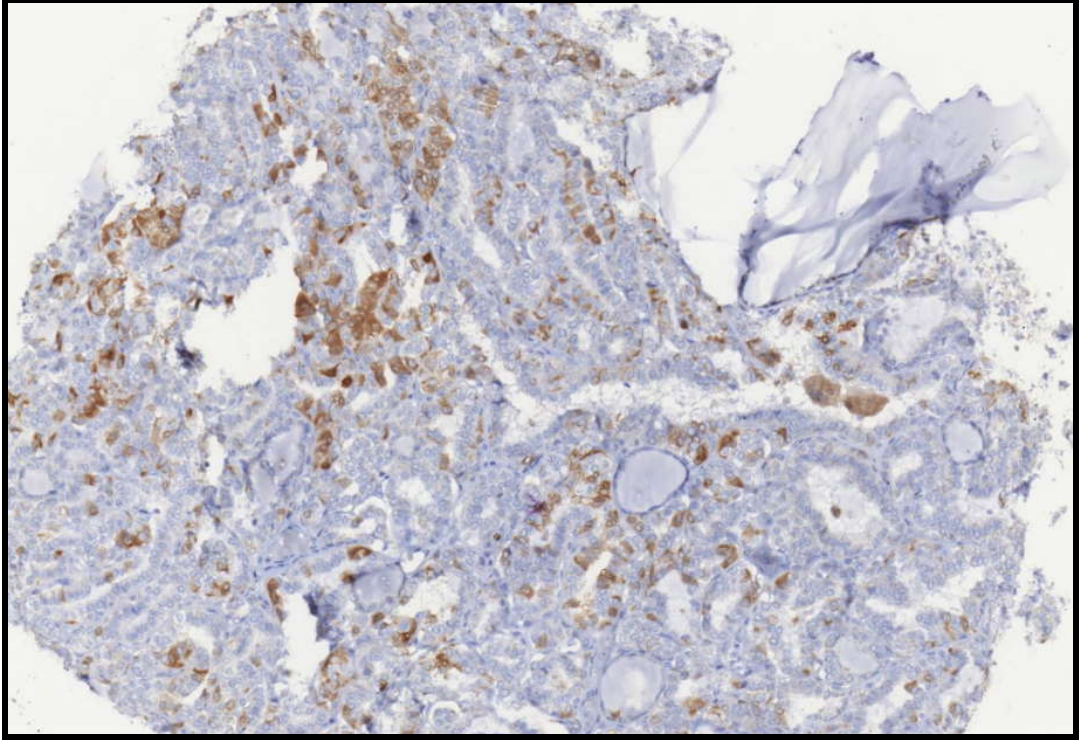
Resim 14. Tiroid papiller karsinomda nükleer ve sitoplazmik p53 boyanması (x200)



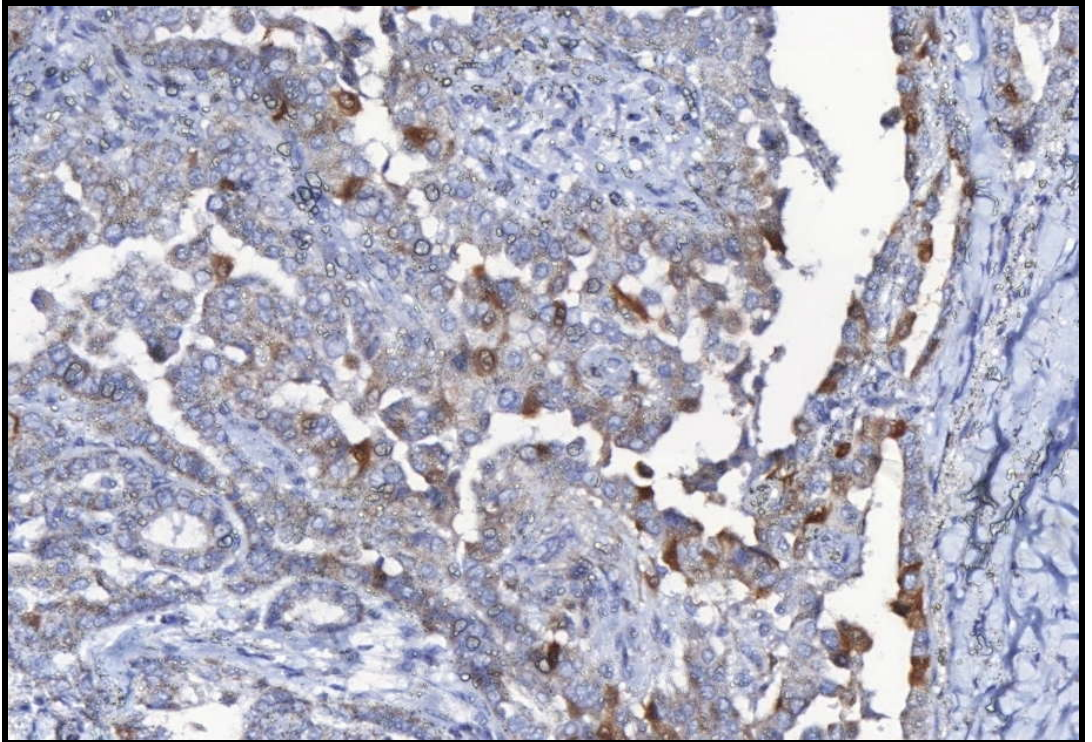
Resim 15. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında nükleer ve sitoplazmik p53 boyanması (x100)



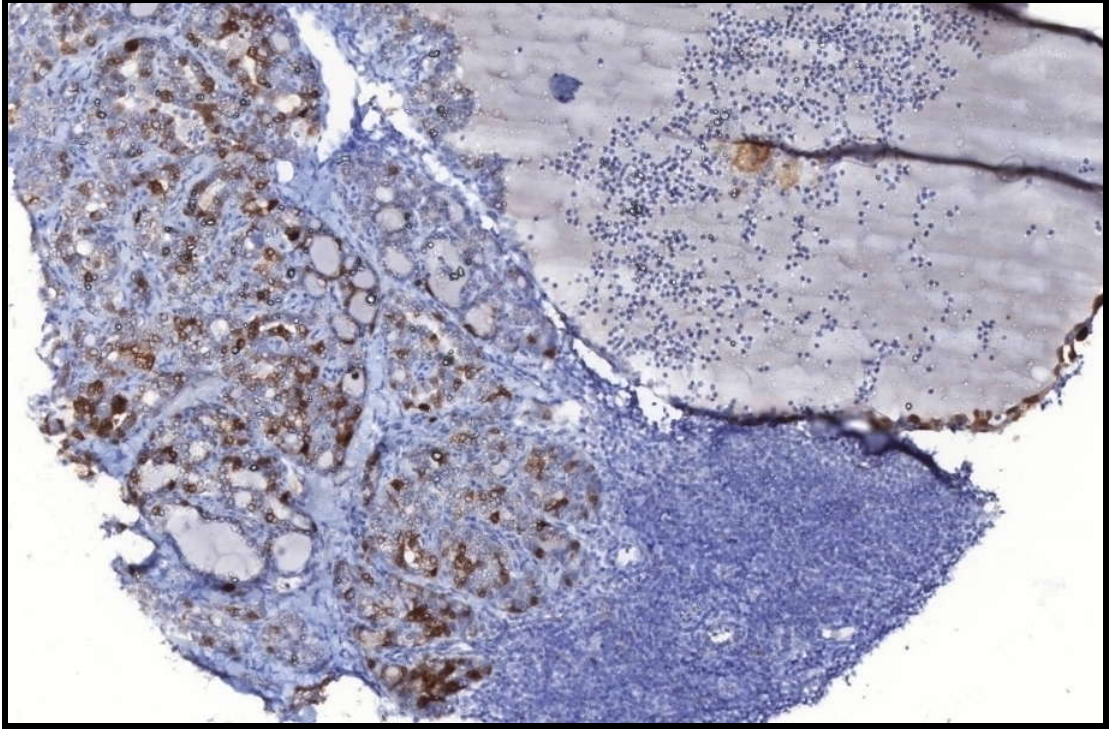
Resim 16. Adenomatöz nodülde p53 boyanması (x100)



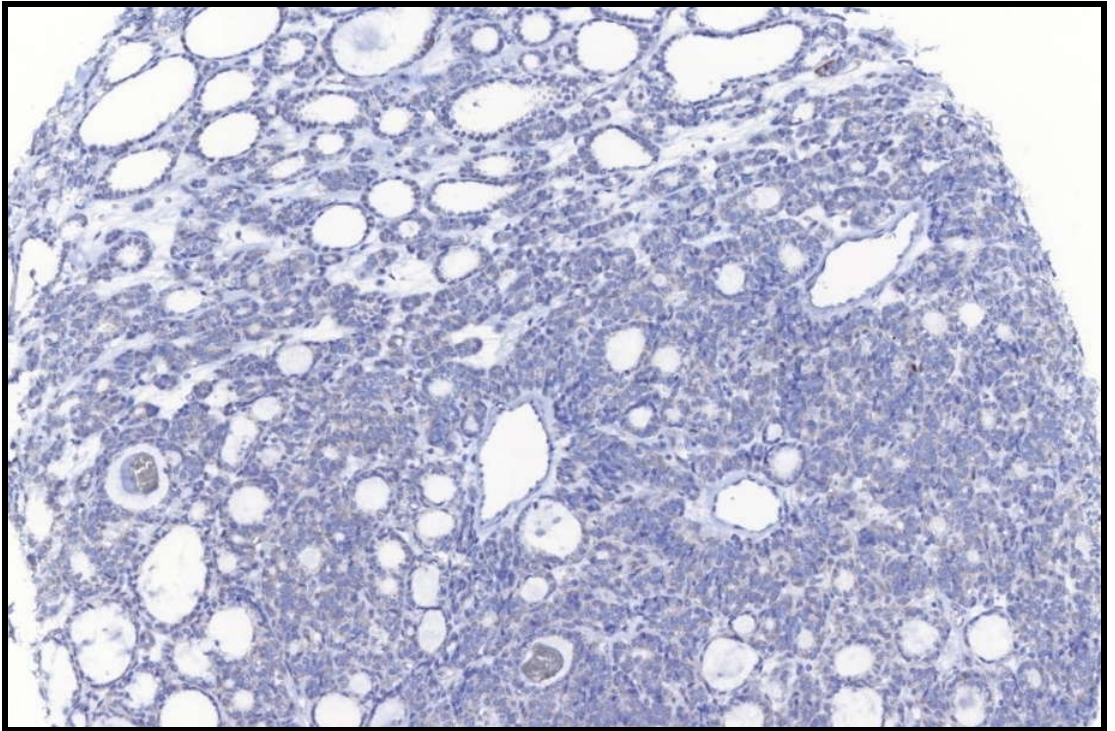
Resim 17. Tiroid papiller karsinomda nükleer ve perinükleer p16 boyanması (x100)



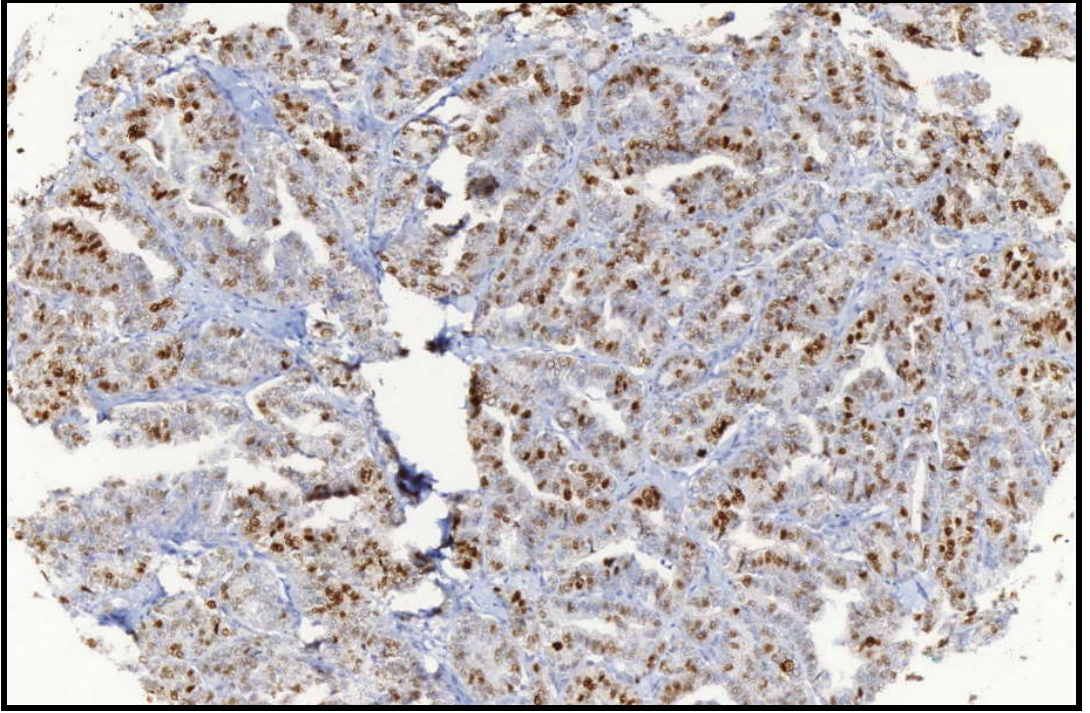
Resim 18. Tiroid papiller karsinomda nükleer ve perinükleer p16 boyanması (x200)



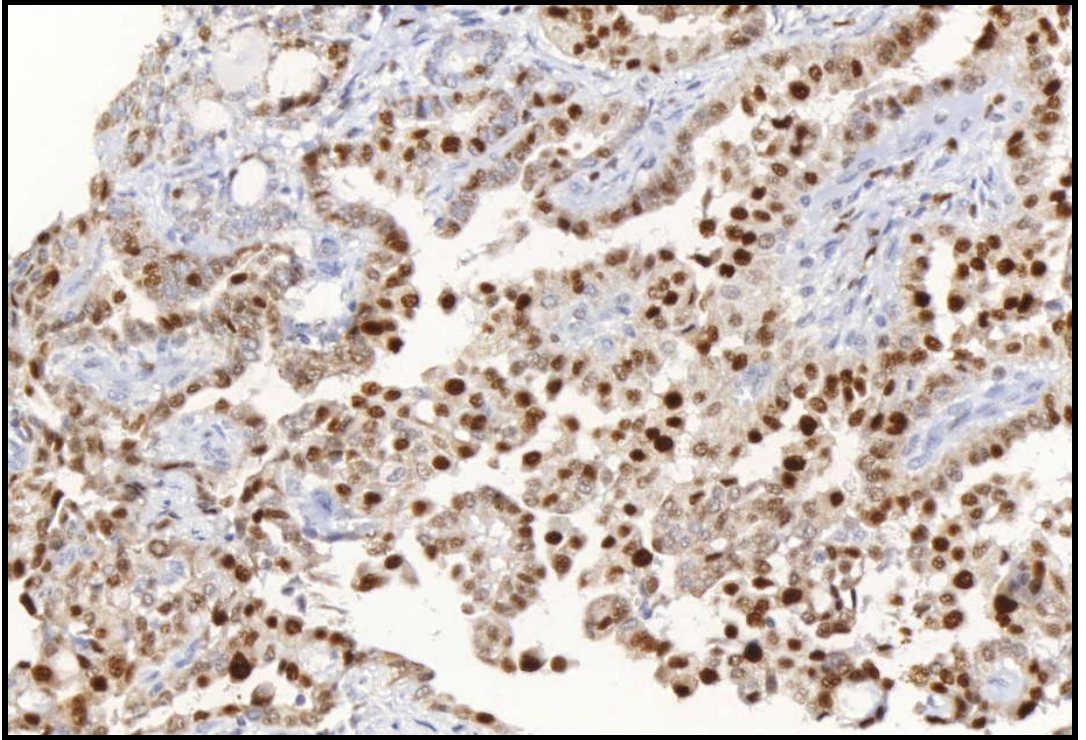
Resim 19. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında nükleer ve perinükleer p16 boyanması (x100)



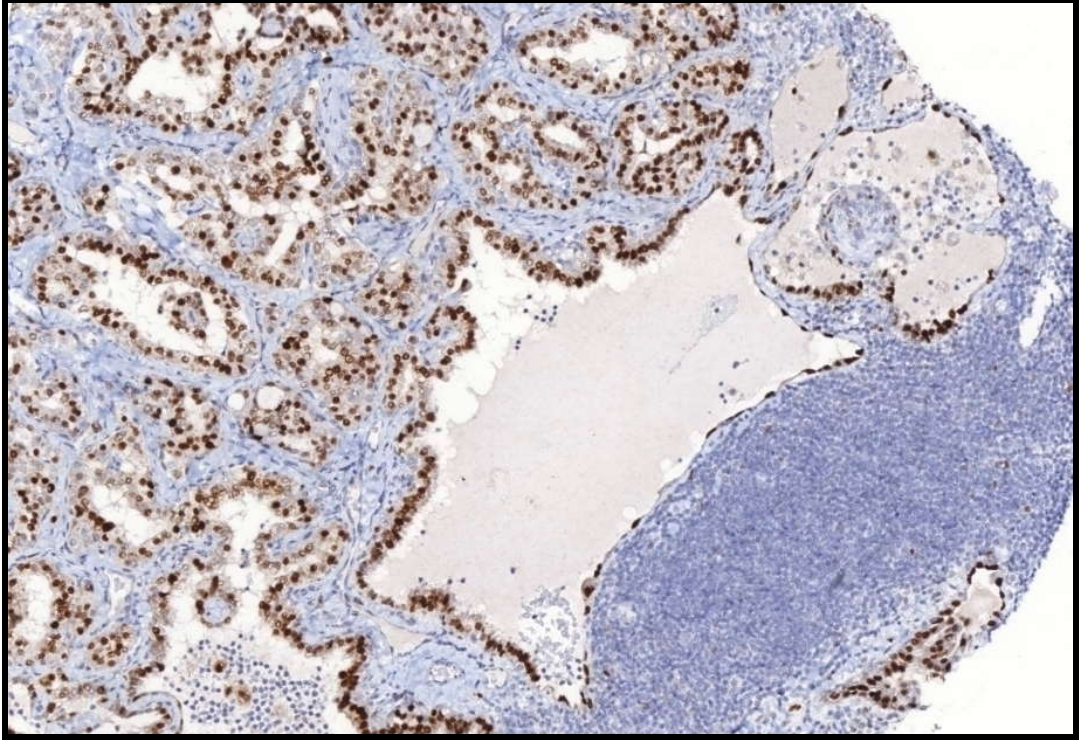
Resim 20. Adenomatöz nodülde p16 boyanması (x100)



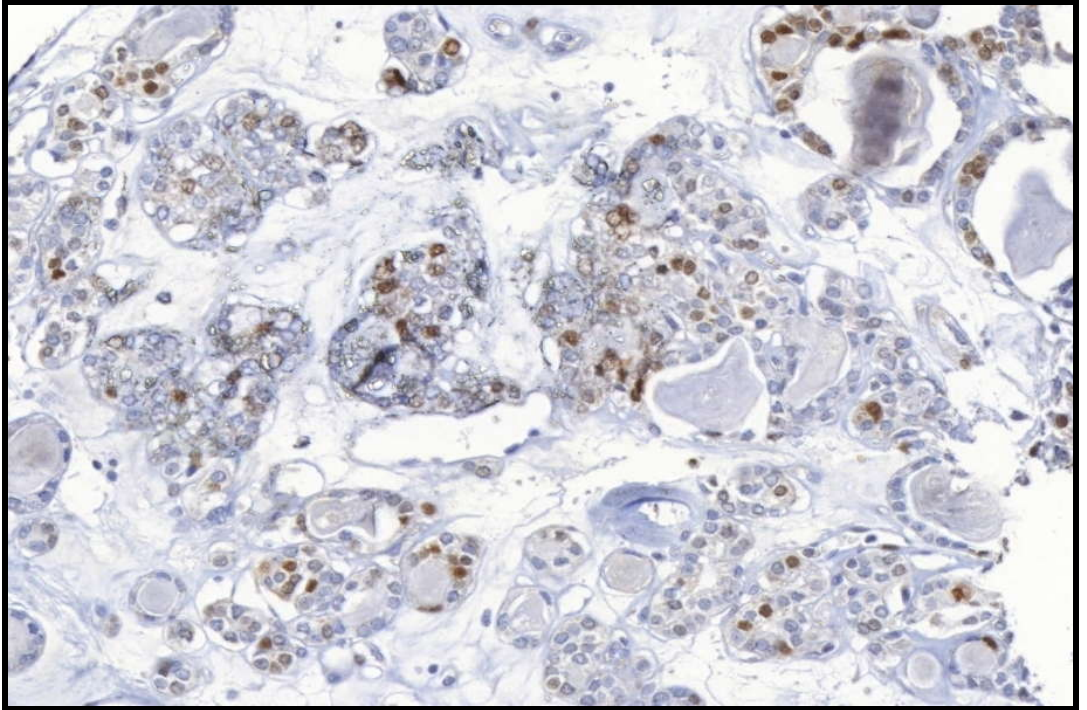
Resim 21. Tiroid papiller karsinomda nükleer p21 boyanması (x100)



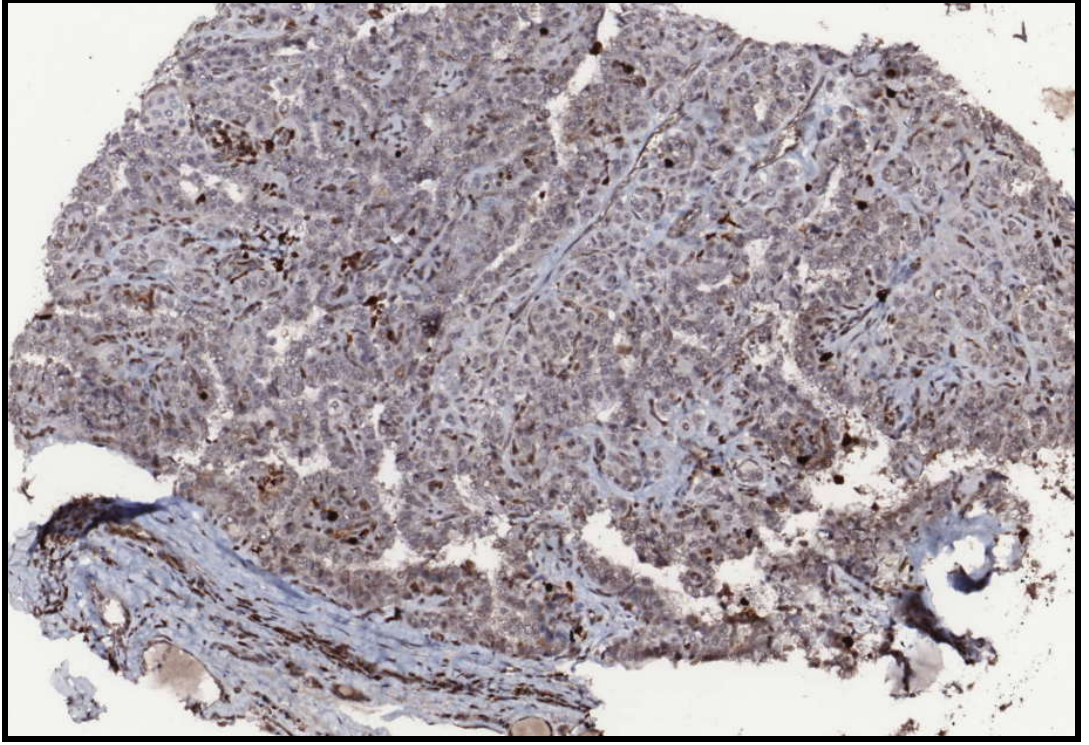
Resim 22. Tiroid papiller karsinomda nükleer p21 boyanması (x200)



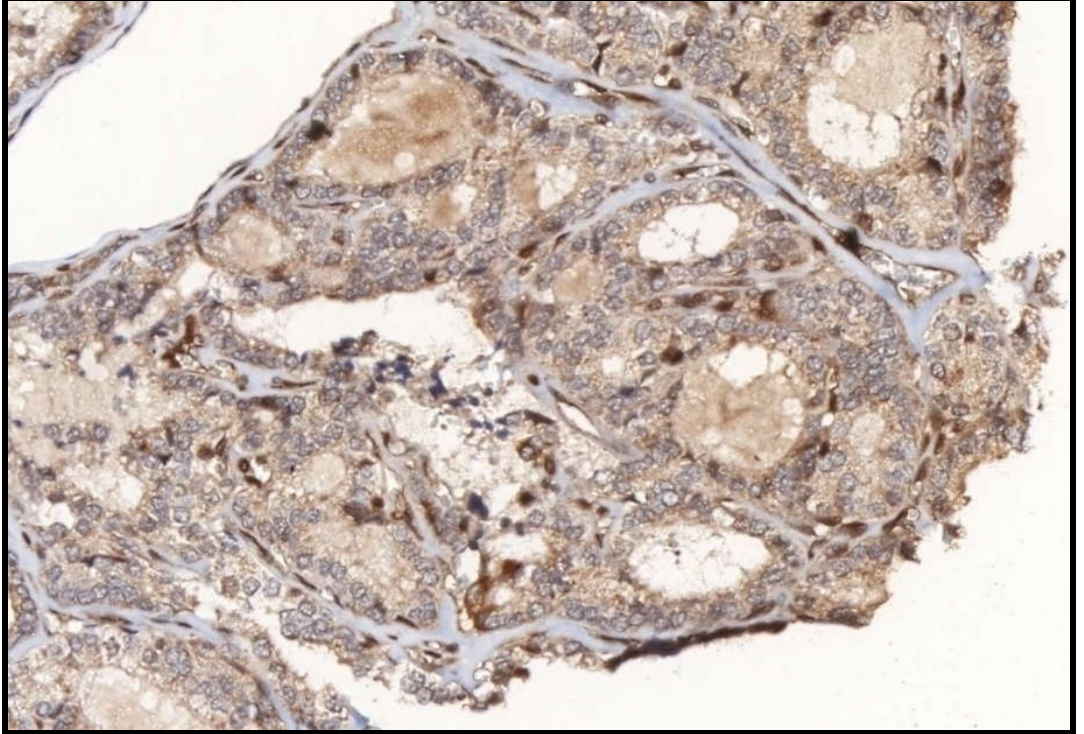
Resim 23. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında nükleer p21 boyanması (x100)



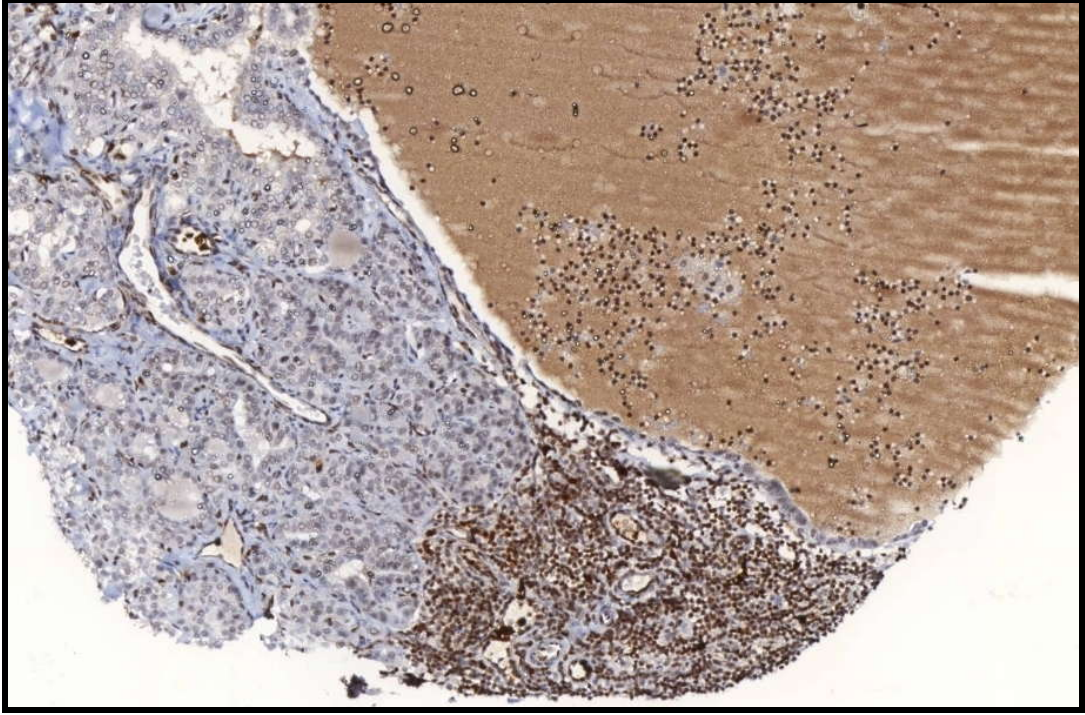
Resim 24. Adenomatöz nodülde nükleer p21 boyanması (x100)



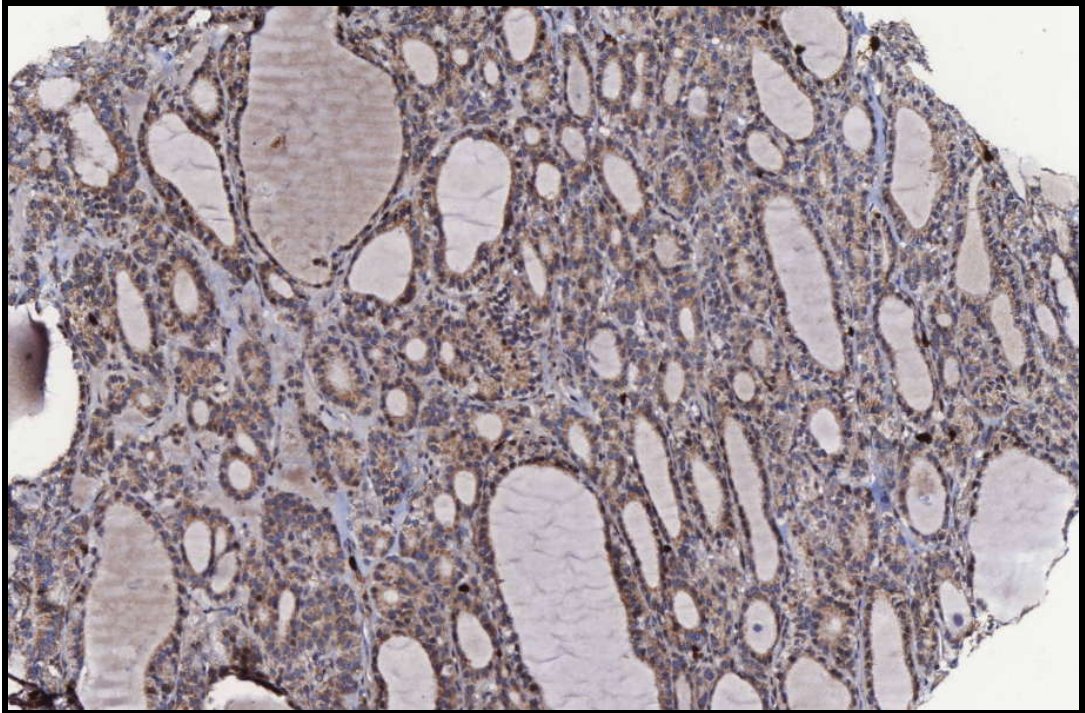
Resim 25. Tiroid papiller karsinomda nükleer ve hafif sitoplazmik p27 boyanması (x100)



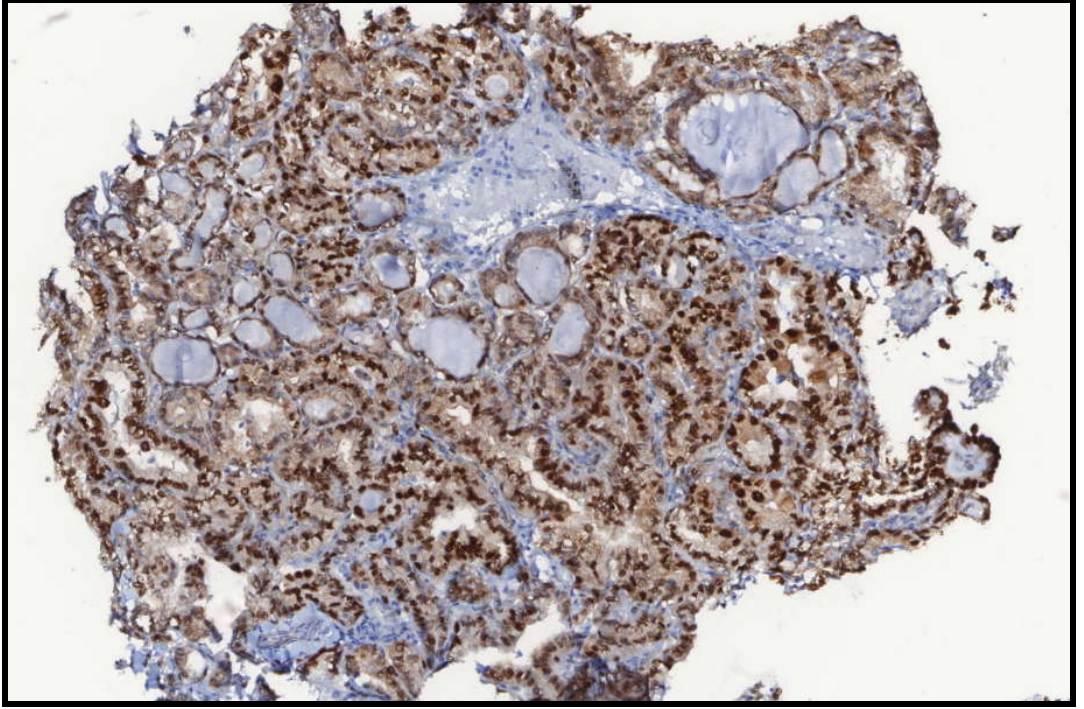
Resim 26. Tiroid papiller karsinomda nükleer ve hafif sitoplazmik p27 boyanması (x100)



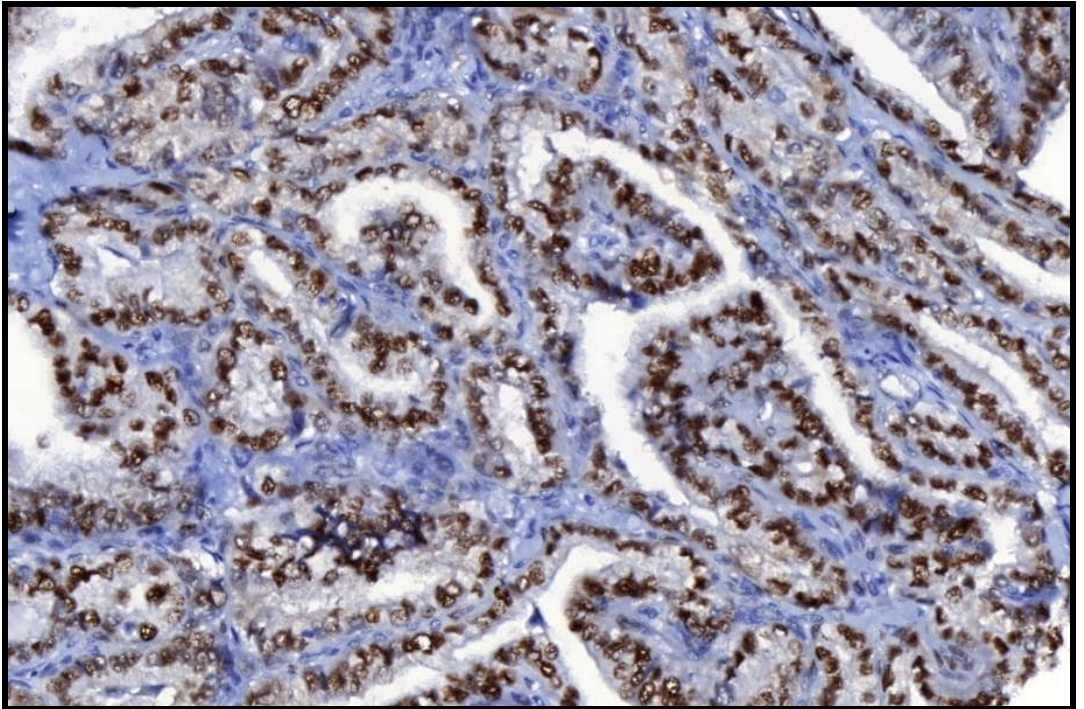
Resim 27. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında nükleer p27 boyanması (x100)



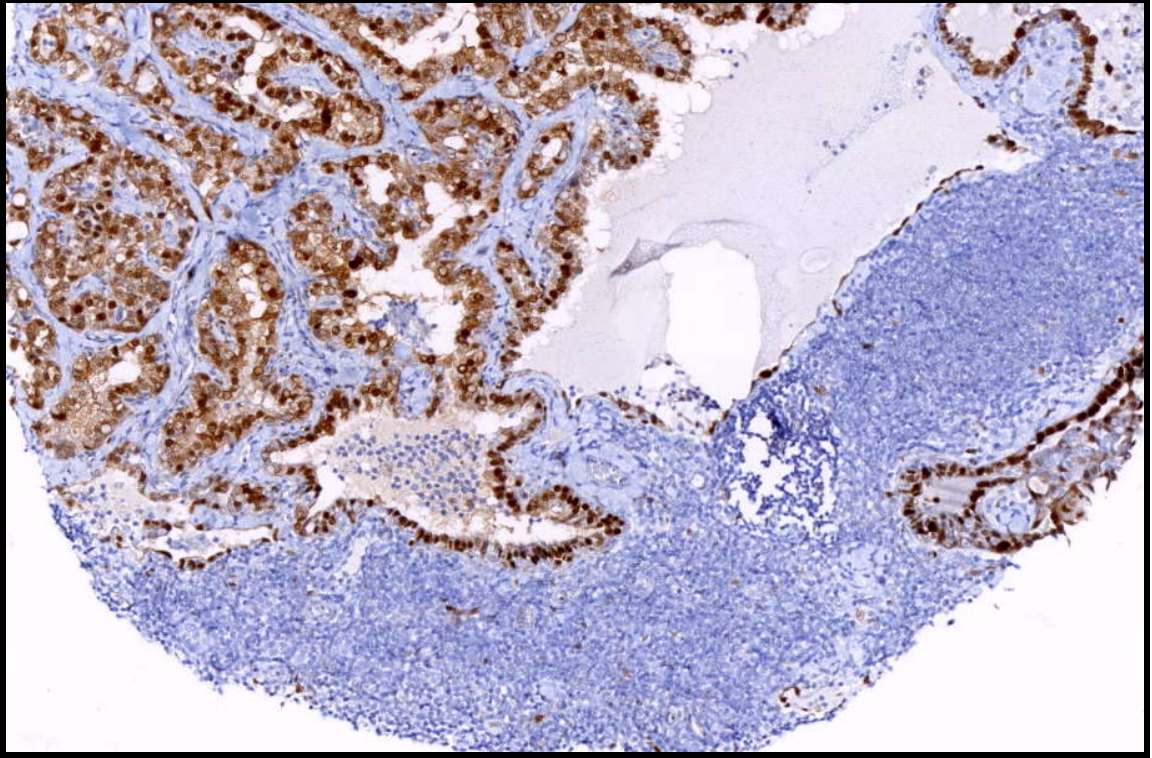
Resim 28. Adenomatöz nodülde nükleer ve zayıf sitoplazmik p27 boyanması (x100)



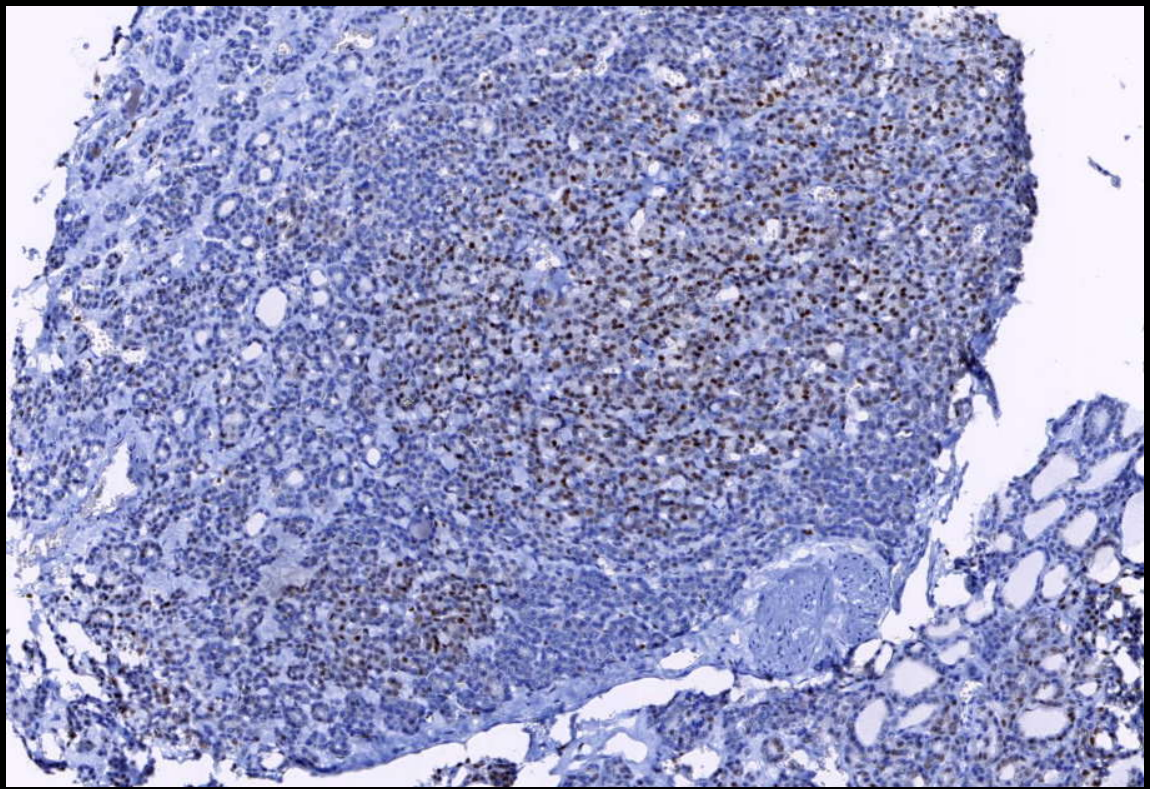
Resim 29. Tiroid papiller karsinomda nükleer siklin D1 boyanması (x100)



Resim 30. Tiroid papiller karsinomda nükleer siklin D1 boyanması (x200)



Resim 31. Tiroid papiller karsinomun lenf nodu metastazında nükleer ve siklin D1 boyanması (x100)



Resim 32. Adenomatöz nodülde nükleer siklin D1 boyanması (x100)

TARTIŞMA

Tiroid neoplazmları, tüm kanserlerin %1'ini, endokrin sistem kanserlerinin ise en yaygın türünü oluşturur. TPK, tiroid neoplazmalarının yaklaşık %80'ini oluşturur. Tüm kanserden ölümlerin %0.2'sinden sorumludur. Çernobil nükleer kazasının etkilerini yakından yaşamış bir ülke olan Türkiye'de, özellikle kadınlarda, artan sayıda tiroid papiller karsinom olgusu saptanmaktadır (7-10).

Tiroid lezyonlarında p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 gibi hücre siklusu düzenleyicileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış olsa da literatürde bunların hepsini bir bütün olarak değerlendiren, geniş boyutlu bir çalışma yer almamaktadır. Ülkemizin yaklaşık 30 yıl önce uğradığı yoğun radyoaktivitenin etkileri yeni yeni ortaya çıkmaktayken bu belirleyicilerin karsinogenezdeki rolü bir kez daha önem kazanmıştır.

Bu çalışmada apoptoz ve hücre siklusuna ilişkin gen ürünlerinin patogenezdaki rolünü belirlemek ve DMA yöntemini laboratuvarımızda kullanılabilir hale getirmek amacıyla TPK, TPMK ve TPK-LNM ve AN örnekleri DMA yöntemiyle p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 İHK boyamaları açısından değerlendirildi.

TPK olgularının %85,3'ü kadın, %14,7'si erkekti ve en büyük olgu grubu altıncı onyıda (ort. 45.76±12,39) izlendi. TPMK olgularının %77,3'ü kadın, %22,7'si erkekti. En büyük olgu grubunun beşinci onyıda (ort. 45,59±9,77) olduğu görüldü. TPK-LNM olgularının %66,7'si kadın, %33,3'ü erkekti ve en büyük olgu grubu altıncı onyıda (ort. 48.41±12,22) izlendi. AN olgularının %75'i kadın, %25'i erkekti ve en büyük olgu grubu altıncı onyıda izlendi.

Tüm grupların yaş ve cinsiyet dağılımı incelendiğinde, tiroid lezyonlarıyla ilgili klasik bilgilere paralel olarak olguların büyük çoğunluğunun kadın olduğu dikkati çekti (1-6). Yirmi yaş altında olgu bulunmadığı, genellikle

olguların altıncı onyılıda kümelenildiği saptandı. Gruplar arasında yaşlar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P>0.05$).

Çalışmamızda ele alınan 34 TPK, 22 TPMK, 12 TPK-LNM yanı sıra 20 AN olgusu, bcl-2 boyanma özellikleri açısından değerlendirildiğinde, TPK (ort. $88,28\pm 13,83$) ve TPMK (ort. $58,11\pm 41,61$) grupları arasında hem bcl-2 boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). AN ($85,22\pm 12,19$) ile diğer tüm gruplar arasında, TPK ve TPK-LNM ($59,32\pm 24,71$) grubu arasında bcl-2 boyanma yüzdesi açısından anlamlı fark izlenirken ($P<0.05$). boyanma yoğunluğu açısından fark görülmedi ($P>0.05$).

Yapılan çeşitli çalışmalarda normal tiroid dokusu, nodüler guatr gibi benign lezyonlar ve TPK'ü da içine alan iyi diferansiye tiroid karsinomlarında perinükleer alanda yoğunlaşan sitoplazmik bcl-2 boyanması tanımlanmıştır (143) Literatüre paralel olarak olgu gruplarımızın tümünde hem benign, hem malign örnekler bcl-2 ile sitoplazmik boyanma göstermiş olup en yüksek boyanma oranı TPK grubundaydı ($117-119,121,144,145$). TPMK grubunda ise Mitselau ve ark. (144) ile Aksoy ve ark.'nın (145). bulgularına benzer şekilde bcl-2 ekspresyonunda azalma dikkati çekti.

Benign lezyonları temsil eden AN'lerin bcl-2 boyanmasının diğer malign gruplara göre anlamlı derecede farklı olması, bcl-2'nin etkin olduğu apoptoz yolağında benign ve malign lezyonlar arasında fark olduğu şeklinde yorumlanabilir. TPMK grubunda AN'e göre azalmış boyanma oranı, organizmanın, tümörün ilk aşamasında bcl-2'yi azaltıp apoptozu indüklemek suretiyle tümör hücrelerini ortadan kaldırma çabasına bağlanabilir. TPK'ların tüm gruplardan daha yüksek oranda bcl-2 ekspresse etmesi ise bu aşamadaki bir tümörün hücrelerinde uzamış yaşam süresini ve bcl-2'nin karsinogenezdeki rolünü ortaya koymaktadır.

Olgu grupları bax boyanması açısından ele alındığında, TPK'lar dışındaki lezyonların yarısından fazlası bax ile boyanmamıştı. Boyanma yoğunluğu. hiçbir grupta yüksek değildi. Ortalama boyanma oranları sırasıyla AN ($3,88\pm 7,26$), TPMK ($8,66\pm 15,21$) ve TPK ($26,95\pm 29,70$)'da giderek artmaktaydı. TPK ve AN grupları arasında hem boyanma yüzdesi, hem de

boyanma yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı ($P<0.05$). TPK ve TPMK arasında ise boyanma yüzdesi açısından fark gözlemlendi ($P<0.05$). Diğer karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$).

Bulgularımız, ülkemizle aynı coğrafi bölgeden çıkmış iki araştırma ile tümüyle paralellik göstermekteydi. Letsas ve ark.ları (Yunanistan), PTK'da (%55) daha fazla olmak üzere NG'larda da (%10) bax ile pozitif sitoplazmik boyanma saptamışlardır (143). Aynı çalışmada TPK'ların yüksek bcl-2 boyanmasına da dikkat çekilmiştir. Manetto ve ark. (İtalya), TPK'da bcl-2 daha baskın olmak üzere, hem bcl-2, hem de bax pozitifliği saptamışlardır (118). Bizim çalışmamızda da TPK olgularında bcl-2 ve bax boyanması birarada görüldü. Bu durum, ilk bakışta çelişkili görünse de, daha önceki araştırmalarda, Letsas ve ark. bunu bcl-2 ve bax'ın yaygın aminoasit homolojisi göstermeleri, homodimer ve heterodimerler oluşturmalarına bağlamışlardır (143). Manetto ve ark. ise, bcl-2 ve bax boyanmalarının tek tek değerlendirilmesi yerine bcl-2/bax oranının daha anlamlı olduğunu, bu oranın da TPK'larda bcl-2 lehine olduğunu öne sürmüşlerdir (118).

Bcl-xL boyanma özellikleri açısından gruplar değerlendirildiğinde bcl-xL boyanma yüzdesi ve yoğunluğu tüm gruplarda yüksekti. Bir TPK örneği dışında, tüm örneklerde bcl-xL boyanması görüldü. TPK ve TPMK grupları arasında, TPK ve AN grupları arasında, TPMK ve TPK-LNM grupları arasında hem bcl-xL boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). TPK ve TPK-LNM grupları arasında, TPMK ve AN grupları arasında yalnız yoğunluk açısından anlamlı fark saptanırken, AN ve TPK-LNM grubu arasında yalnızca boyanma yüzdesi açısından fark bulundu ($P<0.05$).

Yapılan çalışmalarda TPK'larda Bcl-xL'nin pozitif olduğu bildirilmiştir (121,122). Martinez-Brocca ve ark.ları, anti-apoptotik özellikteki bcl-xL'nin bölgesel LNM ve uzak metastaz gibi prognostik tümör değişkenleri ve kötü prognozla ilişkili olduğunu, tümör agresifliğinin öngörülmesinde güçlü bir araç olabileceğini öne sürmüşlerdir (122) Çalışmamızda, tümör gruplarında yüksek bcl-xL boyanması görülse de, TPK-LNM grubunda savunulduğu şekilde önemli derecede bir fark saptanmamıştır.

Çalışmamızda yer alan bcl-2 gen ailesi üyelerine topluca bakıldığında, bcl-2 gen ailesinden bcl-2, bax ve bcl-xL'nin TPK'larda yaygın pozitiflik gösterdiği, bunlarla ilgili bulguların literatürle büyük ölçüde uyumlu olduğu ve bcl-2 öncelikli olmak üzere bu gen ailesinin tümünün TPK patogenezinde payı olduğu sonucuna varılmıştır.

TPK'da p53'ün, nükleer ve nükleus çevresinde yoğunlaşan sitoplazmik boyanma paterni olmak üzere iki farklı boyanma paterni tanımlanmıştır (95,146). Benzer şekilde çalışmamızda yer alan olgu gruplarının hepsinde nükleer boyanma yanı sıra baskın olarak sitoplazmik p53 boyanması görüldü.

p53 ile TPK'ların %76,5'i, TPMK'ların %91,2'si, TPK-LNM'lerin %66.7'si pozitif ve genellikle güçlü bir boyanma göstermekteydi. Buna karşın AN'lerin %60'ında boyanma saptanmadı. AN (1,38±2,00) grubu ile diğer tüm gruplar arasında p53 boyanma yüzdesi ve yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken (P<0.05). TPK (ort. 23,86±26,85) ve TPMK (8,39±12,27) grubu arasında, TPK ve TPK-LNM (18,58±28,20) grubu arasında, TPMK ve TPK-LNM grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (P>0.05).

Bu bulgular literatürle uyumlu olup (95, 106, 108, 114, 146) benign olgu grubunda boyanma yüzdesi, malign olanlara göre anlamlı derecede düşüktü. Bu bulgu, literatürde bildirilen sonuçlarla birlikte yorumlandığında p53'ün malignite göstergesi olduğu ve tümör patogenezinde rolü olduğunu akla getirmektedir.

p53'ün bax'ın transkripsiyonel aktivatörü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda p53 boyanma değerleri yüksek olan tiroid kanserlerinde bax'ın da yüksek olduğu bildirilmiştir (95,119).Olgularımızın p53 ile bax boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede pozitif korelasyon bulunması (r=0,73) literatürle uyumludur.

p16, İHK olarak nükleer boyanma yapan bir belirteç olmasına karşın tiroid lezyonlarında paranükleer sitoplazmik boyanmalar da görülmektedir. Nükleer ve sitoplazmik boyanmanın birarada görülmesi, p16 overekspresyonuna bağlanmış, bu lokalizasyon değişikliğinin TPK patogenezinde sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (147). Çalışmamızdaki

olgu gruplarında, baskın olarak da lezyonlardaki onkositik hücrelerde, nükleer ve sitoplazmik p16 boyanmaları görülmüştür.

p16 ile boyanma yoğunluğu tüm gruplarda genellikle orta ya da zayıf yoğunlukta idi. AN grubunda (ort. 1,05±1,35) boyanan lezyonlar yarıdan az olup bu boyanma da zayıf nitelikteydi. TPK (ort. 3,23±3,44) ve TPMK grupları (ort.3,09±2,44) arasında anlamlı bir fark bulunmazken TPK-LNM grubu ile diğer tüm gruplar arasında boyanma yüzdesi ve yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (P<0.05). Yine AN grubu ile TPK ve TPMK grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (P<0.05).

TPK ve TPMK gruplarında, AN grubuna göre anlamlı derecede yüksek boyanma olması, literatürdeki bilgilere paralel olup p16'nın malign transformasyonda rolü olduğunu düşündürmektedir (90, 147,148).

p16 ekspresyonu, diferansiye tiroid karsinomlarında, ekstrasitroidal tümör yayılımı ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (89) Çalışmamızda, TPK-LNM grubunun, primer tümör gruplarından anlamlı derecede yüksek p16 pozitifliği göstermesi, tümörün progresyonu açısından önemli bulunmuştur.

TPK ve TPK-LNM lezyonlarının büyük çoğunluğunda gözlenen p21 boyanması, oldukça belirgin nitelikteydi. Boyanma yoğunluğu tüm gruplarda genellikle orta ya da zayıf yoğunlukta idi. AN grubunda ise çok daha az ve yoğunluğu düşük bir boyanma özelliği gözlemlendi. TPK ve TPMK gruplarındaki p21 boyanması, yoğunluğu farklı olmakla birlikte yüzde değer olarak benzer nitelikteydi. Tüm gruplar birlikte ele alındığında p21 boyanma yüzdesi ve yoğunluğu önemli derecede anlamlı bulundu (p=0.000). AN grubu (ort. 9,75±10,81), malign lezyonları içeren diğer 3 gruba karşılaştırıldığında önemli derecede anlamlı bir fark dikkati çekti (p=0.000). TPK (ort. 48,08±26,19) ve TPMK (ort. 47,95±32,75) grupları ile TPK-LNM (ort. 65,41±29,34) grubu arasında da yüzde ve yoğunluk farkı vardı (P<0.05).

p21'in malign lezyonlarda benign olanlara göre anlamlı derecede yüksek oranda ve güçlü boyanması, tanı zorluğu yaratan bir lezyonda bu nitelikte bir boyanma görüldüğünde, bu lezyonun malign yönde yorumlanmasına yardımcı olabilir.

p16 ile p21 boyanma yüzdeleri arasında orta derecede ($r=0,30$), p21 ile siklin D1 boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede ($r=0.64$) pozitif korelasyon bulundu.

Daha önce yapılan araştırmalarda p21'in TPK-LNM'da yüksek oranda pozitiflik gösterdiği sonucu elde edilmiştir (92-100). Çalışmamızda da TPK-LNM grubunda benzer nitelikte p21 yüksekliği saptanmış ve p21'in progresyon ve kötü prognoza etkisi olacağı yorumuna varılmıştır.

Genel olarak tüm gruplarda p27 boyanma oranı ve yoğunluğu düşüktü. Olguların çoğunda hiçbir boyanma görülmedi. TPK-LNM grubunda boyanan örnek yoktu. Tüm gruplar birarada değerlendirildiğinde hem p27 boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($P<0.05$). En çarpıcı fark, TPK-LNM (ort. $0,00\pm0,00$) ile TPK (ort. $1,47\pm1,61$) grupları arasında yine yüzde ve yoğunluğu içerecek şekilde bulundu ($P<0.05$).

p27 bulgularımız, p27 ekspresyon kaybının tiroid kanserlerinde tümör agresifliğini, kötü diferansiyasyonu ve metastaz kapasitesini gösterdiği görüşlerini desteklemektedir (81,102).

Tüm grupların siklin D1 boyanması birarada değerlendirildiğinde hem boyanma yüzdesi, hem de boyanma yoğunluğu açısından dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($P<0.05$). Ayrıca, TPK (ort. $34,08\pm27,35$) grubu ile diğer gruplar arasında yoğunluk açısından fark olmamakla birlikte boyanma yüzdeleri açısından anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). AN (ort. $16,65\pm17,03$) grubu ile diğer gruplar arasında ise hem yüzde, hem yoğunluk farkı dikkati çekti ($P<0.05$). TPMK (ort. $53,86\pm27,59$) ile TPK-LNM (ort. $72,50\pm16,58$) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($P<0.05$). En yüksek boyanma yüzdesi TPK-LNM grubundayken en düşük olan AN idi.

Khoo ve ark.ları SiklinD1 ekspresyonunun papiller mikrokarsinomda metastatik potansiyeli gösterebileceğini bulmuşlardır (80, 125). Wang ve ark., siklinD1 over ekspresyonunun agresif tümörlerde daha fazla olduğunu bu yüzden tümör progresyonunda ve prognostik anlamda önemli olabileceğini söylemişlerdir (127). Londero ve ark., nükleer siklinD1 boyanması oranını

metastazlı ve ya metastazı olmayan hastalarda anlamlı derecede farklı bulmuşlardır. (124) Pesutic-Pisac ve ark. da benzer şekilde siklinD1 aşırı ekspresyonu ve p27 azalmış ekspresyonunun TPK'ların metastatik potansiyelini gösterdiğini bulmuşlardır (93).

Çalışmamızın siklin D1 sonuçları, literatürde öne sürülen görüşlerle paralellik göstermektedir.

TPK-LNM olgu grubunun boyanma özellikleri bir bütün olarak ele alındığında; bulgularımız, p53, bcl-2, p16, p21'in TPK-LNM'da pozitif olduğu, siklin D1 pozitifliğinin ve p27 negatifliğinin LNM'na yatkınlık oluşturduğu yönündeki görüşleri desteklemektedir.

DMA çok sayıda dokunun tek bir preparatta görülmesini sağlayan son zamanlarda kullanımı yaygınlaşan bir yöntemdir. Bu yöntem çok sayıda doku örneğinde, immunohistokimya, H&E, histokimya, in situ hibridizasyon, floresan in situ hibridizasyon (FISH), in situ PCR, RNA veya DNA ekspresyon analizi, TUNEL incelemesine olanak sağlar. Bu sonuçları değerlendiren tarama programıyla da İHK profili ve değerlendirme standardize edilebilir. DMA yönteminin avantajları olduğu gibi dezavantajları da vardır(130-138).

Bu çalışma sırasında, aynı bloğa gömülen çok sayıda dokuyu, daha az malzeme harcayarak, daha ucuz maliyetle, daha kısa zamanda ve eşit koşullarda boyama ve değerlendirme şansı elde edildi. İHK boyanmalarının değerlendirilmesi, dijital görüntüler üzerinden bilgisayar programı yardımıyla yapıldığı için zamandan tasarruf sağlandı ve daha objektif, standart sonuçlar elde edildi. Ancak, TPMK ve LNM dokularında tümörlü alanın çok küçük olması, örnekleme zorluğu yarattı. Özellikle TPMK lezyonlarında kesitte dokunun dökülme oranı yüksekti. Bu, TPMK örneklerindeki desmoplastik stromaya bağlı olarak dokuların daha sert olması ile ilgili olabilir. Sonuç olarak, DMA yönteminden en yüksek verimi alabilmek için teknik işlemlerin özenle ve baştan sona dikkatle yürütülmesi gerekmektedir.

Sonuçta bu çalışmada TPK karsinogenezinde bcl-2 ailesi başta olmak üzere hücre siklus düzenleyicilerinin önemli rol oynadığı yorumuna varılmıştır. Siklin-CDK kompleksi üzerinden görev yapan siklin bağımlı kinaz

inhibitörü belirteçlerin, daha çok malignite potansiyeli, progresyon ve kötü prognozla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bir transkripsiyon faktörü olan p53 ise hem apoptozu, hem de hücre siklusunu kontrol eden proteinlerle etkileşerek TPK patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada 34 TPK, 22 TPMK, 12 TPK-LNM yanı sıra 20 AN olgusu p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 İHK boyanması açısından DMA yöntemiyle incelendi.
- AN'lerin bcl-2 boyanmasının diğer malign gruplara göre anlamlı derecede farklı olması, bcl-2'nin etkin olduğu apoptoz yolağında benign ve malign lezyonlar arasında fark olduğu şeklinde yorumlanabilir. TPMK grubunda AN'e göre azalmış boyanma oranı, organizmanın, tümörün ilk aşamasında bcl-2'yi azaltıp apoptozu indüklemek suretiyle tümör hücrelerini ortadan kaldırma çabasına bağlanabilir. TPK'ların tüm gruplardan daha yüksek oranda bcl-2 ekspresyonu etmesi ise bu aşamadaki bir tümörün hücrelerinde uzamış yaşam süresini ve bcl-2'nin karsinogenezdeki rolünü ortaya koymaktadır.
- Çalışmamızda yer alan bcl-2 gen ailesi üyelerine topluca bakıldığında, bcl-2 gen ailesinden bcl-2, bax ve bcl-xL'nin TPK'larda yaygın pozitiflik gösterdiği, bunlarla ilgili bulguların literatürle büyük ölçüde uyumlu olduğu ve bcl-2 öncelikli olmak üzere bu gen ailesinin tümünün TPK patogeneziinde payı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Malign olgu gruplarında p53'ün yüksek boyanma oranları, p53'ün malignite göstergesi olduğu ve tümör patogeneziinde rolü olduğu akla gelmektedir. p53 ile bax boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede pozitif korelasyon bulunmuştur.
- p16 boyanmasının TPK ve TPMK gruplarında, AN grubuna göre anlamlı derecede yüksek boyanma olması, p16'nın malign transformasyonda rolü olduğunu düşündürmektedir. TPK-LNM grubunun, primer tümör gruplarından anlamlı derecede yüksek p16

pozitifliği göstermesi, tümörün progresyonu açısından önemli bulunmuştur.

- p21'in malign lezyonlarda benign olanlara göre anlamlı derecede yüksek oranda ve güçlü boyanması, tanı zorluğu yaratan bir lezyonda bu nitelikte bir boyanma görüldüğünde, bu lezyonun malign yönde yorumlanmasına yardımcı olabilir.
- p16 ile p21 boyanma yüzdeleri arasında orta derecede ($r=0,30$), p21 ile siklin D1 boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede ($r=0.64$) pozitif korelasyon bulunmuştur.
- p27 bulgularımız, p27 ekspresyon kaybının tiroid kanserlerinde tümör agresifliğini, kötü diferansiyasyonu ve metastaz kapasitesini gösterdiği görüşlerini desteklemektedir.
- Siklin D1 ile en yüksek boyanma yüzdesi TPK-LNM grubunda olup, diğer gruplarla arasında anlamlı fark saptanmıştır. Çalışmamızın siklin D1 sonuçları, siklin D1 overekspresyonunun metastatik potansiyel ve tümör progresyonu ile ilişkili olduğuna yönelik görüşleri desteklemiştir.
- TPK-LNM olgu grubunun boyanma özellikleri bir bütün olarak ele alındığında; bulgularımız, p53, bcl-2, p16, p21'in TPK-LNM'da pozitif olduğu, siklin D1 pozitifliğinin ve p27 negatifliğinin LNM'na yatkınlık oluşturduğu yönündeki görüşleri desteklemektedir.
- DMA yöntemiyle, aynı bloğa gömülen çok sayıda dokuyu, daha az malzeme harcayarak, daha ucuz maliyetle, daha kısa zamanda ve eşit koşullarda boyama ve değerlendirme şansı elde edildi. TPMK ve LNM dokularında tümörlü alanın çok küçük olması, örnekleme zorluğu yarattı. Özellikle TPMK lezyonlarında kesitte dokunun dökülme oranı yüksekti. Sonuç olarak, DMA yönteminden en yüksek verimi alabilmek için teknik işlemlerin özenle ve baştan sona dikkatle yürütülmesi gerekmektedir.
- Sonuçta bu çalışmada TPK karsinogenezinde bcl-2 ailesi başta olmak üzere hücre siklus düzenleyicilerinin önemli rol oynadığı yorumuna varılmıştır. Siklin-CDK kompleksi üzerinden görev yapan siklin bağımlı kinaz inhibitörü belirteçlerin, daha çok malignite potansiyeli,

progresyon ve kötü prognozla ilişkili olduğu düşünölmüştür. Bir transkripsiyon faktörü olan p53 ise hem apoptozu, hem de hücre siklusunu kontrol eden proteinlerle etkileşerek TPK patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır.

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada apoptoz ve hücre siklusuna ilişkin gen ürünlerinin TPK patogenezindeki rolünü belirlemek ve DMA yöntemini kullanıma sokmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Otuz dört TPK, 22 TPMK, 12 TPK-LNM ve 20 AN olgusu p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve siklin D1 İHK boyanması açısından DMA yöntemiyle incelendi.

- **BULGULAR:** AN'lerin bcl-2 boyanması diğer malign gruplara göre anlamlı derecede farklıyken TPK'larda tüm gruplardan daha yüksek bcl-2 ekspresyonu görülmüştür. p53, malign olgu gruplarında benignlere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. p53 ile bax boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede pozitif korelasyon görüldü. p16, TPK ve TPMK gruplarında, AN grubuna göre anlamlı derecede yüksek boyanırken TPK-LNM grubu, primer tümör gruplarından anlamlı derecede yüksek p16 pozitifliği göstermekteydi. p21, malign lezyonlarda benign olanlara göre anlamlı derecede yüksek oranda ve güçlü boyanmıştı. p16 ile p21 boyanma yüzdeleri arasında orta derecede ($r=0,30$), p21 ile siklin D1 boyanma yüzdeleri arasında iyi derecede ($r=0.64$) pozitif korelasyon bulundu. TPK-LNM grubunda p27 ile boyanan olgu yoktu. Siklin D1 ile en yüksek boyanma yüzdesi TPK-LNM grubunda olup, diğer gruplarla arasında anlamlı fark saptandı.
- **TARTIŞMA VE SONUÇLAR:** Bu çalışmada, TPK karsinogenezinde bcl-2 ailesi başta olmak üzere hücre siklus düzenleyicilerinin önemli rol oynadığı yorumuna varılmıştır. Siklin-CDK kompleksi üzerinden görev yapan siklin bağımlı kinaz inhibitörü belirteçlerin, daha çok malignite potansiyeli, progresyon ve kötü prognozla ilişkili olduğu sonucuna

varılmıştır. Bir transkripsiyon faktörü olan p53 ise hem apoptozu, hem de hücre siklusunu kontrol eden proteinlerle etkileşerek TPK patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. DMA yönteminden en yüksek verimi alabilmek için teknik işlemlerin özenle ve baştan sona dikkatle yürütülmesi gerekmektedir.

SUMMARY

DETERMINATION OF MARKERS ASSOCIATED APOPTOSIS AND CELL CYCLE (P16, P21, P27, P53, BCL-2, BAX, BCL-XL VE SİKLİN D1) IN THYROID PAPİLLARY CARCINOMA, PAPİLLARY MICROCARCINOMA AND LYMPH NODE METASTASIS OF THYROID PAPİLLARY CARCINOMA WITH TISSUE MICROARRAY ASSAY

Aim: In this study; the role of genetic products associated apoptosis and cell cycle in the pathogenesis of thyroid papillary carcinoma (TPC) was studied. Also the second aim is to put to use tissue microarray (TMA) method.

Materials and methods: Thirty-four cases of TPC, 22 cases of thyroid papillary microcarcinoma (TPMC), 12 cases of lymph node metastasis of thyroid papillary carcinoma (TPC-LNM) and 20 cases of adenomatous nodul (AN) were evaluated for p16, p21, p27, p53, bcl-2, bax, bcl-xL ve cyclin D1 immunostaining with TMA method.

Results:The bcl-2 stainings of AN were significantly different from malignant groups and expression of bcl2 in TPC group were the highest comparing to all groups.p53 results were higher in the malignant groups comparing to benign ones. There was a highly positive correlation between p53 and bax staining ratios. According to results of the p16 stainings; TPC and TPMC groups values were significantly higher comparing AN group and TPC-LNM group showed significantly higher values comparing the primary tumour groups. p21 stainings were higher degree and strong in malignant groups than benign lesions. There was moderate correlation of staining values between p 16 and p21 ($r=0,30$). On the other hand there was highly positive correlation between p21 and cyclin D1 stainings ($r=0.64$).There was no sample that staining positive with p27 in the

TPC-LNM group. The highest cyclin D1 staining was the highest in TPC-LNM group and statistically different from the other groups.

Conclusions: According to this study results; we conclude that; all cell cycle regulators, especially bcl 2 family, have important effects on TPC carcinogenesis. The cyclin dependent kinase inhibitors were relevant mostly in malignant potential, worst prognosis and progression of the tumour. On the other hand; p53 that is a transcription factor, mainly interacts with cell cycle coordinating proteins and plays an important role in TPC pathogenesis. The utility and reliability of TMA method is depend on carefully technical handling of tissues.

KAYNAKLAR

1. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, et al. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. Lyon, IARC Pres, 2004:50-66
2. Thompson LDR, Malignant neoplasms of the thyroid gland. In: Thompson LDR, ed. Endocrine Pathology. Foundations in Diagnostic Pathology. Vol 5. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier, 2006:77-144.
3. Rosai J. Thyroid Gland. In: Rosai J, editor. Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Mosby, Inc., 2004:317-1335.
4. Kumar V., Abbas A. K., Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia, Pennsylvania Elsevier Saunders 2005:1178-1180.
5. Christopher D.M. Fletcher. Diagnostic Histopathology of Tumors. 3rd ed. Churchill Livingstone Elsevier 2010:997-1015.
6. Mills SE. Steinberg's Diagnostic Surgical Pathology. 5th ed. Steinberg. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health, Lipincott Williams & Wilkins 2010:493-507
7. GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer . Section of Cancer Information (17/4/2011).
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=792>
8. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı (TC). Kanser bildirimlerinin değerlendirilmesi 1993-1994. Ankara 1997.
9. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı (Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü) (TC). Ketem Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi (KETEM), 2005 yılı Türkiye Kanser İstatistikleri.
<http://ketem.org/istatistik.php>

10. İzmir Kanser İzlem ve Denetim Merkezi, 2006.
<http://www.ism.gov.tr/kidem/Tdoc3.htm>
11. Tuttle RM, Lukes Y, Onstad Lynn, et al. Ret/PTC activation is not associated with individual radiation dose estimates in a pilot study of neoplastic thyroid nodules arising in Russian children and adults exposed to Chernobyl fallout. *Thyroid*. 2008;18:839-846.
12. Nikiforov Y, Gnepp DR, Fajin JA. Thyroid lesions in children and adolescents after the Chernobyl disaster: implications for the study of radiation tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:9-14.
13. Tuttle RM, Becker DV. The Chernobyl accident and its consequences: update at the millennium. *Semin Nucl Med* 2000;30:133-40.
14. Williams D. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer* 2002;2:543-549.
15. Reiners C, Demidchik YE, Drozd VM, et al. Thyroid cancer in infants and adolescents after Chernobyl. *Minerva Endocrinol* 2008;33:381-95.
16. Hatch M, Brenner A, Bogdanova T, et al. A screening study of thyroid cancer and other thyroid diseases among individuals exposed in utero to Iodine-131 from Chernobyl fallout. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:899-906.
17. Hayashi Y, Lagarde F, Tsuda N, et al. Papillary microcarcinoma of the thyroid among atomic bomb survivors. *Cancer* 2010;116:646-55.
18. Takahashi MH, Thomas GA, Williams ED. Evidence for mutual interdependence of epithelium and stromal lymphoid cells in a subset of papillary carcinomas. *Br J Cancer* 1995;72:813-817.
19. Tamimi DM. The association between chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 2002;10:141-146
20. Kossev P, Livolsi V. Lymphoid lesions of the thyroid: review in light of the revised European-American lymphoma classification and upcoming World Health Organization classification. *Thyroid* 1999;9:1273-1280.
21. Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, et al. Prevalence of RET/PTC 5 arrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2002;10:15-22.

22. Hunt JL, Baloch Z, Barnes EL, et al. Loss of heterozygosity mutations of tumor suppressor genes in cytologically atypical areas in chronic lymphocytic thyroiditis. *Endocr Pathol* 2002;13:321-330
23. Lee ML, Chen GG, Vlantis AC, et al. Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with altered expression of bcl-xL. *Cancer J* 2005;11:113-121.
24. Preston-Martin S, Jin F, Duda MJ, et al. A case control study of thyroid cancer in women under age 55 in Shanghai (People's republic of China). *Cancer Causes Control* 1993;4:431-440.
25. Cetta F, Toti P, Petracci M, et al. Thyroid carcinoma associated with familial adenomatous polyposis. *Histopathol* 1997;31:231-236.
26. Haibach H, Burman T, Carlson H. Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease) associated with renal cell carcinoma and primary neuroendocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). *Am J Clin Pathol* 1992;97:705-712
27. Cetta F, Olschwang S, Petracci M, et al. Genetic alterations in thyroid carcinoma associated with familial adenomatous polyposis: clinical implications and suggestions for early detection. *World J Surg* 1998;22:1231-1236
28. Harach HR, Soubeyran I, Brown A, et al. Thyroid pathologic findings in patients with Cowden disease. *Ann Diagn Pathol* 1999;3:331-340
29. Basolo F, Giannini R, Monaco C, et al. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:247-254.
30. Gordano TJ, Kuick R, Thomas DG, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS and RET/PTC mutation specific gene expression profile discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:6646-6656
31. Sheils O, Smyth P, Finn S, et al. RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis. *Int J Surg Pathol* 2002;10:167-168

32. Kjelman P, Learoyd DL, Messina M, et al. Expression of the RET proto-onkogene in papillary thyroid carcinoma and its correlation with clinical outcome. *BR J Surg* 2001;88:557-563
33. Robboy SJ, Shaco-Levy R, Peng RY, et al. Malignant struma ovarii: an analysis of 88 cases, including 27 with ekstraovarian spread. *Int J Gynecol Pathol.* 2009;28:405-22.
34. Kandogan T, Erkan N, Vardar E. Papillary carcinoma arising in subhyoid ectopic thyroid gland. *Thyroid.* 2008;18:477-8.
35. Talib R K, Wilkins B S, Thaker J M. Cystic metastasis of papillary carcinoma of the thyroid –an unusual presentation. *Histopathol* 2002;20:176-178
36. Kiyono T, Katagiri M, Harada T. The incidence of ground glass nuclei in thyroid diseases. *Thyroidol* 1994;6:43-48
37. Chan J K, Saw D. The grooved nucleus. A useful diagnostic criterion of papillary carcinoma of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 1986;10:672-679
38. Scopa C D, Melachrinou M, Saradopoulou C et al. The significance of the grooved nucleus in thyroid lesions. *Mod Pathol* 1993;6:691-694
39. Isarangkul W. Dense fibrosis. Another diagnostic criteriterion for papillary thyroid carcinom. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:645-646
40. Mancini A, Rabitti C, Conte G, et al. Lymphocytic infiltration in thyroid neoplasms. Preliminary prognostic assessments. *Minerva Chir* 1993;48:1283-1288.
41. Falvo L, Catania A, D'Andrea V, et al. Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary carcinoma. *Ann Surg* 2005;241:640-646
42. Sherman SI, Angelos P, Ball DW, et al. Thyroid carcinoma. *J Natl Comp canc Netw* 2007;5:568-621
43. Mai KT, Ford JC, Yazdi HM, Perkins DG, et al. Immunohistochemical study of papillary thyroid carcinoma and possible papillary thyroid carcinoma related benign thyroid nodules. *Pathol Res Pract* 2000;196:533-540.

44. Mentinen M, Karkkainen P. Differential reactivity of HBME₁ and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours. Preferential reactivity with malignant tumours. *Virchows Arch* 1996;429:213-219
45. Willgeroth C, Floegel R, Rosler B. The importance of S100 protein positive Langerhans cell and Leu-M1 positive tumour cell for prognosis of papillary thyroid cancer. *Zentralbl Chir* 1992;117:603-606
46. Braga M, Graf H, Ogata A, et al. Aggressive behaviour of papillary microcarcinoma in a patient with Graves' disease initially presenting as a cystic neck mass. *J Endocrinol Invest* 2002;25:250-253.
47. Lupoli G, Vitale G, Caraglia M, et al. Familial papillary thyroid microcarcinoma: a new clinical entity. *Lancet* 1999;353:637-639
48. Liu J, Singh B, Talini g, et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer* 2006;107:1255-1264
49. Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, et al. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 1994;73:424-431
50. Lugli A, Terraciano IM, Oberholzer M et al. Macrofollicular variant of papillary carcinoma of the thyroid: A histologic, cytologic, and immunohistochemical study of 3 cases and review of the literature. *Arch pathol Lab med* 2004;28:54-58
51. Fadda G, Fiorino MC, Mule A et al. Macrofollicular encapsulated variant of papillary thyroid carcinoma as a potential pitfall in histologic and cytologic diagnosis. A report of three cases. *Acta Cytol* 2002;46:555-559
52. Anwar F. The phenotype of Hurtle and Warthin-like papillary thyroid carcinomas is distinct from classic papillary carcinoma as to the expression of retinoblastoma protein and E2F-1 transcription factor. *Appl immunohistochem Mol Morphol* 2003;11:20-27.
53. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, et al. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997;57:1690-1694.

54. Virginia A, LiVolsi. Papillary carcinoma tall cell variant (TCV): A review. *Endocr pathol.* 2010;21:12-15
55. Kleer CG, Giardano TJ, Merino MJ. Squamous cell carcinoma of the thyroid: an aggressive tumor associated with tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Mod pathol* 2000;13:742-746
56. Van den Brekel MW, Heckenberg RJ, Asa SL, et al. Prognostic features in tall cell papillary carcinoma and insular thyroid carcinoma. *Laryngoscope* 1997;107:254-259
57. Ghossein RA, Leboeuf R, Patel KN, et al. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma without extrathyroid extension: biologic behaviour and clinical implications. *Thyroid* 2007;17:655-661
58. Sobringo-Simoes M, Nesland JM, Johannessen JV. Columnar-cell carcinoma. Another variant of poorly differentiated carcinoma of the thyroid. *Am J Clin Pathol* 1998;89:264-267
59. Carcangiu M L, Zampi G, Pupi A et al. Familial papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the university of Florence, Italy. *Cancer* 2004;55:805-828
60. Nikiforov YE, Gnepp DR. Pathomorphology of thyroid gland associated with radiation exposure: the Chernobyl experience and review of the literature. *Adv Anat Pathol* 1999;6:78-91
61. Hirokawa M, Maekawa M, Kuma S, et al. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma-cytological and immunocytochemical findings of 18 cases. *Diagn Cytopathol.* 2010;38:890-896.
62. Urano M, Abe M, Kuroda M, et al. Warthin-like tumor variant of papillary thyroid carcinoma: case report and literature review. *Pathol Int.* 2001;51:707-12
63. Baloch ZW, LiVolsi VA. Warthin-like papillary carcinoma of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1192-5.
64. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol* 1996;3:534-538

65. Stern Y, Lisnyansky I, Shpitzer T, et al. Comparison of nuclear DNA content in locally invasive and noninvasive papillary carcinoma of the thyroid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:501-503
66. Akslen LA, Livolsi VA. Prognostic significance of histologic grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2008;8:1902-1904
67. Mizukami Y, Nogushi M, Michigishi T, et al. Papillary thyroid carcinoma in Kanazawa, Japan: prognostic significance of histological subtypes. *Histopathol* 1992;20:243-250
68. Kashima K, Yokoyama S, Nogushi S et al. Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 1998;8:197-202
69. Yamashita H, Noguchi S, Murakami N, et al. DNA ploidy and stromal bone formation as prognostic indicators of thyroid papillary carcinoma in aged patients: a retrospective study. *Acta Pathol Jpn* 1993;43:22-27
70. Kessler A, Rappaport Y, Blank A, et al. Cystic appearance of cervical lymph nodes is characteristic of metastatic papillary thyroid carcinoma. *J Clin US* 2003;31:21-25
71. Verge J, Guixa J, Alejo M, et al. Cervical cystic lymph node metastasis as first manifestation of occult papillary thyroid carcinoma: report of seven cases. *Head Neck* 1999;21:370–374.
72. Hwang CF, Wu CM, Su CY, et al. A long-standing cystic lymph node metastasis from occult thyroid carcinoma—report of a case. *J Laryngol Otol* 1992;106:932–934.
73. Ito Y, Jikuzono T, Higashiyama T, et al. Clinical significance of lymph node metastasis of thyroid papillary carcinoma located in one lobe. *World J Surg* 2006;30:1821–1828.
74. Sivanandan R, Soo KC. Pattern of the cervical lymph node metastasis from papillary carcinoma of the thyroid. *Br J Surg* 2001;88:1241-1244
75. Hughes JH, Shaha AR, Shah JP, et al. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of thyroid: a matched-pair analysis. *Head Neck* 1996;18:127-132.

76. Coburn MC, Wanebo HJ. Prognostic factors and management considerations in patients with cervical metastases of thyroid cancer. *Am J Surg* 1992;164:671-676.
77. Attie JN, Setzin M, Klein L. Thyroid carcinoma presenting as an enlarged cervical lymph node. *Am J Surg* 1993;166:428-430
78. Tennval J, Biorkland A, Moller T, et al. Is the EORTC prognostic index of thyroid cancer valid in differentiated thyroid carcinoma? *Cancer* 1986;57: 1405-1414.
79. Mirallie E, Sagan C, Hamy A, et al. Predictive factors for node involvement in papillary thyroid carcinoma. Univariate and multivariate analyses. *Eur J cancer*. 1999;35:420-3.
80. Khoo ML, Beasley NJ, Ezzat S, et al. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *J Clin End Metab*. 2002;87:1814-8.
81. Yasuoka H, Nakamura Y, Zuo H, et al. VEGF-D expression and lymph vessels play an important role for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:1127–113
82. Temiz P, Karakaş C, Akalın T. Dermatofibrom, dermatofibrosarkoma protuberans ve fibrosarkomatöz transformasyon gösteren dermatofibrosarkoma protuberans lezyonlarının patogenezinin açıklanmasında p53, p16, p21, p27 ve Ki-67 proliferasyon indeksinin yeri, Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, TIP 2006-095, 2007,16-18.
83. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, et al. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16INK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavorable prognosis. *Int J Cancer* 1997;74:57–63.
84. Evangelou K, Bramis J, Peros I, et al. Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) “nuclear” cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non–small cell lung carcinomas. *Biotech Histochem* 2004; 79:5–10.

85. Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, et al. Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in highgrade astrocytomas. *J Neurooncol* 2006; 77:273–7.
86. Shoji T, Tanaka F, Takata T, et al. Clinical significance of p16 expression in non–small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:3865–71.
87. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994;8:27–32.
88. Ohnishi H, Kawamura M, Ida K, et al. Homozygous deletions of p16/MTS1 gene are frequent but mutations are infrequent in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;86:1269– 75.
89. Melck A, Masoudi H, Griffith OL, et al. Cell cycle regulators show diagnostic and prognostic utility for differentiated thyroid cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(12):3403-11.
90. Barroeta JE, Baloch ZW, Lal P, et al. Diagnostic value of differential expression of CK19, Galectin-3, HBME-1, ERK, RET, and p16 in benign and malignant follicular-derived lesions of the thyroid: an immunohistochemical tissue microarray analysis. *Endocr Pathol* 2006; 17:225–34.
91. Jarzab B, Wloch J, Wiench M. Molecular changes in thyroid neoplasia. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39::26–7.
92. Shi Y, Zou M, Farid NR, Al-Sedairy ST. Evidence of gene deletion of p21 (WAF1/CIP1), a cyclin-dependent protein kinase inhibitor in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer* 1996;74:1336-4
93. Pešutić-PisacV, Punda A, Glunčić I, et al. Cyclin D1 and p27 Expression as Prognostic Factor in Papillary Carcinoma of the Thyroid: Association with Clinicopathological Parameters *Croat Med J*. 2008;49:643-9.
94. Ay ME, Terzioğlu O, Terzi C, ve ark. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*. 2006;1:20-25.
95. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, et al. Bax expression in benign and malign thyroid tumours: Disregulation of wild-type p53 is associated with a

high bax and p21 ekspresion in thyroid carcinoma Int J Cancer
2001;92:805–811

96. Akslen LA. Prognostic importance of histologic grading in papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 1993;72:2680-5.

97. Akslen LA and Varhaug JE. Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma: presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient survival. *Cancer* 1995;76:643-54.

98. Basolo F, Pinchera A, Fugazzola L, et al. Expression of p21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid cancer. *Eur J Cancer* 1994;30:171-4.

99. Okayasu I, Osakabe T, Onozawa M, et al. p53 and p21(WAF1) expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors. *Clin Immunopathol* 1998;88:183-91.

100. Ferenc T, Lewinski A, Lange D, et al. Analysis of p53 and p21WAF1 Proteins Expression in Follicular Thyroid Tumors. *Pol J Pathol* 2004;55:133–141.

101. Loda M, Cukor B, Tam SW, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997;3:231–234.

102. Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27Kip1 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:1259 –1263.

103. Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in lymphoid tissue. p27Kip1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 1997;151:151–160.

104. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, et al. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 1998;11:169–74.

105. Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, et al. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:735–9.
106. Morita N, Ikeda Y, Takami H. Clinical Significance of P53 Protein Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. *World J Surg* 2008;32:2617–2622
107. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, et al. Over expression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17:375-381
108. Nakamura T, Yana I, Kobayashi T et al. p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:1293–1298.
109. Zafon C, Obiols G, Castellví J, et al. Clinical significance of RET/PTC and p53 protein expression in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Histopathol* 2007;50:225-231
110. Godballe C, Asschenfeldt P, Jorgensen KE et al. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinomas: p53 expression is a significant indicator of prognosis. *Laryngoscope* 98;108:243–249
111. Ho YS, Tseng SC, Chin TY, et al. p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 1996;103:57– 63.
112. Wang K, Yin XM, Chao DT, et al. BID: a novel BH3 domain only death agonist. *Genes Dev* 1996;10:2859-2869
113. Reed J C, Zha H. Heterodimerization-independent Functions of Cell Death Regulatory Proteins Bax and Bcl-2 in Yeast and Mammalian Cells. *J Biol Chem* 1997;272:31482-31488
114. Basolo F, Pollina L, Fontanini G, et al. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression *British Journal of Cancer* 1997;75:537-541
115. Puglisi V, Cesselli D, Damante G, et al. Expression of Pax-8, p53 and bcl-2 in human benign and malignant thyroid diseases. *Anticancer Res* 200;20:311-16

116. Farid P, Gomb SZ, Peter I, et al. Bcl-2, p53 and bax in thyroid tumors and their relation to apoptosis. *Neoplasma* 2001;48:299-301
117. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, et al. Bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression are related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1996;73:139–43.
118. Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, et al. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumours. An immunohistochemical and western blot analysis. *Virchows Arch* 1997;430:125–30.
119. Cvejic D, Selemetjev S, Savin S, et al. Apoptosis and proliferation related molecules (Bcl-2, Bax, p53, PCNA) in papillary microcarcinoma versus papillary carcinoma of the thyroid. *Pathol* 2008;40:475–80
120. Miyashita T, Reed JC. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-9.
121. Branet F, Brousset P, Krajewski S, et al. Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas developed from the follicular cells of the thyroid gland. *J Clin End Metab* 1996;81:2726–30.
122. Martinez-Broca MA, Castilla C, Navarro E, et al. Clinicopathological correlations of bcl-xl and bax eksression in differantiated thyroid carcinoma. *Clin End* 2008;68:190-197
123. Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, et al. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod pathol* 2000;13:882-7.
124. Londero SC, Godballe C, Krogdahl A, et al. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland: Is the immunohistochemical expression of cyclin D1 or galectin-3 in primary tumour an indicator of metastatic disease? *Acta Oncol* 2008;47:451-57
125. Khoo M, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Cyclin D1 Protein Expression Predicts Metastatic Behavior in Thyroid Papillary Microcarcinomas But Is Not Associated with Gene Amplification. *J Clin End Met* 2002; 87:1810-1813
126. Erickson LA, Jin L, Goellner JR, Lohse C, et al. Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *Mod Pathol* 2000;13:186–192

127. Wang S, Wu J, Savas L, et al. The role of cell cycle regulatory protein cyclin D1, cyclin E and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol* 1998;29:1304-9.
128. Lazzeresci D, Sambuco L, Carnovale Scalco C, et al. CyclinD1 and cyclin E expression in malignant thyroid cell and in human thyroid carcinoma. *Int Cancer* 1998;76:806-11.
129. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, et al. A Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002;198:157-162
130. Mengel M, Kreipe H, von Wasielewski R. Rapid and large-scale transition of new tumor biomarkers to clinical biopsy material by innovative tissue microarray systems. *Appl Im Mol Morphol* 2003;11;261–268.
131. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986;55:244–8.
132. Battifora H, Mehta P. The checkerboard tissue block: an improved multitissue control block. *Lab Invest* 1990;63:722–4.
133. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarray for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-847.
134. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10:657-662
135. Vogel UF. Inexpensive and precise paraffin tissue microarrays constructed with a computer numerical control (CNC) drilling machine. *Histopathol* 2007;51:136-7
136. Vogel UF, Buelتمان BD. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. *Am J Clin Pathol* 2006;126:342-8.
137. Lilischkis R, von Wasielewski R, Mengel M. Method for production of material blocks with multiple test samples. US patent 7,029,615. April 2006.
138. Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hem* 2002;30:1365–1372.

139. Singh A, Sau A K. Tissue Microarray: A powerful and rapidly evolving tool for high-throughput analysis of clinical specimens. *IJCRI* 2010;1:1-6.
140. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *BioTech* 2004;36:98-105.
141. Saxena R, Badve S. Tissue microarray_Construction and Quality Assurance. *IHS Stain Meth* 2009;5:43-50
142. Singh DK, Sakhuja P, Gondal R. Making and using inexpensive manually constructed tissue microarray: Experience of a tertiary care hospital in India. *Indian J Pathol Microbiol* 2009;52:304-309.
143. Letsas KP, Franou-Lazaridis M, Skyrilas A, et al. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Int* 2005;55:694-702.
144. Mitselau A, Peschos D, Dallas P, et al. Immunohistochemical analysis of expression of bcl-2 protein in papillary carcinomas and papillary microcarcinomas of the thyroid gland. *Exp Oncol* 2004;26:282-286.
145. Aksoy M, Giles Y, Kapran Y, et al. Expression of bcl-2 in papillary thyroid cancers and its prognostic value. *Acta Chir Belg* 2005;105:644-648.
146. Zedenius J, Larsson C, Wallin G, et al. Alterations of p53 expression of WAF1/p21 in human thyroid tumors. *Thyroid* 1996;6:1-9.
147. Lam AKY, Lo CY, Leunf P, et al. Clinicopathological roles of alterations of tumor suppressor gene p16 in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1772-1779
148. Boltze C, Zack S, Quednow C, et al. Hypermetylation of the CDKN2/p16INK4 promotor in thyroid carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 2003;199:399-404