



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METASTATİK VE NONMETASTATİK
SPORADİK MEDÜLLER TİROİD
KARSİNOMLARINDA YENİ NESİL
DİZİLEME YÖNTEMİYLE MOLEKÜLER
DEĞİŞİMLERİN TESPİTİ**

SERDAR ALTINAY

**TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. MUSTAFA TURAN**

**MOLEKÜLER ONKOLOĞİ ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER ONKOLOĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
HAZİRAN/2023**

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serdar Altınay

07/06/2023

İTHAF

“Doktora tezimi kariyer basamaklarımı göremeyen Annem ve Babam’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Moleküler Onkoloji doktora programının Sağlık Bilimleri Üniversitesi çatısı altında açılmasına öncülük eden başta rektörümüz sayın Prof. Dr. Cevdet Erdöl olmak üzere tüm rektör yardımcılarımıza,

Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsünün müdürü Prof. Dr. Şaban Tekin ve önceki müdürlerimize,

Program anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Mustafa Duman'a,

Gerek doktora programım sırasında ders aldığım gerekse tez ara raporlarım döneminde katkılarını sunan tez izleme komitesinin değerli hocaları Prof Dr. Ülkan Kılıç ve Prof. Dr. Fikret Ezberci'ye,

Ufuk açıcı tez danışmanım ve aynı zamanda doktora derslerimize giren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mustafa Turan'a,

Anabilim dalının ders aldığım tüm hocalarına,

Tezimin dizileme analizlerini ve biyoinformatik yorumlarını yapan Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Kul Köprülü ve Uzman araştırmacı Altan Kara'ya,

Tez projemi destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü' ne (BAP-2020-105),

Ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşime teşekkür ederim...

Prof. Dr. Serdar Altınay

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TİROİD EMBRİYOLOJİSİ.....	3
2.2. TİROİD ANATOMİSİ.....	4
2.2.1. Tiroidin Kanlanması.....	6
2.2.2. Tiroidin Lenfatikleri.....	7
2.2.3. Tiroidin Sınırları.....	8
2.3. TİROİD BEZİ HİSTOLOJİSİ.....	8
2.4. TİROİD BEZİ HORMON SENTEZİ.....	9
2.5. TİROİD BEZİ FONKSİYONLARI.....	10
2.6. TİROİD KANSERLERİ.....	12
2.6.1. Genel Özellikler ve Epidemiyoloji.....	12
2.6.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	12
2.6.3. Tiroid Karsinomlarında Sınıflama.....	13
2.6.4. Tiroid Karsinomlarında Evreleme.....	15
2.6.5. Tiroid Bezinin C Hücre Kökenli Tümörleri.....	16
2.6.6. Tiroid Medüller Karsinomun Genel Özellikleri.....	16
2.6.7. Sporadik ve Kalıtsal MTK'unun Klinik Özellikleri.....	17
2.6.8. Patolojik Özellikler ve Ayırıcı Tanı.....	19
2.6.9. Sitolojik Özellikler ve Ultrayapı.....	20
2.6.10. Mikst Medüller ve Folliküler Hücreli Karsinomlar.....	21
2.6.11. İmmünohistokimyasal Özellikler.....	22
2.6.12. Medüller Tiroid Karsinom Varyantları.....	23
2.6.13. Medüller Karsinomda Ayırıcı Tanı.....	24

2.6.14. Sporadik ve Kalıtsal MTK'da Moleküler Özellikler.....	26
2.6.15. Tedavi ve Prognoz.....	29
2.6.16. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ) ile Hedefe Yönelik Tedavinin Temeli	31
2.7. RET GENİ.....	31
2.7.1. Biyoloji ve Fizyoloji.....	31
2.7.2. RET Geninin İnsan Malignitelerindeki Rolü	33
2.8. Mutasyonlar.....	33
2.8.1. Mutasyon Tipleri	34
2.9. DNA DİZİLEME (SEKANSLAMA)	37
2.9.1. Sanger Dizileme	38
2.9.2. Yeni Nesil Dizileme (NGS).....	40
2.9.3. Tüm Genom Dizileme (Whole-Genome Sequencing/WGS)	41
2.9.4. Tüm Ekzom Dizileme (Whole-Exome Sequencing/WES)	42
2.9.5. Üçüncü Nesil Dizileme (Third Generation Sequencing-TGS).....	43
2.10. BİYOİNFORMATİK.....	44
2.10.1. Verilerin Analiz ve Yorumlanması	44
2.10.2. NGS Kitaplığı (NGS Library)	47
2.11. ISLAK LABORATUVAR ÇALIŞMALARI (WET-LAB).....	49
2.12. KALİTE KONTROL	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
3.1. OLGU SEÇİMİ VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLER	51
3.1.1. Demografik Veriler	51
3.2. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	52
3.2.1. Tümörün Gradelemesi	52
3.2.2. Dezmozoplazinin Değerlendirilmesi.....	52
3.2.3. Amiloid Birikiminin Değerlendirilmesi	53
3.2.4. C Hücre Hiperplazisinin Değerlendirilmesi	53
3.2.5. pTNM'ye Göre Evreleme.....	53
3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM ve DEĞERLENDİRME	53
3.4. MOLEKÜLER YÖNTEM	54
3.4.1. Örneklerden DNA İzolasyonu, DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi.....	54
3.4.2. Tüm Ekzom Dizileme (WES) Kütüphane Hazırlığı.....	55
3.4.4. İlgili Genlerin Bakılması ve Tüm Ekzom Analizinin (Wes) Yapılması	59
3.5. BİYOLOJİK YOLAK ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMİ	59
3.6. YAPAY ZEKA MODELLEMESİ.....	65

3.7. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. DEMOGRAFİK, KLİNİK ve PATOLOJİK BULGULAR	66
4.2. MOLEKÜLER BULGULAR (NGS ANALİZİ)	84
4.2.1. RET Mutasyonu Gösteren Hastaların Analizi.....	98
4.2.2. RET Mutasyonu Negatif Ancak Lenf Nodu Metastazı Olan Hastaların Analizi.....	99
4.2.3. RET Mutasyonu Negatif Ve Lenf Nodu Metastazı Olmayan Hastaların Analizi	100
4.3. BİYOLOJİK YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİ	110
4.4. YAPAY ZEKA MODELLEMESİNİN KATKISI.....	110
5. TARTIŞMA	115
5.1. Moleküler Bulgular	120
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	129
KAYNAKLAR	131
EK	140

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2. 1: Tiroid tümörleri sınıflaması.....	14
Tablo 2. 2: Tiroid karsinomlarında evreleme	15
Tablo 2. 3: Yaygın RET mutasyonlarının medüller tiroid karsinom riskiyle ilişkisi	27
Tablo 2. 4: Sanger ve NGS dizilemede fayda ve zorluklar	41
Tablo 2. 5: Illumina platformlarına ait bazı bilgiler	44
Tablo 3. 1: Biyolojik yollar ve ilişkili genler	60
Tablo 4. 1: Hastaların takip, hastalısız sağkalım ve genel sağkalım süreleri.....	74
Tablo 4. 2: Lenf nodu metastazına göre RET mutasyonu ve diğer parametrelerin ilişkisi.	75
Tablo 4. 3: RET mutasyonu durumuna göre lenf nodu metastazı ve diğer parametrelerin ilişkisi.....	80
Tablo 4. 4: 1 nolu hastada RET genindeki WES analizi	87
Tablo 4. 5: 7 nolu hastada RET genindeki WES analizi	90
Tablo 4. 6: 11 nolu hastada RET genindeki WES analizi	93
Tablo 4. 7: 13 nolu hastada RET genindeki WES dizisi	96
Tablo 4. 8: 9 nolu hastada (ex) 10. Kromozom üzerindeki WES analizi	101
Tablo 4. 9: 3 nolu hastada 10. Kromozom üzerindeki WES analizi.....	103
Tablo 4. 10: 4 nolu hastada 10. Kromozom üzerindeki WES analizi.....	105
Tablo 4. 11: NGS analizinde hasta spesifik varyantlar.....	109
Tablo 4. 12: Biyolojik yollar: KEGG biyolojik yollar zenginleştirme analizindeki ilişkili genler	111
Tablo 4. 13: Yapay zeka (CHASM_THCA) modellemesi ile bulunan genlerdeki WES analizi.....	113
Tablo 4. 14: Sporadik medüller tiroid kanserlerde RET mutasyon oranları.....	114

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1: Tiroid anatomisi	6
Şekil 2. 2: Tiroid hormonlarının sentezlenmesi	10
Şekil 2. 3: Baz değişimleri (transizyon ve transversiyon).....	35
Şekil 2. 4: Mutasyon tipleri	36
Şekil 2. 5: Yapısal varyasyonlar: Beş ana SV tipinin şematik gösterimi.	36
Şekil 2. 6: Sığır insülininin amino asit dizisi.....	37
Şekil 2. 7: NGS evrimi	38
Şekil 2. 8: F. Sanger tarafından dizilenen bakteriyofaj ϕ X174'ün 5.386 bp'lik genomu. ...	39
Şekil 2. 9: Yeni nesil dizileme (NGS) biyoinformatik iş akışına genel bakış.....	45
Şekil 2. 10: Analizler sonrası üretilen dosya çeşitleri	47
Şekil 2. 11: Genomik DNA'da sekanslama hazırlığı	48
Şekil 2. 12: Wet-lab ve dry lab ana işlemlerinin şematizasyonu.....	49
Şekil 2. 13: Yüksek verimli sekans verileri için bir kalite kontrol aracı olan FastQC	50
Şekil 3. 1: Deparafinizasyon akış şeması.....	55
Şekil 3. 2: Pipetle alınan uygun konsantrasyon ürünün flow cell denen plaka üzerine yerleştirilmesi.....	56
Şekil 3. 3: NovaSeq6000 cihazı ile yapılan iyi kalite NGS dizi analizi	57
Şekil 3. 4: Her baz için doğrulanan dizi kalitesi.....	57
Şekil 3. 5: Her dizi için Phred skoru	58
Şekil 3. 6: Her baz için uygun dizi içeriği.....	58
Şekil 3. 7: Yapay zeka modellemesinin çalışmasının prensibi	65
Şekil 4. 1: Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı.....	66
Şekil 4. 2: Tümörlerde kapsül durumunun dağılımı.....	67
Şekil 4. 3: Tubuler paternde tiroid medüller kanser mikroskopisi	67

Şekil 4. 4: Histolojik alt tiplerin dağılımı.....	68
Şekil 4. 5: Tümör içinde sağda amiloid ile uyumlu yoğun amorf materyal (H&E; x100)..	68
Şekil 4. 6: Her bir hastada dezmoplazi ve amiloid varlığının dağılımı	69
Şekil 4. 7: Tümörlerde dezmoplazi ve amiloid varlığının dağılımı	69
Şekil 4. 8: C hücre natürünü doğrulayan Kalsitonin immünohistokimyası (x40).....	70
Şekil 4. 9: Tümörlerde kalsitonin boyanma yoğunluğunun dağılımı	70
Şekil 4. 10: Nodal metastaz gösteren medüller kanser (H&E; x40,x100)	71
Şekil 4. 11: Tiroid medüller kanser metastazını doğrulayan Kalsitonin immünohistokimyası.	71
Şekil 4. 12: Lenf nodu metastazı durumu.....	72
Şekil 4. 13: Nekroz ve mitoz içermeyen medüller kanserde %3 (düşük) Ki67 proliferasyon indeksi.....	73
Şekil 4. 14: WHO 2022 endokrin tümörlere göre medüller kanser gradelemesi	73
Şekil 4. 15: Hasta son durum dağılımı	74
Şekil 4. 16: RET mutasyonu gösteren hastaların yüzdesi	75
Şekil 4. 17: RET mutasyonlarının hastalara göre dağılımı	84
Şekil 4. 18: 1 nolu hastada RET genindeki baz dizisi	86
Şekil 4. 19: 7 nolu hastada RET genindeki baz dizisi	89
Şekil 4. 20: 11 nolu hastada RET genindeki baz dizisi	92
Şekil 4. 21: 13 nolu hastada RET genindeki baz dizisi	95
Şekil 4. 22: RET mutasyonu ve lenf nodu metastazı durumuna göre gen mutasyonları ..	108

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropinhormon
AJCC	: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Komitesi)
ATA	: American Thyroid Association (Amerikan Tiroid Birliği)
CAP	: College of American Pathologists (Amerikan Patologlar Birliği)
CCH	: C Hücre Hiperplazisi
CEA	: Karsino Embriyojenik Antijen
CLA	: Kutanöz Liken Amiloidoz
CNV	: Kopya Sayı Varyasyonu
CV	: Kristal Viole
CR	: Kongo Red
DFS	: Disease Free Survival (Hastaliksız Sağkalım)
DIT	: Diiyodotirozin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FDA	: Amerika Gıda Ve İlaç Dairesi
FMTK	: Ailesel Medüller Tiroid Karsinomu
GNDF	: Glial Hücre Kökenli Nörotrofik Faktör
GFR	: GDNF Ailesi Reseptörü
GLOBOCAN	: Global Cancer Observatory (Küresel Kanser Gözlem)
H&E	: Hematoksilen Ve Eozin
HD	: Hirschsprung Hastalığı
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu
LNМ	: Lenf Nodu Metastazı

LVI	: Lenfovaskülerinvazyon
MAM	: Marmara Araştırma Merkezi
MEN	: Multipl Endokrin Neoplazi
MIM	: Mendel Kalıtmıllı Erkek
MTK	: Medüller Tiroid Karsinom
MIT	: Monoiyodotirozin
NCAM	: Nöral Hücre Adezyon Molekülü
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
OS	: Overall survival (Genel sağkalım)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHEO	: Feokromositoma
PTK	: Papiller Tiroid Karsinom
RTA	: Gerçek Zamanlı Analiz
ROH	: Homozigotluk Dizileri
SEER	: Surveillance, Epidemiology, and End Results (Sürveyans Epidemiyoloji ve Nihai Sonuçlar)
SV	: Yapısal Varyasyon
TCGA	: The Cancer Genome Atlas (Kanser Genom Atlası)
TGS	: Üçüncü nesil dizileme
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNM	: Tümör, Nod, Metastaz
TRH	: Tirotropin Salgılatıcı Hormon
TUBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TSH	: Tiroid stimulan hormon
TTF-1	: Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1
UICC	: Union for International Cancer Control (Uluslararası Kanser Kontrol Birliği)

- VCF** : Değişken Arama Biçimi
- VEGFR** : Vasküler Endotelyal Growth Faktör Reseptörü
- WES** : Tüm Ekzom Dizileme
- WHO** : World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)



METASTATİK ve NONMETASTATİK SPORADİK MEDÜLLER TİROİD KARSİNOMLARINDA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE MOLEKÜLER DEĞİŞİMLERİN TESPİTİ

ÖZET

Amaç: Medüller tiroid karsinomları (MTK'lar) %75 sporadik ve %25 kalıtsal olarak ortaya çıkar. Bu çalışmada üniversite hastanesinde yeni nesil dizileme (NGS) ile metastatik ve metastatik olmayan sporadik MTK'lardaki moleküler değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya dahil edilen 13 hasta, akciğer-tiroid gen paneli ve diğer kanserle ilişkili genler dahil olmak üzere toplam 63 gen için tüm ekzom dizilimi (WES) ile analiz edildi. Sürücü veya yolcu olabilecek mutasyonlar, biyolojik yolak zenginleştirme analizi ve yapay zeka modellemesi ile araştırıldı

Bulgular: RET mutasyon oranı %30,8 (4/13) idi ve tüm RET mutasyonları yanlış anlamlı mutasyonlardı. RET mutasyonu olan hastalarda nodal tutulumda KDR gen mutasyonu varken, nodal tutulumu olmayan hastalarda KDR gen mutasyonu gözlenmedi. RET mutasyonu olmayan hastalarda nodal tutulumda MLH1, GNAS, HRAS gen mutasyonları bulunurken, nodal tutulumu olmayan hastalarda bu gen mutasyonları gözlenmedi. Yapay zeka modellemesi ile HRAS, MAP3K1 ve EIF1AX genlerinde önemli olma potansiyeline sahip mutasyonlar bulundu.

Sonuç: Sonuç olarak, RET mutasyonunun varlığında veya yokluğunda lenf nodu metastazını tahmin edebilecek farklı gen mutasyonları tespit edildi. HRAS, MAP3K1 ve EIF1AX gibi tümör ilerlemesine dahil olabilecek ve prognostik önemi olan mutasyonlar görüldü. KDR mutasyonunun nodal tutulumdaki önemi gösterildi. Bulguların ATA (Amerikan Tiroid Derneği) tarafından hazırlanacak tedavi kılavuzlarına dahil edilebilmesi için daha fazla hasta ile ek çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Medüller Karsinom WES, Metastaz, Mutasyon NGS, Tiroid,

DETECTION OF MOLECULAR CHANGES IN METASTATIC AND NONMETASTATIC SPORADIC MEDULLARY THYROID CARCINOMAS BY NEXT GENERATION SEQUENCING

ABSTRACT

Aim: Medullary thyroid carcinomas (MTCs) occur 75% sporadic and 25% hereditary. In this study, it was aimed to detect molecular changes in metastatic and nonmetastatic sporadic MTCs by next generation sequencing in the university hospital.

Materials and Methods: 13 patients included in the study were analyzed by whole-exome sequencing (WES) for a total of 63 genes, including lung-thyroid gene panel and other cancer-related genes. Mutations that could be drivers or passengers were investigated with biological pathway enrichment analysis and artificial intelligence modeling.

Results: The RET mutation rate was 30.8% (4/13) and all RET mutations were missense mutations. While there was a KDR gene mutation in nodal involvement among patients with RET mutation, no KDR gene mutation was observed in patients without nodal involvement. MLH1, GNAS, HRAS gene mutations in nodal involvement among patients without RET mutation, while these gene mutations were not observed in patients without nodal involvement. With artificial intelligence modeling, mutations with the potential to be important were found on the HRAS, MAP3K1 and EIF1AX genes. In conclusion, we identified different gene mutations that could predict lymph node metastasis in the presence or absence of RET mutation.

Conclusion: As a result, different gene mutations were identified that could predict lymph node metastasis in the presence or absence of RET mutation. Mutations with prognostic significance were seen that may be involved in tumor progression, such as HRAS, MAP3K1 and EIF1AX. The importance of KDR mutation in nodal involvement was demonstrated. Additional studies with more patients are needed to include the findings in the treatment guidelines to be prepared by the ATA (American Thyroid Association).

Key Words: Medullary Carcinoma WES, Metastasis, Mutation NGS, Thyroid

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid kanseri dünya genelinde her iki cinste kanserler arasında 9. sırada yer alırken, kadınlar arasında meme kanserinden sonra 2. sırada yer alır. Kansere bağlı ölümler sıralamasında her iki cinste 24. sırada iken kadınlarda 19.sırada gelmektedir (1). Kadınlarda 100.000'de 10.1 olan küresel insidans oranı, erkeklerdekinden 3 kat daha yüksektir. En yüksek insidans oranları her iki cinsiyet için Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda, Doğu Asya ve Güney Avrupa'da ve ayrıca kadınlar için Mikronezya/Polinezya ve Güney Amerika'da bulunur (2). Küresel Kanser Gözlem (GLOBOCAN) verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 586.202 yeni vaka ve 43.646 ölüm bildirilmiştir (2). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, Sürveyans, Epidemiyoloji ve Nihai Sonuçlar (SEER) Programı verilerine göre 2022 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 43.800 yeni vaka (tüm kanserler içinde %2.3) ve tiroid kanseri nedeniyle 2.230 ölüm (tüm kanserden ölümler arasında %0.4) olacağını öngörmektedir (3). 2020 GLOBOCAN verilerine göre Türkiye'de tiroid kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserler arasında 2. sırada gelmekte olup 13 682 yeni vaka ile ülke genelinde tüm kanserler arasında 5. sırada, 795 ölümlerle ülke genelinde kansere bağlı ölümler sıralamasında 21. sırada yer almaktadır (4).

Tiroid kanserleri follikül epitel hücrelerinden köken alan neoplazmlardır. Çoğu sporadik (%75) olarak ortaya çıkmakla birlikte, kalıtsal (%25) formları da olan medüller tiroid kanseri, tiroidin C hücrelerinden kaynaklanan bir tümördür (5–7). Sporadik form, tiroid nodülü ya da boyun kitlesi şeklinde ortaya çıkarken kalıtsal formlar MEN2A ve MEN2B adını alan sendromların bir parçası şeklinde de görülebilir (5–8). Tümörün davranışı follikül epitel hücrelerinden köken alan diferansiye tiroid kanserlerinden oldukça farklılık göstermektedir (9). Tanı ve tedavi yaklaşımları da benzer şekilde diferansiye tiroid kanserlerine göre pek çok farklılık içerir (10). Kalıtsal neoplazmlar sporadik olandan farklı olarak çoğu kere aile bireylerinden birinde medüller kanser saptanması sonrası yapılan genetik testlerle belirlenir. Bu nedenle Medüller tiroid kanseri tanısı alan her hastaya germline RET mutasyon testi yapılmalıdır. RET mutasyonu tespit edilmesi durumunda hastanın bütün 1. derece akrabalarında da bu inceleme yapılmalıdır (9,11).

Medüller tiroid kanserinde temel tedavi cerrahidir. Sporadik olgularda tiroidektomiye ilaveten santral kompartman ve lateral boyun diseksiyonu önerilmektedir. RET mutasyonu saptanan olgularda medüller kanser henüz mevcut olmasa bile profilaktif cerrahiye ihtiyaç vardır. Profilaktif cerrahi zamanlamasında ise RET mutasyonun tipi önem arz etmektedir. Buna ilişkin 'kodon ilişkili "profilaktik tiroidektomi" kavramı ortaya atılmıştır (11). Kodonların tespitinde önemli bir yeri olan gen analizi 2010 yılından önce real-time PCR ve mikroarray gibi yöntemler ile sınırlı idi (12). Tüm genlerin eş zamanlı analizi hem kompleks bir prosestir hem de geniş kapsamlı teknolojiler gerektirmektedir (13, 14). Günümüzde yeni nesil dizileme (next-generation sequencing, NGS) teknolojileri; DNA, RNA, mikro-RNA gibi hücre içerisindeki moleküller hakkında düşük maliyetle, hızlı ve buna paralel olarak çok büyük miktarda veri elde edilmesini sağlamıştır (12). NGS teknolojisi, tek bir örnekten alınan ve milyonlarca parçaya ayrılmış olan bir DNA molekülünün her bir parçasının aynı anda ve uyum içerisinde paralel olarak işlenmesini temel alan bir metottur (12–14). Beraberinde getirdiği avantajlar ile pek çok alanda yürütülen biyolojik araştırmaların vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Genomun yalnızca %2'lik kısmı protein kodlaması yaptığından genomun tümünü analiz etmek yerine sadece protein kodlayan kısımları yani tüm ekzomu analiz etmek, günümüzde DNA mutasyonlarının taramanın en iyi yolu olarak karşımıza çıkmaktadır (13, 15,16).

MAPK yolağının onkojenik aktivasyonu tüm tiroid kanserlerinin %70'inde gözlenir. Somatik RET mutasyonları ise sporadik medüller kanserlerde %40-60 arasındadır. Günümüzde RET tirozin kinaz reseptör blokeri olan Vandetanib (17), Imatinib, Sorafenib, Sunitinib gibi ilaçlar tedavide kullanılmaktadır (18,19). Ancak ülkemizde sporadik medüller tiroid kanserlerinin hangi mutasyonları, hangi kodonlarda içerdiğine dair kapsamlı bir veri bulunmadığından doğru ilacın seçilmesi de mümkün olmamaktadır. Bu araştırma ile ülkemizde endokrin cerrahi yoğun tersiyer bir merkezde sporadik medüller tiroid karsinomlarının tüm ekzom analizinin yapılması, lenf nodu metastazı gösteren ve göstermeyen hastaların mutasyonlarının belirlenmesi, histopatolojik parametreler ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Gözlenen mutasyonların hangileri olduğu ve hangi kodonda görüldüğü daha iyi anlaşılacak ve bu yolla sınıflandırılma ve hedefli tedavi için yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TİROİD EMBRİYOLOJİSİ

Faringeal aparat, baş ve boyun bölgesinin çok sayıda bölümünün oluşumundan sorumludur. 3. gebelik haftasında, primitif farinksin orta hattında, tuberculum impar ile kopula arasındaki birinci faringeal arkten kaynaklanan daha sonra foramen çekum olarak anılacak bir noktada endodermin hipertrofisi vardır. Bu tiroid primordium daha sonra genişler ve tiroglossal kanal olarak bilinen içi boş bir tüple ilkel farinks tabanına bağlanır. Kanal, tuberculum impar'ın kaudalinde (medyan dil tomurcuğu) ve kopulanın rostralinde (hipobranşiyal eminens) foramen çekum ile iletişim kurar. Tiroid primordium, dilin tabanında yer alan bir tiroid plakoduna doğru ilerler; daha sonra aort kesesinin apikal kutbu yakınında tiroid divertikülünü oluşturur (20,21).

Tiroid divertikülü daha sonra laringeal kıkırdakların ve hyoid kemiğin önünden geçerek son pretrakeal hedefine doğru alçalmaya başlar. Bu seyir sırasında tiroglossal kanal vasıtasıyla primitif farinks tabanı ile bağlantısını sürdürür. Normal koşullar altında, tiroglossal kanal dejenere olur ve divertikül mezenkim içinde askıda kalır. Solid yapı, solid hücresel düzenlemenin bozulmasına neden olan vasküler mezenşim tarafından istila edilir. Daha sonra, hücreler kendilerini bir epitel kordon ağı halinde düzenlerler. Bez, aort kesesi ile yeniden temas kurar ve ardından çatallanır. Bu süreç, tiroid progenitör hücrelerinin hızlı, tiroid uyarıcı hormondan (TSH) bağımsız proliferasyonu ile ilişkilidir (20–22).

Gebeliğin 5. haftasında, ultimobranşiyal cisim (4. faringeal arkten çıkan) tiroid bezi ile birleşir. Bundan önce endodermal bir türev olan ultimobranşiyal cisim nöral krest hücreleri tarafından istila edilir. Bu hücreler, hipokalsemik koşullar altında kalsitonin üreterek kalsiyum homeostazına katılan C hücrelerini oluşturur (22). Zuckerkandl tüberkülü olarak bilinen yapı, iki ilkel yapının birleştiği noktada geriye kalan tek yapıdır. Bu tüberkül çoğu erişkinde bezin arka yüzünde görülebilir. Sinir rekürren laringeal sinirle yakın bir ilişki içinde olduğundan, tiroidektomiler sırasında klinik önemi vardır (23).

7. gebelik haftasında bez büyümeye devam eder ve proksimal trakeada tiroid kıkırdağın her iki tarafında sol ve sağ loblar oluşmaya başlar. Tiroid istmusu ile

birbirlerine bağlanırlar. 10. gebelik haftasında, epitel kordonları daha küçük gruplar halinde kümelenir. Hücreler bir lümen etrafında tek bir tabaka halinde toplanır ve tiroid foliküllerini oluşturur. 11. haftada tiroglobulin üretiminin başlamasıyla sonuçlanan hücrel farklılaşma meydana gelir ve tiroid foliküllerinde kolloid görülebilir. 20. haftada TSH seviyeleri yükselmeye başlar ve bu da tiroid hormonlarının üretilmesine neden olur. Son trimesterde fetüste yetişkin tiroid hormonu seviyeleri gözlenebilir ve hücrel proliferasyon TSH'ye yanıt verir (22,24).

2.2. TİROİD ANATOMİSİ

Enstitümüz sağlık temalı ilk üniversite olan SBÜ'nün çatısı altında 2015 yılında kurulmuştur. Modern bilimsel yöntem ve teknikleri kullanarak, kişisel gelişim ve mesleki yeterliliği önemseyen bir eğitim anlayışı çerçevesinde, ulusal ve uluslararası düzeyde bilime katkı sağlayacak, yaratıcı, donanımlı ve özgüveni yüksek bilim insanları yetiştirmek öncelikli hedeflerimizdir. Enstitümüz, bu hedefleri doğrultusunda Hamidiye Tıp Fakültesi, Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Fakültesi ve Hamidiye Hemşirelik Fakültesi'nin bünyesinde yer alan 54 Ana Bilim Dalı'nda 94 farklı Yüksek Lisans ve Doktora programı ile lisansüstü eğitim vermektedir.

Tiroid bezi, boyunun ön orta hattında yer alan kelebek şeklinde, vasküler, kırmızı-kahverengi bir endokrin bezdir. Normal şartlarda 5. servikal vertebra seviyesinden (C5) 1. torasik vertebraya (T1) kadar uzanır. Ortalama olarak, bez 15 ila 25 g ağırlığındadır ve endokrin bezlerin en büyüğüdür. Organın sağ ve sol loblarını inferomedial olarak birbirine bağlayan merkezde bir istmustan oluşur. 8 ay ile 15 yaş arasında tiroid bezi hem erkeklerde hem de kadınlarda aynı görünür. Bununla birlikte, bez, 15 yaşın üzerindeki kadınlarda, benzer yaştaki erkeklere göre biraz daha ağırdır (25,26).

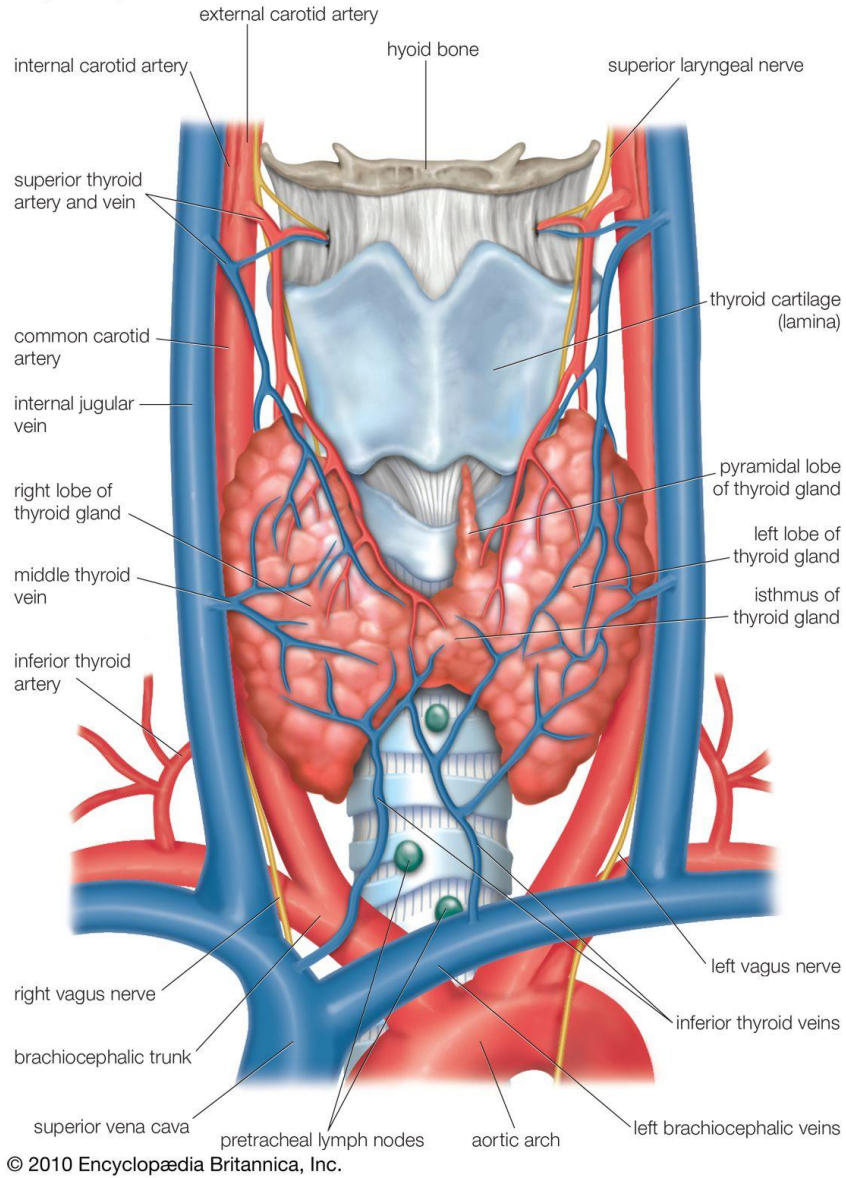
Her bir lob, kabaca koni şeklindedir, tepe süperolaterali, taban inferomedialı (4. ve 5. trakeal halkalar arasında) gösterir. En geniş noktalarında, her lob enine düzlemde yaklaşık 3 cm ve ön-arka boyutta 2 cm'dir. Loblar kabaca 5 cm uzunluğundadır. İstmus, 2. veya 3. trakeal kırkırdakların üzerinde yer alır ve hem enine hem de dikey düzlemde 1.25 cm'dir. Bazı kişilerde, piramidal lob olarak bilinen tiroid bezinin üçüncü bir lobu olabilir. Aynı zamanda istmustan hyoid kemiğe kadar uzanan konik bir yapıdır. Bazı durumlarda, sol veya sağ lobların inferomedial yönünden de kaynaklanabilir; ancak daha çok sol lobdan köken aldığı görülmektedir (25).

Büyük laringeal kıkırdaklar tiroid bezi için bir iskele görevi görür. Bez posteromedialde lateral tiroid bağları ile krikoid kıkırdağa bağlanır. Ek olarak, fibromusküler bir yapı olan levator glandulae tiroideae (tiroid bezinin levatörü) de istmusu veya piramidal lobu hyoid kemiğe tutturur (25)

Medial olarak, bez larinks ve trakea ile ilişkilidir ve Berry'nin asıcı bağı ile ilk iki trakeal halka ile birlikte krikoid kıkırdağa sabitlenir. Krikotiroid kaslar ve farinksin alt konstriktörleri medial kas ilişkileridir. Eksternal laringeal sinir de bu sınır boyunca bezin yanından geçer. Hem rekürren laringeal sinir hem de trakea, tiroid bezinin medial sınırı ile posteroinferior olarak ilişkilidir (25,27).

Karotis kılıfı, bezin posterolateral sınırına yakın bir yerde bulunabilir. Superior ve inferior tiroid arterlerin ön dalı, sırasıyla tiroid bezinin ön ve arka kenarlarıyla ilişkilidir. Tiroid bezinin sol lobuyla posteroinferior ilişkisi olan bir diğer önemli yapı torasik kanaldır. Ek olarak, paratiroid bezleri sıklıkla bezin üst ve alt uzantılarına da gömülüdür. Şekil 2.1'de gösterilmiştir (27).

Thyroid gland



Şekil 2. 1: Tiroid anatomisi (Encyclopedia Britannica) (27)

2.2.1. Tiroidin Kanlanması

Sağlık bilimleri alanında modern bilimsel yöntem ve teknikleri kullanarak, kişisel gelişim ve mesleki yeterliliği önemseyen bir eğitim anlayışı çerçevesinde, etik değerlere sahip nitelikli bilim insanlarının yetiştirilmesine yönelik lisansüstü eğitim vermek SBE'nin temel amacıdır.

Superior tiroid arteri (eksternal karotid arterden çıkan) ve inferior tiroid arteri (subklavyan arterin tiroservikal dalından çıkan) tiroid bezine oksijenli, besin açısından

zengin kan getirir. Tutarsız bir şekilde, aynı zamanda bezi besleyen brakliyosefalik gövdeden doğrudan çıkan arteria tiroidea ima da vardır (25). Büyük damarlar ve dalları arasında çok sayıda intraglandüler ve periglandüler anastomoz noktaları vardır. Superior tiroid arteri bez üzerinde isthmusa doğru ilerleyen bir anterior dala ve lobun arkasından aşağı inen posterior dala ayrılır. İnfierior tiroid arterin çıkan dalı ile anastomoz yaparlar. İnfierior tiroid arter, pretrakeal fasyanın dışında fasyayı delen ve beslenmek için bezin alt kutbuna ulaşan 4-5 dala ayrılır (25,27).

Cerrahın superior tiroid arter ile eksternal laringeal sinir arasındaki çok yakın ilişkinin farkında olması büyük önem taşır. Bu sinir superior kutupta artere çok yakındır. Ek olarak, rekürren laringeal sinir en sık olarak inferior tiroid arterin arka dalı ile ilişkilidir. Her iki sinirin de hasar görmesi ciddi komplikasyonlarla ilişkilidir (25). Superior tiroid arterin bifurkasyonu, damar pretrakeal fasyayı beze girmek için deldikten sonra meydana gelir. Sırasıyla anterior, lateral ve medial yüzeyleri perfüze eden anterior ve posterior dalları oluşturur. Alt tiroid arteri de tiroid bezinin alt kutbuna yaklaştıkça çıkan üst ve alt dallara ayrılır. Posterior ve inferior yüzeyleri beslerler (25,27).

Bu organın venöz kolları birleşerek superior, orta ve inferior tiroid damarlarını oluşturur. Üç damardan ilki, tiroid bezinin üst kutbundan çıkar ve benzer şekilde adlandırılan arter boyunca ilerler. Karotis kılıfına doğru ilerler ve ardından internal juguler vene boşalır. Orta tiroid damarı, bezin yan tarafından çıkar, bezin alt kısmından deoksijenlenmiş kanı getirir ve ayrıca iç juguler vene akar (25,27). Üst ve orta tiroid damarları arasındaki iletişimi sağlayan glandüler bir venöz pleksus vardır. Bu pretrakeal pleksus daha sonra inferior tiroid venini oluşturur. Sol tarafta, inferior tiroid veni sol brakliyosefalik vene akar. Sağda, inferior tiroid veni eğik bir seyir izler, sağ brakliyosefalik arteri geçer ve sağ brakliyosefalik vene katılabilir veya doğrudan süperior vena kavaya akabilir (25).

2.2.2. Tiroidin Lenfatikleri

Tiroid bezinden çıkan lenfatik pleksus da trakeal lenfatik pleksus ile iletişim kurar. Tiroid kistağının üzerinde bulunan Delphian (prelaringeal) lenf düğümlerine boşalırlar. Daha sonra paratrakeal ve pretrakeal lenf bezlerine de drenaj vardır. Tiroid bezinden timus yakınındaki brakliyosefalik lenf düğümlerine lenfatik drenajı destekleyen kanıtlar da vardır (25). Derin servikal lenf düğümleri, bezin yan kısmından lenf alır. Bu sıvı, superior tiroid damarı boyunca ilerleyen lenf kanalları tarafından taşınır. Tiroidden

çıkan ve tüm lenf düğümlerini atlayarak doğrudan torasik kanala akan başka lenf damarları da vardır (25,27).

2.2.3. Tiroidin Sinirleri

Sempatik ganglion zinciri, vertebral kolonun her iki tarafında yer alan, iki taraflı olarak eşleştirilmiş bir dizi otonomik sinir lifi ve bunlarla ilişkili hücre gövdeleridir. Servikal, torasik, lomber ve sakral kısımlara ayrılmıştır. Her iki sempatik ganglion da koksikte koksigeal ganglion olarak son bulur (25).

Servikal sempatik ganglion ayrıca üst, orta ve alt ganglionlara bölünmüştür. Üç gangliyonun en büyüğü C1'den C3'e uzanan üsteki gangliyondur. Orta ganglion en sık C6'da görülür ve alt ganglion C7-T1 bileşkesinde bulunabilir. Her üç ganglion da tiroid bezine ve damar sistemine otonomik innervasyon sağlarken, inferior ganglion da inferior tiroid arterinin çevresinde bir pleksus oluşturur. Bu pleksus aynı zamanda bezin parasempatik innervasyonunu da sağlayan hem dış hem de tekrarlayan laringeal sinirlerle etkileşime girer (25,27).

2.3. TİROİD BEZİ HİSTOLOJİSİ

Sekretlerini doğrudan kan dolaşımına salgılayan diğer endokrin bezlerin aksine, tiroid bezi hormonlarını foliküllerde depolar. Foliküller, tiroidin her bir lobunun parankimini oluşturan çok sayıda lobül oluşturmak için sıklıkla bir araya toplanır. Lobüller ayrıca çevreleyen fibröz kapsülün istilacı kısımları tarafından oluşturulan septalarla ayrılır. Septalar ayrıca nörovasküler ve lenfatik yapıların bezi geçmesi için bir kanal görevi görür. Her folikül, merkezi bir lümeni çevreleyen basit alça kolumnar veya küboidal epitelden oluşur. Bez uyku halindeyken, epitel skuamöz de olabilir (28,29). Tirositlerin (foliküler hücreler) yuvarlak bir çekirdeğe ve işlevine (yani protein sentezi ve salgılanması) uygun nispeten çok sayıda organelle (mitokondri, kaba endoplazmik retikulum, Golgi cisimcikleri, vb.) sahip olduğu belirtilmiştir. Granüler endoplazmik retikulum, hücrelerin tabanına doğru daha fazla bulunurken, Golgi cisimcikleri apekse doğru bulunur (28).

Geçici olarak Golgi aparatında depolanan yeni sentezlenmiş tiroglobulin, vezikül hücre tepe noktasına ulaştığında lümenek ekzositoz edilmek üzere hazırlanır. Bu hücrelerin apikal kutbu birkaç mikrovillus içerir. Tiroglobulin, folikül lümeninde kolloid olarak bilinen yarı katı bir ürün olarak depolanır. Hematoksilen ve eozin (H&E) ile parlak pembe

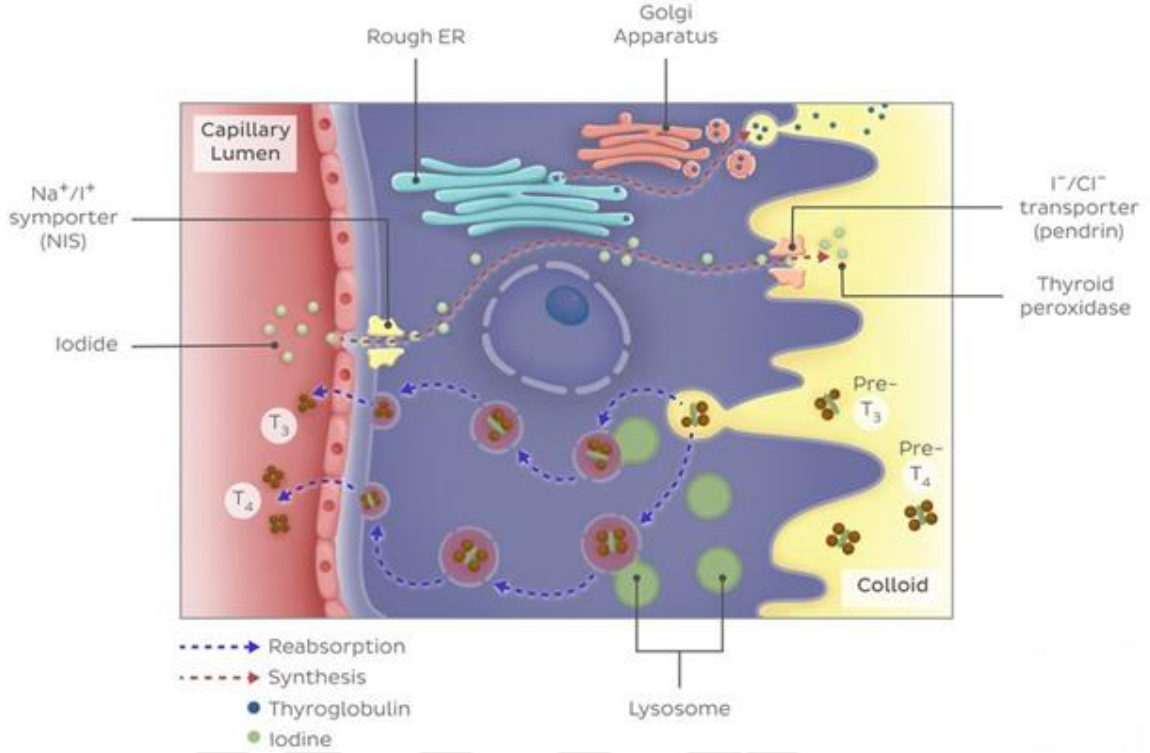
boyandığı için ışık mikroskopunda gözlemlenen temel histolojik özelliklerden biridir. Apikal olarak, tiroisitler, hücreleri bir arada tutan çok sayıda zonula okludensine (sıkı bağlantı noktaları), zonula yapışıklıklarına (sabitlenme bağlantıları) ve makula yapışıklıklarına (spot desmozomlar) sahiptir (28,30).

Timositlerin üzerinde bulunduğu bazal lamina, tiroid bezinde de bulunan parafoliküler (C hücreleri) için bir iskele görevi görür. Bu endokrin hücreler, tiroisitlerden biraz daha büyüktür ve daha soluk görünür (daha az H&E alır). Ayrıca kalsiyum homeostazını korumaya yardımcı olmak için kalsitonin sentezleme ve salgılama işlevlerini destekleyen çok sayıda organelleri vardır (28,29). Esas olarak timositler ve parafoliküler hücreler tarafından işgal edilmesine rağmen, tiroid bezinin stroması ayrıca seyrek retiküler bağ dokusu içerir. Ek olarak, tiroid hormonlarını sistemik olarak dağıtabilmeleri için ana dolaşımlarına taşımak için mevcut olan geniş bir pencereci kılcal damar ağı da vardır (29).

2.4. TİROİD BEZİ HORMON SENTEZİ

Tiroid hormon sentezi hipotalamus tarafından yönetilir. Dolaşımdaki tiroid hormonu seviyeleri düşük olduğunda, hipotalamus tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) salgılar. Bu hormon daha sonra tiroid uyarıcı hormonun (TSH) salınmasını teşvik ettiği ön hipofiz glandına gider. TSH kan dolaşımına girer ve tiroglobülinin transkripsiyonunu ve translasyonunu yukarı regüle ettiği tiroid bezine gider (Şekil 2.2). Tiroglobulin, Golgi gövdesi tarafından ekzositoz edilen veziküllerde paketlenir. Bileşik daha sonra geçici olarak foliküler lümende depolanır (22,29).

İyot, tiroid hormonlarının üretimi için de önemlidir. İyot, diyet yoluyla sağlanır ve bazolateral sodyum-iyodür (Na^+/I^-) simporterleri aracılığıyla hücreler içinde konsantre edilir. Tiroisitler içindeki iyodür daha sonra pendrin pompaları (apikalde bulunan iyodür-klorür (I^-/Cl^-) pompaları) vasıtasıyla foliküler lümene pompalanır. Ayrıca fazla sodyum, Na^+/K^+ ATPaz pompaları tarafından sistemik dolaşıma geri pompalanır (22). Foliküler hücrelerin lümen yüzeyindeki iyodür, mikrovilluslara bağlı peroksidaz tarafından iyodine oksitlenir; bu daha sonra tiroglobulin proteininin tirozin kısmının organizasyonu için kullanılır. Ortaya çıkan monoiyodotirozin (MIT), diiyodotirozine (DIT) daha fazla organize edilebilir. Tiroperoksidaz varlığında, MIT ve DIT veya iki DIT molekülü sırasıyla triiyodotironin (T3) veya tiroksin (T4) oluşturmak üzere reaksiyona girer (21,22).



Şekil 2. 2: Tiroid hormonlarının sentezlenmesi (21)

2.5. TİROİD BEZİ FONKSİYONLARI

Hücresel düzeyde, hormonlar hücre içindeki toplam mitokondri sayısında ve aynı zamanda mitokondrinin toplam yüzey alanında bir artışı teşvik eder. Mitokondri miktarındaki bu artış, organizmada gözlenen artan metabolik hıza da doğrudan karşılık gelmektedir (22). Ayrıca hücresel düzeyde, tiroid hormonları hücre zarları boyunca aktif iyon taşıma hızında bir artışa neden olur. Bu, ilgili iyonların taşınma hızını artıran sodyum-potasyum adenozin trifosfataz (Na⁺-K⁺ ATPaz) enziminin etkinliğinin artırılmasıyla elde edilir. Bu enerjiye bağlı aktivite, organizmanın metabolik hızındaki yukarıda belirtilen artışla da desteklenir (yani, artan ATP üretimi) (21,22).

İlginçtir ki, tiroid bezi anne karnında çalışmaya başlayan ilk endokrin organlardan biridir. Yukarıda belirtilen hücresel değişikliklerin, tiroid hormonunun diğer dokuya özgü işlevleriyle birlikte büyüme ve gelişmeyi desteklediği gösterilmiştir. Gastrointestinal sistemden karbonhidratların artan emilimi, glikoliz ve glukoneogenezin optimizasyonu ve artan insülin aktivitesi ile kanıtlandığı gibi, karbonhidratların emilimini ve metabolizmasını teşvik eder. Ayrıca, yağ depolarından lipitlerin mobilizasyonu ile

trigliserit, kolesterol ve fosfolipid miktarında azalmaya neden olan tiroid hormonu seviyelerindeki artış da gözlenmiştir. Kolesterolün büyük bir kısmı dışkıyla (safra yoluyla) atılır. Bu olaylar ve diğer dokuya özgü aktiviteler, organizmanın bazal metabolizma hızında bir artışa neden olur (21).

Kardiyovasküler sistemde, tiroid hormonlarının kalbin kasılma hızını ve gücünü ve dolayısıyla genel kalp debisini arttırdığı gösterilmiştir. Bu fenomenin, organizmanın artan metabolik hızıyla ilişkili artan oksijen ihtiyacına bağlı olduğu öne sürülmüştür. Artan kan akışı, meydana gelen metabolik reaksiyonlardan üretilen fazla ısıyı dağıtmak için de gereklidir. Artan metabolik süreçler tarafından üretilen fazla karbondioksiti dışarı atma (ve daha fazla oksijen elde etme) ihtiyacı olduğu için organizmanın solunum fonksiyonu da artar (6,21).

Kas-iskelet sistemi içinde tiroid hormonları, kas liflerinin nörotransmitterlere reaksiyonunu teşvik eder. Sonuç olarak, kas lifleri, tiroid hormonlarında kabul edilebilir yükselmelerle daha güçlü yanıt verir. Öte yandan, tiroid hormonlarındaki bir azalma, nörotransmitterlere karşı azalmış bir kas tepkisi ile ilişkilendirilecektir. Bu hormonların merkezi sinir sisteminde de sırasıyla yüksek veya azalmış hormon seviyeleri ile anksiyete veya depresyonu teşvik etmek gibi uyarıcı etkileri vardır (21,22).

Hormonun etkileri aynı zamanda cinsel üremeye kadar uzanır; öyle ki hastalar libido kaybı, iktidarsızlık (erkeklerde) veya adet döngüsü bozuklukları (menoraji, polimenore, oligomenore veya amenore) yaşayabilir. Son olarak, diğer endokrin bezleri de tiroid hormonlarının aktivitesinden etkilenir. Tiroid hormonları, hedef doku düzeyinde diğer hormonlara olan talebi artırarak diğer endokrin bezlerin negatif geri bildirim mekanizmalarını değiştirir. Örneğin, karaciğerde glukokortikoid hormonlarının metabolizmasını artırarak, hormonların dolaşımdaki seviyelerinin düşmesine neden olur. Bu, glukokortikoid üretimini artırarak yanıt veren adrenal bezler tarafından tespit edilir (6,21).

2.6. TİROİD KANSERLERİ

2.6.1. Genel Özellikler ve Epidemiyoloji

Tiroid malignitelerinin %98'inden fazlasını oluşturan tiroid karsinomu, tüm insan kanserlerinin %1'ini oluşturur (31). Küresel düzeyde, tiroid karsinomu insidansında, 100.000'de 0,5-10 vaka arasında değişen, önemli coğrafi farklılıklar vardır (32). ABD ve Avrupa'da insidans, 100.000 nüfusta yaklaşık 3'tür (33). Ayrıca insidans, insanlar bir bölgeden diğerine göç ettiğinde değişebilir, örneğin, Hindistan'da tiroid kanseri insidansı 1.0'dır, ancak yaşayan Hintliler dahil güney Asyalılar arasında ABD'de insidans 100.000'de 2.3'e yükselmiştir (34). Kadınlar erkeklerden üç kat daha sık etkilenir. Tiroid karsinomu tüm yaş gruplarında görülebilmekle birlikte en sık görüldüğü yaşlar dördüncü ve beşinci dekatlardır. Tiroid karsinomlarının çoğu diferansiye tümörler olup yavaş seyirlidirler. Tiroid karsinomunun en agresif formlarından biri olan anaplastik karsinom, özellikle yedinci ve sekizinci dekatlardaki yaşlılarda görülür (31).

Tiroid karsinomu, tiroid hormonu üreten foliküler hücrelerden veya kalsitonin üreten C hücrelerinden kaynaklanabilir ki bunlar medüller karsinom olarak adlandırılır ve sporadik olabilir veya multipl endokrin neoplazinin (MEN) bir parçası olarak ailesel bir ortamda ortaya çıkabilir. ABD'de 5.500'den fazla vakayı içeren geniş, çok merkezli prospektif bir kohort çalışmasında, foliküler hücre kaynaklı tiroid karsinomu arasında en sık papiller karsinom (%81), sonra foliküler karsinom (%10), Hurthle hücreli karsinom (%3,6) ve anaplastik karsinom (%1,7) gelmektedir (31). Papiller, foliküler dahil olmak üzere medüller olmayan tiroid karsinomu, ve anaplastik karsinom da ailesel bir ortamda ortaya çıkabilir (35).

2.6.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Tiroid kanserinin belirlenmiş bir etiyolojik faktörü yoktur, ancak birkaç on yıldır radyasyona maruz kalma suçlanmıştır. Tiroid kanseri insidansında artışa yol açan radyasyona maruz kalma olgusu, II. Dünya Savaşı sırasında Hiroşima ve Nagazaki'de atom bombasına maruz kalmanın ardından belgelenmiştir (36). Daha yakın zamanlarda, Çernobil kazasından sonra radyasyon serpintisine maruz kalan çocuklar arasında tiroid kanserinde keskin bir artışın meydana geldiği gösterilmiştir (37). Çocukluk döneminde düşük doz radyasyona maruz kalmak da (örneğin, tedavi amaçlı radyasyon alan hastalarda

lösemi/lenfoma) tiroid kanseri insidansında artış ile ilişkilidir (38). Radyasyona maruz kaldıktan sonra tiroid kanseri insidansı daha yüksek olmasına rağmen, hastalığın biyolojik davranışı hem radyasyona maruz kalan hem de radyasyona bağlı olmayan tiroid kanserinde benzerdir. Bu nedenle, radyasyon maruziyeti hastalığı tetiklemek için önemli olsa da, malignitenin agresifliğini belirlemede bir rol oynuyor gibi görünmemektedir.

İyot eksikliği olan bölgelerde foliküler karsinom insidansı daha yüksektir ve %45'e kadar çıkabilir (32). Ancak, dünyanın bazı bölgelerinde yeterli iyot takviyesi ile foliküler karsinom insidansı son birkaç on yılda azalmıştır (39). Yakın tarihli bir epidemiyolojik incelemede Maso ve ark. (40) tiroid karsinomu için önemli risk faktörlerinin iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma ve iyot eksikliğini içerdiği sonucuna varmıştır. Ayrıca iyi huylu tiroid nodülleri/adenomu veya guatr öyküsü ile güçlü bir ilişki var gibi görünmektedir. Sebzeler açısından zengin bir diyet, tiroid kanserini önlemeye yardımcı olabilir, ancak diyetle doğrudan bir nedensel ilişki henüz kurulmamıştır; tiroid kanseri için dünya çapında ölüm oranları kadınlar için 0.8/100.000 ve erkekler için 0.4/100.000'dir (40).

2.6.3. Tiroid Karsinomlarında Sınıflama

Tiroid bezi en yaygın endokrin tümörlerdir, bu nedenle, DSÖ Endokrin ve Nöroendokrin Tümörler Sınıflandırmasının yeni 5. baskısı en büyük bölümünü temsil eder. DSÖ sınıflandırma serisinin tüm ciltleri, tümörleri anatomik bölgeye göre düzenler (41). Bu baskıda benimsenen yaklaşım önceki yinelemelerinden biraz farklıdır; Carl Linnaeus'un (42,43) yaklaşımını izleyerek taksonomiye odaklanır. Dört ana taksonomik sıralama kategori, aile (sınıf), tip ve alt tiptir. Sitogenez, bu yeni sınıflandırmanın çerçevesinin temelini oluşturur, histoloji ve moleküler özelliklere sahip tümör tiplerini ve alt tiplerini tanımlar.

Son 15 yılda tiroid patolojisinde moleküler biyolojinin önemi hem bu disiplinde devrim yaratmış hem de klasik histopatolojinin doğal değerini kanıtlamıştır. Bu, patologların belirli moleküler değişiklikleri yansıtan kalıpları uzun süredir tanıdığı bir alandır, ancak patologların tanısına moleküler testlerin eklenmesi, hedefe yönelik tedavilerin etkinliğini öngörme ve tahmin etme yeteneğimizi geliştirmiştir (41,44). Yeni sınıflandırma, tiroid tümörlerini, hücre kökeninin, patolojik özelliklerin (sitopatoloji ve histopatoloji), moleküler sınıflandırmanın ve biyolojik davranışın daha net anlaşılmasını sağlayan birkaç yeni kategoriye ayırmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Endokrin ve

Nöroendokrin Tümörler kitabının 2022 yılında yayımlanan 5. baskısındaki tiroid tümörleri sınıflaması Tablo 2.1’de gösterilmiştir (41).

Tablo 2. 1: Tiroid tümörleri sınıflaması

Gelişimsel Anomaliler
Tiroglossal duktus kisti
Diğer konjenital tiroid anomalileri
Foliküler Hücre Kökenli Tümörler
1.Benign tümörler
Tiroid folliküler nodüler hastalık
Foliküler adenoma
Papiller yapıli folliküler adenoma
Tiroidin onkositik adenomu
2.Düşük riskli tümörler
NIFT-P (Papiller benzeri nükleuslu invaziv olmayan folliküler tiroid tümörü)
Malignite potansiyeli belirsiz tiroid tümörleri
Hyalinize trabeküler tümör
3.Malign tümörler
Foliküler tiroid karsinomu
İnvaziv enkapsüle folliküler varyant papiller karsinom
Papiller karsinom
Onkositik karsinom
Foliküler kökenli karsinom, yüksek grade
- Diferansiye high grade tiroid karsinomu
- Kötü diferansiye tiroid karsinomu
Anaplastik folliküler hücre kökenli tiroid karsinomu
Tiroid C hücre kökenli tiroid karsinomu
Medüller tiroid karsinomu
Mikst medüller ve folliküler hücre kökenli tiroid karsinomu
Tiroidin tükrük bezi tipi karsinomları
Mukoepidermoid karsinom
Tükrük bezi tipi sekretuar karsinom
Histogenezi belirsiz tiroid tümörleri
Skleroze mucoepidermoid karsinom, eozinofilili (SMECE)
Kribriiform morular tiroid karsinom
Tiroid içindeki timik tümörler
Aliesel timoma
Timus benzeri elementler içeren iğsi epitelyal tümör (SETTLE)
Ailesel timik karsinom
Embriyonal tiroid tümörleri
Tiroblastom

2.6.4. Tiroid Karsinomlarında Evreleme

TNM (tümör/nod/metastaz) sistemi ise klinik ve patolojik bir evreleme olup Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC), diferansiye, anaplastik tiroid kanser ve medüller tiroid kanseri için aşağıda belirtildiği gibi farklı TNM sistemi kullanır. Her iki evreleme sistemi Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 2: Tiroid karsinomlarında evreleme

T Evresi	Tanım
T0	Primer tümöre dair kanıt yok
T1	Tümör tiroide sınırlı, en geniş tümör çapı ≤ 2 cm
T1a	Tümör tiroide sınırlı, en geniş tümör çapı ≤ 1 cm
T1b	Tümör tiroide sınırlı, en geniş tümör çapı > 1 cm ama ≤ 2 cm
T2	Tümör tiroide sınırlı, en geniş tümör çapı > 2 cm ama ≤ 4 cm
T3	Tiroidle sınırlı 4 cm'den büyük tümör veya sadece strap kasları tutan gros ekstratiroidal yayılım
T3a	Tiroide sınırlı 4 cm'den büyük tümör
T3b	Herhangi bir boyuttaki bir tümörden yalnızca strap kaslarını (sternohyoid, sternotiroid, thyrohyoid veya omohyoid kasları) tutan gros ekstratiroidal yayılım
T4	Askı kaslarının ötesinde gros ekstratiroidal yayılımı içerir
T4a	Herhangi bir boyuttaki bir tümörden deri altı yumuşak dokuları, larenks, trakea, özofagus veya tekrarlayan laringeal siniri tutan gros ekstratiroidal yayılım
T4a	Herhangi bir büyüklükteki tümörden prevertebral fasyayı tutan veya karotid arteri veya mediastinal damarları kaplayan gros ekstratiroidal yayılım
	Medüller Kanser İçin pT0, pT1, pT2, pT3 evreleri aynıdır.
T4	İlerlemiş hastalık
T4a	Orta derecede ilerlemiş hastalık; Subkutan yumuşak doku, larinks, trakea, özofagus veya rekürren laringeal sinir
T4b	Çok ilerlemiş hastalık; Omurgaya veya yakındaki büyük kan damarlarına doğru uzanan, prevertebral fasyayı istila eden veya karotid arteri veya mediastinal damarları kaplayan gros ekstratiroidal yayılım ile herhangi bir boyuttaki tümör
N Evresi	Tanım
N0	Rejyonel lenf nodu metastazı yok
N1a	Seviye VI veya VII (pretrakeal, paratrakeal ve prelaringeal / Delphian veya üst mediastinal) lenf düğümlerine metastaz. Bu tek taraflı veya iki taraflı bir hastalık olabilir.
N1b	Tek taraflı, iki taraflı veya kontralateral lateral boyun lenf düğümlerine (seviye I, II, III, IV veya V) veya retrofarengeal lenf düğümlerine metastaz
M Evresi	Tanım
	Geçerli değil - pM, gönderilen örnek(ler)den belirlenemez
M1	Uzak metastaz

2.6.5. Tiroid Bezinin C Hücre Kökenli Tümörleri

Medüller tiroid karsinomu (MTK), tüm tiroid malignitelerinin %5-10'unu oluşturur ve vakaların %75'inde sporadik olarak ortaya çıkar, geri kalanı ise çoklu endokrin neoplazi (MEN) 2A, MEN2B veya ailesel MTK (FMTK) ile birlikte gelişir (5, 6, 8). MEN2 sendromları, otozomal dominant kalıtım paternlerine sahip olanlar, RET proto-onkojenindeki (10q 11.2) germ line mutasyonlarının sonucu olarak ortaya çıkar. MEN2A'da profilaktik tiroidektomiler için kılavuzlar, MEN2B ve FMTK mutasyon analizlerinin sonuçlarına dayanmaktadır (6,8). Tümörler, oldukça geniş bir histolojik görünüm yelpazesi sergiler ve her tür tiroid malignitesini taklit edebilir. Vakaların küçük bir kısmı mikst foliküler ve C hücreli neoplazmaları temsil eder.

Çoğalan C hücrelerinin preinvaziv maligniteleri (karsinoma in situ) temsil ettiği görüşünü destekleyen artan sayıda veri olmasına rağmen, C hücre hiperplazisi (CCH), hiperkalsemi, hipergastrinemi, Hashimoto hastalığı olan hastalarda ve foliküler hücre neoplazmalarının (peritümöral CCH) hemen yakınında da görülür (46). Hiperplazi türleri, MEN2 sendromlarındaki C hücre proliferatif değişiklikleriyle karşılaştırıldığında fizyolojik veya sekonder CCH olarak sınıflandırılmıştır (47). C hücrelerinin çoğunlukla sitolojik olarak normal görüldüğü fizyolojik hiperplazinin aksine, MEN2 sendromlarındaki C hücreleri sıklıkla displastiktir. Ancak bu ayrımlar C hücre dağılımı ve morfolojisinde önemli farklılıklar gösterebilen bazı normal bezler dahil olmak üzere bireysel vakalarda her zaman belirgin olmayabilir (48).

2.6.6. Tiroid Medüller Karsinomun Genel Özellikleri

Nöroendokrin tümörler hemen hemen tüm organlarda görülür, ancak dikkate değer medüller karsinom dışında, tiroid bezinde son derece nadirdirler. Medüller tiroid karsinomu (MTK), immünoaktif kalsitonin ve/veya kalsitonin mRNA'nın varlığıyla kendini gösteren C hücre farklılaşması kanıtı olan malign bir tiroid tümörüdür (5,6,10). Daha önceki raporlar bu tümör tipinin varlığını öne sürmüş olsa da, Horn 1951'de hyalinize bağ dokusu arka planında keskin bir şekilde tanımlanmış yuvarlak veya oval, orta büyüklükte kompakt hücre grupları ile karakterize edilen bir dizi birincil tiroid kanseri vakası bildirmiştir (49). Prognozları, farklılaşmamış (anaplastik) tiroid karsinomları ile papiller veya foliküler tiplerin farklılaşmış karsinomları arasında orta düzeydedir. Stromal amiloid birikimlerinin varlığı da dahil olmak üzere bu tümör tipinin ana histopatolojik özellikleri daha sonra Hazard ve serilerindeki birçok vakanın

görünümüne dayanarak medüller tiroid karsinomu (MTK) terimini öneren arkadaşları tarafından tanımlandı (50). E.D. Williams, köpeklerde ve diğer hayvanlarda yapılan karşılaştırmalı çalışmalara dayanarak, MTK'ların tiroid parafoliküler hücrelerinden geliştiğini öne sürdü (51). Sonraki immünofloresan çalışmaları, kalsitoninin parafoliküler hücre kökenini (52) ve bu hormonun tümör ekstraktlarında ve etkilenen hastaların serumundaki varlığını (53,54) doğrulamıştır. Medüller karsinomlar çoğu seride tüm tiroid malignitelerinin %5-10'unu oluşturur (5,6,10). Serum bazal ve pentagastrin ile uyarılan kalsitonin çalışmalarına tabi tutulan nodüler tiroid hastalığı olan hastalarda, MTK prevalansı, başlıca Avrupa'dan bildirilen dokuz seriye dayalı olarak % 0.24-%2.85 (ortalama %0.61) arasında değişmektedir (55). Pacini ve ark. ayrıca nodüler tiroid hastalığı olan 1300'den fazla hastada MTK'nun nispeten yüksek prevalansının altını çizmiştir (56). Çalışmalarında MTK, tesadüfen keşfedilen tüm tiroidlerin karsinomlarının yaklaşık %15'ini temsil ediyordu.

2.6.7. Sporadik ve Kalıtsal MTK'unun Klinik Özellikleri

Medüller tiroid karsinomları (MTK'lar), sporadik olarak veya otozomal dominant özellikler olarak kalıtılan MEN2 sendromları ile birlikte ortaya çıkar (57). Sporadik tümörler vakaların yaklaşık %75'ini temsil ederken, geri kalanı MEN2 ile ilişkili tümörler oluşturmaktadır (58). Etiyolojileri hakkında dünyanın farklı yerlerinde çok az şey bilinmekte, papiller ve foliküler karsinomların aksine, radyasyona maruz kalma ile MTK gelişimi arasında belirgin bir ilişki yoktur (8,58).

Sporadik MTK öncelikle orta yaşlı erişkinlerde görülür ve kadınlarda erkeklere göre biraz daha fazladır. Çoğu hasta, ilişkili servikal lenfadenopati ile birlikte veya tek başına ağrısız bir tümör kitlesi ile başvurur. Kebebew'in serisinde, hastaların yaklaşık %75'inde tiroid kitlesi görülürken, %15'inde disfaji, nefes darlığı veya ses kısıklığı semptomları görülmektedir (59). Servikal lenf nodu metastazları mevcut olabilir ve bazı durumlarda uzak metastazlar da başvuru anında belirgin olabilir. Etkilenen hastalar, kalsitonin, diğer peptitler, aminler veya prostaglandinlerin üretimi ile ilişkili çeşitli belirti ve semptomlar gösterebilir. Örneğin, metastatik hastalığı olan hastalarda şiddetli ishal veya kızarma olabilir ve bu semptomlar dolaşımdaki yüksek kalsitonin seviyeleri ile ilişkili olabilir. Kebebew'in serisinde, hastaların yaklaşık %10'u sistemik semptomlarla başvurmuştur.

MTK'lu hastaların %1'inden daha azında görülen Cushing sendromu, adrenokortikotropinin (ACTH) tümör tarafından üretiminin bir sonucudur. Sendromun ortaya çıkmasından sonra hayatta kalma oranı kötüdür (60). Bu tümörleri olan hastalarda çok yüksek seviyelerde kalsitonin bulunabilmesine rağmen, hipokalsemi neredeyse yoktur. MEN2'nin yıllık yaklaşık 1.25-7.5/107 insidansı ve 1/35.000 tahmini prevalansı vardır. MEN2'li hastaların %90'dan fazlasında MTK gelişir (58).

MEN2A [MIM# (Mendel Kalıtımı Man Number) 1714007] tüm kalıtsal MTK vakalarının %75'inden fazlasını oluşturur. Etkilenen hastalarda ayrıca vakaların yaklaşık %40-60'ında feokromositoma ve hiperparatiroidizm (%10-30) vardır. MEN2A veya FMTK'li bazı akrabalarda, sırtın üst kısmında kaşıntılı plaklar olarak görülen kutanöz liken amiloidozu da olabilir (61). Kaşıntının, tekrarlayan kaşımalardan kaynaklanan amiloidoz ile kutanöz liken amiloidoz gelişiminde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (62). Hirschsprung hastalığı, birkaç ailede MEN2A ile ilişkilendirilmiştir (63). MEN2A'lı hastalar genellikle 25-35 yaşları arasında tiroid tümörleri ile başvururlar. Ancak, 1970'lerde kalsitonin tarama çalışmalarının ve son on yılda RET mutasyonları için moleküler tanı testleri geliştirilmesiyle başvuru yaşı giderek daha genç hale gelmiştir (58,61). Olguların yaklaşık %10'unda feokromositomalar tiroid tümörleri ortaya çıkmadan önce belirginleşir. Bu sendromdaki feokromositomalar genellikle iki taraflı ve çok merkezlidir ve gelişmelerinden önce adrenal medüller hiperplazi fazları gelir (64,65). Malignite sıklığı MEN2A ile ilişkili feokromositomalarda, sendromik olmayan tümörleri olan hastalarda gözlenenden önemli ölçüde farklı değildir. Hiperparatiroidizm, etkilenen hastaların %30'a kadarında görülür ve rezeke edilen paratiroid bezleri tipik olarak hiperplastiktir (57,66).

MEN2B (MIM# 162300), MEN2 sendromlarının fenotipik olarak en belirgin tipidir (58,67). MTK'unun kalıtsal formlarının yaklaşık %5'ini oluşturur ve vakaların önemli bir oranı de novo mutasyonları temsil eder. MEN2B'li hastalarda vakaların %40-60'ında feokromositoma vardır, ancak paratiroid anormallikleri neredeyse yoktur. Etkilenen hastalarda ayrıca dilde nöromalar ve/veya gastrointestinal sistemde gangliyonöromatoz, marfanoid habitus ve/veya medullalı korneal sinir lifleri olabilir. Bu sendromdaki MTK'lar, MEN2A veya FMTK'lu hastalarda meydana gelenlere göre daha erken başlangıçlı ve daha agresif bir klinik seyir gösterir.

Ailevi MTK sendromları olan bazı akrabalar, yalnızca tiroid tümörleri gösterebilir ve bu hastalar FMTK'na sahip olarak sınıflandırılır (MIM# 155240) (58,68). Etkilenen hastalar tipik olarak ailesel olmayan MTK'ları olanlarla aynı yaşta ortaya çıkar. Daha da önemlisi, belirgin sporadik MTK'lar ile başvuran hastaların önemli bir oranı, moleküler analizler temelinde FMTK'na sahip olduklarını kanıtlayacaktır (69).

2.6.8. Patolojik Özellikler ve Ayırıcı Tanı

Medüller karsinomların boyutu zar zor görülebilenlerden tiroidin tüm lobunu kaplayanlara kadar değişir (5,6). Tümörler genellikle keskin bir şekilde sınırlıdır, ancak kapsüllü değildir. Tümörlerin çoğu, genellikle yumuşak bir kıvamda, ten rengi ile pembe renktedir, diğerleri fokal kalsifikasyonları temsil eden granüllü sarı renk değişikliği alanları ile sert ve fibrotiktir. Daha küçük tümörler genellikle, normalde C hücrelerinin baskın olduğu bir alan olan lobların üst ve orta 1/3' lük kısmının birleştiği yerde meydana gelir. Tümörler çok büyüdüğünde, peritiroidal yumuşak dokulara ve trakeaya uzanan tüm lobu değiştirirler. Aksine, kalıtsal tümörler tipik olarak iki taraflı ve çok merkezlidir (58).

Sporadik ve ailesel medüller karsinomlar, neredeyse tüm diğer primer tiroid tümörlerini taklit edebilen geniş bir histolojik model yelpazesine sahiptir (5,6). Olağan medüller karsinom, tümörün komşu normal tiroide fokal yayılımına dair kanıtlarla birlikte, lobüler, trabeküler, insular veya tabaka benzeri bir büyüme paternine sahiptir. Tümör hücreleri yuvarlak, çok köşeli veya iğ şeklinde olabilir ve bu hücre tiplerinin sık sık karışmasıyla oluşur. Çekirdekler kaba kümelenmiş veya benekli (tuz ve biber) kromatine ve genellikle göze çarpmayan nükleollere sahiptir. Birkaç çekirdek, papiller karsinomlarda görülenlere benzer yalancı inklüzyonlar içerebilir. İki çekirdekli hücreler yaygındır ve ara sıra çok çekirdekli dev hücreler görülebilir. MTK'ların çoğu orta derecede pleomorfizm sergiler, ancak mitotik aktivite genellikle düşüktür (58).

Sitoplazma, eozinofilik ile bazofilik arasında değişir ve iyi fikse edilmiş preparasyonlarda ince granüler görünür. İmmünohistokimyanın ortaya çıkmasından önce, argirofil boyaları (örn. Grimelius tekniği), MTK'ların tanımlanması için tercih edilen yöntemlerdir (70). Küçük tümörlerde nekroz ve kanama odakları nadirdir; ancak, daha büyük tümörler bu özellikleri daha yaygın olarak sergiler. Tümörün ilerleyen döneminde lenfatik ve vasküler invazyon görülebilir. Büyük tümörlerde, kontralateral lobda lenfatik invazyon odakları bulunabilir. Nadiren, 1 cm'den az çaplı tümörlerle ilişkili olarak nodal ve uzak metastazlar mevcut olabilir (5,6).

Bazı MTK'lar, belirgin fibroz alanlar içerir ve vakaların %80'inde stromal amiloid birikintileri bulunur. Ultra yapısal olarak, amiloid birikintileri, diğer amiloidoz formlarında görülenle aynı olan fibriler bir ultra yapıya sahiptir. Kalsitonin immün boyaları sıklıkla amiloid birikintileri içinde pozitif boyanma gösterir. Daha önceki çalışmalar, amiloidin kalsitonin öncüsünden türetildiğini ileri sürmesine rağmen (71), daha yeni çalışmalar, tam uzunluktaki kalsitoninin, amiloidin tek bileşeni olduğunu göstermektedir (72). Amiloid kalsifikasyonu meydana gelebilir ve ara sıra tümörler psammoma cisimcikleri içerebilir. Birkaç medüller karsinom neredeyse tamamen amiloidden oluşabilir ve bu vakaların amiloid guatlardan ayırt edilmesi zor olabilir.

2.6.9. Sitolojik Özellikler ve Ultrayapı

Medüller karsinomlar, sitolojik preparasyonlarda değişken şekilde hücrelidir (58,73). Hücreler genellikle tek tek veya zayıf şekilde tanımlanmış hücre kenarları ile gevşek bir şekilde kohezyonlu gruplar halinde bulunur. Aspiratlar tipik olarak pleomorfik görünür ve bazı hücreler küçük ve yuvarlak iken diğerleri kübik, çokyüzlü veya iğ şeklinde olabilir. Çekirdekler sitoplazma içinde eksantrik olarak bulunma eğilimindedir ve bu özellik, tümör hücrelerine plazmasitoid bir görünüm verir. Kromatin kaba tanelidir ve nükleoller genellikle küçük ve göze çarpmaz. Nadiren nükleer yalancı inklüzyonlar mevcut olabilir (73).

Papanicolaou ile boyanmış preparasyonlarda sitoplazma genellikle soluk ve fibriler olup ara sıra proses oluşum alanları vardır. Wright-Giemsa ile boyanmış lamlarda, sitoplazmik granülerlik belirgin olabilir ve bazı durumlarda granüller metakromatik görünür. Amiloid, Papanicolaou boyalarında kolloidden ayırt edilemeyebilir, ancak amiloidin varlığını doğrulamak için bir Kongo kırmızısı boyası yapılabilir. Medüller karsinom tanısı, kalsitonin veya kromogranin için immün boyalarla doğrulanmalıdır (58,73).

Ultrayapısal olarak, MTK'lar, kalsitonin ve diğer peptit ve amin ürünlerinin depolanma bölgelerini temsil eden zara bağlı yoğun çekirdek salgı granülleri içerir. Ortalama çapı 280 nm olan Tip 1 granüller, sınırlayıcı zarlarına yakından uygulanan orta yoğunlukta ince taneli içerikler içerir. Tip 2 granüllerin ortalama çapı 130 nm'dir ve sınırlayıcı zarlarından dar bir elektron saydam boşlukla ayrılmış elektron yoğun içerikleri ile karakterize edilirler. Her iki granül tipi de kalsitonin içerir (74).

2.6.10. Mikst Medüller ve Folliküler Hücreli Karsinomlar

Nöroendokrin ve foliküler hücre farklılaşmasına sahip kombine tümörler arasında mikst medüller ve foliküler/papiller karsinom, tiroglobulin immünoaktivitesi olan medüller karsinom ve nöroendokrin belirteçleri birlikte eksprese eden tiroglobulin pozitif tümörler bulunur (58,75–77). İkinci grup arasında nadiren farklılaşmış (insular) karsinomlar, mukoepidermoid tümörler ve hyalinizasyon trabeküler tümörler vardır (78,79). Örneğin, insular tipteki kötü diferansiye karsinomlar tiroglobulin ve somatostatini birlikte eksprese edebilirken hyalinize trabeküler tümörler nöroendokrin belirteçler için pozitif boyanabilir ve elektron yoğun nöroendokrin tip granüller içerebilir.

DSÖ Endokrin Tümörler Sınıflandırmasına göre mikst tümörler, "hem kalsitonin immünoaktivitesi gösteren medüller karsinomun morfolojik özelliklerini hem de tiroglobulin pozitif folliküler (veya papiller) morfolojik özellikler gösteren tümörler olarak tanımlanır (41). Bu tanım basit gibi görünse de hapsedilmiş normal foliküllerin neoplastik foliküllerden ayrılması imkansız değilse bile zor olabilir, çünkü genelde periferik bölgelerde hapsedilmiş foliküller bulunur. Ancak bazen daha merkezi bölgelerde bulunabilirler.

Papiller ve medüller bileşenleri olan mikst tümörler de ortaya çıkar (80). Papiller bileşenler tiroglobulin pozitif ancak kalsitonin ve CEA için negatiftir. Medüller bileşenler ise kalsitonin ve CEA pozitif ancak tiroglobulin için negatiftir. Her iki bileşen de birincil tümörlerde ve metastatik bölgelerde tanınmıştır. Böyle tümörlerin varlığı, mikst folliküler ve medüller karsinomlarla aynı histogenetik sorunları ortaya çıkarmıştır.

Volante ve arkadaşları, bir dizi 12 mikst medüller ve folliküler/papiller karsinomu incelemek için moleküler yaklaşımlar kullandılar (81). Bu çalışma, iki bileşenin farklı hücrelerden türetildiği görüşünü destekledi, çünkü yedi vakanın bileşenleri sürekli olarak RET mutasyonları, alelik kayıplar ve klonal kompozisyon modellerinde farklılıklar gösterdi. Volante ve ark. "rehine" hipotezine göre neoplastik olmayan sıkışmış foliküllerin, medüller karsinom türevli trofik faktörler tarafından uyarıldığını ve bunun hiperplastik foliküler odaklara yol açtığını öne sürdüler. Bununla birlikte, varsayılan trofik faktörlerin doğası bilinmemektedir. Folliküler hücrelerde daha sonra edinilmiş genetik kusurlar, bunların neoplastik transformasyonuna ve metastaz yapma kapasitesine sahip papiller veya folliküler karsinom bileşenlerinin gelişmesine yol açar. İlginç bir

şekilde, "mikst tümörler" in bir alt kümesi, hiperplastik folliküller içeren bir medüller karsinomdan oluşur ki bu tür foliküllerin genellikle poliklonal veya oligoklonal olduğu gerçeğine dayanır (77,81,82).

Nadiren, germ line RET nokta mutasyonları olan ailelerde hem MTK hem de papiller tiroid karsinomu (PTK) gelişir, bu da yeniden düzenlemelerden ziyade RET nokta mutasyonlarının PTK gelişimini yönlendirebileceğini düşündürür. Bu tür ailelerde bulunan mutant RET, seviyesi RET/PTC1'den önemli ölçüde daha düşük olmasına rağmen, kültürlenmiş tiroid foliküler hücreleri (PCC13) için yapıcı kinaz aktivitesi ve mitojenik etkiler kaydetmiştir (81,82). Bu bulgular, RET nokta mutasyonlarının tiroid foliküler hücreleri için baskın onkogenler olarak işlev görme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Medüller ve foliküler/papiller karsinomların heterojen bir grubu temsil ettiği açıktır (82). "Rehine" hipotezi ile açıklanan tümörlere ek olarak, bazı mikst tümörler çarpışma tümörlerini temsil edebilir veya C hücrelerine veya foliküler hücrelere farklılaşabilen bir kök hücrenin türevleri olabilir (82,83).

2.6.11. İmmünohistokimyasal Özellikler

Medüller tiroid karsinomları, foliküler hücre orijinli tümörlere benzer şekilde, tiroid transkripsiyon faktörü-1 (TTF-1) için pozitifdir (58). Tiroglobulin boyaları tipik olarak negatiftir, ancak sıkışmış normal tiroid folikülleri pozitif boyanabilir. Tümörler ise tipik olarak pozitifdir. Düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinler için ve en yaygın olarak sitokeratin 7 pozitif/sitokeratin 20 negatif fenotipe sahiptir (84). Vimentin, tümör hücrelerinde değişken bir şekilde bulunur ve bazı tümörler, nörofilament pozitif hücrelerin alt popülasyonlarını içerir (84).

Tümörler genellikle kalsitonin, kromogranin ve sinaptofizin dahil olmak üzere geniş bir jenerik nöroendokrin belirteç yelpazesi için pozitifdir (58). Kromogranin, medüller karsinom için duyarlı bir belirteçtir ve aslında bu tümör tipinin tanımlanmasında kalsitoninden daha duyarlı olabilir. Calbindin-D28K ve NCAM'ın (neural cell adhesion molecule) polisialik asidi içeren diğer ürünler de bu tümörlerde bulunur (85). Kalsitonin, tümörlerin %80-90'ında bulunur. Birçok vaka tümörün tamamında yaygın kalsitonin immünoreaktivitesi gösterse de, diğerleri sadece fokal ve zayıf reaktivite gösterebilir (58).

Kalsitonin peptidi ve kalsitonin genine bağlı peptit için negatif olan bazı tümörler in situ hibridizasyon kullanarak kalsitonin mRNA için pozitif sinyaller verir (85). Çeşitli

diğer peptitler bu tümörler içinde lokalize edilmiştir ve bunların mevcudiyeti, tümör ekstraktlarının radyoimmünoanalizleri ile doğrulanmıştır. Hem somatostatin hem de gastrin salan peptit, normal C hücrelerinin alt popülasyonlarında bulunur ve bu peptitlerin her ikisi de medüller karsinomlarda yaygın olarak eksprese edilir (86,87). Somatostatin reseptörleri de bu tümörlerde sıklıkla eksprese edilir.

Yaygın olarak bulunan diğer peptidler arasında ACTH, leu-enkefalin, nörotensin, P maddesi, vazoaktif bağırsak peptidi ve koryonik gonadotropin yer alır (88). Nadiren, tümörler glukagon, gastrin ve insülin için immünoreaktif hücrelerin alt popülasyonlarını içerebilir ve hem katekolaminler hem de serotonin de mevcut olabilir (89). Galektin-3, kalıtsal medüller tiroid karsinomlarının %92'sinde bildirilmiştir (90). Boyanma, karsinomların %26'sında fokaldır ve geri kalanında diffüzdür. İlginç bir şekilde, nodal metastazlarda galektin-3 azalır veya yoktur, C hücresi hiperplazi odakları ise galektin-3 için negatiftir. CEA seviyeleri tipik olarak plazmada yükselir.

MTK'lu hastalar ve bağıntılı immünohistokimyasal çalışmalar, tümörlerin neredeyse tamamının CEA pozitif olduğunu göstermiştir. Birkaç grup, MTK'ların bir alt kümesinin kalsitonini sentezleme ve salgılama yeteneğini kaybederken CEA sentezi için kapasitelerini koruyabileceğini göstermiştir. Aslında, medüller karsinomdaki kalsitonin negatif alanlar sıklıkla CEA için pozitiftir. Artan CEA düzeyleri karşısında kalsitonin düzeylerinin düştüğü bulgusu genellikle agresif bir klinik gidişi öngörür (91).

2.6.12. Medüller Tiroid Karsinom Varyantları

Aşağıda özetlendiği gibi çok sayıda medüller karsinom alt tipi tarif edilmiştir (58)

- ❖ *Ampikrin varyant*: Tümör hücreleri müsin içerir ve kalsitonin eksprese eder
- ❖ *Anjiyosarkom benzeri varyant*: Kanamalı yarık- boşluklar içerir
- ❖ *Berrak hücreli varyant*: Optik berrak hücreler bulunur
- ❖ *Enkapsüle varyant*: Tümüyle kapsüllüdür
- ❖ *Foliküler varyant*: Eozinofilik sekresyon içeren foliküllere sahiptir
- ❖ *Dev hücreli varyant*: İri çekirdekli büyük hücreler, daha agresif olabilir
- ❖ *Melanotik varyant*: Melanin pigmentasyonu içerir
- ❖ *Onkositik varyant*: Hürthle hücreli adenomu / karsinomu taklit eder ancak belirgin fibrovasküler septaya sahiptir
- ❖ *Papiller varyant*: Fibrovasküler korlar boyunca hizalanmış tümör hücreleri içerir

- ❖ *Paraganjiyom benzeri varyant:*
-İç içe tümör hücreleri, paragangliyomayı taklit eder
-Sustentaküler hücrelere benzeyen pigmentli dendritik hücreler ile yuva benzeri desen oluşturu
- ❖ *Psödopapiller varyant:* Damar kaynağından uzakta tümör hücrelerinin nekrozundan kaynaklanan bir psödopapiller patern oldukça yaygındır.
- ❖ *Küçük hücreli varyant:* Akciğerin küçük hücreli karsinomuna benzer, oldukça agresif
- ❖ *İğsi hücreli varyant:* Yalnızca iğsi hücreleri içerir
- ❖ *Skuamöz varyant:* Fokal skuamöz farklılaşmaya sahip olabilir

Medüller mikrokarsinomlar, tanım gereği, 1 cm'den daha küçük çaptadır ve sporadik olarak veya MEN2 ile birlikte ortaya çıkabilir. Yuvalanma, trabeküler veya yaygın büyüme modelleri sergileyebilirler ve ara sıra mikrokarsinomlar, küçük foliküler adenomlara veya adenomatöz odaklara benzeyen mikrofoliküler büyüme modeline sahip olabilir. Bildirilen vakaların çoğu başka nedenlerle veya kalsitonin anormallikleri açısından taranan nodüler tiroid hastalığı olan hastalarda çıkarılan tiroidlerde tesadüfi bulgular olmuştur. Nadiren mikrokarsinomlar metastaza neden olabilir (92).

2.6.13. Medüller Karsinomda Ayırıcı Tanı

Medüller karsinomlar, iyi huylu ve kötü huylu tiroid tümörlerinin tüm spektrumunu taklit edebilir. Hem papiller/psödopapiller hem de diğer MTK varyantları nükleer yalancı inklüzyonlar ve psammoma cisimcikleri içerebilir; ancak, papiller tiroid karsinomlarında (PTK'lar) tipik olan nükleer berraklaşmadan yoksundurlar. Ayrıca medüller karsinomlar kromogranin, kalsitonin ve sinaptofizin için pozitifken PTK'lar bu belirteçler için negatiftir. Medüller karsinomlar folikül içerebileceğinden, tipik olarak tiroglobulin için pozitif ve kalsitonin, kromogranin ve sinaptofizin için negatif olan foliküler hücre neoplazmalarından ayırt edilmelidirler. İnsülin tipteki az diferansiye karsinomlar, foliküler hücrelerin yuvalarından ve adacık benzeri düzenlemelerinden oluşur ve mikrofoliküller içerebilir. Bu tümörler ayrıca tiroglobulin için pozitif ve tipik olarak kalsitonin, kromogranin ve sinaptofizin için negatiftir. Bununla birlikte, az sayıda farklılaşmış karsinom, jenerik nöroendokrin belirteçleri gösterebilir. İğsi ve dev hücreli medüller karsinom tipleri, nöroendokrin belirteçler, kalsitonin, tiroglobulin ve TTF-1 için

negatif olan folliküler hücre kaynaklı farklılaşmamış karsinomlardan ayırt edilmelidir (41,58).

Küçük hücreli medüller karsinomun malign lenfomalardan ayrımı, özellikle küçük biyopsi veya sitolojik örneklerde zor olabilir. CD45'in ve T ve B hücre soyunun belirteçlerinin gösterilmesi lenfoma tanısını koyar. Akciğerlerin ve diğer bölgelerin küçük hücreli karsinomu tiroide metastaz yapabilir ve küçük hücreli tip medüller karsinomu taklit edebilir (93). Çeşitli orijinli küçük hücreli karsinoma ek olarak TTF-1 hem akciğerde hem de tiroid tümörlerinde eksprese edildiğinden, bu markırın varlığı yararlı bir ayırt edici değildir (58). Ayrıca kalsitonin ve jenerik nöroendokrin belirteçler diğer küçük hücreli karsinomlarda bulunabilir. Bu durumlarda, dikkatli bir klinik ve radyolojik inceleme, bir pulmoner veya ekstra pulmoner primer tümörü belirlemede yardımcı olabilir.

Medüller karsinomlarda mün bulunabileceğinden, bu tümörler tiroide metastaz yapmış münöz karsinomlardan da ayırt edilmelidir. Onkositik medüller karsinomlar, folliküler hücre kaynaklı onkositik tümörlerden ve onkositik paratiroid neoplazmalarından ayırt edilmelidir (58). Onkositik folliküler hücreli tümörler tiroglobulin için pozitifken, paratiroid tümörleri paratiroid hormonu için pozitifdir. Hyalinize trabeküler tümör tipik olarak medüller karsinomun bazı varyantlarında olduğu gibi kapsüllüdür. Her iki tümör tipinde de trabeküler bir patern mevcuttur ve her ikisi de hyalinizasyon alanları sergileyebilir. Bununla birlikte, medüller karsinomun stroması amiloid için pozitifken, hyalinize trabeküler tümörlerin stroması sadece kollajen için boyanır. Medüller karsinomlar kalsitonin ve CEA için pozitif boyanırken, hyalinize trabeküler tümörlerde bu belirteçler negatiftir. Nadiren hyalinize trabeküler tümörlerin jenerik nöroendokrin belirteçler için pozitif olabileceğine dikkat edilmelidir (94).

Medüller karsinomları paragangliomalardan ayırmak zor olabilir. İkinci tümörler bir "Zellballen" yapısına sahiptir ve kromogranin ve sinaptofizin için pozitifdir ancak kalsitonin için negatiftir. S-100-pozitif sustentaküler hücre popülasyonu tipik olarak paragangliomalarda hücre yuvalarının çevresinde bulunur, ancak MTK'larda yoktur (58). İntratiroidal paratiroid adenomlarını medüller karsinomlardan ayırt etmek de zor olabilir. Paratiroid tümörleri, paratiroid hormonu ve kromogranin için pozitifdir, ancak kalsitonin için boyamalar negatiftir ve bu tümör tiplerini ayırt etmeye hizmet etmelidir. Tiroid bezini tutan metastatik nöroendokrin karsinomları MTK'lardan ayırt etmek özellikle zor olabilir

(93). Metastatik nöroendokrin karsinom tanısını destekleyen özellikler arasında interstisyel bir yayılma paterni, çoklu tümör odaklarının oluşumu, follikülotropizm (folikülleri kaplayan tümör hücreleri), kütiküler sınırları olan rozet oluşumları ve kalsitonin ve CEA için immünreaktivite eksikliği yer alır (58).

2.6.14. Sporadik ve Kalıtsal MTK'da Moleküler Özellikler

Ailesel MTK sendromlarının moleküler kökenlerine ilişkin çalışmadaki büyük bir ilerleme, varsayılan MEN2A geninin, kromozom 10'un perisentromerik bölgesiyle eşleştiğinin gözlemlenmesiydi (95). Daha sonraki çalışmalar, ailesel MTK sendromlarının taşıyıcılarını tanımlamak için kısıtlama uzunluğu polimorfizmlerinin kullanılmasına yol açmıştır (96). Nihayetinde sorumlu gen, RET proto-onkogenini içeren kromozom 10 (10q11.2) bölgesine haritalandı ve etkilenen bireylerde germline missense RET mutasyonları gösterildi (97). RET proto-onkogeni 21 ekzom içerir ve bağlanma bölgesi sistein açısından zengin bir hücre dışı alan, bir transmembran bölge ve iki sitoplazmik tirozin kinaz alanı ve bir cadherin ligandı ile bir hücre yüzeyi tirozin kinaz reseptörünü kodlar (9). Kadherin bağlama bölgesi, hücre sinyalleşmesinde önemli bir rol oynarken, sistein bakımından zengin hücre dışı alan, reseptör dimerizasyonu için önemlidir. RET, çeşitli nöral krest türevlerinde (C hücreleri, adrenal medulla, ekstraadrenal paraganglia, sempatik ve enterik ganglionlar), paratiroid bezinde ve ürogenital sistemde eksprese edilir (98).

RET reseptörlerinin anormal aktivasyonu ile sonuçlanan germ line mutasyonları MEN2A, MEN2B ve FMTK'nda karakterize edilmiştir (18,44,99). Mutasyonlar missense tiptedir ve en yaygın olarak ekzom 10 ve 11'i ve daha az yaygın olarak ekzomları etkiler. 13,14,15 ve 16. Mutasyonların çoğu sistein açısından zengin hücre dışı alanı (MEN2A, FMTK) etkiler. Kodon 634 mutasyonları, MEN2A hastalarının yaklaşık %80'inde bulunurken, kodon 609, 618 ve 620 mutasyonları, FMTK vakalarının ve Hirschsprung fenotipine sahip hastaların %60'ından fazlasını oluşturur. Kodon 634 mutasyonları, feokromositoma ve hiperparatiroidizm gelişimi ile güçlü bir genotip-fenotip ilişkisine sahiptir. Sisteinin birkaç başka amino asitle yer değiştirmesi, aktif RET dimerlerinin oluşumunu artırarak bunların transformasyon potansiyeline yol açar. 768 veya 804 kodonlarını (tirozin kinaz alanı) etkileyen mutasyonlar da meydana gelebilir (100). ATA kriterlerine göre mutasyonların risk kategorileri Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3: Yaygın RET mutasyonlarının medüller tiroid karsinom riskiyle ilişkisi (100)

RET mutasyon ^a	MTK risk seviyesi ^b	FEO insidansı ^c	HPTH insidansı ^c	CLA ^d	HD ^d	
G533C	8	MOD	+	-	N	N
C609F/G/R/S/Y	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C611F/G/S/Y/W	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C618F/R/S	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C620F/R/S	10	MOD	+ / ++	+	N	Y
C630R/Y	11	MOD	+ / ++	+	N	N
D631Y	11	MOD	+++	-	N	N
C634F/G/R/S/W/Y	11	H	+++	++	Y	N
K666E	11	MOD	+	-	N	N
E768D	13	MOD	-	-	N	N
L790F	13	MOD	+	-	N	N
V804L	14	MOD	+	+	N	N
V804M	14	MOD	+	+	Y	N
A883F	15	H	+++	-	N	N
S891A	15	MOD	+	+	N	N
R912P	16	MOD	-	-	N	N
M918T	16	HST	+++	-	N	N

Not: ^aMTK'dae bildirilen tüm RET mutasyonları ^bAgresif MTK riski: MOD, orta; H, yüksek; HST, en yüksek. ^cPHEO ve HPTH insidansı: + = ~% 10; ++ = ~% 20-30; +++ = ~% 50. ^dY, pozitif; N, negatif kutanöz liken amiloidozis (CLA). Hirschsprung hastalığı (HD).

Tirozin kinaz domainini (kodon 918) etkileyen mutasyonlar, MEN2B'li hastalarda ve bazı sporadik medüller karsinomlarda meydana gelir (99). Bu mutasyon metiyoninin treonin ile yer değiştirmesiyle sonuçlanır. Alanin yerine fenilalaninin yer değiştirmesiyle sonuçlanan kodon 883 mutasyonları, MEN2B'li hastaların küçük bir alt grubunda da ortaya çıkar (18). MEN2B mutasyonları RET monomerik formunda aktivasyon ile sonuçlanır. Bu mutasyonlar, tirozin kinaz domainin katalitik çekirdek bölgesinde mevcuttur ve bunların, bu bölgede tirozin kinaz aktivitesinin artmasına veya substrat özgüllüğünde değişikliğe yol açan bir konformasyonel değişikliğe neden oldukları öne sürülmüştür (66). MEN2A ve 2B'de yaygın olarak tespit edilen mutasyonlar, NIH 3T3 hücreleri, RET mutasyonlarının altında yatan tümörjenik mekanizmanın, tümör baskılayıcı fonksiyon kaybından ziyade baskın onkojenik dönüşümden kaynaklandığını düşündürür. Ayrıca, transgenik farelerde MEN2A mutant RET formlarının C hücrelerine

hedeflenmesi, hayvanların %100'ünde CCH veya MTK gelişimi ile, yaklaşık %50'sinde meme ve parotis bezi karsinomları ile sonuçlanır (101).

Belirgin sporadik MTK vakalarında RET germ line mutasyonlarının sıklığı, birkaç çalışmada değerlendirilmiştir (102). Kodonlarda görülen mutasyonlar (609,630,768,790,791,804,891 (level-1), 611,618,620,634 (level-2), 883,918,922 (level-3) risk seviyesine göre sınıflandırılmıştır (103). Çeşitli çalışmaların sonuçları bileştirildiğinde, belirgin sporadik tümörleri olan hastaların yaklaşık %7'sinin germ line mutasyonlarına sahip olduğu tahmin edilmiştir (102). Bu bulgular, belirgin sporadik medüller karsinom ile başvuran tüm hastalarda RET analizinin yapılması gerektiği görüşünü desteklemektedir.

Sporadik MTK'ların %70'e kadarında kodon 918'deki somatik mutasyonlar gözlemlenmiştir (102, 103). MEN2B'deki 918 germ line mutasyonu ile aynı olan bu mutasyon, metiyonin yerine treoninin yer değiştirmesiyle sonuçlanır. Bu mutasyona sahip sporadik tümörlerin daha agresif bir seyir izlediğini ileri sürülse de bu nokta tartışmalıdır. Sporadik medüller karsinomlarda 630,634,766,768,804 ve 833 kodonlarındaki somatik mutasyonlar, kodon 918 mutasyonlarından çok daha az yaygın olarak gözlenmiştir (18,99,102).

Fizyolojik/sekonder CCH'nin ailesel olmayan MTK gelişimi ile ilişkisi tartışmalıdır. İzole edilmiş veya ailesel olmayan MTK ile ilişkili 24 CCH vakasının lazer yakalama mikrodiseksiyon çalışmalarına dayanan son çalışmalar, üç eşzamanlı MTK'de kodon 918 mutasyonlarının varlığına rağmen, CCH odaklarında RET mutasyonları gösterememiştir (104). 620,630,634 ve 918 kodonlarını içeren RET mutasyonları, sporadik feokromositomaların %10-20'sinde görülür (102,105). Buna karşılık, paratiroid hiperplazilerinde veya adenomlarında, hipofiz adenomlarında, pankreatik endokrin tümörlerinde, karsinoidlerde veya nöroblastomlarda RET mutasyonları saptanmamıştır (105).

RET mutasyonları ayrıca Hirschsprung hastalığının otozomal dominant formlarının %40'a kadarından ve sporadik hastalığı olan hastaların bir alt grubundan sorumludur (102,106). Mutasyonlar gen boyunca dağılır ve RET proteininin fonksiyon kaybına neden olur. Nadiren, FMTK veya MEN2A, Hirschsprung hastalığı ile birlikte bulunabilir ve bu birlikteliğe sahip beş türde, 609,618 ve 620 kodonlarında mutasyonlar tanımlanmıştır (106).

2.6.15. Tedavi ve Prognoz

Moleküler genetik testlerin sendromları olan hastaların tedavisinde derin bir etkisi olmuştur (9,11,103). Profilaktik tiroidektomi yapma kararı, geçmişte kullanılan kalsiyum ve pentagastrin provokatif testlerinin kullanımından ziyade artık yalnızca moleküler testlerin kullanımına dayanmaktadır. Negatif bir test sonucuna göre, sendrom geliştirme riski taşıyan aile üyelerinin ek testlere tabi tutulmasına gerek yoktur.

Bir dizi çalışma, MEN2'li hastalarda profilaktik tiroidektomilerin temeli olarak genetik analizlerin değerini değerlendirmiştir (107). Kanıtlanmış RET mutasyonları olan 75 çocuk ve ergende tiroidektomi yapılan bir araştırmada, %61'inde MTK ve %39'unda tek başına C hücre hiperplazisi bulunmuştur (75). RET mutasyonları için test yapmak, artık MEN2'li hastalar için bakım standardıdır (11). MEN2A'lı hastalar için 5 ila 10 yaşları arasında profilaktik tiroidektomi önerilir. MEN2B'li hastalar için 6 ay ile 3 yaş arasında tiroidektomi önerilir. FMTK ile ilişkili mutasyonları olan hastalar için en uygun terapötik strateji henüz belirlenmemiştir (11,107).

Medüller tiroid karsinomlu hastaların cerrahi tedavisine, bu tümörlerin, önce ipsilateral sonra kontralateral servikal lenf nodlarını takip eden santral kompartman lenf nodlarını içeren bilinen yayılım paterni rehberlik eder (108,109). Palpabl primer tümörü olan hastaların yaklaşık %50'sinde aslında servikal nodal metastaz kanıtı olacaktır. Bu nedenle hem sporadik hem de kalıtsal MTK'lar genellikle santral lenf nodu diseksiyonu ve total tiroidektomi ile tedavi edilir. Palpabl primer tümörü olan hastalarda, bazı cerrahlar tam lokal kontrol şansını optimize etmek için ipsilateral ve hatta kontralateral servikal lenf nodu diseksiyonlarının yapılmasını savunmaktadır (108). Bazal ve uyarılmış kalsitonin düzeylerinin yanı sıra diğer biyobelirteçlerin postoperatif azalması, biyokimyasal iyileşme hakkında bilgi sağlamada oldukça etkilidir.

MTK'lu hastaların hayatta kalması evre ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Cerrahi, tümör çapı birkaç milimetreden küçük olan hastaların hemen hemen hepsinde, tümörleri bir santimetreden küçük olanların %90'ında ve bir santimetreden büyük olan tümörlerin %50'sinde iyileşme sağlar (110,111). Genel olarak 10 yıllık sağkalım oranları ortalama %75-85'tir. Sporadik ve kalıtsal MTK içeren 104 hastalık seride, hastaların %49.4'ü iyileşmiş, %12.3'ünde nüks tümör ve %38.3'ünde kalıcı tümör bulunmuştur (59). Ortalama takip süresi 8,6 yıl olup sırasıyla %10,7 ve %13,5 5 ve 10 yılda ölümlere neden olmaktadır. Bu seride kalıtsal tümörü olan hastaların %32'sine genetik veya biyokimyasal

tarama çalışmaları ile teşhis konulmuştur. Tahmin edileceği gibi, bu hastalarda servikal nod metastazı insidansı sporadik tümörleri olan hastalara göre daha düşüktür ve son takipte %94.7'si iyileşmiştir. Diyare, kemik ağrısı ve kızarma (flushing) gibi sistemik semptomları olan hastalarda yaygın metastatik hastalık gelişmiş ve bu hastaların üçte biri 5 yıl içinde ölmüştür.

MTK'lu hastalarda 50 yaşından büyük yaş ve evre en önemli prognostik faktörlerdir. Nitekim Kebebew'in çalışmasında yaş ve evre sadece iki bağımsız prognostik faktördü (59). Erkek cinsiyet, tek değişkenli analizlerde istatistiksel anlamlılığa yaklaşmış ve büyük olasılıkla küçük bir risk faktörünü temsil ediyordu. Servikal lenf nodu metastazları olan hastalarda tekrarlayan veya kalıcı hastalık olasılığı daha yüksekken bu parametre önemli ölçüde daha yüksek bir mortalite ile ilişkili değildi. MTK tipinin (sporadik MTK,FMTK,MEN2A,MEN2B) bazı çalışmalarda önemli bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bir çalışmaya göre evre veya çok değişkenli analizler kontrol edildiğinde, MTK'nın alt tipi önemli bir prognostik faktör gibi görünmemektedir (112).

Hücre sel bileşim (iğsi hücreye karşı yuvarlak hücre), pleomorfizm, amiloid birikiminin boyutu ve kalsitonin boyanmasının kapsamı dahil olmak üzere çok sayıda histolojik ve immünohistokimyasal parametre, potansiyel prognostik parametreler olarak incelenmiştir, ancak çok değişkenli analizlerde hiçbirinin anlamlı olduğu kanıtlanmamıştır (110). Koperek ve ark. primer tümördeki dezmozoplazinin, nodal metastatik potansiyeli öngörmek için güvenilir ve tekrarlanabilir bir parametre olduğunu göstermişlerdir (113). Benzer şekilde Scheuba ve ark da (114) dezmozoplazik reaksiyonun lenf nodu metastazı için intraoperatif güvenilir bir parametre olduğunu belirtmektedirler. Hem kalsitonin hem de CEA serum iki katına çıkma süreleri, MTK'lu hastalarda prognostik indeksler olarak da kullanılmıştır (115).

Hızlı kalsitonin ikiye katlanma süresine sahip hastaların prognozu, iki katına çıkma süresi daha uzun olanlara göre daha kötüdür. Özellikle kodon 918'i içeren bir somatik RET mutasyonunun varlığı, kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (18,99,116). Kodon 918'i içeren RET mutasyonları, büyük tümörlerde ve nodal ve uzak metastazları olan tümörlerde daha sık görülür (116). Daha kötü bir sonuçla ilişkili olduğu bulunan tüm prognostik faktörler arasında, yalnızca tanı anında ileri evre ve RET mutasyonlarının varlığı bağımsız bir korelasyon göstermiştir (18,116).

2.6.16. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ) ile Hedefe Yönelik Tedavinin Temeli

Germline RET mutasyonları, MEN2A ve MEN2B'li hemen hemen tüm hastalarda mevcuttur. Sporadik MTK'lu hastaların yaklaşık yarısında somatik RET mutasyonları bulunur ve somatik RET mutasyonları olmayan hastaların %18-80'inde somatik RAS mutasyonları vardır (117,118). Ayrıca, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) reseptörleri (VEGFR-1 [FLT-1] ve VEGFR-2 [FLK-1, KDR]), hem tümör hücrelerinde hem de destekleyici vasküler endotelyumda sıklıkla MTK'da aşırı eksprese edilir (119). VEGFR-2 kinazı hedefleyen birçok ajan aynı zamanda RET kinazı da hedefler. Son yıllarda birkaç TKİ (axitinib, cabozantinib, gefitinib, imatinib, motesanib, sorafenib, sunitinib ve vandetanib) ilerlemiş MTK'lu olan hastaların faz I, II ve III klinik çalışmalarında değerlendirilmiştir (100). Faz II klinik deneylerinde, kısmi yanıt oranları %0 ila %50 arasında değişmektedir ve çok sayıda hasta uzun süreli stabil hastalık göstermiştir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA), yakın zamanda tamamlanan faz III klinik deneylere dayanarak, çok ileri MTC hastaların tedavisi için oral yoldan uygulanan iki TKİ'yi, vandetanib (2011) ve cabozantinib'i (2012) onaylamıştır.

2.7. RET GENİ

2.7.1. Biyoloji ve Fizyoloji

RET geni, sentromere yakın 10q11.2 kromozomunda bulunur ve 21 ekzom içerir (103). Takahashi ve ark. (120) RET'i (Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenme-REarranged during Transfection) ilk kez 1985'te sitojenik yeniden düzenlemeyle aktivasyona uğrayabilen bir proto-onkogen olarak tanımlamıştır (120). Üç yıl sonra aynı araştırmacılar tarafından RET geni klonlanmıştır (121). RET geni plazma membran bağliyan tirozin kinaz enzimini kodlar. RET reseptörü, tiroid C hücreleri, adrenal medüller hücreler, parasempatik, sempatik ve kolonik gangliyonlar, ürogenital sistemin hücreleri ve brankial yarıktan köken alan paratiroid hücreleri gibi nöroendokrin ve nöral hücreler tarafından eksprese edilir (120,121).

RET proteini, bir N terminal sinyal peptidi, bir hücre dışı bölge (dört kaderin benzeri tekrar, bir kalsiyum bağlama bölgesi ve sistein açısından zengin bir bölge), bir transmembran bölgesi ve iki hücre içi tirozin kinaz bölgesinden oluşur (103,122). Hücre dışı kaderin benzeri alanlar hücre-hücre sinyalleşmesi için önemlidir, oysa sistein açısından zengin hücre dışı alan, reseptör dimerizasyonu için önemlidir. RET'in C-terminal kuyruğu, C'lerinde 9 (RET9; kısa izoform), 43 (RET43; orta izoform) veya 51 (RET51; uzun izoform) farklı amino asitli üç protein izoformu üreten üç farklı ekleme varyantı gösterir (122). Üç izoform, in situ hibridizasyon çalışmalarının gösterdiği gibi, böbrekler, enterik ganglionlar ve sempatik ve duyuşal nöronal hücrelerin gelişiminde fizyolojik olarak farklı rollere sahiptir (123). Sadece bir izoform ile farelerde yapılan çalışmalar, böbrek morfogenezini ve bağırsak sinir sistemi gelişimi için yalnızca kısa izoformu olan RET9'un gerekli olduğunu göstermiştir (124). Bununla birlikte, uzun izoformu olan RET51, farelerde iç medüller toplayıcı kanal hücrelerinin hayatta kalmasını ve tübülogenezini teşvik ederek böbrek farklılaşmasına katılır. Ayrıca RET51, olgun sempatik nöronların metabolizması ve büyümesi için gereklidir. Kısa ve uzun izoformlar ayrıca nöronlarda farklı sinyal yollarını aktive eder (122,124).

Bugüne kadar, RET reseptörü için dört ligand tanımlanmıştır (9,125). Bu ligandlar glial hücre dizisinden türetilen nörotrofik faktör (GDNF), neurturin, artemin ve persephindir (125). RET sinyali, RET reseptörü ve GDNF ailesi reseptörü- (GFR- α) 1-4 olarak adlandırılan dört farklı yüksek afiniteli glikosil-fosfatidilinositol bağlantılı ko-reseptörden oluşan multimerik bir kompleksten başlar. Dört RET ligandının GDNF, neurturin, persephin ve artemin'in tercihen sırasıyla GFR- α 1, GFR- α 2, GFR- α 3 ve GFR- α 4 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (125). Sinyalleşme, spesifik tirozin kalıntıları üzerinde reseptör hücre içi alanının tirozin otofosforilasyonu ile sonuçlanan GDNF ile indüklenen RET reseptörü dimerizasyonunu gerektirir. RET C-terminal ucu 16 tirozin kalıntısı içerir ve uzun izoform RET51, C terminalinde iki ekstra tirozin kalıntısı gösterir. Bu tirozin kalıntıları arasında Y1062,SHC,FRS2,DOK4/5,IRS1/2 ve Enigma dahil olmak üzere bir dizi transdüksiyon molekülü ile etkileşime giren bir çoklu yerleşme bölgesidir. RET reseptörü, Y1062,RES/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz, fosfatidilinositol-3 kinaz/AKT,p38/MAPK ve JNK yolları dahil çeşitli sinyal yollarını aktive edebilir. GDNF/RET sinyal yolu, Takahashi (123) tarafından gözden geçirilmiştir.

2.7.2. RET Geninin İnsan Malignitelerindeki Rolü

1985'te Takahashi ve meslektaşları (120), bir insan T lenfomasından yeni bir onkogen klonladılar; bu onkogen, kültürde transfeksiyondan sonra fibroblastları dönüştürmeyi başardı. Dönüşen onkogen, muhtemelen transfeksiyon prosedürü sırasında meydana gelen, birbirine bağlanmamış iki DNA fragmanı arasındaki rekombinasyon tarafından üretildiğinden, RET (REarranged during Transfection) olarak adlandırıldı. Araştırmacılar, wild tip RET'in 3'-terminal dizisi ile RFP'nin (encoding RET finger protein) 5'-terminal dizisi arasında füzyon meydana geldiğini gösterdi. 1989'da RET, kromozom 10'un (10q11.2) uzun koluyla eşlendi ki bu RET'in, aynı zamanda söz konusu kromozomal bölgeye eşlenmiş olan çoklu endokrin neoplazi tip 2 (MEN2) sendromu (Box 1) için bir aday gen olduğunu gösteren bir kilometre taşı idi (126). 1989'da, RET'in tirozin kinaz (RTK) aktivitesine sahip bir transmembran reseptörünü kodladığı gösterildi (127). Bu keşfin ardından, 1990'da RET füzyonlarının papiller tiroid karsinomunun (PTC; füzyonlara RET-PTC adı verildi) yaygın bir onkogenik driver olduğu gösterildi. RET'te medüller tiroid karsinomunun (MTK) kalıtsal ve sporadik formlarında belirtiler tanımlandı (128). Son olarak, 2012'de küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda (KHDAK) ve ardından kolon, meme ve diğer kanser türlerinde RET füzyonları tanımlandı (129).

MTK'unun biyolojik davranışı, kalıtsal MTK'lu hastalarda spesifik RET mutasyonu ile ilişkilendirilebilir. Risk altındaki hastalarda RET proto-onkogeninin DNA bazlı mutasyon analizi, gen taşıyıcılarının tespiti ve spesifik mutasyonun tanımlanması için önemlidir (9,100). Hem ileri yaş hem de MTK risk grubu, MTK saldırganlığının bağımsız belirteçleridir. MTK yönetiminde erken müdahalenin ve feokromositoma taramasının önemi nedeniyle, RET mutasyonu taşıyıcılarının tanımlanması hastalığa bağlı morbidite ve ölümleri en aza indirebilir. MEN 2 veya FMTK'lu hastaların kapsamlı bakımı ayrıca uygun genetik danışmanlığı ve uzun süreli sürveyansı içermelidir (18,99).

2.8. MUTASYONLAR

Haploid insan genomu 3 milyar nükleotitten oluşmasına rağmen, tek bir baz çiftindeki değişiklikler bile dramatik fizyolojik hasara neden olabilir. Örneğin, orak hücreli anemi, en küçük genetik değişikliklerin neden olduğu bir hastalıktır. Burada hemoglobin proteininin (kanı kırmızı yapan oksijen taşıyan protein) beta zinciri genindeki

tek bir nükleotidin değişmesi normal bir hemoglobin genini orak hücreli hemoglobin genine dönüştürmek için yeterlidir. Bu tek nükleotid değişikliği, protein zincirinde yalnızca bir amino asidi değiştirir, ancak sonuçlar yıkıcıdır (16,130).

Herhangi bir hücredeki DNA, belirli kimyasallara, ultraviyole radyasyona, diğer genetik hasarlara ve hatta replikasyon sürecinde meydana gelen hatalara çevresel maruz kalma yoluyla değiştirilebilir (130,131). Bir germ line hücresinde (gametleri, yani yumurta veya sperm hücrelerini oluşturacak olan) bir mutasyon meydana gelirse, bu mutasyon bir organizmanın yavrularına geçebilir. Bu, gelişmekte olan embriyodaki her hücrenin mutasyonu taşıyacağı anlamına gelir. Germ line mutasyonlarının aksine, bir organizmanın vücudunun başka yerlerinde bulunan hücrelerde somatik mutasyonlar meydana gelir. Bu tür mutasyonlar, mitoz sürecinde yavru hücrelere aktarılır, ancak eşeyli üreme yoluyla gebe kalan yavrulara aktarılmaz (130,132).

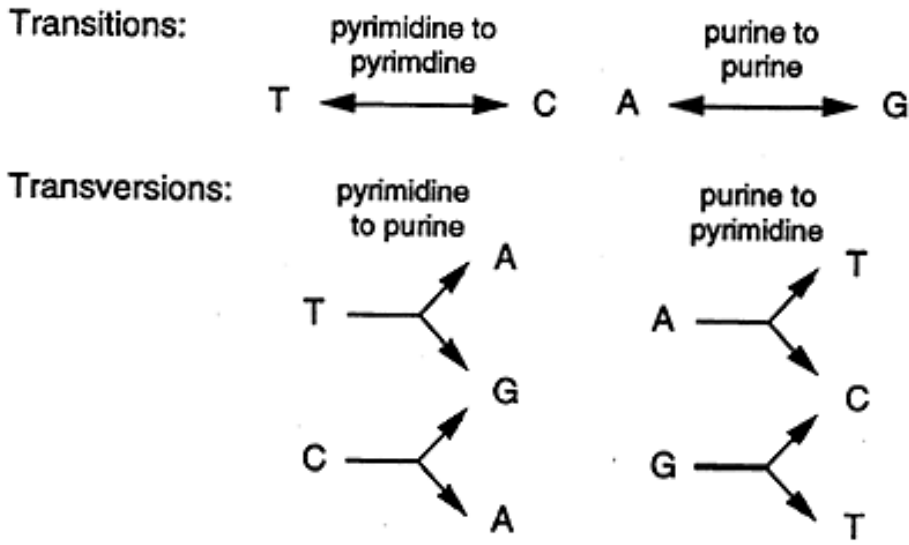
2.8.1. Mutasyon Tipleri

Üç tip DNA Mutasyonu vardır (132): Baz değişimleri (base substitutions), silmeler (deletions) ve eklemeler (insertions).

2.8.1.1. Baz değiştirmeler: Tek baz değişimine nokta mutasyonları denir Örn; orak hücre hastalığına neden olan Glu ----> Val nokta mutasyonu). Nokta mutasyonları en yaygın mutasyon türüdür ve iki türü vardır (Şekil 2.3).

Transizyon: Bu, bir pürin başka bir pürin ile ikame edildiğinde veya bir pirimidin başka bir pirimidin ile ikame edildiğinde meydana gelir.

Transversiyon: Bir pirimidin yerine bir pürin geldiğinde veya bir pürin bir pirimidin ile değiştiğinde.



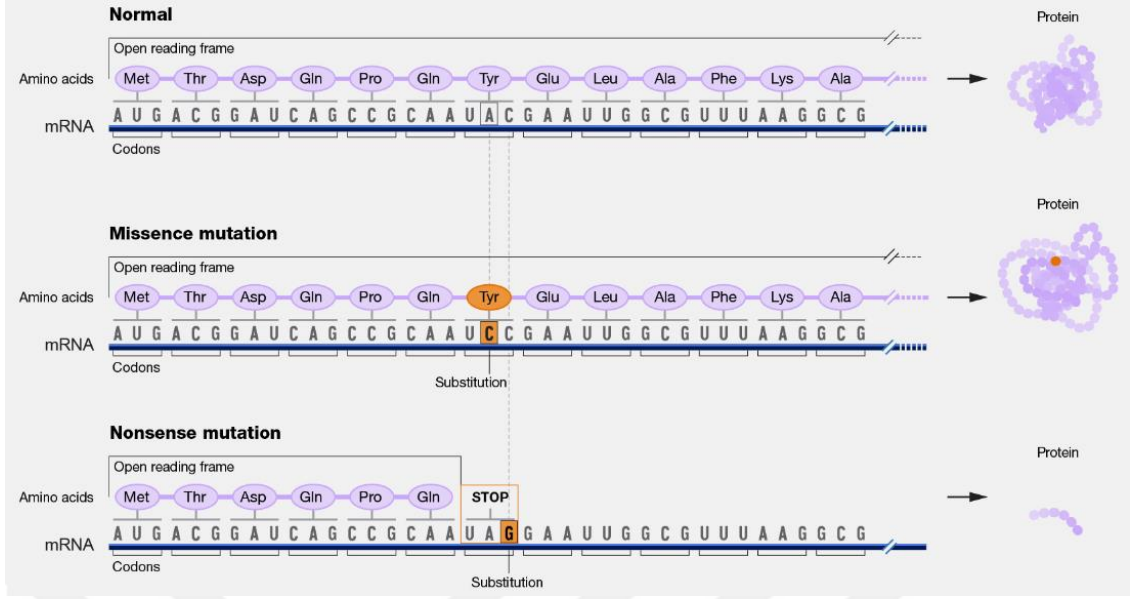
Şekil 2. 3: Baz değişimleri (transizyon ve transversiyon)

Proteinleri kodlayan DNA dizilerinde meydana gelen nokta mutasyonları ya sessiz (silent), yanlış (missense) ya da anlamsızdır (nonsense) (Şekil 2.4).

Sessiz (silent): Eğer kodonun üçüncü konumunda bir baz değişimi meydana gelirse, eş anlamlı bir kodonun üretilmesi için iyi bir şans vardır. Böylece gen tarafından kodlanan amino asit dizisi değişmez ve mutasyonun sessiz olduğu söylenir (130,132).

Yanlış (missense): Baz değişimi, farklı bir amino asidi belirten ve dolayısıyla farklı bir polipeptit dizisine yol açan bir kodonun üretilmesiyle sonuçlandığında olur. Amino asit süstitüsyonunun tipine bağlı olarak, yanlış anlamlı mutasyon ya konservatiftir ya da değildir. Örneğin, değişim olmuş amino asidin yapısı ve özellikleri orijinal amino aside çok benziyorsa, mutasyonun konservatif olduğu söylenir ve büyük olasılıkla elde edilen proteinlerin yapısı / işlevi üzerinde çok az etkisi olacaktır. Değişim, çok farklı yapı ve özelliklere sahip bir amino aside yol açarsa, mutasyon koruyucu değildir ve elde edilen proteinlerin yapısı / işlevi (yani orak hücre noktası mutasyonu) için muhtemelen zararlı (kötü) olacaktır (130,132).

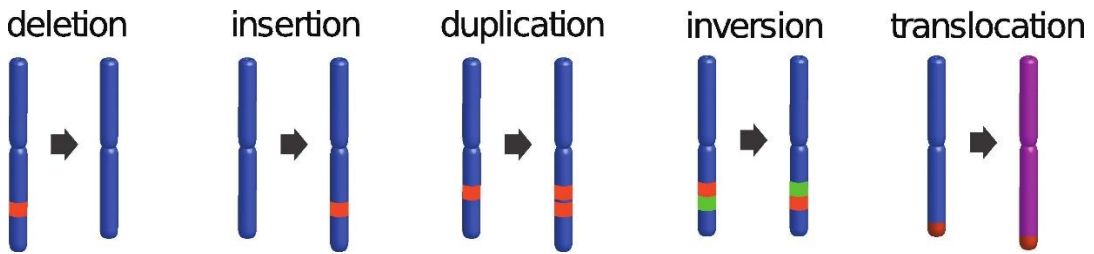
Anlamsız (nonsense): Bir baz değişimi, bir durdurma kodonunun nihayetinde translasyonu kesmesine ve büyük olasılıkla işlevsel olmayan bir proteine yol açmasına neden olur.



Şekil 2. 4: Mutasyon tipleri (133)

2.8.1.2. Silmeler (deletions): Çerçeve kaymasıyla sonuçlanan bir silme, DNA'dan bir veya daha fazla baz çifti kaybolduğunda sonuçlanır (Şekil 2.5). Bir veya iki baz silinirse, öteleme çerçevesi değiştirilir ve bu da bozuk bir mesaja ve işlevsiz bir ürüne neden olur. Üç veya daha fazla bazın silinmesi, okuma çerçevesini olduğu gibi bırakır. Bir veya daha fazla kodonun silinmesi, bir veya daha fazla amino asidin eksik olduğu bir proteinle sonuçlanır. Bu zararlı olabilir veya olmayabilir (130,132)

2.8.1.3. Eklemeler (insertions): Ek baz çiftlerinin eklenmesi, üç baz çiftinin katlarının eklenip eklenmediğine bağlı olarak çerçeve kaymalarına yol açabilir. Çeşitli sonuçlara yol açan ekleme ve silme kombinasyonları da mümkündür.

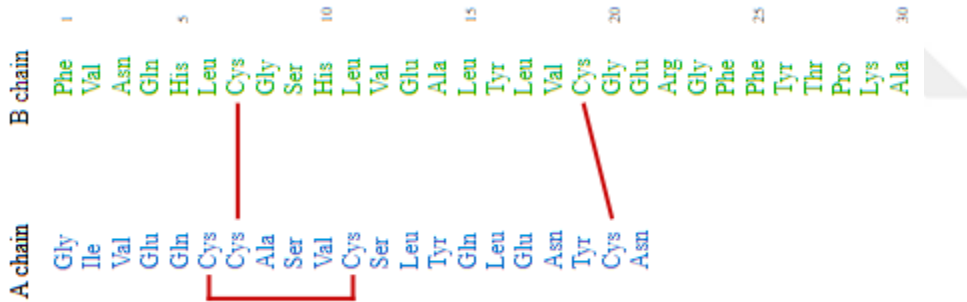


Şekil 2. 5: Yapısal varyasyonlar: Beş ana SV tipinin şematik gösterimi (16).

2.9. DNA DİZİLEME (SEKANSLAMA)

DNA dizileme yeteneği, moleküler patoloji alanı için çok önemlidir, çünkü dizi bilgisi PCR, PCR alternatifleri ve başarılı Southern blot analizi için gerekli olan problemlerle hibridizasyon için bir ön koşuldur. Geçen yetmiş yıllık süre içinde bir çok gelişme kaydetmiştir (15,16).1953'te Watson ve Crick, DNA'nın çift sarmal yapısını çözen ufuk açıcı makalelerini yayınladılar (134). Çalışmalarında, "bilindiği kadarıyla zincir boyunca bazların dizilişinin düzensiz olduğunu" ve "tek bir zincirdeki baz dizisinin hiçbir şekilde sınırlı görünmediğine" dikkat çektiler. Genetik bilginin depolanması ve zincir boyunca bazların tam sırasının belirlenmesinin önemini vurgulayarak DNA'nın iki önemli rolünü kaydettiler.

İnsülinle ilgili çalışmalarda, RNA önce RNase A ve RNase T1 ile parçalandı, parçalar kromatografi ile ayrıldı ve bozunma ürünleri dizisini çıkarmak için kullanıldı (135) (Şekil 2.6).

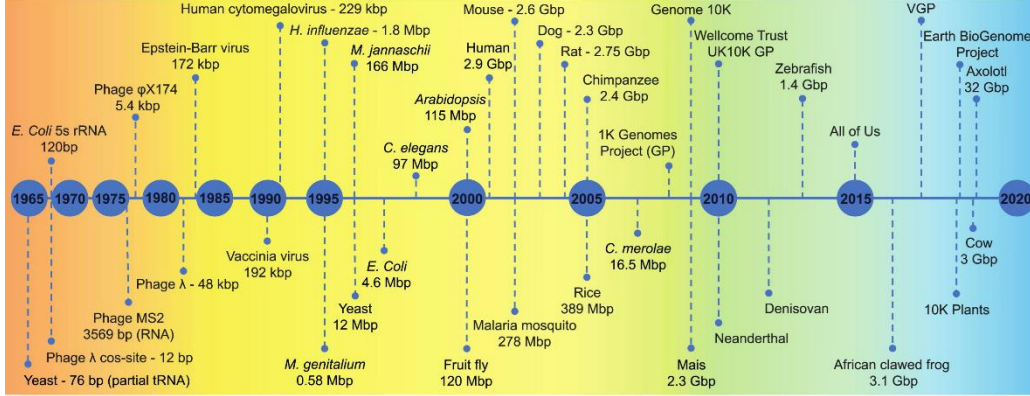


Şekil 2. 6: Sığır insülininin amino asit dizisi (135)

Not: Disülfid köprüleri kırmızı ile gösterilmiştir

1960'ların sonunda, RNA dizilimi hala DNA dizilimin önündeydi. 1968'de, faj λ kos-sitesinin 12 baz uzunluğundaki tamamlayıcı uçları dizilenen ilk DNA molekülleri (136). Aynı yıl, Sanger'in de dahil olduğu bir ekip, ^{32}P etiketli RNA ve kağıt fraksiyonasyon tabanlı bir yaklaşım kullanarak 120 baz çifti (bp) uzunluğunda 5s rRNA'yı belirledi (137). 1972'de Fiers, RNA virüsü faj MS2'den ilk geni, kaplama proteini geninin 510bp'sini diziledi (138). 1973'te Gilbert ve Maxam, DNA'sını RNA'ya kopyalayarak Escherichia coli laktöz baskılayıcı bağlanma bölgesinin 24 bazını rapor ettiler (139). 1976'da, faj MS2, 3569bp RNA genomunun tamamen sekanslandığı ilk

organizmaydı (140,141). 1970'lerin ortalarında, DNA dizileme gelişmek üzereydi. Dizileme teknolojisi son 40 yılda inanılmaz gelişmeler kaydetti (Şekil 2.7).



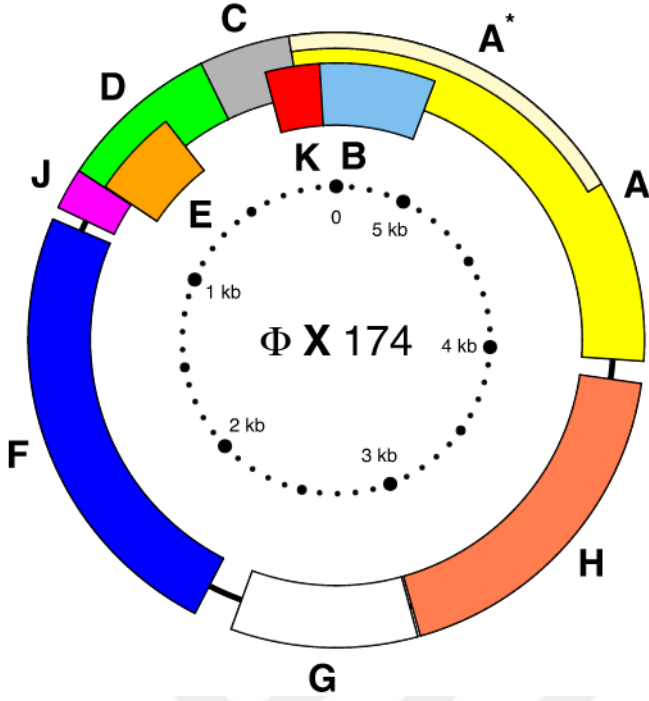
Şekil 2. 7: NGS evrimi

Not: Büyük genom birleştirme başarılarındaki kilometre taşlarını gösteren bir zaman çizelgesi. Arka plan rengi, ne tür dizilemenin kullanıldığını gösterir: Kırmızı, erken dizileme yöntemlerini, sarı, Sanger tabanlı yöntemleri, yeşil, NGS'yi ve mavi, üçüncü nesil dizilemeyi temsil eder (16).

2.9.1. Sanger Dizileme

1975'te Sanger ve Coulson (142), DNA dizilimi için 'artı ve eksi' yöntemini geliştirdiler ve bunu faj ϕ X174 tek sarmallı DNA'daki iki kısa bölgeyi belirlemek için kullandılar. Bu DNA dizileme yöntemi, hem klinik laboratuvarlarda hem de İnsan Genomu Projesi için gerçekleştirilen çoğu DNA dizilemenin temelini oluşturdu (Şekil 2.8).

Bir dizileme reaksiyonunun gerçekleştirilmesinden önce, dizilenecek DNA şablonunun uygun şekilde saflaştırılması ve miktarının belirlenmesi gerekir. Sekanslama reaksiyonunda kullanılmak üzere sekansa özgü bir tamamlayıcı primer sentezlenmelidir. Sekanslama primerleri aynı zamanda yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ile saflaştırılmış veya en azından tuzdan arındırılmış olmalıdır. Numuneler, kılcal damar içine enjeksiyon için rekabet edecek tuzlardan, fazla boyalardan ve fazla primerlerden kurtulmak için sekanslama reaksiyonunun ardından saflaştırılmalıdır. Reaksiyon sonrası saflaştırma için çok sayıda protokol ve ticari kit mevcuttur. Etanol çöktürme en ucuz saflaştırma yöntemidir, ancak çok sayıda jel filtrasyonu ve döndürme kolonu yöntemleri de kullanılabilir (15,16).



Şekil 2. 8: F. Sanger tarafından dizilenen bakteriyofaj ϕ X174'ün 5.386 bp'lik genomu.

Not: Her renkli blok bir geni temsil eder (141).

Sanger dizileme reaksiyonu, PCR'nin çok tekrarlı amplifikasyonu yerine lineer amplifikasyonlu tek bir DNA primeri ve DNA polimeraz kullanır. Sanger dizileme reaksiyonu için gerekli olan bileşenler şunları içerir; (143) düzinelere veya yüzlerce nükleotid uzunluğundaki DNA iplikçiklerindeki tek nükleotid uzunluk farklılıklarını net bir şekilde ayırt edebilen bir elektroforez tekniği, (144) ileri reaksiyonda kullanılan bir primer ile diziye özgü tamamlayıcı primerler ve her bir DNA şablon ipliği için ters reaksiyonda kullanılan (145) ve polimeraz reaksiyonunda kullanılan geleneksel deoksiribonükleosit trifosfatlara (dNTP'ler) ek olarak küçük oranlarda dideoksinükleosit eklenen trifosfatları (ddNTP'ler). Dideoksinükleotidler deoksinükleotid üzerinde bulunan bir OH grubu yerine 3' karbona bağlı bir hidrojen atomuna sahip olmasıyla deoksinükleotitlerden farklıdır. ddNTP'lerde bir 3'-hidroksil grubu bulunmadığından, yeni polimerize edilmiş DNA zincirinin uzaması, bir ddNTP dahil edildikten sonra gerçekleşemez (arabinonükleositler ayrıca uzama inhibitörleri olarak da kullanılabilir). Sonuç, bir dizi yeni ddNTP'nin zincirin 3' ucuna dahil edildiği noktaya göre belirlenen

uzunluk ile şablon DNA'yı tamamlayıcı olan ancak uzunluğu değişen sentezlenmiş DNA zincirleridir (130).

2.9.2. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

NGS teknolojisi yıllar içinde inanılmaz bir gelişme kaydetmiştir. Prensipten olarak, Sanger (142) ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin arkasındaki kavramlar benzerdir. Hem NGS hem de Sanger dizilemede (dideoksi veya kılcal elektroforez dizileme olarak da bilinir), DNA polimeraz floresan nükleotidleri büyüyen bir DNA şablon sarmalına birer birer ekler. Dahil edilen her nükleotit, floresan etiketi ile tanımlanır (13,14).

Sanger dizileme ve NGS arasındaki kritik fark, dizileme hacmidir. Sanger yöntemi bir seferde yalnızca tek bir DNA parçasını dizilerken, NGS büyük ölçüde paraleldir ve çalışma başına aynı anda milyonlarca parçayı diziler. Bu süreç, bir seferde yüzlerce - binlerce genin dizilenmesi anlamına gelir. NGS ayrıca derin dizileme ile yeni veya nadir varyantları tespit etmek için daha fazla keşif gücü sunar (13,15,16).

Sınırlı sayıda örnek veya genomik hedef (~20 veya daha az) üzerinde küçük bir DNA bölgesini sorgularken Sanger dizileme iyi bir seçim olabilir. Aksi takdirde, hedeflenen NGS'nin ihtiyaçları karşılama olasılığı daha yüksektir. NGS, daha fazla numuneyi uygun maliyetle taramaya ve genomun hedeflenen alanlarında birden fazla varyantı tespit etmeye olanak tanır; bu, Sanger dizileme kullanılarak maliyetli ve zaman alıcı olabilecek bir yaklaşımdır (13,14). Her iki yöntem arasındaki fark Tablo 2.4'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4: Sanger ve NGS dizilemede fayda ve zorluklar (13)

	Sanger Dizileme	Hedeflenen NGS
Faydalar	<ul style="list-style-type: none">• Az sayıda hedef için (1-20 hedef) hızlı, uygun maliyetli sıralama• Tanıdık iş akışı	<ul style="list-style-type: none">• Daha yüksek sıralama derinliği, daha yüksek hassasiyet sağlar (%1'e kadar)• Daha yüksek keşif gücü*• Daha yüksek mutasyon çözünürlüğü†• Aynı miktarda girdi DNA‡ ile üretilen daha fazla veri• Daha yüksek numune verimi
Zorluklar	<ul style="list-style-type: none">• Düşük hassasiyet (algılama sınırı ~%15–20)• Düşük keşif gücü• Çok sayıda hedef için (> 20 hedef) o kadar uygun maliyetli değil• Artan örnek giriş gereksinimleri nedeniyle düşük ölçeklenebilirlik	<ul style="list-style-type: none">• Düşük sayıda hedefi (1-20 hedef) sıralamak için daha az maliyetli• Az sayıda hedefi (1–20 hedef) sıralamak için zaman alıcı

Not: * Keşif gücü, yeni değişkenleri belirleme yeteneğidir. † Mutasyon çözünürlüğü, tanımlanan mutasyonun boyutudur. NGS, tek nükleotit varyantlarına kadar büyük kromozomal yeniden düzenlemeleri tanımlayabilir. ‡ 10 ng DNA, Sanger dizileme ile ~1 kb veya hedeflenen yeniden dizileme ile ~300 kb üretecektir (250 bp amplicon uzunluğu × 1536 amplicon, AmpliSeq for Illumina iş akışı ile)

2.9.3. Tüm Genom Dizileme (Whole-Genome Sequencing/WGS)

Tüm genom dizileme (WGS), tüm genomları analiz etmek için kapsamlı bir yöntemdir (13,14). Genomik bilgi, kalıtsal bozuklukların tanımlanmasında, kanserin ilerlemesini sağlayan mutasyonların karakterize edilmesinde ve hastalıkların izlenmesinde etkili olmuştur (130). Dizileme maliyetlerinin hızla düşmesi ve günümüzün dizileycileri ile büyük hacimli veri üretme yeteneği, tüm genom dizilemeyi genom araştırmaları için güçlü bir araç haline getiriyor (15,16).

Tüm Genom Dizilemenin avantajları şu şekilde sıralanabilir;

- ❖ Genomun yüksek çözünürlüklü, taban tabana görünümünü sağlar
- ❖ Hedeflenen yaklaşımlarla gözden kaçabilecek hem büyük hem de küçük varyantları yakalar
- ❖ Gen ekspresyonu ve düzenleme mekanizmalarının daha ileri takip çalışmaları için potansiyel nedensel varyantları tanımlar
- ❖ Yeni genomların birleştirilmesini desteklemek için kısa sürede büyük hacimli veriler sunar (15,16).

2.9.3.1. Büyük tüm genom dizileme (Large WGS): Büyük genomların (> 5 Mb) dizilenmesi, hastalık ve popülasyon düzeyindeki çalışmalar için değerli bilgiler sağlayabilir. Araştırmacılar genellikle tümörleri analiz etmek, hastalıkların nedenlerini araştırmak ve popülasyonlar arasındaki ortak genetik varyasyonları belirlemek için geniş tüm genom dizilimi kullanırlar (13,14).

2.9.3.2. Küçük tüm genom dizileme (Small WGS): Küçük genom dizileme (≤ 5 Mb), bir bakteri, virüs veya başka bir mikrobun tüm genomunun dizilenmesini ve ardından dizilim bilinen bir referansla karşılaştırılmasını içerir. Küçük mikrobiyal genomların dizilenmesi, halk sağlığı, bulaşıcı hastalık gözetimi, moleküler epidemiyoloji çalışmaları ve çevresel metagenomikte gıda testi için yararlı olabilir (13,14).

2.9.4. Tüm Ekzom Dizileme (Whole-Exome Sequencing/WES)

Tüm ekzom dizileme, genomun protein kodlayan bölgelerinin dizilenmesini içeren, yaygın olarak kullanılan bir yeni nesil dizileme (NGS) yöntemidir. İnsan ekzomu, genomun %2'sinden daha azını temsil eder, ancak bilinen hastalıkla ilgili varyantların ~%85'ini içerir, bu da bu yöntemi tüm genom dizilemesine uygun maliyetli bir alternatif haline getirir (15,16). Ekzom zenginleştirme kullanan ekzom dizilimi, popülasyon genetiği, genetik hastalık ve kanser çalışmaları dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesinde kodlama varyantlarını verimli bir şekilde tanımlayabilir (146).

Tüm genom ve ekzom dizileme arasındaki farklar şu şekilde özetlenebilir;

Bir numune veya birey içindeki eksiksiz genomik bilgi, tüm genom olarak bilinir. Ekzomlar, genomun protein kodlayan bölgeleridir ve topluca ekzom olarak bilinirler.

Ekzomun tüm genomdaki nispeten küçük oranına (yaklaşık %2) rağmen, hastalıkla ilgili bilinen varyantların çoğunu kodlar (15,16).

2.9.4.1. Tüm genom dizileme (WGS):

- ❖ Kodlayan, kodlamayan ve mitokondriyal DNA dahil olmak üzere tüm genomu analiz etmede
- ❖ Yeni genomik varyantları keşfetmede (yapısal, tek nükleotit, eklemeye-delesyon, kopya numarası)
- ❖ Gelecekteki hedefli çalışmalar için önceden bilinmeyen varyantları tanımlamada (13,14)

2.9.4.2. Tüm exome dizileme (WES):

- ❖ Verimlilik yeteneklerini artırmada
- ❖ Örnek başına maliyeti optimize etmede
- ❖ Yönetilebilir veri kümelerini analiz etmede ve veri depolamayı en üst düzeye çıkarmada

2.9.5. Üçüncü Nesil Dizileme (Third Generation Sequencing-TGS)

2010'lardan başlayarak, kökten yeni teknolojiler, Üçüncü Nesil Dizileme (TGS) çağını açtı (15,16,146). TGS değişik şekillerde tanımlanabilir, ancak genellikle amplifikasyon olmadan tek DNA moleküllerini dizileyebilen teknolojiler olarak adlandırılır. Günümüzde bu teknolojiler, her biri birkaç ila yüzlerce kbps'yi kapsayan NGS'den çok daha uzun okumalar üretmeye izin veriyor. (147). Genom montajı bağlamında, uzun okumaların mevcudiyeti büyük bir avantaj teşkil eder, çünkü NGS kısa okumaları arasındaki örtüşmeleri saptamanın zorluğu, uzun sürekli konsensüs dizileri oluşturma yeteneğini azaltır. Bu da montajların genel kalitesini etkiler (148). Bu sorun, tekrarlanan ve düşük karmaşıklıkta DNA bölgelerinin varlığıyla daha da kötüleşir.

Daha karmaşık genomlar ele alındıkça, aynı HMW DNA fragmanından kaynaklanan aynı barkodu paylaşan kısa okumaları gruplandırmak için kullanılan tekrar elemanlarının etkisi artar (149). Düşük karmaşıklık bölgelerinin 'ekstra' DNA'nın çoğundan sorumlu olduğu amfibilerinki gibi ekstra büyük genom boyutları, NGS tabanlı

WGS için pratik olarak aşılması zor bir engel oluşturur. TGS, benzeri görülmemiş kalitede (149,150) genom düzenekleri oluşturmak için bu eksikliklerin giderilmesini sağlar.

Dizileme işleminin toplam süresi platformun dizileme prosedürünü ne kadar zamanda tamamladığını ifade etmektedir. Bu süre genellikle 4 saat – 6 gün arasında değişmektedir. Tablo 2.5’de Illumina’ya ait farklı platformların toplam dizileme kapasitesinin, dizi okuma uzunluğunun ve dizileme işlemi sürelerinin yer aldığı tabloyu görebilirsiniz.

Tablo 2.5: Illumina platformlarına ait bazı bilgiler (151)

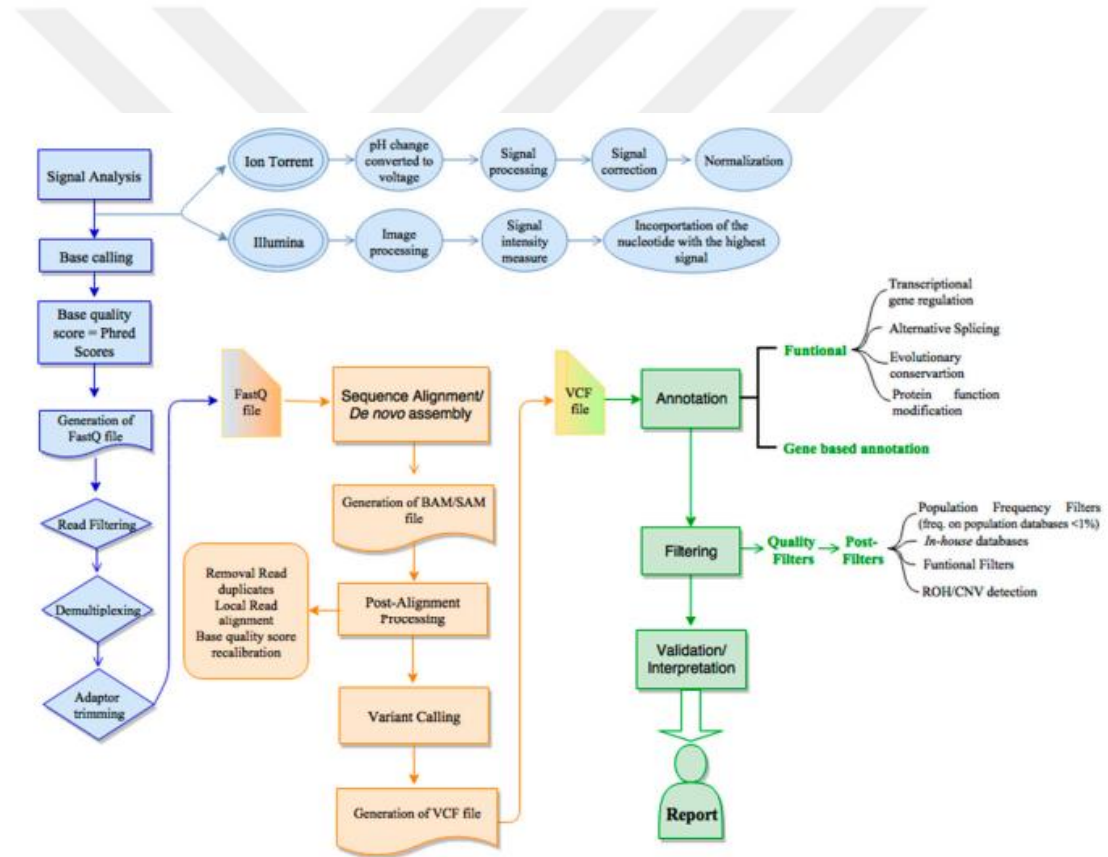
Illumina Platformları	MiniSeq	MySeq	NextSeq	HiSeq	HiSeq X	NovaSeq
Dizileme İşlemi Süresi	4–24 saat	4–55 saat	12–30 saat	< 1–3.5 gün (HiSeq 3000/HiSeq 4000) 7 saat–6 gün (HiSeq 2500)	< 3 gün	19–40 saat
Toplam Dizileme Kapasitesi	7.5 Gb	15 Gb	120 Gb	1500 Gb	1800 Gb	6000 Gb
Dizi Okuma Uzunluğu	25 Milyon	25 Milyon	400 Milyon	5 Milyar	6 milyar	20 milyar
Maksimum Okuma Uzunluğu	2x150 bç	2x300 bç	2 × 150 bç	2 × 150 bç	2 × 150 bç	2 × 150 bç

2.10. BİYOİNFORMATİK

2.10.1. Verilerin Analiz ve Yorumlanması

Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojileri, DNA/RNA molekülleri içindeki nükleotitlerin kesin sırasını belirlemek için yüksek verimli, hızlı ve doğru yöntemler sunar (146,152). Modern dizileme tekniklerinin ortaya çıkışından bu yana, nükleik asit dizilerinin tanımlanması, biyoloji biliminin tüm alanlarında her yerde bulunan ve temel

bir araç haline geldi. Buna bağlı olarak, biyoinformatik alanı, bu biyolojik verilerin yorumlanması ve uygulanmasının merkezinde yer alır. Çok çeşitli programatik diller tarafından uygulanan matematiksel ve istatistiksel yöntemleri kullanan biyoinformatik araçlar, biyolojik bilgileri moleküler, hücrel ve genomik düzeyde organize eder, analiz eder ve yorumlar. NGS ve biyoinformatiğin birleşik gücü teşhis, tıbbi tedavi ve epidemiyolojik araştırmalar için hayati önem taşımaktadır. NGS veri analizi süreci üç ana adımı içerir: birincil, ikincil ve üçüncül veri analizi. Bazı adımlar sıralama aletinde otomatik olarak gerçekleştirilir, diğer adımlar ise sıralama tamamlandıktan sonra gerçekleşir (152). Şekil 2.9'da yeni nesil dizileme (NGS) biyoinformatik iş akışının aşamaları özetlenmiştir.



Şekil 2. 9: Yeni nesil dizileme (NGS) biyoinformatik iş akışına genel bakış

Not: NGS biyoinformatik birincil (mavi), ikincil (turuncu) ve üçüncül (yeşil) analiz olarak alt bölümlere ayrılmıştır. Birincil veri analizi, ham verilerin saptanması ve analizinden oluşur. Ardından, ikincil analizde, okumalar referans insan genomuna (veya de novo toplanmış) göre hizalanır ve arama gerçekleştirilir. Son adım, varyant açıklamasını, varyant filtrelemeyi, önceliklendirmeyi, veri görselleştirmeyi ve raporlamayı içeren üçüncül analizdir. CNV— copy number variation; kopya sayısı değişimi; ROH— runs of homozygosity; homozigotluk dizileri, VCF— variant calling format değişken arama biçimi (153).

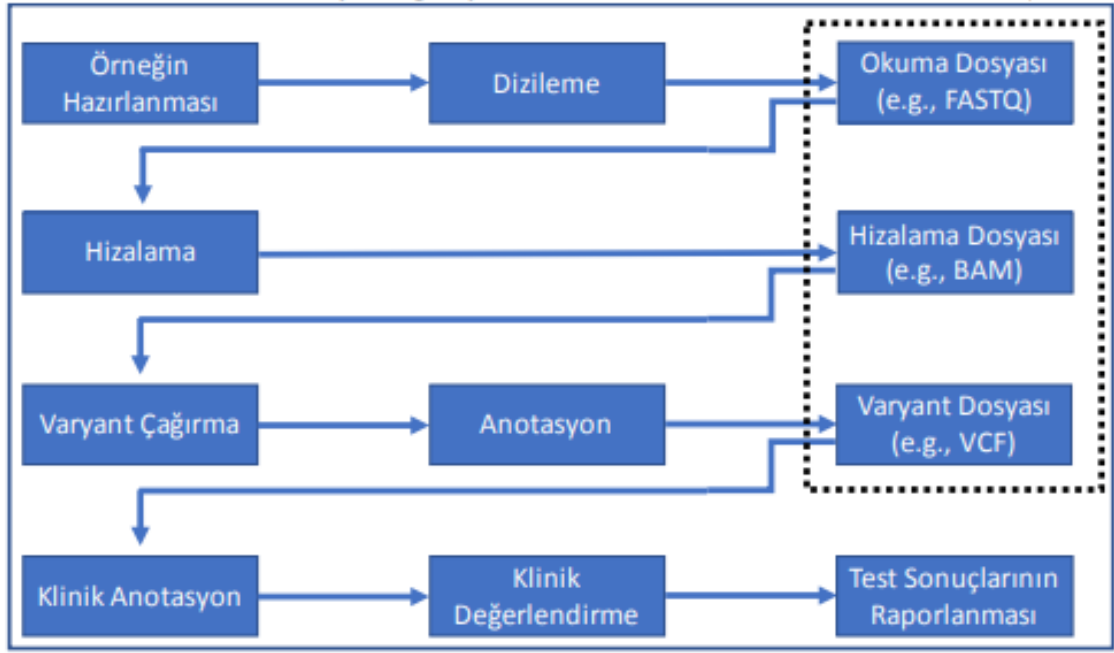
2.10.1.1. Birincil veri analizi: Gerçek Zamanlı Analiz (RTA) yazılımı, sıralama kimyası ve görüntüleme döngüleri sırasında çalışarak, DNA veya RNA sarmallarının birincil yapısını temsil eden baz çağruları ve ilişkili kalite puanları sağlar. Bu yerleşik yazılım, bazı ticari sıralama sistemlerinde birincil veri analizini otomatik olarak gerçekleştirilir.

2.10.1.2. İkincil veri analizi: DNA veya RNA fragmanlarının hizalanması ve birleştirilmesi, genetik varyantların belirlenebileceği bir numune için tam diziyi sağlar.

- ❖ *DNA Dizileme Veri Analizi;* Bazı ticari sunucular DNA dizisi hizalamasını, değişken çağırma ve veri görselleştirmeyi basitleştirmek ve ultra hızlı ikincil analiz sağlamak için sezgisel biyoinformatik araçlar sunar.
- ❖ *RNA Sıralama Veri Analizi;* Kullanıcı dostu yazılım araçları, gen füzyon tespitinden toplam RNA ekspresyon profili oluşturmaya kadar çok çeşitli RNA dizileme deneyleri için NGS veri analizini basitleştirir.

2.10.1.3. Üçüncül veri analizi: Dizi verilerinden, verileri bilgiye dönüştürmek için biyolojik veri madenciliği ve yorumlama araçlarını kullanılabilir.

2.10.1.4. Biyolojik verilerin yorumlanması: Genetik çeşitliliğin yorumlanması, temel biyolojiye, hastalıkların nedenlerine ve bunların nasıl tedavi edileceğine veya önleneyeğine ilişkin bilgi ve öngörülerini sağlar (154) (Şekil 2. 10).



Şekil 2. 10: Analizler sonrası üretilen dosya çeşitleri

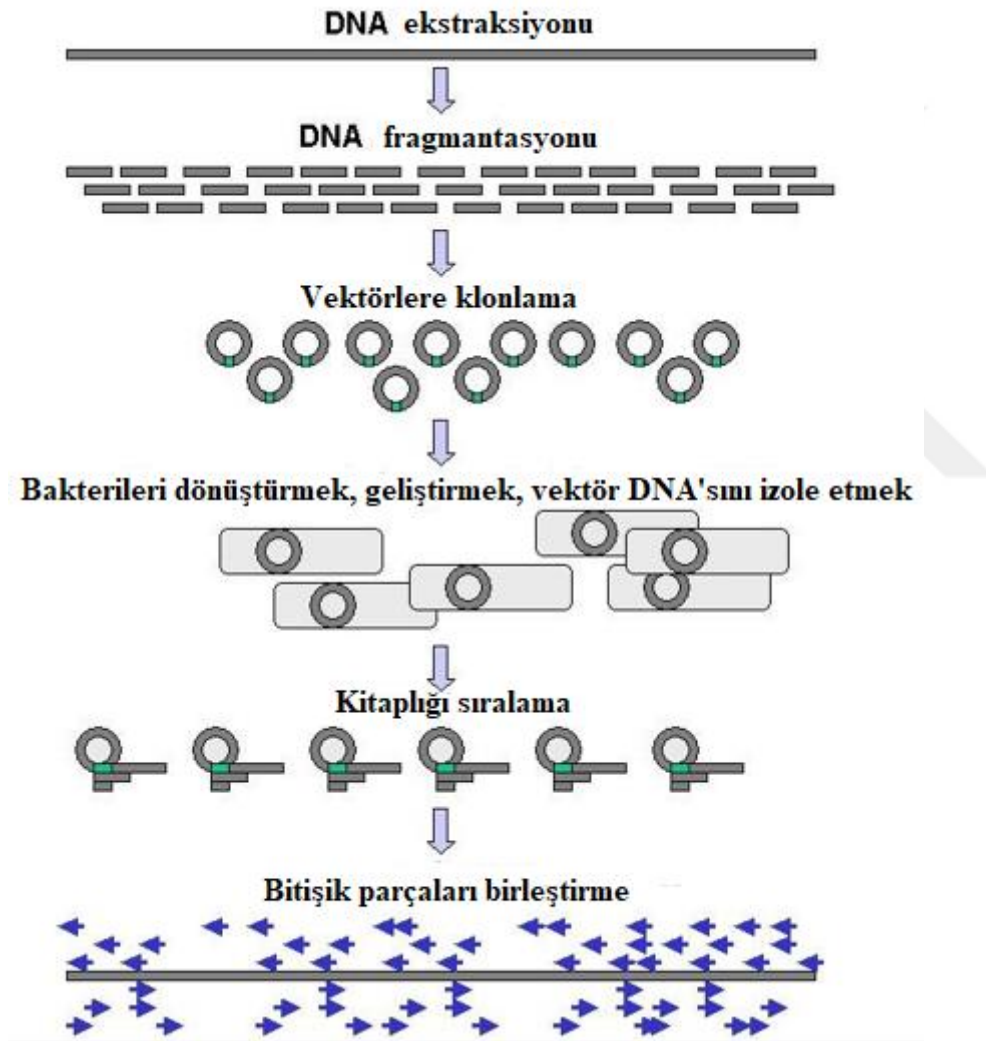
Not: J Mol Diagn 2017’den değiştirilerek alınmıştır (154).

2.10.2. NGS Kitaplığı (NGS Library)

NGS’de bir kitaplık, tüm genomu/transkriptomu veya bir hedef bölgeyi temsil eden bir DNA/RNA fragmanları koleksiyonu olarak tanımlanır (153). Her NGS platformunun kendine özgü özellikleri vardır, ancak basit bir ifadeyle, bir NGS kitaplığının hazırlanması, başlangıç materyalinin parçalanmasıyla başlar, ardından dizi bağdaştırıcıları, bu parçaların zenginleştirilmesine izin vermek için parçalara bağlanır (155). İyi bir kitaplık, büyük bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olmalıdır. Bu, ilgilenilen tüm parçaların kitaplıkta eşit şekilde temsil edilmesi ve rastgele hatalar (spesifik olmayan ürünler) içermemesi gerektiği anlamına gelir (156). Bununla birlikte, genomik bölgelerin dizilenmeye eşit derecede yatkın olmaması nedeniyle, hassas ve spesifik bir kitaplığın oluşturulmasını zorlaştırdığından, söylemesi yapmaktan daha kolaydır (153).

Nükleik asit fragmentasyonu üzerine fragmanlar, istenen kütüphane boyutuna göre seçilir (Şekil 2.11). Bu, NGS cihazının türü ve özel dizileme uygulaması ile sınırlıdır. Illumina ve Ion Torrent gibi kısa okunan sıralayıcılar, DNA kitaplıkları benzer boyutlarda daha kısa parçalar içerdiğinde en iyi sonuçları verir. Illumina fragmanları, Ion Torrent’ten daha uzundur ve 1500 baz uzunluğa kadar çıkabilir (155), Ion Torrent’te ise

fragmanların uzunluğu 400 baza kadar çıkabilir. Aksine, PacBio RS II (157) gibi uzun okumalı dizileyciler, bir DNA fragmanını tam olarak dizileyerek ultra uzun okumalar üretme eğilimindedir. En uygun kitaplık boyutu da sıralama uygulamasıyla sınırlıdır. Tüm genom dizilimi için daha uzun fragmanlar tercih edilirken, insan ekzonlarının çoğu 200 baz çiftinin altında olduğundan, RNA-seq ve ekzom dizilimi için daha küçük fragmanlar uygundur (158).

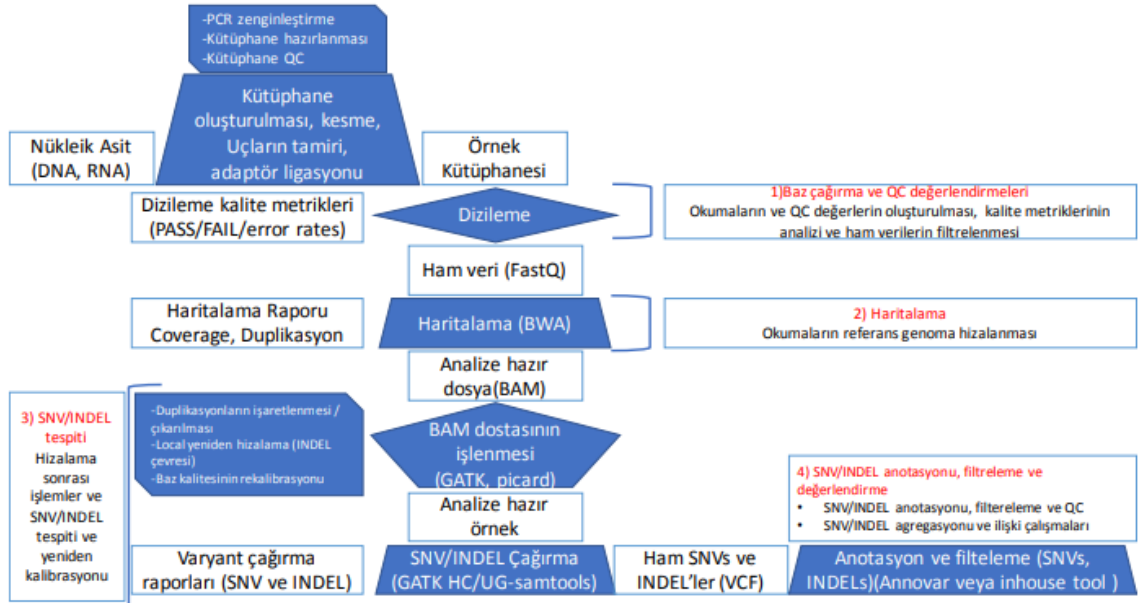


Şekil 2. 11: Genomik DNA'da sekanslama hazırlığı

Not: Rastgele parçalara bölünür ve bir bakteri kütüphanesi olarak klonlanır. Bireysel bakteri klonlarından DNA sekanslanır ve sekans, örtüşen DNA bölgeleri kullanılarak birleştirilir (153).

2.11. ISLAK LABORATUVAR ÇALIŞMALARI (WET-LAB)

Klinik laboratuvarlarda ıslak tezgah (wet bench) süreçlerinin ayrıntılı bir dokümantasyonu, kalite değerlendirmesinin hayati bir bileşenidir (159). Bu amaçla DNA izolasyonu ve küçük parçalara kesilmesi, kütüphane hazırlığı, barkodlama, örnek havuzu ve dizi üretimine ait tüm standart çalışma protokolleri kayıt altına alınmalı, böylece her bir adım ve sonraki manipülasyonlar takip edilmelidir (160) (Şekil 2.12).



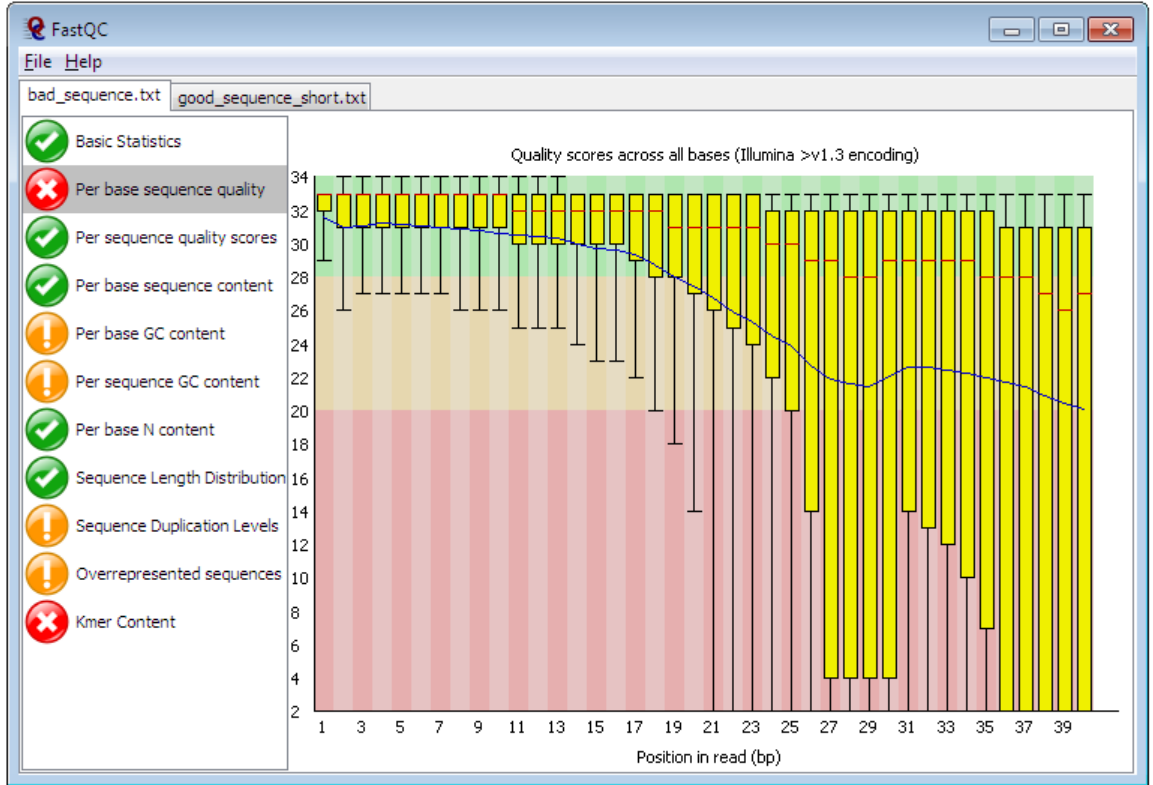
Şekil 2.12: Wet-lab ve dry lab ana işlemlerinin şematizasyonu

Not: Expert Rev Mol Diagn 2015'dan değiştirilerek alınmıştır (160).

2.12. KALİTE KONTROL

Okuma Filtreleme ve Kırpma (Read Filtering and Trimming) aşamalarında hem Ion Torrent hem de Illumina sıralamasında hatalar meydana geldiğinden, logaritmik bir hata olasılığı olan Phred puanı kullanılarak kalite puanları ile ifade edilir (161, 162). Bu nedenle, 10'luk bir Phred puanı (Q10), 10'da 1 olasılıkla yanlış olan veya %90.0'lık bir doğrulukla bir tabanı ifade eder ve Q30 için 1000'de 1 olasılıkla yanlış bir taban veya %99.9 doğruluk anlamına gelir. Fastq dosyaları, tüm ham sıralama okumalarını, dosya adlarını ve kalite değerlerini içerdiğinden, daha yüksek sayıların daha yüksek kaliteleri gösterdiğinden, ilk kalite kontrol adımı için önemlidir (162). Ham dizinin kalitesi, NGS

analizinin genel başarısı için kritik öneme sahiptir, dolayısıyla ham verilerin kalitesini değerlendirmek için NGS QC araç takımı, QC-Chain ve FastQC gibi birkaç biyoinformatik araç geliştirilmiştir (162,163). FastQC en popüler olanlardan biridir. Çıktı olarak FastQC, okuma kalitesinin farklı yönleri hakkında iyi yapılandırılmış ve grafiksel olarak resimlenmiş bilgiler içeren bir rapor verir (Şekil 2.13). Sekans okumaları yeterli kaliteye sahipse, sekanslar referans genomla hizalanmaya/haritalanmaya hazırdır. Phred puanı, dizileri filtrelemek ve kırmak için de kullanışlıdır. Bağdaştırıcı dizilerini kaldırmak için her okumanın sonunda ek kırpma gerçekleştirilir. Genel olarak kırpma adımı, okumaların toplam sayısını ve uzunluğunu azaltsa da, kaliteyi kabul edilebilir seviyelere yükseltir (159,162). Kırpma gerçekleştirmek için BTrim, IeeHom, AdapterRemoval ve Trimmonatic gibi Illumina verileriyle çeşitli araçlar geliştirildi (153). Yine de, en iyi araç yoktur, bunun yerine seçim, aşağı akış analizine ve kullanıcı tarafından kararlaştırılan parametreye bağlı yapılır.



Şekil 2. 13: Yüksek verimli sekans verileri için bir kalite kontrol aracı olan FastQC (163).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. OLGU SEÇİMİ VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLER

Retrospektif dizayn edilen çalışmada, 01.01.2007-31.12.2019 yılları arasında Bakırköy Dr. Sadi Konuk Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği'nde tiroidektomi materyaline ait parafin bloklarından elde edilen kesitleri incelenen ve medüller tip tiroid karsinomu tanısı alan hastalar alındı. Toplam 20 olgu saptandı. Olgulara ait Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı lamalar arşivden çıkarıldı. Papiller karsinom ile birliktelik gösteren mikst/kombine medüller kanser içeren 2 olgu, parafin bloklarına/H&E boyalı kesitlerine ulaşamayan 1 olgu, %30'dan az tümör alanı içeren 1 olgu ve 10 nanogram/mikrolitre (ng/μl) den az DNA içeren veya yetersiz DNA kalitesinde 3 olgu olmak üzere toplam 7 olgu çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya dahil edilen 13 olguya ait preparatların tamamı retrospektif olarak, board sertifikalı endokrin patolog (SA) tarafından yeniden değerlendirildi. Olguların patolojik evrelemesi WHO 2022 Endokrin Patoloji serisine (41) ve AJCC 8. baskısına (45) göre yapıldı.

Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22/07/2019 tarihli toplantısında ETİK KURUL: 2019-14-Karar numarası ile çalışma için onay alındı (Bkz. Ek).

3.1.1. Demografik Veriler

Hastalara ait tanı anındaki yaş, yerleşim yeri, cerrahi prosedür bilgileri, lokal/uzak yayılım gibi parametreler hastane elektronik bilgi yönetim sisteminden, tümör çapı, enkapsülasyon, histolojik tümör tipi, tümör derecesi, lenfatik-vasküler-perinöral invazyon, cerrahi sınır durumu, ekstra tiroidal yayılım, lenf nodu tutulumu gibi histopatolojik özellikler mikroskopik yeniden değerlendirme sonucu elde edildi. Takipte ulaşılabilen 13 hastanın son durum bilgileri, takip süresi, hastalısız sağkalım (DFS) ve genel sağkalım (OS) süreleri endokrin cerrahi kliniği tarafından sağlandı.

3.2. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

Olgulara ait H&E boyalı kesitlerin tamamı, endokrin patolog (SA) tarafından Nikon marka Eclipse Ni-U model mikroskopta incelendi. Histolojik alt tip verifikasyonu için DSÖ 2017 tiroid tümörleri sınıflaması (10) temel alındı.

3.2.1. Tümörün Gradelemesi

Bilimin güncel verileri, gelişmeleri izlemesine iyi bir örnek olacak şekilde çalışmalar devam ederken tez konusu ile ilgili güzel bir gelişme yaşandı: Bugüne kadar gradelemesi yapılmayan Tiroid Medüller kanserlerde tanımlanan yeni kriterlere göre artık derecelendirmeye gidildi. Memorial Sloan Kettering Cancer Center'den Bin Xu ve ark. (164) 2022 yılı ilk çeyreğinde medüller kanserlerde mitoz ve/veya Ki 67 proliferasyon indeksine, nekroz durumuna göre gradeleme yapılabileceğini ve bunun uluslararası geçerliliği olan kabul edilebilir bir sistem olduğunu çok merkezli bir çalışma ile gösterdiler. Buna göre aşağıdaki özelliklerden en az bir tanesini içeren tümörler high grade diğerleri low grade olarak derecelendirildi;

- 2 mm²'de 5 ya da daha fazla mitoz ($\geq 5/2\text{mm}^2$),
- Ki-67 proliferasyon indeksi %5'e eşit ya da daha büyük ($\geq 5\% \text{ Ki}67$),
- Ya da nekroz içerenler

Bu amaçla tümör örnekleri makalede belirtildiği şekilde H&E boyalı lamalar üzerinden nekroz ve mm²'deki mitoz sayılarına göre derecelendirildi.

3.2.2. Dezmozplazinin Değerlendirilmesi

Dezmoplastik stromal reaksiyon (dezmoplazi), invaziv epitelyal tümör hücrelerini çevreleyen yeni oluşan fibrotik (kollajenöz) bir stromanın varlığı olarak tanımlandı. Bu stroma oluşumunun miktarına ve kapsamına bakılmaksızın, yukarıda tanımlandığı gibi yoğun kollajenden zengin bir stroma gözlemlendiğinde, bir tümör dezmoplazi için pozitif kabul edildi. Sadece gevşek retiküler lifler ve damarlardan oluşan stroma, dezmoplastik stromal reaksiyon için negatif olarak sınıflandırıldı (113). Dezmoplazi skorlaması; negatif (0), hafif (1+), orta (2+) veya yoğun (3+) olarak kaydedildi (165).

3.2.3. Amiloid Birikiminin Değerlendirilmesi

Medüller kanserlerin bir özelliği olan amiloid birikimi (166) raporlama yaparken kullandığımız Cristal Viyole (CV) ve Kongo red (CR) histokimyasal boyama sonuçlarına göre yapıldı. Cristal Viole boyası çok hızlı solduğu için Kongo Red boyası ile polarize filtreli mikroskop altında birefringent (çift kırınım) veren elma yeşili renk değerlendirildi. Amiloid skorlaması; dezmoplaziye benzer şekilde birikim negatifse (0), hafif (1+), orta (2+) veya yoğun (3+) olarak kaydedildi.

3.2.4. C Hücre Hiperplazisinin Değerlendirilmesi

Mikroskopik olarak x100 büyütme alanında en az 50 hücre ve üzeri C hücre hiperplazisi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle C hücre hiperplazisi varlığı durumunda literatürde tanımlandığı şekilde fokal-nodüler-diffüz olarak sınıflandırıldı (47).

3.2.5. pTNM'ye Göre Evreleme

Olguların patolojik evrelemesi CAP 2022-Mart Tiroid Kanseri Protokolü (167) ve AJCC 8. Baskısına (45) göre yapıldı. Boyun diseksiyonu/lenf nodu diseksiyonu yapılan olgularda lenf nodlarına ait H&E kesitlerde metastaz varlığı araştırıldı; mikrometastaz pTNM sınıflamasında yer almadığından herhangi bir metastaz varlığı lenf nodu metastazı (LNM) olarak kabul edildi, şüpheli izole hücre odakları AJCC evrelemesini değiştirmemesi nedeniyle dikkate alınmadı.

3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM VE DEĞERLENDİRME

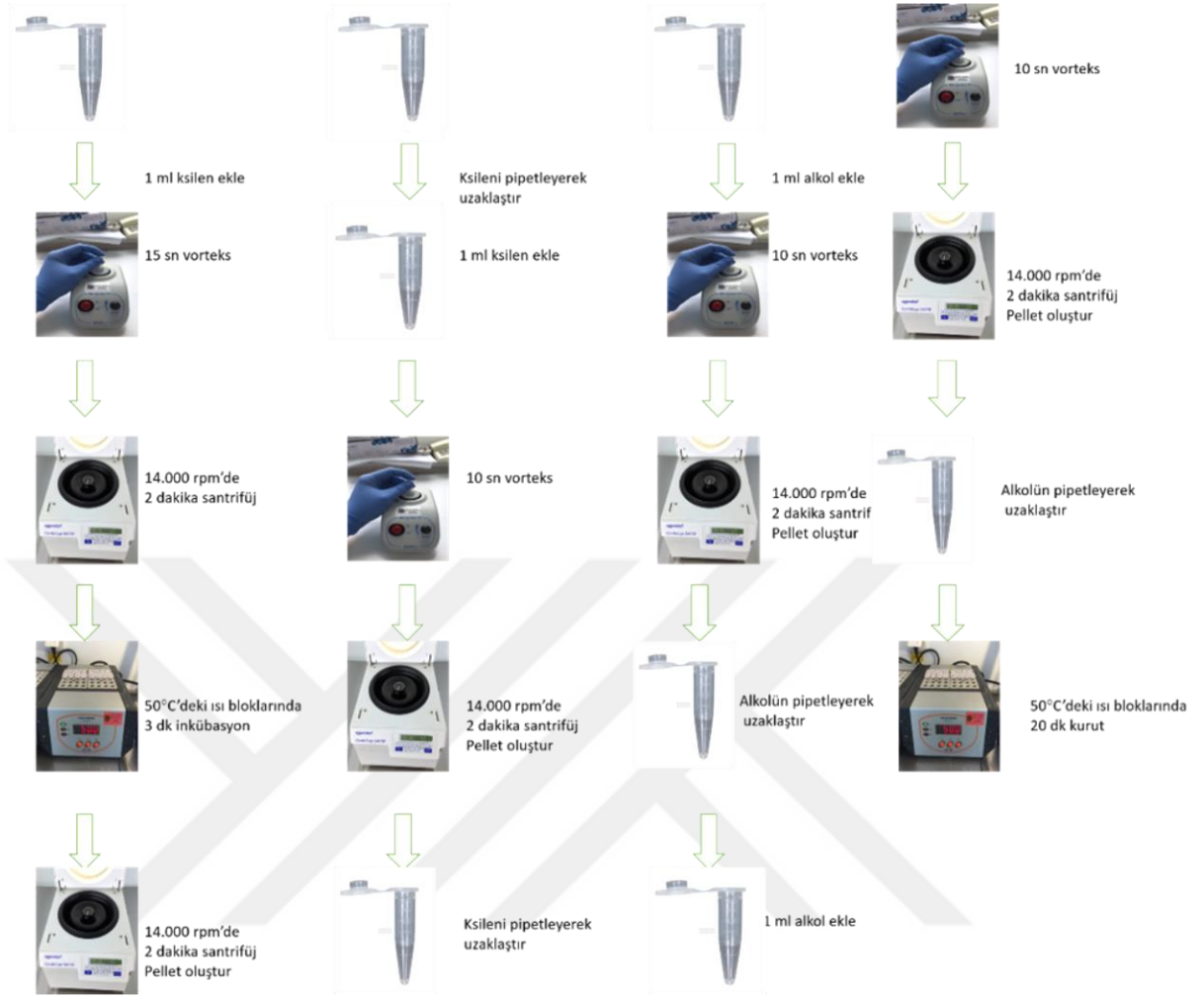
İmmünohistokimyasal değerlendirmenin standartlara göre yapılabilmesi için kontrol dokuları içermelidir. Bu nedenle Kalsitonin için normal tiroid dokusu içerisinde bulunan ve internal kontrol olarak kabul edilen C hücreleri referans alındı. Toplam 13 olguya ait nekroz ve hemoraji içermeyen, histomorfolojiyi optimal biçimde yansıtan bloklardan daha önce hazırlanan ve medüller kanser tanısı için gerekli olan (Laboratuvarımızda bulunan otomatik immünohistokimya cihazında (Dako Omnis); Kalsitonin (Rabbit Policlonal Anti-Human Kalsitonin, Ready to use) boyalı lamalar kullanıldı. Kalsitoninin tümör hücrelerindeki nükleer boyanması pozitif immünoreaktivite olarak kabul edildi. Kalsitonin boyanma yüzdesi 50 altı olanlar (< %50) ve yüzde elliye eşit veya üzeri olanlar (%50≤) şeklinde gruplandı.

3.4. MOLEKÜLER YÖNTEM

Seçilen medüller karsinom olgularına ait H&E boyalı lamlarda nekroz ve hemoraji içermeyen en az %30 tümör dokusu bulunan alanlar, Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu altında işaretlendi. H&E boyalı lamlara ait tümörlü parafin bloklardan 5'er µm kalınlığında, 5-10 adet doku kesiti alındı. Tümör dışı odaklar 11 numaralı bisturi ucu ile uzaklaştırıldı.

3.4.1. Örneklerden DNA İzolasyonu, DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

FFPE dokudan DNA izolasyonu, Quick DNA FFPE kit (Zymo Research, #D3067) ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. FFPE örneklerinden mikrotom ile (Leica, RM2235) 10 µm boyutunda 5-6 kesit alınarak 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere alınmış ve üzerine 400 uL deparafinizasyon solüsyonu eklenerek 55 °C'de 1 dk süreyle inkübe edildi. Ardından dokuların parçalanması için 2X Digestion buffer ve Proteinase K eklenerek 55 °C'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler 94 °C 20 dk boyunca ikinci bir inkübasyona alınmış ve ardından 5 µL RNase A eklenerek 5 dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. 350 µL Genomic Lysis Buffer eklenen örnekler iyice vorteksledikten sonra 135 µL isopropanol eklenerek 12.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant filtreli spin column üzerine eklenerek 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edilerek, DNA'nın spin column üzerine tutunması sağlandı. Genomic DNA Wash Buffer 1 ve 2 ile yapılan iki ayrı yıkama sonrasında spin columndan DNA, 50 µL DNA Elution Buffer kullanılarak elüe edildi. Elde edilen DNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri sırasıyla Genomic DNA ScreenTape Assay kiti kullanılarak TapeStation 4150 (Agilent) cihazında ve dsDNA BR Assay Kit kullanılarak Qubit 4.0 fluorometre ile gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Örneklerin OD260/280 değerleri ise Take 3 Plate kullanılarak Synergy Neo 2 Multi-Mode reader (BioTek) ile kaydedildi. DIN değeri $7 \geq OD260/280$ değeri 1.8-2.0 ve konsantrasyonu 20 ng/uL'nin üzerinde olan örnekler çalışmaya dahil edildi. DNA izolasyonunun hemen ardından kütüphane hazırlığı gerçekleştirileceği için, izole edilen DNA örnekleri +4°C'de saklandı.

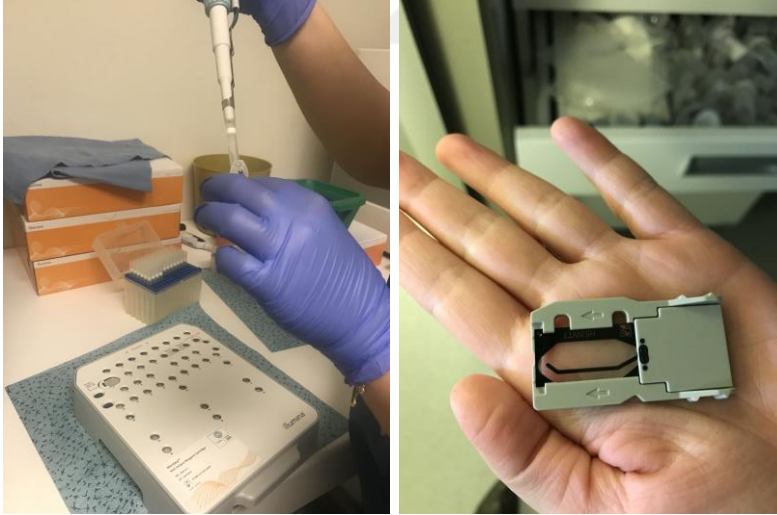


Şekil 3. 1: Deparafinizasyon akış şeması

3.4.2. Tüm Ekzom Dizileme (WES) Kütüphane Hazırlığı

FFPE dokulardan elde edilen DNA'ların WES kütüphane hazırlığı Sure Select XT HS /Low Input Target Enrichment with Pre-Capture Pooling kit (Agilent) kullanılarak Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Yeni Nesil Dizileme laboratuvarında gerçekleştirildi. Kütüphane hazırlığı öncesinde, konsantrasyonu belirlenen her bir genomik DNA (gDNA) örneği, 50 µL'de 100 ng gDNA olacak şekilde 1X TE Low TE buffer kullanılarak dilüe edildi. Dilüe gDNA örnekleri SureSelect XT HS and XT Low Input Enzymatic Fragmentation kit kullanılarak parçalanmış ve 150-200 bp boyutlarında DNA fragmanları elde edildi. Ardından Repair and dA-Tail işlemi ile DNA'nın 3' ucuna non-templated nükleotid eklenmesi gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 70 µL hacmindeki örnekler üzerine 25 µL Ligation Master

Mix ve her örnek için spesifik olmak üzere 5 μ L Adaptor Oligo Mix eklenerek örnekler adaptörler bağlandı. AMPure XP beadler kullanılarak gerçekleştirilen yıkama işlemleri sonrasında elde edilen adaptör bağlı kütüphaneler Pre-Capture PCR Amplifikasyonu ile çoğaltıldı. Amplifiye edilen kütüphane örneklerinde istenmeyen fragmanlar AMPure XP beadler ile uzaklaştırılmış ve hazırlanan kütüphane örnekleri D1000 ScreenTape Assay kit kullanılarak analiz edildi. Her bir örnekten eşit hacim alınarak 8 örnek tek tüpte pool edilmiş ve toplamda 1500 ng indekslenen örnekler, Capture Library ve SureSelect Fast Hybridization Buffer kullanılarak hibridize edildi. Hibridize edilen kütüphane örnekleri Streptavidin kaplı beadler ile yakalanarak beadlerden elüe edilmiş ve ardından elde edilen kütüphaneler Post Capture PCR Amplifikasyonu ile çoğaltıldı. Çoğaltılan kütüphane örnekleri AMPure XP beadler kullanılarak yıkanmış ve beadler tarafından tutulan kütüphane örnekleri 25 μ L Low TE buffer ile çözülerek kütüphane konsantrasyonu ve büyüklüğü High Sensitivity D1000 kiti ile TapeStation 4150 cihazında ölçülerek kaydedildi. Her bir kütüphanenin konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, dizileme işlemine kadar kütüphane örnekleri -20°C’de muhafaza edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2: Pipetle alınan uygun konsantrasyon ürünün flow cell denen plaka üzerine yerleştirilmesi

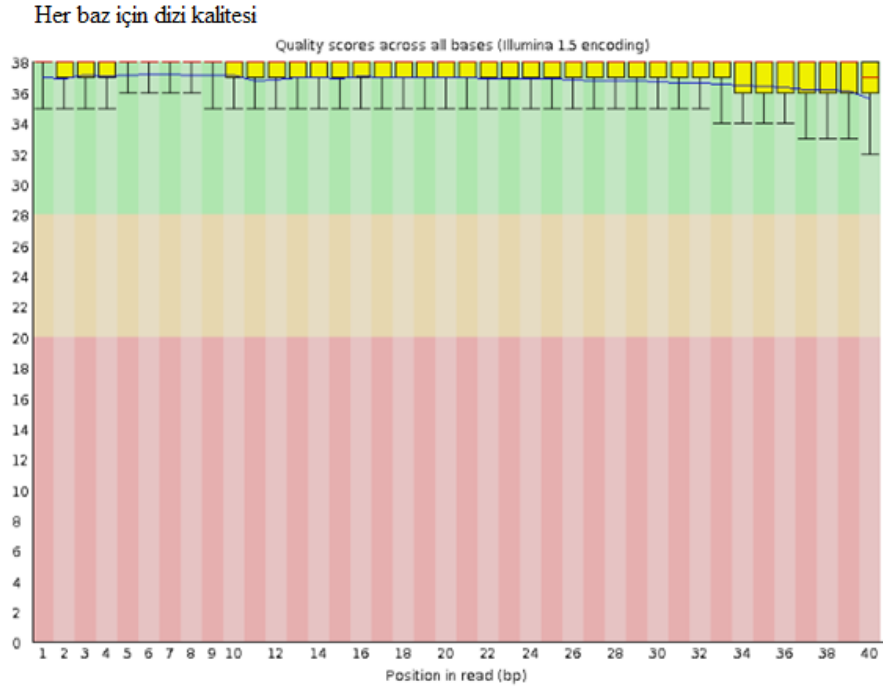
3.4.3. WES Kütüphanelerinin Analizi

Hazırlanan kütüphane örnekleri NovaSeq 6000 Sequencing System Guide kullanılarak analiz için hazırlandı. Elde edilen kütüphane örnekleri 2nM olacak şekilde

pool edilmiş ve 2.5 nM PhiX eklendikten sonra 0.2 NaOH ile denatüre edildi. PhiX içeren denatüre kütüphanelerin analizleri, SP flowcell 300 cys kit kullanılarak Novaseq 6000'de gerçekleştirildi. Analizlere ilişkin temel kalite ölçümleri aşağıda sunuldu: (Şekil 3.3 - 3.6).

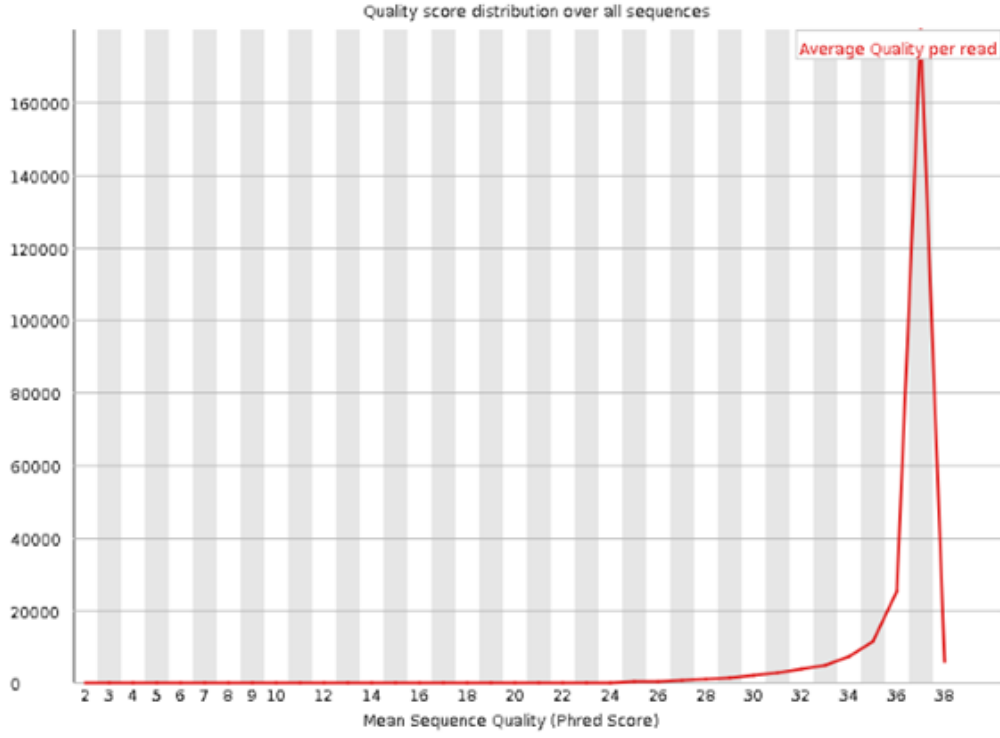
Measure	Value
Filename	good_sequence_short.txt
File type	Conventional base calls
Encoding	Illumina Novaseq 6000
Total Sequences	250000
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	40
%GC	45

Şekil 3. 3: NovaSeq6000 cihazı ile yapılan iyi kalite NGS dizi analizi



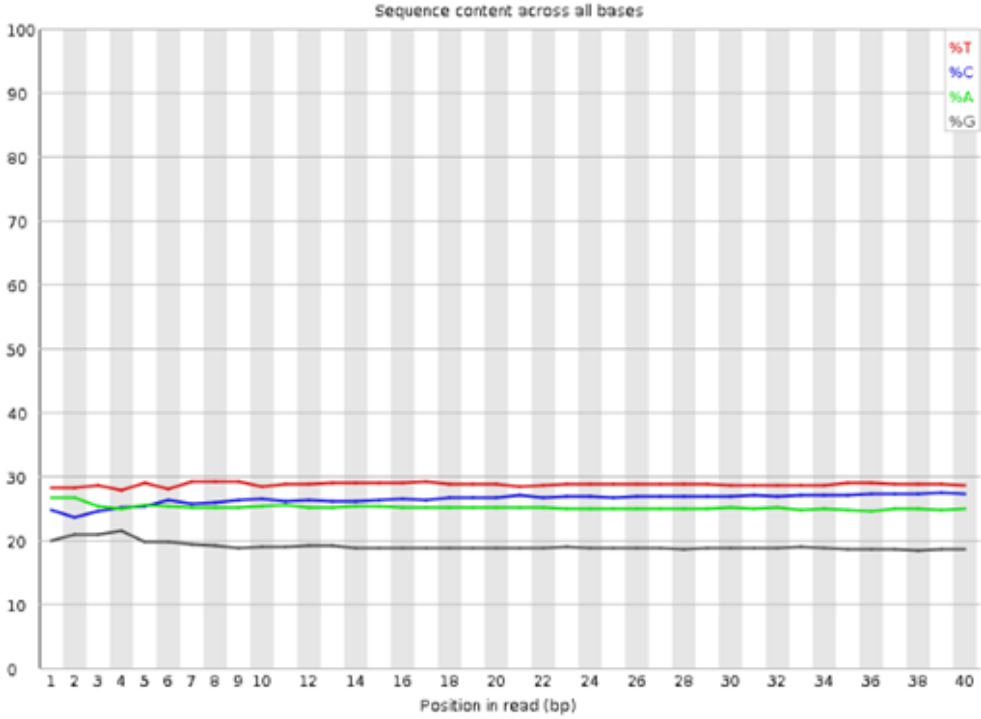
Şekil 3. 4: Her baz için doğrulanmış dizi kalitesi

Her dizi için Phred Skor



Şekil 3. 5: Her dizi için Phred skoru

Her baz için dizi içeriği



Şekil 3. 6: Her baz için uygun dizi içeriği

3.4.4. İlgili Genlerin Bakılması ve Tüm Ekzom Analizinin (Wes) Yapılması

Kombine/mikst tümör olmayan, yeterli tümör alanı içeren (en az %30) ve nekroz bulandırmayan tiroid medüller karsinom tanılı parafin bloklar TUBİTAK MAM Tıbbi Biyoloji ve Genetik Mühendisliği bölümünde NGS analizi için değerlendirildi. Yeterli ve kaliteli miktarda DNA içeren örneklerden WES analizi yapıldı. İşlemler İllumina NovaSeq 6000 (USA) cihazında gerçekleştirildi.

Planlandığı şekilde RET geni dahil 63 gene (*ABL1, AKT1, ALK, AXL, APC, ATM, BRAF, CALCA, CCND1, CDH1, CSF1R, CTNNA1, DDR2, EGFR, ERBB2, FBXW, FGFR1, FGFR2, FGFR3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1α, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAZ3, KDR, KIT, KRAS, KRT20, KRT7, MAP2K1, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PIK3CA, PPARG, PTEN, PTH, PTPN11, RB1, RAF1, RET, ROS1, SLC5A5, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, THADA, TP53, TTF1, VHL*) bakıldı.

Medüller kanserler daha çok RET geni ile ilişkili olduğundan öncelikle 10. Kromozom üzerindeki RET geni üzerine yoğunlaşıldı. Aynı zamanda sporadik tümörlerde de en sık görülen mutasyon olan ekzom 16' daki M918T mutasyonu araştırıldı. 1. aşamada ilgili analiz tüm WES baz alınarak yapıldı, 2. aşamada ise yukarıda da bahsi geçen 63 genlik listede mevcut olan genlerden herhangi birinde sadece ilgili hastaya özel bir mutasyon olup olmadığına bakıldı.

3.5. BİYOLOJİK YOLAK ZENGİNLEŞTİRME YÖNTEMİ

Çalışmanın bir sonraki basamağında kullanmak üzere KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanını baz alarak bir biyolojik yolak zenginleştirme analizi yapıldı (168). Burada amaç; ilgili genlerin her birinin katıldığı biyolojik yolları görmek ve bunlar arasından hastalık ile direkt ilişkilendirilenler/dikkat çekenler veya önemli olabileceği düşünülenleri seçmektir. Bu şekilde listelenmiş bir yolağın hedef hastalık için ilginç bir bulgu olabileceğinin ön görülmesi durumunda ilgili yolda görev alan fakat 63 genlik liste içerisinde bulunmayan diğer genleri de böylece inceleme imkanı olacaktı (168). Tüm yollar ve ilişkili genler tabloda gösterildi (Tablo 3. 1).

Tablo 3.1: Biyolojik yollar ve ilişkili genler

1	Term	Overlari P-value	Adjusted P-value	Old P-value	Old Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
2	Pathways in cancer	35/531 8,83236E-46	1,65165E-43	0	0	114,4144825	11869,41472	ALK, RB1, RET, CSF1R, NOTCH1, FLT3, PTEN, EGFR, NRAS, CDH1, GNA11, ERBB2, ABL1, AKT1, VHL, JAK2, HRAS, JAK3, PDGFRA, SMAD4, BRAF, MLH1, APC, PIK3CA, SMO,
3	Central carbon metabolism in cancer	18/70 2,42132E-33	2,26394E-31	0	0	237,5450928	17839,87267	RET, PDGFRA, FLT3, IDH1, PTEN, EGFR, NRAS, PIK3CA, ERBB2, KIT, AKT1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, TP53, FGFR2, FGFR1
4	Rap1 signaling pathway	20/210 8,02145E-28	5,00004E-26	0	0	77,04873294	4807,090736	CSF1R, PDGFRA, SRC, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, CDH1, GNAQ, KIT, KDR, GNAS, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, FGFR2, FGFR1
5	PI3K-Akt signaling pathway	22/354 1,47105E-26	6,87717E-25	0	0	52,00746988	3093,468481	CSF1R, PDGFRA, FLT3, PTEN, EGFR, NRAS, STK11, PIK3CA, ERBB4, ERBB2, KIT, KDR, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3, FGFR3, MET, TP53, FGFR2, FGFR1
6	Endometrial cancer	14/58 1,72795E-25	6,46254E-24	0	0	191,9600551	10945,11894	PTEN, BRAF, MLH1, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, CDH1, ERBB2, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53
7	Gastric cancer	17/146 5,93514E-25	1,84979E-23	0	0	85,08015152	4746,646572	RB1, SMAD4, BRAF, MLH1, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, CDH1, ERBB2, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, MET, TP53, FGFR2
8	Prostate cancer	15/97 4,11863E-24	1,03529E-22	0	0	113,5918445	6116,525609	RB1, PDGFRA, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, ERBB2, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53, FGFR2, FGFR1
9	Melanoma	14/72 4,9827E-24	1,03529E-22	0	0	145,522466	7808,163719	RB1, PDGFRA, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, CDH1, AKT1, KRAS, HRAS, MET, TP53, FGFR1
10	Non-small cell lung cancer	14/72 4,9827E-24	1,03529E-22	0	0	145,522466	7808,163719	ALK, RB1, RET, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, ERBB2, AKT1, KRAS, HRAS, JAK3, MET, TP53
11	Breast cancer	16/147 3,87827E-23	7,25236E-22	0	0	78,09702044	4030,124049	RB1, NOTCH1, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, ERBB2, KIT, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53, FGFR1
12	Proteoglycans in cancer	17/205 1,6225E-22	2,75826E-21	0	0	59,57535461	2989,068365	SRC, BRAF, PTPN11, EGFR, NRAS, PIK3CA, SMO, ERBB4, ERBB2, KDR, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, MET, TP53, FGFR1
13	Ras signaling pathway	17/232 1,38757E-21	2,1623E-20	0	0	52,02263566	2498,477206	CSF1R, PDGFRA, FLT3, PTPN11, EGFR, NRAS, PIK3CA, KIT, ABL1, KDR, AKT1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, FGFR2, FGFR1
14	MAPK signaling pathway	18/294 1,89583E-21	2,72708E-20	0	0	44,25112444	2111,426043	CSF1R, PDGFRA, FLT3, BRAF, EGFR, NRAS, ERBB4, ERBB2, KIT, KDR, AKT1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, TP53, FGFR2, FGFR1
15	Bladder cancer	11/41 1,02243E-20	1,86567E-19	0	0	202,9194444	9340,284946	RB1, NRAS, SRC, CDH1, ERBB2, BRAF, KRAS, HRAS, FGFR3, TP53, EGFR
16	Hepatocellular carcinoma	15/168 2,30308E-20	2,87117E-19	0	0	60,66176471	2742,970585	RB1, SMAD4, SMARCB1, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, MET, TP53
17	Colorectal cancer	12/86 8,30815E-19	9,71015E-18	0	0	92,1034749	3834,440786	NRAS, SMAD4, APC, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, BRAF, KRAS, MLH1, HRAS, TP53, EGFR
18	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	13/143 8,35586E-18	9,19145E-17	0	0	58,30294118	2292,679711	SMAD4, NRAS, APC, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3, FGFR3, FGFR2, FGFR1
19	Glioma	11/75 1,49882E-17	1,55711E-16	0	0	94,95616319	3678,532261	RB1, PDGFRA, NRAS, PIK3CA, PTEN, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS, TP53, EGFR
20	Chronic myeloid leukemia	11/76 1,74958E-17	1,72195E-16	0	0	93,49059829	3607,294744	RB1, NRAS, SMAD4, PIK3CA, ABL1, AKT1, BRAF, PTPN11, KRAS, HRAS, TP53
21	ErbB signaling pathway	11/85 6,42151E-17	6,00411E-16	0	0	82,08295796	3060,405043	NRAS, PIK3CA, SRC, ERBB4, ERBB2, ABL1, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS, EGFR
22	Human cytomegalovirus infection	14/225 8,51543E-17	7,58279E-16	0	0	39,69381014	1468,753002	RB1, PDGFRA, SRC, EGFR, NRAS, PIK3CA, GNA11, GNAQ, GNAS, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53
23	MicroRNAs in cancer	15/310 2,45413E-16	2,08601E-15	0	0	31,23622881	1122,742112	PDGFRA, NOTCH1, PTEN, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, ERBB2, ABL1, ATM, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, TP53
24	Hepatitis B	12/162 2,15857E-15	1,75501E-14	0	0	45,264	1528,534879	RB1, NRAS, SMAD4, PIK3CA, SRC, AKT1, BRAF, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3, TP53
25	Calcium signaling pathway	13/240 7,56592E-15	5,89511E-14	0	0	33,22596528	1080,346328	RET, PDGFRA, EGFR, ERBB4, GNA11, GNAQ, ERBB2, KDR, GNAS, FGFR3, MET, FGFR2, FGFR1
26	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway	10/89 8,18146E-15	6,11973E-14	0	0	67,99178926	2205,443289	ALK, NRAS, PIK3CA, PTEN, AKT1, PTPN11, KRAS, JAK2, HRAS, EGFR
27	FoxO signaling pathway	11/131 8,84928E-15	6,36467E-14	0	0	50,50069444	1634,123725	NRAS, STK11, SMAD4, PIK3CA, PTEN, AKT1, BRAF, ATM, KRAS, HRAS, EGFR
28	Thyroid cancer	8/37 1,81993E-14	1,22593E-13	0	0	140,9301503	4458,662496	RET, NRAS, CDH1, CTNNB1, BRAF, KRAS, HRAS, TP53
29	Human papillomavirus infection	14/331 1,83562E-14	1,22593E-13	0	0	26,27894083	831,1715855	RB1, NOTCH1, PTEN, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, GNAS, AKT1, CTNNB1, ATM, KRAS, HRAS, TP53
30	Focal adhesion	12/201 2,92871E-14	1,88852E-13	0	0	35,85306122	1117,239749	PDGFRA, PIK3CA, SRC, ERBB2, PTEN, KDR, AKT1, CTNNB1, BRAF, HRAS, MET, EGFR
31	Acute myeloid leukemia	9/67 3,74378E-14	2,33362E-13	0	0	81,24092559	2511,652198	CSF1R, NRAS, PIK3CA, FLT3, KIT, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS
32	Renal cell carcinoma	9/69 4,94514E-14	2,98304E-13	0	0	78,525	2405,832072	NRAS, PIK3CA, AKT1, BRAF, PTPN11, KRAS, VHL, HRAS, MET
33	Regulation of actin cytoskeleton	12/218 7,75051E-14	4,52921E-13	0	0	32,86601942	992,1736074	PDGFRA, NRAS, APC, PIK3CA, SRC, BRAF, KRAS, HRAS, FGFR3, EGFR, FGFR2, FGFR1
34	Pancreatic cancer	9/76 1,22834E-13	6,96062E-13	0	0	70,29615082	2089,759703	RB1, SMAD4, PIK3CA, ERBB2, AKT1, BRAF, KRAS, TP53, EGFR
35	Gap junction	9/88 4,82596E-13	2,65428E-12	0	0	59,58227848	1689,729324	PDGFRA, NRAS, SRC, GNA11, GNAQ, GNAS, KRAS, HRAS, EGFR
36	Phospholipase D signaling pathway	10/148 1,48316E-12	7,92432E-12	0	0	38,80728555	1056,988034	PDGFRA, NRAS, PIK3CA, KIT, GNAS, AKT1, PTPN11, KRAS, HRAS, EGFR
37	Human T-cell leukemia virus 1 infection	11/219 2,59976E-12	1,35043E-11	0	0	29,00574252	773,745649	RB1, NRAS, SMAD4, PIK3CA, PTEN, AKT1, ATM, KRAS, HRAS, JAK3, TP53
38	Hepatitis C	10/157 2,68449E-12	1,35676E-11	0	0	36,41478213	970,2183308	RB1, NRAS, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, BRAF, KRAS, HRAS, TP53, EGFR
39	Adherens junction	8/71 4,7282E-12	2,32677E-11	0	0	64,76190476	1688,827081	SMAD4, SRC, CDH1, ERBB2, CTNNB1, MET, EGFR, FGFR1
40	Growth hormone synthesis, secretion and action	9/119 7,74697E-12	3,62171E-11	0	0	42,72416268	1093,043001	NRAS, PIK3CA, GNA11, GNAQ, GNAS, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS
41	Neurotrophin signaling pathway	9/119 7,74697E-12	3,62171E-11	0	0	42,72416268	1093,043001	NRAS, PIK3CA, ABL1, AKT1, BRAF, PTPN11, KRAS, HRAS, TP53
42	Thyroid hormone signaling pathway	9/121 9,0171E-12	4,11268E-11	0	0	41,95700188	1067,046184	NRAS, NOTCH1, PIK3CA, SRC, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53
43	Chemokine signaling pathway	10/192 1,99861E-11	8,89856E-11	0	0	29,35996436	723,3116705	NRAS, PIK3CA, SRC, GNAQ, AKT1, BRAF, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3

Tablo 3.1 (devam)

44	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	10/193	2,10426E-11	9,15106E-11	0	0	29,19805051	717,8187284	RB1,NRAS,PIK3CA, SRC, AKT1, CTNNB1, KRAS, JAK2, HRAS, TP53
45	Estrogen signaling pathway	9/137	2,78195E-11	1,18233E-10	0	0	36,68277138	891,5852383	NRAS, PIK3CA, SRC, GNAQ, GNAS, AKT1, KRAS, HRAS, EGFR
46	GnRH signaling pathway	8/93	4,35639E-11	1,81032E-10	0	0	47,94690799	1143,859413	NRAS, SRC, GNA11, GNAQ, GNAS, KRAS, HRAS, EGFR
47	VEGF signaling pathway	7/59	7,71817E-11	3,1376E-10	0	0	66,97451923	1559,492216	NRAS, PIK3CA, SRC, KDR, AKT1, KRAS, HRAS
48	Long-term depression	7/60	8,72227E-11	3,47035E-10	0	0	65,70754717	1521,954806	NRAS, GNA11, GNAQ, GNAS, BRAF, KRAS, HRAS
49	Cellular senescence	9/156	8,95937E-11	3,49042E-10	0	0	31,91084855	738,280961	RB1, NRAS, PIK3CA, PTEN, AKT1, ATM, KRAS, HRAS, TP53
50	JAK-STAT signaling pathway	9/162	1,2565E-10	4,79523E-10	0	0	30,6501548	698,7474309	PDGFRA, PIK3CA, MPL, AKT1, PTPN11, JAK2, HRAS, JAK3, EGFR
51	GnRH secretion	7/64	1,39319E-10	5,21053E-10	0	0	61,08421053	1386,260697	NRAS, PIK3CA, GNA11, GNAQ, AKT1, KRAS, HRAS
52	Chemical carcinogenesis	10/239	1,72882E-10	6,33901E-10	0	0	23,27864983	523,2670476	RB1, NRAS, PIK3CA, SRC, GNAS, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS, EGFR
53	Cholinergic synapse	8/113	2,11418E-10	7,60291E-10	0	0	38,77509158	863,7998913	NRAS, PIK3CA, GNA11, GNAQ, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS
54	Prolactin signaling pathway	7/70	2,66036E-10	9,38656E-10	0	0	55,25	1218,118245	NRAS, PIK3CA, SRC, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS
55	Sphingolipid signaling pathway	8/119	3,2065E-10	1,1104E-09	0	0	36,66805267	801,5881993	NRAS, PIK3CA, GNAQ, PTEN, AKT1, KRAS, HRAS, TP53
56	Axon guidance	9/182	3,54986E-10	1,20695E-09	0	0	27,07940371	589,2192027	NRAS, PIK3CA, SMO, SRC, ABL1, PTPN11, KRAS, HRAS, MET
57	Relaxin signaling pathway	8/129	6,12461E-10	2,04518E-09	0	0	33,62068235	713,2135277	NRAS, PIK3CA, SRC, GNAS, AKT1, KRAS, HRAS, EGFR
58	mTOR signaling pathway	8/154	2,50905E-09	8,23143E-09	0	0	27,8285915	551,0996953	NRAS, STK11, PIK3CA, PTEN, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS
59	Cushing syndrome	8/155	2,64099E-09	8,51493E-09	0	0	27,63788592	545,9065815	RB1, APC, GNA11, GNAQ, GNAS, CTNNB1, BRAF, EGFR
60	Choline metabolism in cancer	7/98	2,92315E-09	9,2649E-09	0	0	38,19615385	750,5774731	PDGFRA, NRAS, PIK3CA, AKT1, KRAS, HRAS, EGFR
61	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic comp	7/100	3,37049E-09	1,05047E-08	0	0	37,37096774	729,040624	NRAS, SMAD4, PIK3CA, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS
62	Melanogenesis	7/101	3,61514E-09	1,10825E-08	0	0	36,97154255	718,657875	NRAS, GNAQ, KIT, GNAS, CTNNB1, KRAS, HRAS
63	Longevity regulating pathway	7/102	3,87472E-09	1,16866E-08	0	0	36,58052632	708,5206669	NRAS, STK11, PIK3CA, AKT1, KRAS, HRAS, TP53
64	C-type lectin receptor signaling pathway	7/104	4,44165E-09	1,31839E-08	0	0	35,82268041	688,9503926	NRAS, PIK3CA, SRC, AKT1, PTPN11, KRAS, HRAS
65	Viral carcinogenesis	8/203	2,19723E-08	6,42002E-08	0	0	20,78422091	366,4982376	RB1, NRAS, PIK3CA, SRC, KRAS, HRAS, JAK3, TP53
66	Apelin signaling pathway	7/137	3,03489E-08	8,5932E-08	0	0	26,68480769	461,9274777	NRAS, SMAD4, CDH1, GNAQ, AKT1, KRAS, HRAS
67	Autophagy	7/137	3,03489E-08	8,5932E-08	0	0	26,68480769	461,9274777	NRAS, STK11, PIK3CA, PTEN, AKT1, KRAS, HRAS
68	Human immunodeficiency virus 1 infection	8/212	3,07885E-08	8,5932E-08	0	0	19,85822021	343,4702762	NRAS, PIK3CA, GNA11, GNAQ, AKT1, ATM, KRAS, HRAS
69	Lipid and atherosclerosis	8/215	3,43366E-08	9,44257E-08	0	0	19,56744705	336,3067588	NRAS, PIK3CA, SRC, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS, TP53
70	Apoptosis	7/142	3,888E-08	1,0537E-07	0	0	25,69	438,3429551	NRAS, PIK3CA, AKT1, ATM, KRAS, HRAS, TP53
71	Oxytocin signaling pathway	7/154	6,7977E-08	1,81596E-07	0	0	23,57857143	389,1430314	NRAS, SRC, GNAQ, GNAS, KRAS, HRAS, EGFR
72	Alzheimer disease	9/369	1,64951E-07	4,34448E-07	0	0	12,89013158	201,3131594	NRAS, APC, PIK3CA, GNAQ, AKT1, CTNNB1, BRAF, KRAS, HRAS
73	Parathyroid hormone synthesis, secretion and ac	6/106	1,72926E-07	4,49129E-07	0	0	29,05317073	452,3694673	GNA11, GNAQ, GNAS, BRAF, EGFR, FGFR1
74	Serotonergic synapse	6/113	2,52981E-07	6,48047E-07	0	0	27,14292227	412,2996975	NRAS, GNAQ, GNAS, BRAF, KRAS, HRAS
75	Long-term potentiation	5/67	4,98564E-07	1,25988E-06	0	0	38,19316436	554,2414172	NRAS, GNAQ, BRAF, KRAS, HRAS
76	Fc epsilon RI signaling pathway	5/68	5,37191E-07	1,32177E-06	0	0	37,58503401	542,6118087	NRAS, PIK3CA, AKT1, KRAS, HRAS
77	Mitophagy	5/68	5,37191E-07	1,32177E-06	0	0	37,58503401	542,6118087	NRAS, SRC, KRAS, HRAS, TP53
78	Natural killer cell mediated cytotoxicity	6/131	6,06257E-07	1,47234E-06	0	0	23,21326829	332,3202529	NRAS, PIK3CA, BRAF, PTPN11, KRAS, HRAS
79	Insulin signaling pathway	6/137	7,88871E-07	1,89127E-06	0	0	22,1493625	311,1732165	NRAS, PIK3CA, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS
80	Fluid shear stress and atherosclerosis	6/139	8,58906E-07	2,03311E-06	0	0	21,80817898	304,608068	PIK3CA, SRC, KDR, AKT1, CTNNB1, TP53
81	Bacterial invasion of epithelial cells	5/77	1,00228E-06	2,34282E-06	0	0	32,87202381	454,0690353	PIK3CA, SRC, CDH1, CTNNB1, MET
82	B cell receptor signaling pathway	5/81	1,29067E-06	2,97969E-06	0	0	31,13565163	422,2103436	NRAS, PIK3CA, AKT1, KRAS, HRAS
83	Small cell lung cancer	5/92	2,43003E-06	5,54165E-06	0	0	27,18390805	351,4229117	RB1, PIK3CA, PTEN, AKT1, TP53
84	Chagas disease	5/102	4,04436E-06	9,11198E-06	0	0	24,36917035	302,6209494	PIK3CA, GNA11, GNAQ, GNAS, AKT1
85	T cell receptor signaling pathway	5/104	4,44978E-06	9,90606E-06	0	0	23,87445887	294,1967394	NRAS, PIK3CA, AKT1, KRAS, HRAS
86	HIF-1 signaling pathway	5/109	5,60371E-06	1,23282E-05	0	0	22,72092491	274,7432756	PIK3CA, ERBB2, AKT1, VHL, EGFR

Tablo 3.1 (devam)

87	Cell cycle	5/124	1,05196E-05	2,26112E-05	0	0	19,84193677	227,4335765	RB1;SMAD4;ABL1;ATM;TP53
88	Platelet activation	5/124	1,05196E-05	2,26112E-05	0	0	19,84193677	227,4335765	PIK3CA;SRC;GNAQ;GNAS;AKT1
89	Basal cell carcinoma	4/63	1,44022E-05	3,06046E-05	0	0	31,36618053	349,6743443	APC;SMO;CTNNB1;TP53
90	Thermogenesis	6/232	1,64767E-05	3,46195E-05	0	0	12,77379668	140,6850568	NRAS;SMARCB1;GNAS;KRAS;HRAS;FGFR1
91	Adipocytokine signaling pathway	4/69	2,06878E-05	4,29847E-05	0	0	28,46225403	306,9929051	STK11;AKT1;PTPN11;JAK2
92	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori i	4/70	2,1904E-05	4,50114E-05	0	0	28,02959831	300,7251671	SRC;PTPN11;MET;EGFR
93	Shigellosis	6/246	2,29333E-05	386581	0	0	12,02012195	128,4099879	PIK3CA;SRC;AKT1;ATM;TP53;EGFR
94	Endocytosis	6/252	2,6261E-05	5,28043E-05	0	0	11,72337894	123,65148	PDGFRA;SRC;HRAS;FGFR3;EGFR;FGFR2
95	Alcoholism	5/186	7,36668E-05	0,00014655	0	0	13,00447251	123,7500255	NRAS;GNAS;BRAF;KRAS;HRAS
96	Inflammatory mediator regulation of TRP channel	4/98	8,22441E-05	0,000161891	0	0	19,6526472	184,8492409	PIK3CA;SRC;GNAQ;GNAS
97	Transcriptional misregulation in cancer	5/192	8,5585E-05	0,000166713	0	0	12,583397	117,856097	CSF1R;FLT3;ATM;MET;TP53
98	Progesterone-mediated oocyte maturation	4/100	8,89722E-05	0,000171524	0	0	19,24127907	179,4669988	PIK3CA;AKT1;BRAF;KRAS
99	Amoebiasis	4/102	9,6092E-05	0,000183359	0	0	18,84670147	174,3358331	PIK3CA;GNA11;GNAQ;GNAS
100	Epstein-Barr virus infection	5/202	0,000108691	0,000205305	0	0	11,93860285	108,9636889	RB1;PIK3CA;AKT1;JAK3;TP53
101	Pathways of neurodegeneration	7/475	0,000112729	0,000210802	0	0	7,286057692	66,23410704	NRAS;APC;GNAQ;CTNNB1;BRAF;KRAS;HRAS
102	Insulin resistance	4/108	0,000119939	0,000222066	0	0	17,75402504	160,2926336	PIK3CA;PTEN;AKT1;PTPN11
103	Vascular smooth muscle contraction	4/133	0,000267103	0,000489688	0	0	14,29529475	117,6199347	GNA11;GNAQ;GNAS;BRAF
104	Regulation of lipolysis in adipocytes	3/55	0,000292873	0,000531721	0	0	26,09396853	212,2945775	PIK3CA;GNAS;AKT1
105	Yersinia infection	4/137	0,00029906	0,000537733	0	0	13,86256339	112,4928585	PIK3CA;SRC;GNAQ;AKT1
106	Measles	4/139	0,000316027	0,000562829	0	0	13,65581395	110,0615201	PIK3CA;AKT1;JAK3;TP53
107	Cortisol synthesis and secretion	3/65	0,000479666	0,000846202	0	0	21,87426686	167,1723652	GNA11;GNAQ;GNAS
108	Hippo signaling pathway	4/163	0,000577247	0,001008833	0	0	11,58051777	86,35870445	SMAD4;APC;CDH1;CTNNB1
109	Wnt signaling pathway	4/166	0,000618167	0,001070344	0	0	11,36434109	83,96830547	SMAD4;APC;CTNNB1;TP53
110	p53 signaling pathway	3/73	0,000674075	0,001156441	0	0	19,36655844	141,4178845	PTEN;ATM;TP53
111	Herpes simplex virus 1 infection	6/498	0,001044739	0,001776057	0	0	5,788518739	39,73232231	PIK3CA;SRC;AKT1;PTPN11;JAK2;TP53
112	Insulin secretion	3/86	0,001085724	0,001829102	0	0	16,32256298	111,4097953	GNA11;GNAQ;GNAS
113	Th1 and Th2 cell differentiation	3/92	0,001319222	0,00220263	0	0	15,21756895	100,9033331	NOTCH1;JAK2;JAK3
114	Aldosterone synthesis and secretion	3/98	0,001582125	0,002618206	0	0	14,25215311	91,9119439	GNA11;GNAQ;GNAS
115	Hematopoietic cell lineage	3/99	0,001628893	0,002667849	0	0	14,10298295	90,53910388	CSF1R;FLT3;KIT
116	cAMP signaling pathway	4/216	0,001640656	0,002667849	0	0	8,662132514	55,54730487	PIK3CA;GNAS;AKT1;BRAF
117	Th17 cell differentiation	3/107	0,002034429	0,003251608	0	0	13,01289336	80,64793024	SMAD4;JAK2;JAK3
118	Glucagon signaling pathway	3/107	0,002034429	0,003251608	0	0	13,01289336	80,64793024	GNAQ;GNAS;AKT1
119	Leukocyte transendothelial migration	3/114	0,002436597	0,003861387	0	0	12,18796069	73,33682166	PIK3CA;CTNNB1;PTPN11
120	Salmonella infection	4/249	0,002748747	0,004319459	0	0	7,482866635	44,12354835	PIK3CA;AKT1;CTNNB1;HRAS
121	AMPK signaling pathway	3/120	0,002817898	0,004391224	0	0	11,55944056	67,87430823	STK11;PIK3CA;AKT1
122	Osteoclast differentiation	3/127	0,003306916	0,005110688	0	0	10,90304252	62,27533568	CSF1R;PIK3CA;AKT1

Tablo 3.1 (devam)

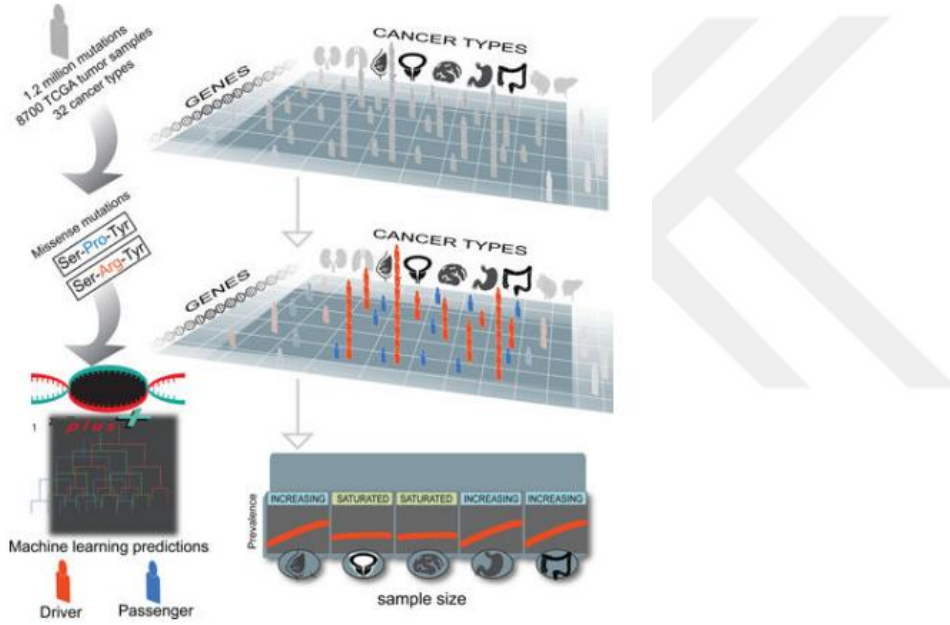
123	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	2/37	0,003416044	0,005236068	0	0	25,29269841	143,6441165	PIK3CA,KRAS
124	Dopaminergic synapse	3/132	0,003686165	0,005604169	0	0	10,47780127	58,70888848	GNAQ;GNAS;AKT1
125	Spinocerebellar ataxia	3/143	0,004611248	0,00695406	0	0	9,649188312	51,90546042	PIK3CA;GNAQ;AKT1
126	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	3/150	0,005266803	0,007879137	0	0	9,186456401	48,19519797	GNAQ;GNAS;AKT1
127	Carbohydrate digestion and absorption	2/47	0,005462547	0,008107113	0	0	19,66222222	102,4370353	PIK3CA;AKT1
128	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	2/53	0,006901373	0,010161864	0	0	17,34379085	86,30330836	GNAQ;GNAS
129	cGMP-PKG signaling pathway	3/167	0,007083773	0,01034895	0	0	8,227134146	40,72389093	GNA11;GNAQ;AKT1
130	Tight junction	3/169	0,007319002	0,010609715	0	0	8,127190581	39,96368273	STK11;SRC;ERBB2
131	Influenza A	3/172	0,007680476	0,01104807	0	0	7,981710597	38,8635374	PIK3CA;AKT1;JAK2
132	Tuberculosis	3/180	0,008695545	0,012412725	0	0	7,617873652	36,14638693	SRC;AKT1;JAK2
133	Neutrophil extracellular trap formation	3/189	0,009927632	0,014064146	0	0	7,245967742	33,4215428	PIK3CA;SRC;AKT1
134	Pathogenic Escherichia coli infection	3/197	0,011104163	0,015612621	0	0	6,944353327	31,25261197	SRC;ABL1;PTPN11
135	Renin secretion	2/69	0,011472991	0,016010815	0	0	13,19137645	58,93589928	GNAQ;GNAS
136	Diabetic cardiomyopathy	3/203	0,012037415	0,016674049	0	0	6,733977273	29,76239873	PIK3CA;PTEN;AKT1
137	Inositol phosphate metabolism	2/73	0,012775962	0,017566947	0	0	12,4456964	54,26559946	PIK3CA;PTEN
138	Thyroid hormone synthesis	2/75	0,013450599	0,018359577	0	0	12,10350076	52,15073656	GNAQ;GNAS
139	Gastric acid secretion	2/76	0,013793639	0,01869138	0	0	11,93933934	51,14272995	GNAQ;GNAS
140	Salivary secretion	2/93	0,020189771	0,027161778	0	0	9,700610501	37,85740081	GNAQ;GNAS
141	Circadian entrainment	2/97	0,02184404	0,028766447	0	0	9,290292398	35,5244725	GNAQ;GNAS
142	Fc gamma R-mediated phagocytosis	2/97	0,02184404	0,028766447	0	0	9,290292398	35,5244725	PIK3CA;AKT1
143	Phosphatidylinositol signaling system	2/97	0,02184404	0,028766447	0	0	9,290292398	35,5244725	PIK3CA;PTEN
144	Pancreatic secretion	2/102	0,023988361	0,031369396	0	0	8,823555556	32,91350791	GNAQ;GNAS
145	Toll-like receptor signaling pathway	2/104	0,024869436	0,032295726	0	0	8,649673203	31,9528935	PIK3CA;AKT1
146	TNF signaling pathway	2/112	0,028523701	0,036533782	0	0	8,017373737	28,51795809	PIK3CA;AKT1
147	Toxoplasmosis	2/112	0,028523701	0,036533782	0	0	8,017373737	28,51795809	AKT1;JAK2
148	Glutamatergic synapse	2/114	0,02946908	0,037487878	0	0	7,873412698	27,7491635	GNAQ;GNAS
149	Ubiquitin mediated proteolysis	2/140	0,042845333	0,054135657	0	0	6,381642512	20,10318573	FBXW7;VHL
150	Non-alcoholic fatty liver disease	2/155	0,05141094	0,064522455	0	0	5,751633987	17,0702992	PIK3CA;AKT1
151	Mismatch repair	1/23	0,052703528	0,065703731	0	0	19,69466403	57,96283166	MLH1
152	Necroptosis	2/159	0,05379138	0,066615815	0	0	5,603963199	16,37837845	JAK2;JAK3
153	Maturity onset diabetes of the young	1/26	0,059374257	0,073045961	0	0	17,32869565	48,93440891	HNF1A
154	Citrate cycle (TCA cycle)	1/30	0,06819709	0,083351999	0	0	14,93553223	40,107182	IDH1
155	African trypanosomiasis	1/37	0,083442556	0,101323103	0	0	12,02717391	29,87065114	GNAQ
156	Primary immunodeficiency	1/38	0,085600454	0,103272805	0	0	11,70152761	28,76311191	JAK3
157	Ferroptosis	1/41	0,092044358	0,109632452	0	0	10,82228261	25,81638924	TP53
158	Homologous recombination	1/41	0,092044358	0,109632452	0	0	10,82228261	25,81638924	ATM

Tablo 3.1 (devam)

159	Vasopressin-regulated water reabsorption	1/44	0,098443811	0,116512611	0	0	10,06572295	23,33505696	GNAS
160	Type II diabetes mellitus	1/46	0,102685565	0,120598993	0	0	9,617391304	21,8899878	PIK3CA
161	Coronavirus disease	2/232	0,103186304	0,120598993	0	0	3,811207729	8,656087958	PIK3CA;EGFR
162	Cocaine addiction	1/49	0,109011598	0,126615956	0	0	9,014945652	19,97983301	GNAS
163	Vibrio cholerae infection	1/50	0,11111056	0,127470397	0	0	8,830523514	19,40268707	GNAS
164	Malaria	1/50	0,11111056	0,127470397	0	0	8,830523514	19,40268707	MET
165	Ovarian steroidogenesis	1/51	0,113204682	0,129080949	0	0	8,653478261	18,85210213	GNAS
166	Parkinson disease	2/249	0,116014679	0,131483303	0	0	3,545838956	7,637873823	GNAS;TP53
167	Fanconi anemia pathway	1/54	0,11945812	0,134570292	0	0	8,16242822	17,34344121	MLH1
168	Hedgehog signaling pathway	1/56	0,123603079	0,138405843	0	0	7,864822134	16,44282494	SMO
169	Glutathione metabolism	1/57	0,125668392	0,139880888	0	0	7,723990683	16,02039592	IDH1
170	Notch signaling pathway	1/59	0,129784736	0,143607962	0	0	7,456896552	15,22607361	NOTCH1
171	Viral myocarditis	1/60	0,131835789	0,145019368	0	0	7,330140015	14,85231615	ABL1
172	Prion disease	2/273	0,134771721	0,14738194	0	0	3,227880279	6,469230143	NOTCH1;PIK3CA
173	Amphetamine addiction	1/69	0,150083624	0,163172312	0	0	6,357097187	12,05663307	GNAS
174	Cytokine-cytokine receptor interaction	2/295	0,152527635	0,164870912	0	0	2,982176716	5,607713386	CSF1R;MPL
175	Huntington disease	2/306	0,161576093	0,17364787	0	0	2,872660819	5,236226056	GNAQ;TP53
176	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopath	1/77	0,165988404	0,176362679	0	0	5,685640732	10,21048599	CTNNA1
177	Leishmaniasis	1/77	0,165988404	0,176362679	0	0	5,685640732	10,21048599	JAK2
178	Peroxisome	1/82	0,175780573	0,185711679	0	0	5,333333333	9,272100301	IDH1
179	GABAergic synapse	1/89	0,189300806	0,198872195	0	0	4,90736166	8,167900888	SRC
180	Bile secretion	1/90	0,191214463	0,19976036	0	0	4,851978505	8,026917415	GNAS
181	Morphine addiction	1/91	0,193123697	0,200634063	0	0	4,797826087	7,889662171	GNAS
182	TGF-beta signaling pathway	1/94	0,198824974	0,205415857	0	0	4,642356241	7,498939021	SMAD4
183	Dilated cardiomyopathy	1/96	0,202603901	0,208169942	0	0	4,54416476	7,254770091	GNAS
184	Viral protein interaction with cytokine and cytol	1/100	0,210109494	0,21411193	0	0	4,359683794	6,801658147	CSF1R
185	Amyotrophic lateral sclerosis	2/364	0,21067698	0,21411193	0	0	2,405279312	3,746052285	ERBB4;TP53
186	NF-kappa B signaling pathway	1/104	0,217545929	0,219897777	0	0	4,189531448	6,390482029	ATM
187	Cell adhesion molecules	1/148	0,29495673	0,29495673	0	0	2,929015084	3,576112459	CDH1
188	Retrograde endocannabinoid signaling	1/148	0,29495673	0,29495673	0	0	2,929015084	3,576112459	GNAQ

3.6. YAPAY ZEKA MODELLEMESİ

Tüm hastalar CHASMplus THCA kullanılarak değerlendirildi (169). İlgili yazılım bir yapay zeka örneği olup makine öğrenim modeli algoritmasıdır (Şekil 3.7). 32 kanser türünden 8.657 örneğe uygulanan CHASMplus, 240 gende 4.000'den fazla benzersiz driver mutasyonu tanımlar ve ayrıca spesifik kanser türleri ile ayırt edilir (170). Çalışmamızda özellikle tiroid kanseri üzerine eğitilen bu yazılım bize sunulan data içerisinde ilgili hasta için driver veya passanger olabilecek mutasyonları gösterdi.



Şekil 3. 7: Yapay zeka modellemesinin çalışmasının prensibi (170)

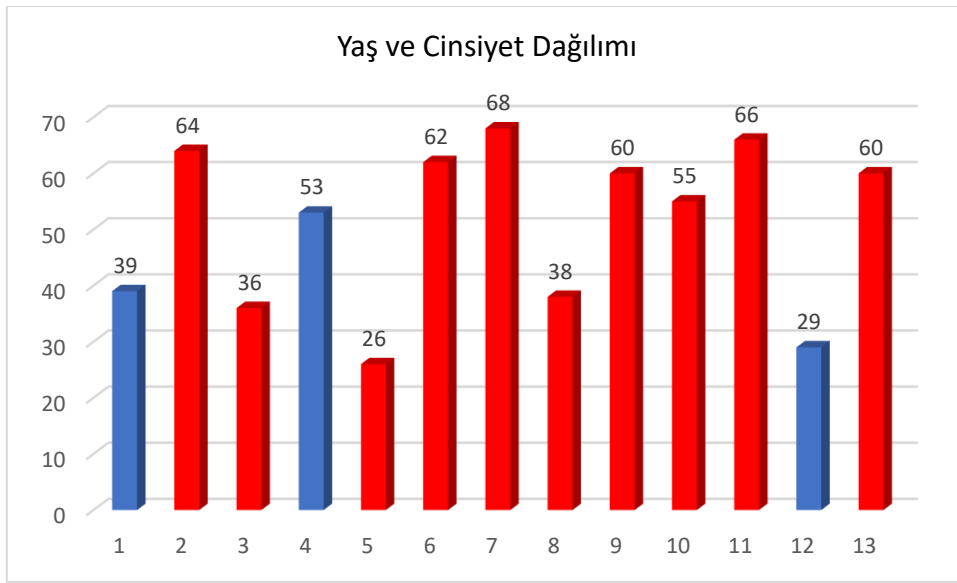
3.7. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Verilerin analizinde SPSS 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanıldı. Kantitatif sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma ile ifade edildi. Kategorik veri türüne sahip olan veri grupları arasındaki bağımlılığı yani ilişkiyi incelemek için ki-kare testi kullanıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olup olmadığını araştırmak için sürekli verilerde örneklem sayısı 20'den az olduğu için parametrik olmayan testlerden Mann-Whitney U testinden faydalandı.

4. BULGULAR

4.1. DEMOGRAFİK, KLİNİK VE PATOLOJİK BULGULAR

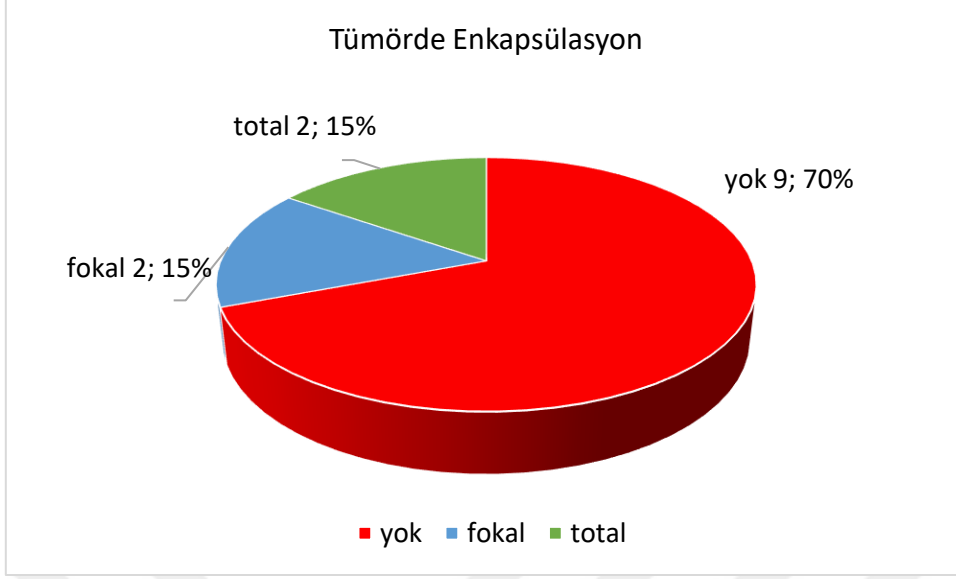
Çalışmaya dahil edilen 13 olgunun yaş aralığı 26-68 olup yaş ortalaması $50,4 \pm 14,8$, ortanca değeri 55'dir. Kadın hastaların sayısı 10 (%77), erkek hastaların sayısı 3 (%23) olup kadın/erkek oranı: $10/3=3,33$ 'dür (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1: Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

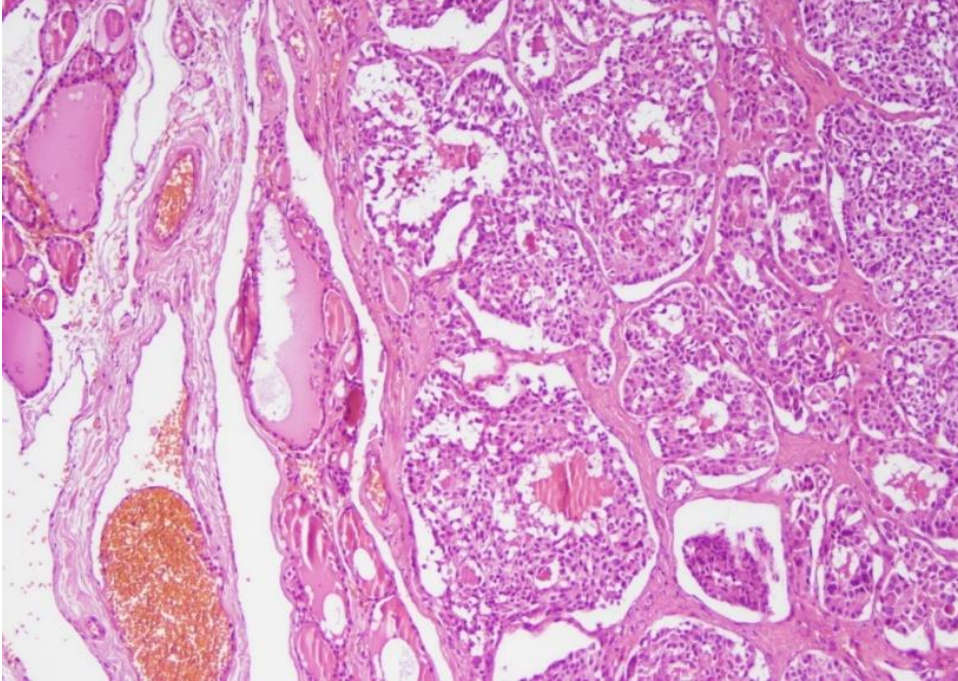
Not: Kırmızı - Kadın Mavi - Erkek

Olguların 9'unda (%69) enkapsülasyon yokken, 2'sinde (%15) fokal, 2'sinde (%15) total enkapsülasyon görülmüştür (Şekil 4.2). Kapsül içeren 4 adet tümörde kapsül invazyonu tespit edilmiştir. Enkapsüle olmayan ya da fokal kapsüllü olan tümörlerden 6 tanesinde metastaz yokken 5 tanesinde lenf nodu metastazı vardır. Benzer şekilde kapsül invazyonu olan 4 olguda lenf nodu metastazı varken 4 olguda lenf nodu metastazı yoktur.



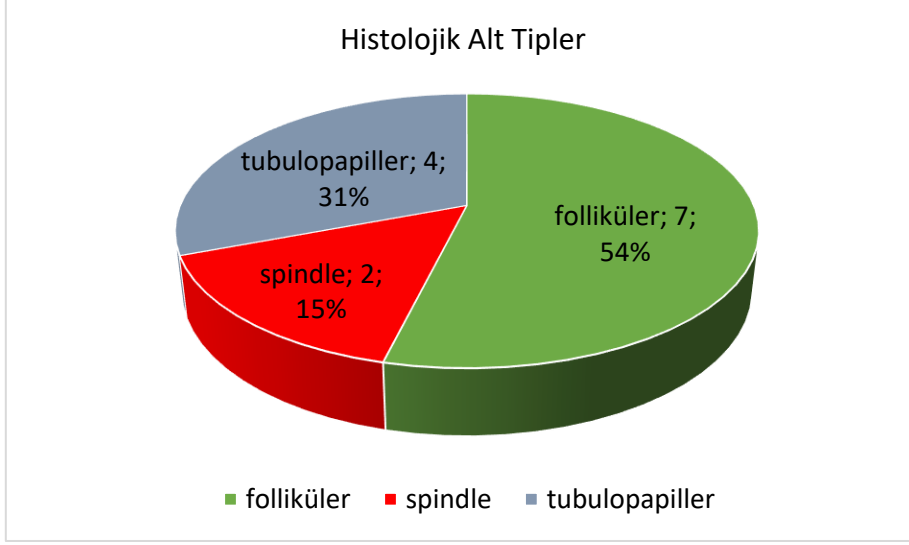
Şekil 4. 2: Tümörlerde kapsül durumunun dağılımı

Vakaların 7'si (%54) folliküler, 4'ü (%31) tubulopapiller (Şekil 4.3), 2'si (%15) spindle hücreli medüller karsinom histolojik alt tiptedir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 3: Tubuler paternde tiroid medüller kanser mikroskopisi (H&E; x100)

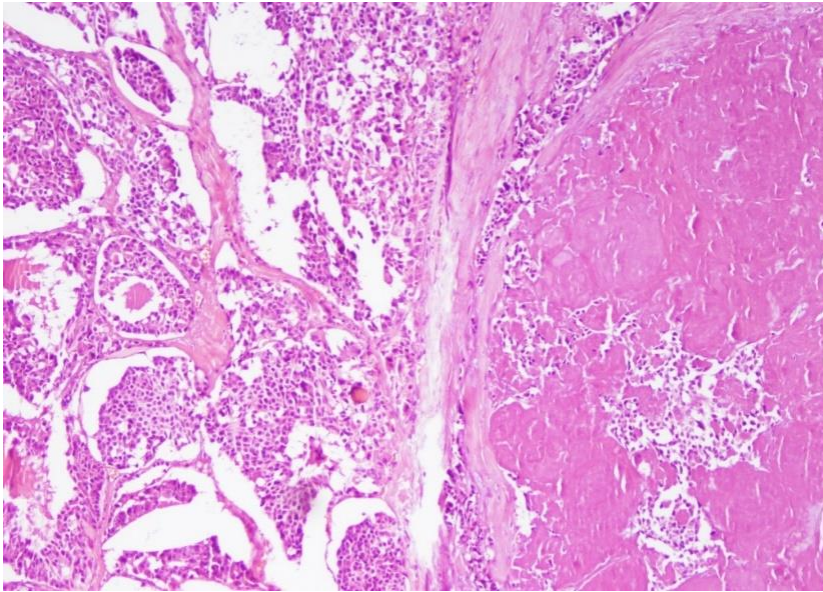
Not: Solda normal tiroid dokusuna karşın sağda tubulopapiller paternde tümör infiltrasyonu görülüyor



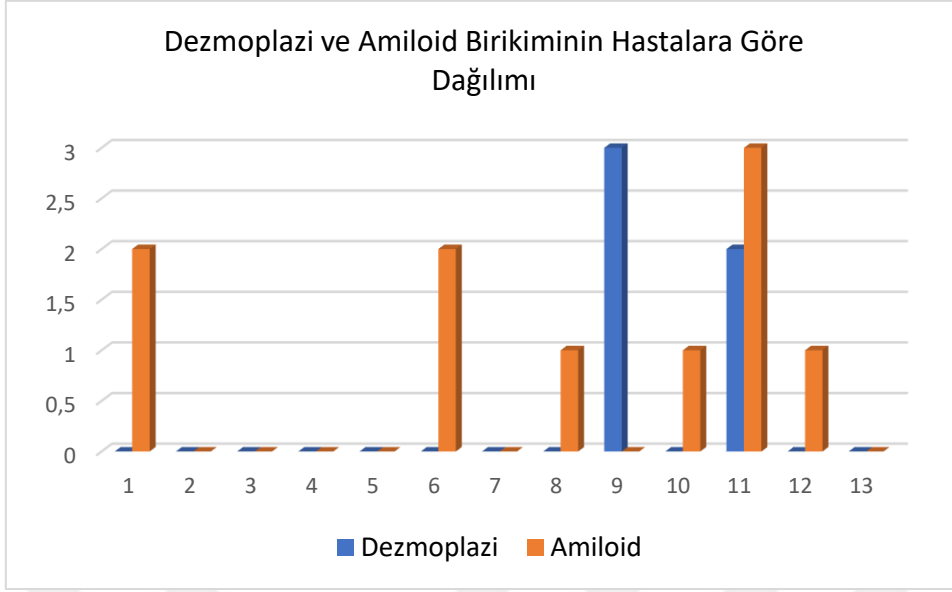
Şekil 4. 4: Histolojik alt tiplerin dağılımı

Tümör çapları 0,3 cm ve 5 cm arasında değişmekte olup çap ortalaması $2,16 \pm 1,46$ cm, ortanca değeri 2 cm dir.

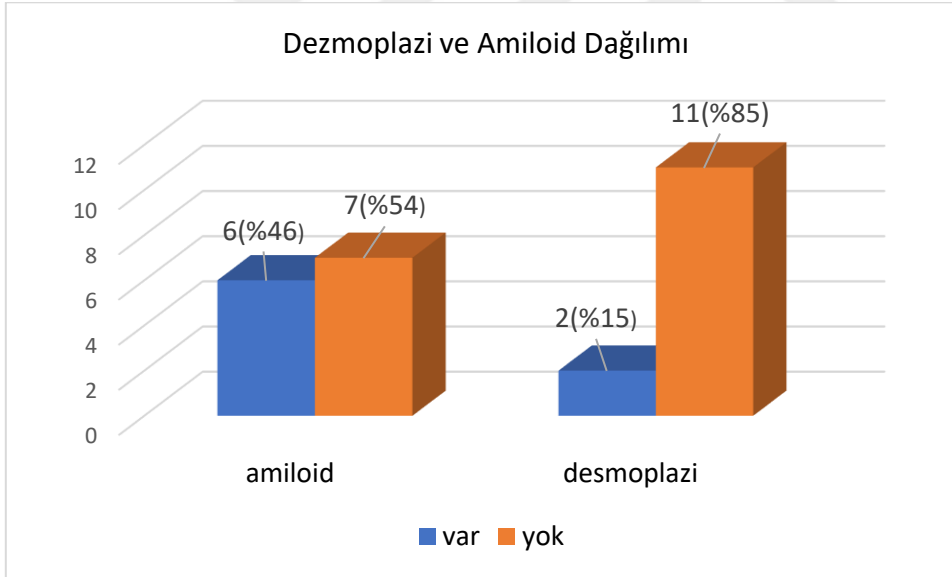
Amiloid birikimi (Şekil 4.5) ve dezmoplazi varlığı tüm hastalarda farklılık göstermektedir (Şekil 4.6). Çalışmaya katılan hastaların 2'sinde (%15) dezmoplazi varken, 11'inde (%85) dezmoplazi yoktur. 6'sında (%46) amiloid varken, 7'sinde (%54) amiloid birikimi yoktur (Şekil 4.7).



Şekil 4. 5: Tümör içinde sağda amiloid ile uyumlu yoğun amorf materyal (H&E; x100)

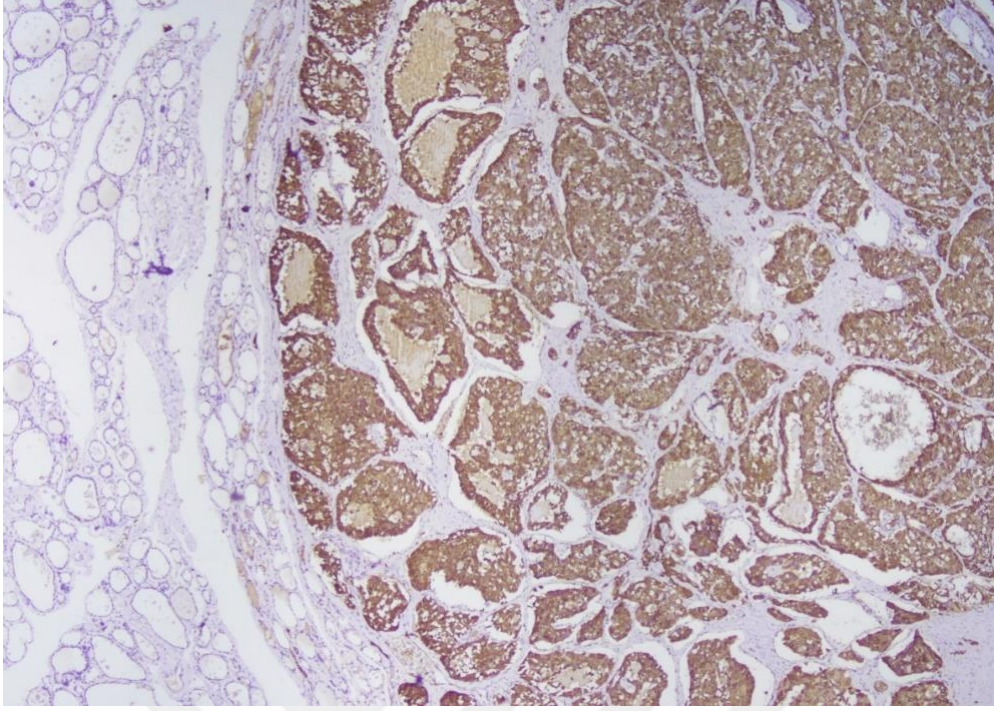


Şekil 4. 6: Her bir hastada dezmoplazi ve amiloid varlığının dağılımı



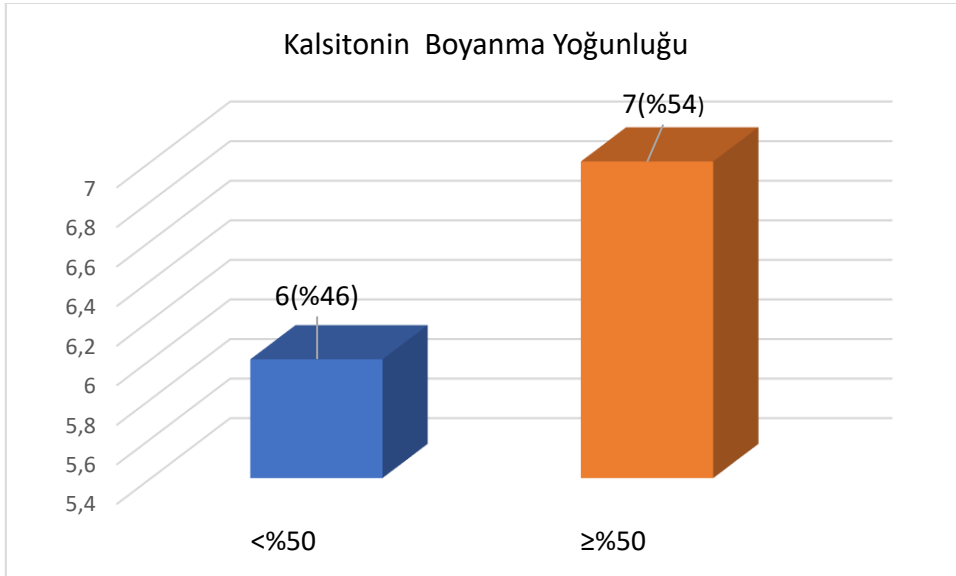
Şekil 4. 7: Tümörlerde dezmoplazi ve amiloid varlığının dağılımı

C hücre hiperplazisi yalnızca bir hastada (%7,7) nodüler paternde görüldü. Tanı anında uygulanan Kalsitonin immünohistokimya boyanma yoğunluğu (Şekil 4.8); 6 hastada (%46) %50'den az boyanma gösterirken 7 hastada (%54) %50'ye eşit veya daha fazla boyanma gösterdi (Şekil 4.9).



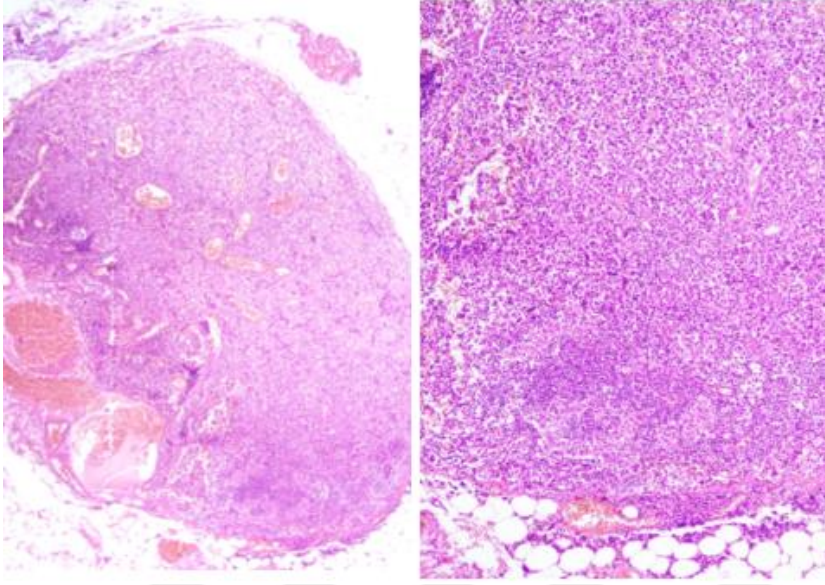
Şekil 4. 8: C hücre natürünü doğrulayan Kalsitonin immünohistokimyası (x40)

Not: C hücrelerinin bir belirteci olan Kalsitonin immünohistokimyası ile soldaki normal tiroid içinde boyanma yokken sağda medüller kanser hücrelerinde kuvvetli boyanma görülüyor (x40).

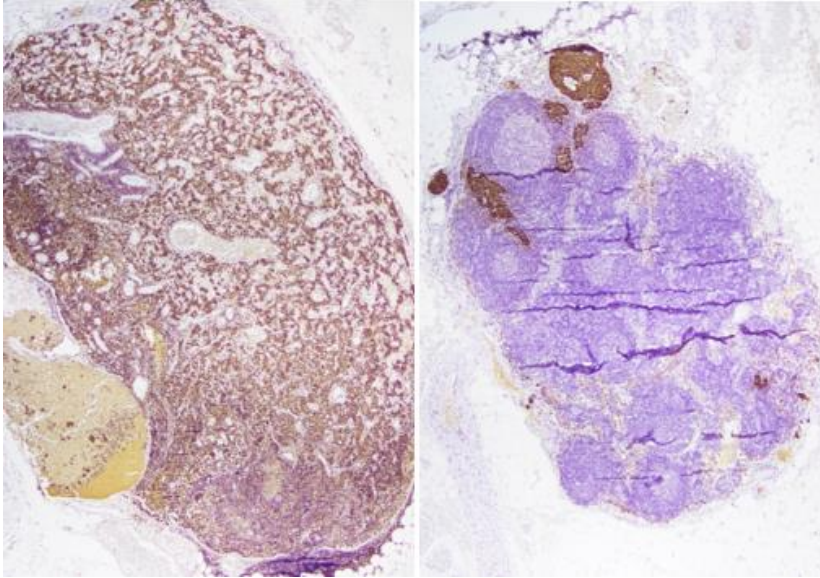


Şekil 4. 9: Tümörlerde kalsitonin boyanma yoğunluğunun dağılımı

Vakaların yalnızca bir tanesinde angioinvazyon varken (%7,7), 5 hastada (%38,4) lenfatik invazyon (Şekil 4.10) vardı. Metastaz Kalsitonin boyası ile doğrulandı (Şekil 4.11). Ancak boyun lenf nodu diseksiyonu yapılan 13 hastadan 6'sında (%46) level I-VI lenf nodu metastazı var iken 7 hastada (%54) yoktu (Şekil 4.12).

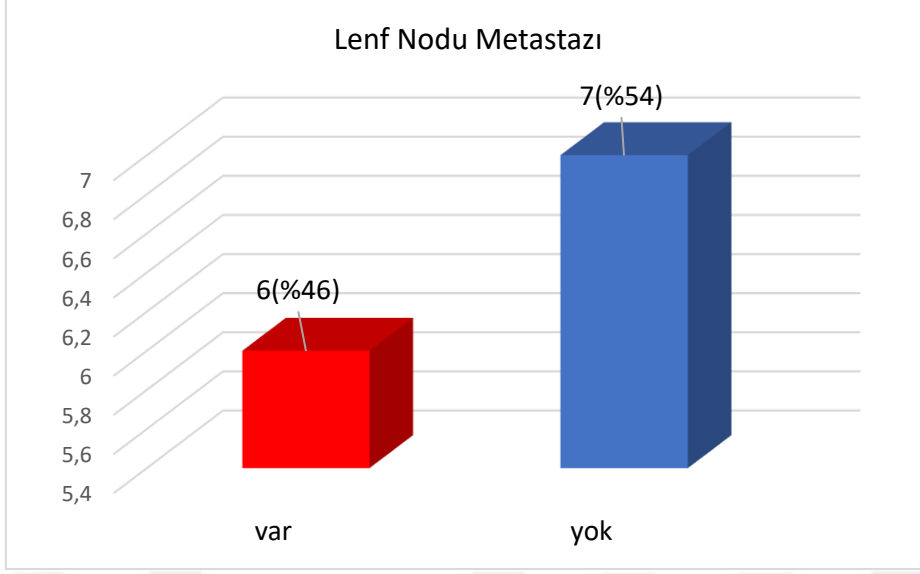


Şekil 4. 10: Nodal metastaz gösteren medüller kanser (H&E; x40,x100)



Şekil 4. 11: Tiroid medüller kanser metastazını doğrulayan Kalsitonin immünohistokimyası.

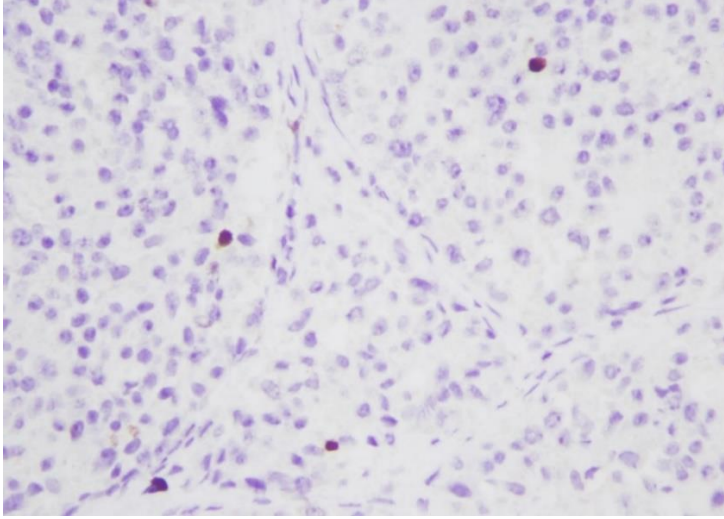
Not: Solda nodun tamamı tümör ile infiltre, sağda ise çok küçük birkaç odakta (x40)



Şekil 4. 12: Lenf nodu metastazı durumu

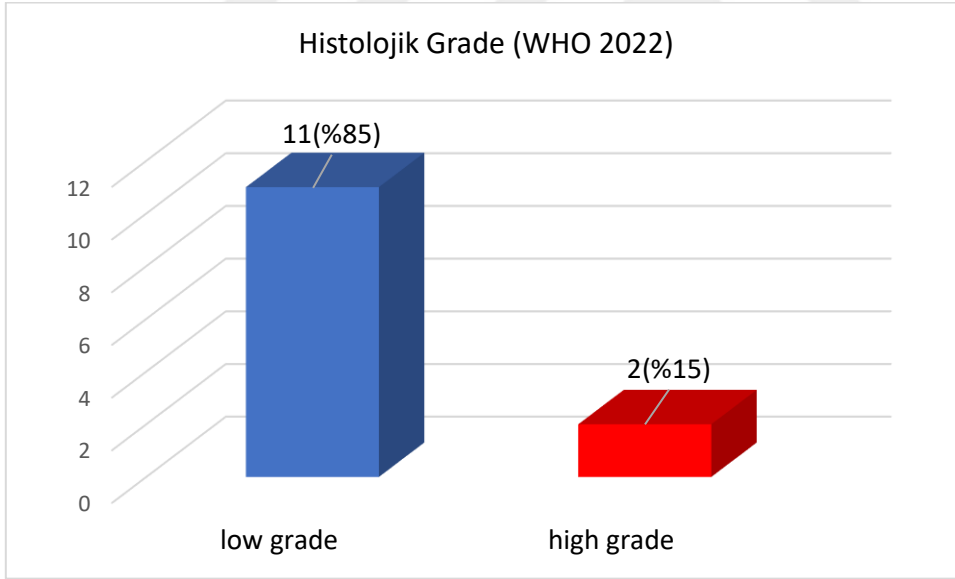
Cerrahi sınır durumuna bakıldığında 3 hastada (%23) tümör cerrahi sınırdaki devamlılık göstermektedir. Bu hastalardan biri (9 nolu) uzak metastaz nedeni ile ölen hastadır. Vakaların 2 tanesinde (%15,3) extratiroidal yayılım mevcuttur.

Yeni kriterlere göre incelenen tümörlerin hiç birinde nekroz yok iken (Şekil 4.13) iki vakada (9 nolu hastada; 8 mitoz, 13 nolu hastada; 12 mitoz) 2 mm^2 'de 5 ya da daha fazla mitoz ($\geq 5/ 2\text{mm}^2$) vardır. DSÖ 2022 sınıflamasına göre bu 2 olgu (%15) high grade iken, 11'i (%85) low grade olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 4.14).



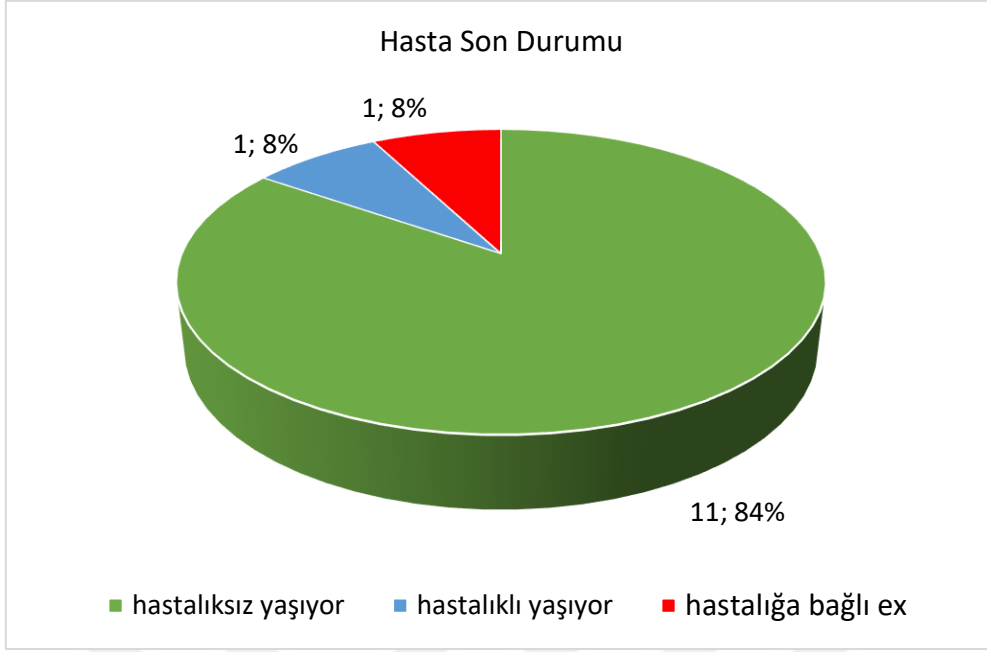
Şekil 4. 13: Nekroz ve mitoz içermeyen medüller kanserde %3 (düşük) Ki67 proliferasyon indeksi.

Not: DSÖ 2022 sınıflamasına göre low grade. (x400)



Şekil 4. 14: WHO 2022 endokrin tümörlere göre medüller kanser gradelemesi

Hastaların tümünün (13/13, %100) takip bilgilerine ulaşılmış, 1 (%8) hasta hastalığa bağlı uzak metastazı nedeniyle ölmüştür; 1 (%8) hasta hastalıklı, diğer 11 hasta (%84) hastaliksız yaşamaktadır (Şekil 4.15). 13 hastanın ortalama takip süresi, DFS ve OS süreleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Ortalama 58,30 ay takip süresi sonucunda ortalama DFS süresi ve ortalama OS süresi 58,30 ay olarak hesaplanmıştır.

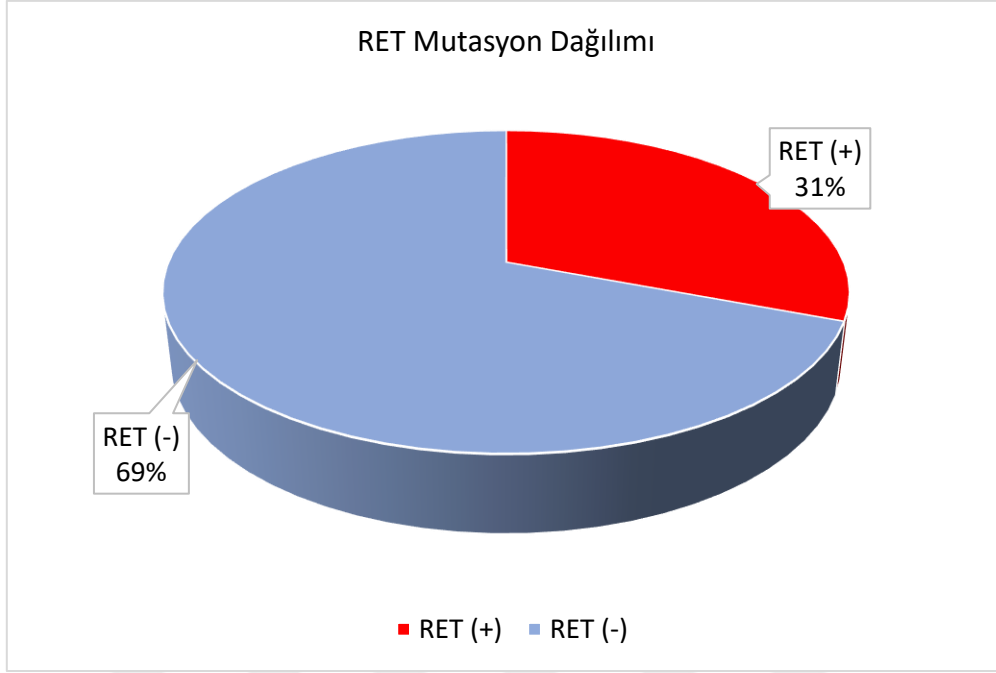


Şekil 4. 15: Hasta son durum dağılımı

Tablo 4.1: Hastaların takip, hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım süreleri

	Takip Süresi (ay)	DFS (ay)	OS (ay)
Aralık	25-119	25-119	25-119
Ortanca	58	58	58
Ortalama±SS	58,30±25,72	58,30±25,72	58,30±25,72
Kısaltmalar: <i>DFS</i> hastaliksız sağkalım, <i>OS</i> genel sağkalım, <i>SS</i> standart sapma			

Çalışmadaki olguların 4 tanesinde (%30,8) RET mutasyonu varken 8 tanesi (%69,2) RET negatif idi. RET geninde izlenen mutasyonların tümü missense mutasyonlar idi (Şekil 4. 16). Lenf nodu metastazı ile diğer tüm parametreler arasındaki ilişki Tablo 4.2’de gösterildi.



Şekil 4. 16: RET mutasyonu gösteren hastaların yüzdesi

Tablo 4.2: Lenf nodu metastazına göre RET mutasyonu ve diğer parametrelerin ilişkisi

Parametreler		Lenf Nodu Metastazı		p
		Yok	Var	
RET Mutasyonu	Negatif	4 (%57,1)	5 (%83,3)	0,31 ^a
	Pozitif	3 (%42,9)	1 (%16,7)	
Evre	pT1	6 (%85,7)	1 (%16,7)	0,02 ^{a,*}
	pT2	1 (%14,3)	1 (%16,7)	
	pT3	-	4 (%66,7)	
Son durum	Ex	-	1 (%16,7)	0,25 ^a
	Hastaliksız yaşıyor	7 (%100)	4 (%66,7)	
	Hastalıklı yaşıyor	-	1 (%16,7)	
Dezmoplazi	Yok	7 (%100)	4 (%66,7)	0,25 ^a
	Orta	-	1 (%16,7)	
	Yoğun	-	1 (%16,7)	
Amiloid Varlığı	Yok	4 (%57,1)	3 (%50)	0,33 ^a
	Hafif	1 (%14,3)	2 (%33,3)	
	Orta	2 (%28,6)	-	
	Yoğun	-	1 (%16,7)	
Varyant	Foliküler	4 (%57,1)	3 (%50)	0,21 ^a
	Tubulopapiller	3 (%42,9)	1 (%16,7)	
	Spindle	-	2 (%33,3)	
Fokalite	Unifokal	7 (%100)	4 (%66,7)	0,10 ^a
	Multifokal	-	2 (%33,3)	
Cinsiyet	Erkek	2 (%28,6)	1 (%16,7)	0,61 ^a
	Kadın	5 (%71,4)	5 (%83,3)	

Tablo 4.2 (devam)

Cerrahi Sınır	Negatif	6 (%85,7)	4 (%66,7)	0,42 ^a
	Pozitif	1 (%14,3)	2 (%33,3)	
Kalsitonin Yüzdesi	<%50	3 (%42,9)	3 (%50)	0,80 ^a
	≥%50	4 (%57,1)	3 (%50)	
Grade	Low	6 (%85,7)	5 (%83,3)	0,91 ^a
	High	1 (%14,3)	1 (%16,7)	
C Hücre Hiperplazisi	Yok	6 (%85,7)	6 (%100)	0,34 ^a
	Var	1 (%14,3)	-	
Kapsül İnvazyonu	Yok	5 (%71,4)	1 (%16,7)	0,05 ^{a, *}
	Var	2 (%28,6)	5 (%83,3)	
LVI	Yok	6 (%85,7)	2 (%33,3)	0,05 ^a
	Var	1 (%14,3)	4 (%66,7)	
Enkapsülasyon	Enkapsüle değil	5 (%71,4)	4 (%66,7)	0,98 ^a
	Fokal enkapsüle	1 (%14,3)	1 (%16,7)	
	Total enkapsüle	1 (%14,3)	1 (%16,7)	
Ekstratiroidal Yayılım (ETE)	Yok	7 (%100)	4 (%66,7)	0,10 ^a
	Var	-	2 (%33,3)	
Anjoinvazyon	Yok	7 (%100)	5 (%83,3)	0,26 ^a
	Var	-	1 (%16,7)	
DFS (Ay, Ortalama ± ss)		62,86 ± 26,52	53 ± 24,84	0,63 ^b
OS (Ay; Ortalama ± ss)		62,86 ± 26,52	53 ± 24,84	0,63 ^b
Yaş (Yıl; Ortalama ± ss)		53,29 ± 11,86	47,17 ± 18,25	0,63 ^b
Tümör Çapı (cm; Ortalama ± ss)		1,41 ± 0,76	3,05 ± 1,65	0,05 ^b

Not: *p<0,05; ^a ki-kare testi istatistiği; ^b Mann-Whitney U testi istatistiği

İstatistiksel analizde şu sonuçlara ulaşıldı:

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %57,1'inin RET mutasyonu negatif iken %42,9'unun pozitifdir; lenf nodu metastazı olanların %83,3'ünün RET mutasyonu negatif iken %16,7'sinin pozitifdir. Lenf nodu metastazı olma durumu ile RET mutasyonu durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %85,7'sinin evre durumu pT1 iken %14,3'ünün pT2'dir; lenf nodu metastazı olanların %16,7'sinin evre durumu pT1; %16,7'sinin pT2 ve %66,7'sinin ise pT3'tür. Lenf nodu metastazı olma durumu ile evre durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %100'ü hastaliksız yaşamaktadır; lenf nodu metastazı olanların %16,7'si ex; %66,7'si hastaliksız

yaşamakta ve %16,7'si hastalıklı yaşamaktadır. Lenf nodu metastazı ile son statü durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %100'ünde desmoplazi yoktur; lenf nodu metastazı olanların %66,7'sinde desmoplazi yoktur; %16,7'sinde orta ve %16,7'sinde yoğun desmoplazi vardır. Lenf nodu metastazı ile desmoplazi durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %57,1'inde amiloid varlığı yok; %14,3'ünde hafif ve %28,6'sında orta amiloid vardır; lenf nodu metastazı olanların %50'sinde amiloid varlığı yok; %23,3'ünde hafif ve %16,7'sinde yoğun amiloid vardır. Lenf nodu metastazı ile amiloid varlığı durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %57,1'inde follüküler varyant; %42,9'unda tubulopapiller varyant vardır; lenf nodu metastazı olanların %50'sinde follüküler varyant; %16,7'sinde tubulopapiller varyant ve %33,3'ünde spindle varyant vardır. Lenf nodu metastazı ile varyant durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %100'ünde unifokal fokalite vardır; lenf nodu metastazı olanların %66,7'sinde unifokal fokalite ve %33,3'ünde multifokal fokalite vardır. Lenf nodu metastazı ile fokalite durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %28,6'sı erkek ve %71,4'ü kadındır; lenf nodu metastazı olanların %16,7'si erkek ve %83,3'ü kadındır. Lenf nodu metastazı ile cinsiyet durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %85,7'sinin cerrahi sınırı negatif ve %14,3'ünün pozitifdir; lenf nodu metastazı olanların %66,7'sinin cerrahi sınırı negatif ve %33,3'ünün pozitifdir. Lenf nodu metastazı ile cerrahi sınır durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %42,9'unun kalsitonin yüzdesi %50'nin altında ve %57,1'inin %50'nin üstündedir; lenf nodu metastazı olanların %50'sinin kalsitonin yüzdesi %50'nin altında ve %50'sinin %50'nin üstündedir. Lenf nodu metastazı ile kalsitonin yüzdesi durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %85,7'sinin grade durumu düşük ve %14,3'ünün yüksektir; lenf nodu metastazı olanların %83,3'ünün grade durumu düşük ve %16,7'sinin yüksektir. Lenf nodu metastazı ile grade durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %85,7'sinin C hücre hiperplazisi yoktur ve %14,3'ünün vardır; lenf nodu metastazı olanların %100'ünün C hücre hiperplazisi yoktur. Lenf nodu metastazı ile C hücre hiperplazisi durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %71,4'ünün kapsül invazyonu yoktur ve %28,6'sının vardır; lenf nodu metastazı olanların %16,7'sinin kapsül invazyonu yoktur ve %83,3'ünün vardır. Lenf nodu metastazı ile kapsül invazyonu durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %85,7'sinde LVI yoktur ve %14,3'ünde vardır; lenf nodu metastazı olanların %33,3'ünde LVI yoktur ve %66,7'sinde vardır. Lenf nodu metastazı ile LVI durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %71,4'ü enkapsüle değildir; %14,3'ü fokal enkapsüledir ve %14,3'ü enkapsüledir; lenf nodu metastazı olanların %66,7'si enkapsüle değildir; %16,7'si fokal enkapsüledir ve %16,7'si enkapsüledir. Lenf nodu metastazı ile enkapsüle durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %100'ünde ekstratiroidal yayılım yoktur; lenf nodu metastazı olanların %66,7'sinde ekstratiroidal extension yoktur ve %33,3'ünde vardır. Lenf nodu metastazı ile ekstratiroidal extension durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların %100'ünde anjoinvazyon yoktur; lenf nodu metastazı olanların %83,3'ünde anjoinvazyon yoktur ve %16,7'sinde vardır. Lenf nodu metastazı ile anjoinvazyon durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların ($\bar{X}=62,86$; $ss=26,52$) ve lenf nodu metastazı olanların ($\bar{X}=53$; $ss=24,84$) DFS ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların ($\bar{X}=62,86$; $ss=26,52$) ve lenf nodu metastazı olanların ($\bar{X}=53$; $ss=24,84$) OS ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların ($\bar{X}=53,29$; $ss=11,86$) ve lenf nodu metastazı olanların ($\bar{X}=47,17$; $ss=18,25$) yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan lenf nodu metastazı olmayanların ($\bar{X}=1,41$; $ss=0,76$) ve lenf nodu metastazı olanların ($\bar{X}=3,05$; $ss=1,65$) tümör çapı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

RET Mutasyonu ile diğer tüm parametreler arasındaki ilişki Tablo 4.3'te gosterildi.

Tablo 4. 3: RET mutasyonu durumuna göre lenf nodu metastazı ve diğer parametrelerin ilişkisi

Parametreler		RET Mutasyonu		P
		Negatif	Pozitif	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	4 (%44,4)	3 (%75)	0,31 ^a
	Var	5 (%55,6)	1 (%25)	
Evre	pT1	5 (%55,6)	2 (%50)	0,81 ^a
	pT2	1 (%11,1)	1 (%25)	
	pT3	3 (%33,3)	1 (%25)	
Son durum	Ex	1 (%11,1)	-	0,59 ^a
	Hastalıksız yaşıyor	7 (%77,8)	4 (%100)	
	Hastalıklı yaşıyor	1 (%11,1)	-	
Dezmoplazi	Yok	8 (%88,9)	3 (%75)	0,25 ^a
	Orta	-	1 (%25)	
	Yoğun	1 (%11,1)	-	
Amiloid Varlığı	Yok	5 (%55,6)	2 (%50)	0,27 ^a
	Hafif	3 (%33,3)	-	
	Orta	1 (%11,1)	1 (%25)	
	Yoğun	-	1 (%25)	
Varyant	Foliküler	4 (%44,4)	3 (%75)	0,49 ^a
	Tubulopapiller	3 (%33,3)	1 (%25)	
	Spindle	2 (%22,2)	-	
Fokalite	Unifokal	8 (%88,9)	3 (%75)	0,52 ^a
	Multifokal	1 (%11,1)	1 (%25)	
Cinsiyet	Erkek	2 (%22,2)	1 (%25)	0,91 ^a
	Kadın	7 (%77,8)	3 (%75)	
Cerrahi Sınır	Negatif	7 (%77,8)	3 (%75)	0,91 ^a
	Pozitif	2 (%22,2)	1 (%25)	
Kalsitonin Yüzdesi	<%50	5 (%55,6)	1 (%25)	0,31 ^a
	≥%50	4 (%44,4)	3 (%75)	
Grade	Low	8 (%88,9)	3 (%75)	0,52 ^a
	High	1 (%11,1)	1 (%25)	
C Hücre Hiperplazisi	Yok	9 (%100)	3 (%75)	0,12 ^a
	Var	-	1 (%25)	
Kapsül İnvazyonu	Yok	4 (%44,4)	2 (%50)	0,85 ^a
	Var	5 (%55,6)	2 (%50)	
LVI	Yok	5 (%55,6)	3 (%75)	0,51 ^a
	Var	4 (%44,4)	1 (%25)	
Enkapsülasyon	Enkapsüle değil	6 (%66,7)	3 (%75)	0,53 ^a
	Fokal enkapsüle	2 (%22,2)	-	
	Total enkapsüle	1 (%11,1)	1 (%25)	
Ekstratiroidal Yayılım (ETE)	Yok	7 (%77,8)	4 (%100)	0,31 ^a
	Var	2 (%22,2)	-	
Anjoinvazyon	Yok	8 (%88,9)	4 (%100)	0,49 ^a
	Var	1 (%11,1)	-	
DFS (Ay; Ortalama ± ss)		61,56 ± 29,72	51 ± 13,78	0,83 ^b
OS (Ay; Ortalama ± ss)		61,56 ± 29,72	51 ± 13,78	0,83 ^b
Yaş (Yıl; Ortalama ± ss)		47 ± 14,79	58,25 ± 13,28	0,11 ^b
Tümör Çapı (cm; Ortalama ± ss)		2,22 ± 1,78	2,05 ± 0,24	1,00 ^b

*p<0,05; ^a ki-kare testi istatistiği; ^b Mann-Whitney U testi istatistiği

İstatistiksel analizde şu sonuçlara ulaşıldı:

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %44,4'ünün lenf nodu metastazı yok iken %55,6'sının vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inin lenf nodu metastazı yok iken %25'inin vardır. RET mutasyonu durumu ile lenf nodu metastazı olma durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %55,6'sının evre durumu pT1; %11,1'inin pT2 ve %33,3'ünün pT3'tür; RET mutasyonu pozitif olanların %50'sinin evre durumu pT1; %25'inin pT2 ve %25'inin ise pT3'tür. RET mutasyonu durumu olma durumu ile evre durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %11,1'i ex; %77,8'i hastaliksiz yaşamakta ve %11,1'i hastalıklı yaşamaktadır; RET mutasyonu pozitif olanların %100'ü hastaliksiz yaşamaktadır. RET mutasyonu durumu ile son statü durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %88,9'unda desmoplazi yoktur ve %11,1'inde yoğundur; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inde desmoplazi yoktur ve %25'inde orta desmoplazi vardır. RET mutasyonu durumu ile desmoplazi durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %55,6'sında amiloid varlığı yok; %33,3'ünde hafif ve %11,1'inde orta amiloid vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %50'sinde amiloid varlığı yok; %25'inde orta ve %25'inde yoğun amiloid vardır. RET mutasyonu durumu ile amiloid varlığı durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %44,4'ünde follüküler varyant; %33,3'ünde tubulopapiller varyant ve %22,2'sinde spindle varyant vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inde follüküler varyant; %25'inde tubulopapiller varyant vardır. RET mutasyonu durumu ile varyant durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %88,9'unda unifokal fokalite ve %11,1'inde multifokal fokalite vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inde unifokal fokalite ve %25'inde multifokal fokalite vardır. RET mutasyonu durumu ile fokalite durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %22,2'si erkek ve %77,8'i kadındır; RET mutasyonu pozitif olanların %25'i erkek ve %75'i kadındır. RET mutasyonu durumu ile cinsiyet durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %77,8'inin cerrahi sınırı negatif ve %22,2'sinin pozitifdir; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inin cerrahi sınırı negatif ve %25'inin pozitifdir. RET mutasyonu durumu ile cerrahi sınır durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %55,6'sının kalsitonin yüzdesi %50'nin altında ve %44,4'ünün %50'nin üstündedir; RET mutasyonu pozitif olanların %25'inin kalsitonin yüzdesi %50'nin altında ve %75'inin %50'nin üstündedir. RET mutasyonu durumu ile kalsitonin yüzdesi durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %88,9'unun grade durumu düşük ve %11,1'inin yüksektir; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inin grade durumu düşük ve %25'inin yüksektir. RET mutasyonu durumu ile grade durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %100'ünün C hücre hiperplazisi yoktur; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inin C hücre hiperplazisi yoktur ve %25'inin vardır. RET mutasyonu durumu ile C hücre hiperplazisi durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %44,4'ünün kapsül invazyonu yoktur ve %55,6'sının vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %75'inin kapsül invazyonu yoktur ve %25'inin vardır. RET mutasyonu durumu ile kapsül invazyonu durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %55,6'sında LVI yoktur ve %44,4'ünde vardır; RET mutasyonu pozitif olanların

%50'sinde LVI yoktur ve %50'sinde vardır. RET mutasyonu durumu ile LVI durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %66,7'si enkapsüle değildir; %22,2'si fokal enkapsüledir ve %11,1'i enkapsüledir; RET mutasyonu pozitif olanların %75'i enkapsüle değildir ve %25'i enkapsüledir. RET mutasyonu durumu ile enkapsüle durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %77,8'inde ekstratiroidal yayılım yoktur ve %22,2'sinde vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %100'ünde ekstratiroidal yayılım yoktur. RET mutasyonu durumu ile ekstratiroidal extension durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların %88,9'unda anjioinvazyon yoktur ve %11,1'inde vardır; RET mutasyonu pozitif olanların %100'ünde anjioinvazyon yoktur. RET mutasyonu durumu ile anjioinvazyon durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların ($\bar{X}=61,56$; $ss=29,72$) ve RET mutasyonu pozitif olanların ($\bar{X}=51$; $ss=13,78$) DFS ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

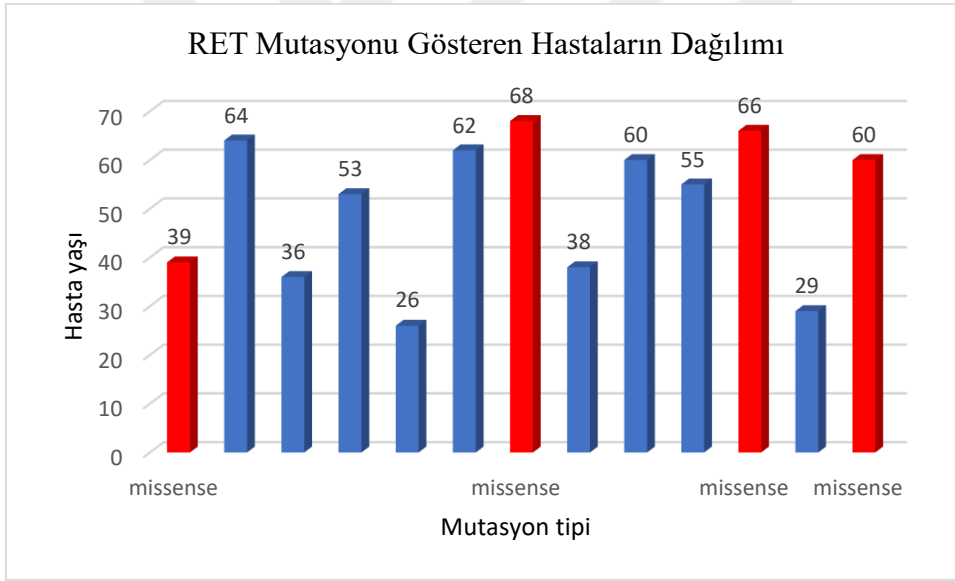
❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların ($\bar{X}=61,56$; $ss=29,72$) ve RET mutasyonu pozitif olanların ($\bar{X}=51$; $ss=13,78$) OS ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların ($\bar{X}=47$; $ss=14,79$) ve RET mutasyonu pozitif olanların ($\bar{X}=58,25$; $ss=13,28$) yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

❖ Araştırmaya katılan hastalardan RET mutasyonu negatif olanların ($\bar{X}=2,22$; $ss=1,78$) ve RET mutasyonu pozitif olanların ($\bar{X}=2,05$; $ss=0,24$) tümör çapı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

4.2. MOLEKÜLER BULGULAR (NGS ANALİZİ)

Çalışmada planlanan ABL1, AKT1, ALK, AXL, APC, ATM, BRAF, CALCA, CCND1, CDH1, CSF1R, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, FBXW, FGFR1, FGFR2, FGFR3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1 α , HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JA3, KDR, KIT, KRAS, KRT20, KRT7, MAP2K1, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRASNRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PIK3CA, PPARG, PTEN, PTH, PTPN11, RB1, RAF1, RET, ROS1, SLC5A5, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, THADA, TP53, TTF1, VHL olmak üzere 63 gen araştırıldı. Moleküler patogeneizde ilişkili olan RET geni üzerinde yoğunlaşıldı. 10.kromozom üzerinde bulunan RET geni için yapılan değerlendirmede 4 hastada (%30,8) RET geninde mutasyon vardır (Şekil 4.17).



Şekil 4. 17: RET mutasyonlarının hastalara göre dağılımı

İllumina NovaSeq6000 NGS cihazı ile RET geni ve üzerindeki aminoasit dizilimlerine göre görülen tüm RET mutasyonları yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. RET mutasyonu olan hastalardaki değişimler, 10. kromozomlardaki ilgili genlere ait aminoasit dizisindeki farklılıklar, allelik frekanslar, mutasyonların tipi, hasar derecesi, skorları gibi tüm veriler sırası ile şu şekildedir:

1 nolu hasta: c.1902C>G p.Cys634Trp (Ekzom 11) (Şekil 4.18, Tablo 4.4)

7 nolu hasta: c.2257A>C p.Thr753Pro (Şekil 4.19, Tablo 4.5)

11 nolu hasta: c.2370G>T p.Leu790Phe (Ekzom 13) (Şekil 4.20, Tablo 4.6)

13 nolu hasta: c.1901G>T p.Cys634Phe (Ekzom 11) (Şekil 4.21, Tablo 4.7)

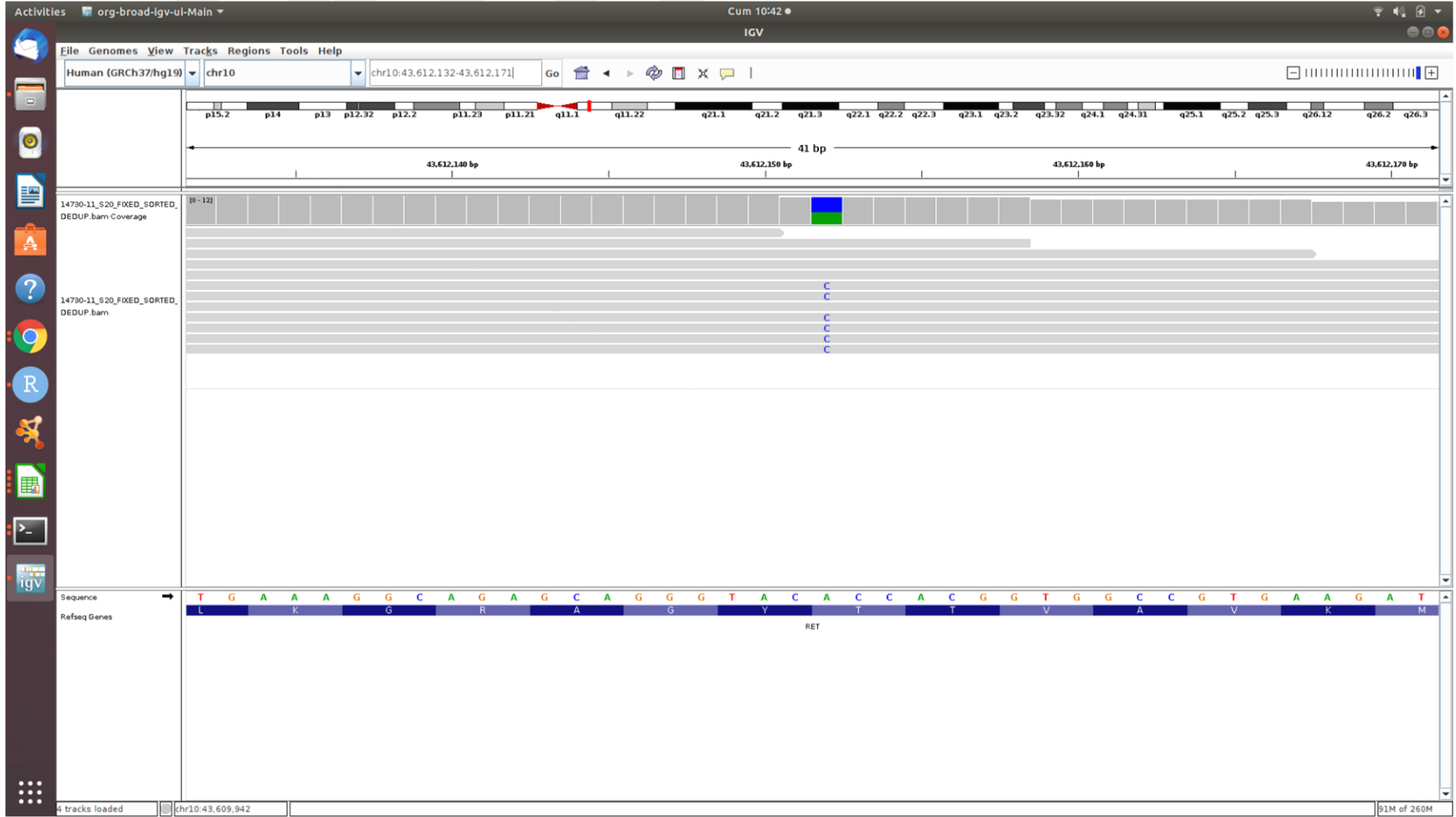


Tablo 4. 4: 1 nolu hastada RET genindeki WES analizi

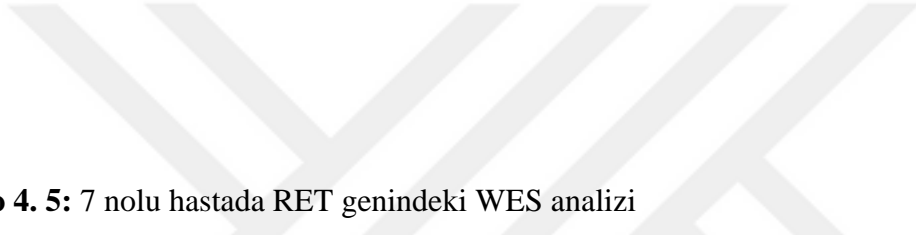
Variant_Annotation										1000_Genomes	CADD_Exome	
Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	Samples	AF	Score	Phred
chr10	5499436	C	G	CALML5	ENST00000380332.5	start_lost	c.3G>C	p.Met1?	Patient 1		2,352199	21,9
chr10	5747050	C	T	TASOR2	ENST00000645567.1	missense_variant	c.4274C>T	p.Ser1425Leu	Patient 1		1,773417	17,54
chr10	19136775	A	G	MALRD1	ENST00000454679.7	missense_variant	c.1405A>G	p.Thr469Ala	Patient 1	0,068490415	0,29982	4,287
chr10	20869799	C	T	NEBL	ENST00000377122.8	missense_variant	c.523G>A	p.Ala175Thr	Patient 1	0,000399361	1,22717	13,85
chr10	27155460	G	C	MASTL	ENST00000375940.8	missense_variant	c.34G>C	p.Gly12Arg	Patient 1	0,004392971	1,322596	14,55
chr10	27167161	C	T	MASTL	ENST00000375940.8	missense_variant	c.871C>T	p.Leu291Phe	Patient 1	0,000399361	3,448347	24,5
chr10	43114502	C	G	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.1902C>G	p.Cys634Trp	Patient 1		3,769394	25,7
chr10	58388810	A	-	TFAM	ENST00000487519.6	frameshift_truncation	c.440del	p.Glu148SerfsTer2	Patient 1			
chr10	82973915	G	A	NRG3	ENST00000372141.7	missense_variant	c.1412G>A	p.Arg471Lys	Patient 1		6,601847	36
chr10	86942614	-	CGGCC	MMRN2	ENST00000372027.10	inframe_insertion	c.2165_2170dup	p.Gly722_Ala723dup	Patient 1			
chr10	87022343	G	C	FAM25A	ENST00000343959.5	missense_variant	c.103G>C	p.Val35Leu	Patient 1	0,037739617	3,249364	24
chr10	91908383	T	C	FGFBP3	ENST00000311575.6	missense_variant	c.587A>G	p.Lys196Arg	Patient 1	0,009185304	0,905708	10,49
chr10	93518926	G	A	CEP55	ENST00000371485.8	missense_variant	c.1043G>A	p.Arg348Lys	Patient 1	0,033945687	2,390786	22
chr10	94402760	GGAGGAGGC	-	TBC1D12	ENST00000225235.5	inframe_deletion	c.172_189del	p.Ala58_Glu63del	Patient 1			
chr10	96160082	A	T	ZNF518A	ENST00000316045.9	missense_variant	c.3760A>T	p.Ile1254Phe	Patient 1	0,035942492	0,75223	8,933
chr10	101550817	C	A	BTRC	ENST00000370187.8	missense_variant	c.1775C>A	p.Pro592His	Patient 1	0,006589457	2,381038	22
chr10	103288460	A	C	INA	ENST00000369849.9	missense_variant	c.1291A>C	p.Ile431Leu	Patient 1	0,017971246	1,210442	13,72
chr10	122085634	C	T	TACC2	ENST00000369005.6	missense_variant	c.3134C>T	p.Pro1045Leu	Patient 1	0,000599042	1,564892	16,15
chr10	124412065	C	G	OAT	ENST00000368845.6	missense_variant	c.107G>C	p.Gly36Ala	Patient 1		2,181505	20,7
chr10	125026676	C	G	CTBP2	ENST00000309035.11	missense_variant	c.1084G>C	p.Gly362Arg	Patient 1	0,000599042	1,357936	14,8
chr10	133073046	C	T	ADGRA1	ENST00000607359.5	missense_variant	c.584C>T	p.Pro195Leu	Patient 1	0,005591054	1,219581	13,79
chr10	133080335	C	T	ADGRA1	ENST00000607359.5	missense_variant	c.784C>T	p.Arg262Cys	Patient 1	0,012779553	0,183741	2,94
chr10	133093243	T	C	ADGRA1	ENST00000607359.5	missense_variant	c.2018T>C	p.Leu673Pro	Patient 1	0,01158147	0,342869	4,783
chr11	400124	C	G	PKP3	ENST00000331563.7	missense_variant	c.1431C>G	p.Asn477Lys	Patient 1	0,001996805	0,236322	3,544

Tablo 4. 4 (devam)

Variant_Count (Tissue)	Variant	Match	Prediction	Prediction	Functional	MutationTaster Rank_Score	Prediction	VCF_Info Phred	VCF_filter	Zygoticity	P-value
			Neutral	Tolerated		0,81001	Damaging	44,9	PASS	het	0,02975
			Neutral	Tolerated		0,08975	Polymorphism	47,6	PASS	het	0,54539
								42,3	PASS	hom	0,94201
			Damaging	Tolerated	low	0,81001	Damaging	61,9	PASS	het	0,13339
[[["lung", 2]]	2	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	0,08975	Polymorphism	45,2	PASS	het	0,57191
			Neutral	Damaging	medium	0,54805	Damaging	46,6	PASS	het	0,25807
[[["thyroid", 9]]	9	Exact Match	Damaging	Damaging	medium	0,81001	Automatic Disease Causin	41,9	PASS	het	0,00283
[[["stomach", 6], ["upper a	18	Protein Change						22,5	PASS	het	
[[["lung", 1]]	1	Genomic Location	Damaging	Tolerated	low	0,81001	Damaging	23,7	PASS	het	0,09766
								60,8	PASS	het	
			Neutral	Tolerated		0,31842	Damaging	51	PASS	het	0,52545
[[["thyroid", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	neutral	0,08975	Polymorphism	51	PASS	het	0,99787
[[["skin", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	0,43845	Automatic Polymorphism	52,5	PASS	het	0,79101
								44	PASS	het	
[[["stomach", 2], ["pancrea	3	Exact Match			neutral			43,3	PASS	het	0,93837
			Neutral	Tolerated	low	0,52396	Damaging	50	PASS	het	0,29278
			Neutral	Tolerated	neutral	0,27345	Polymorphism	48,2	PASS	het	0,84921
[[["large intestine", 1]]	1	Genomic Location		Tolerated	low	0,20581	Polymorphism	62,3	PASS	het	0,30543
[[["pancreas", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	low	0,81001	Polymorphism	55,9	PASS	het	0,31889
			Neutral	Tolerated		0,08975	Polymorphism	58	PASS	het	0,48264
			Neutral	Tolerated				47,7	PASS	het	0,71147
			Neutral	Tolerated				48,8	PASS	het	0,84921
			Neutral	Tolerated		0,08975	Polymorphism	35,3	PASS	het	0,36403
			Neutral	Damaging	medium	0,54805	Damaging	64	PASS	het	0,05253



Şekil 4. 19: 7 nolu hastada RET genindeki baz dizisi

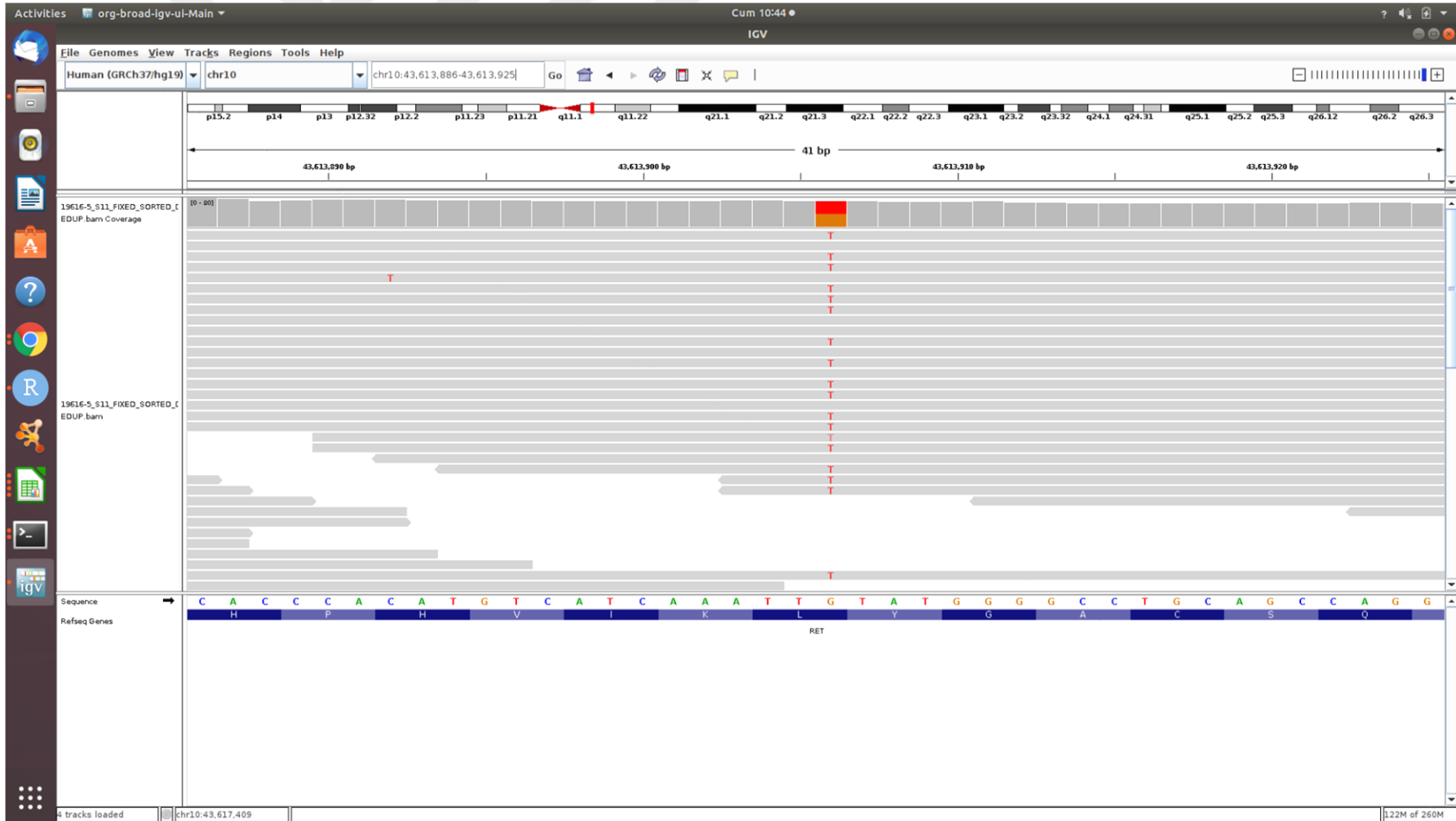


Tablo 4. 5: 7 nolu hastada RET genindeki WES analizi

Variant_Annotation	Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	Samples	1000_Genomes AF	CADD_Exome Score	Phred
	chr10	1044113	C	T	IDI1	ENST00000381344.7	missense_variant	c.199G>A	p.Asp67Asn	Patient 7		3,300092	24,1
	chr10	5099417	C	T	AKR1C3	ENST00000380554.5	missense_variant	c.538C>T	p.Pro180Ser	Patient 7	0,008586262	3,111877	23,7
	chr10	7985588	C	T	TAF3	ENST00000344293.8	missense_variant	c.2058C>T	p.Pro88Ser	Patient 7		2,009353	19,33
	chr10	13498858	C	T	BEND7	ENST00000341083.7	missense_variant	c.323G>A	p.Gly108Glu	Patient 7		2,011756	19,35
	chr10	13656927	C	T	FRMD4A	ENST00000357447.7	missense_variant	c.2662G>A	p.Gly88Ser	Patient 7		0,614527	7,653
	chr10	15214021	G	C	FAM171A1	ENST00000378116.9	missense_variant	c.1567C>G	p.Pro523Ala	Patient 7		1,328144	14,59
	chr10	15572324	C	T	ITGA8	ENST00000378076.4	missense_variant	c.2524G>A	p.Val842Met	Patient 7		3,834944	26
	chr10	21759570	G	A	DNAJC1	ENST00000376980.8	missense_variant	c.1198C>T	p.Pro399Leu	Patient 7		2,385708	22
	chr10	22981451	TG	-	ARMC3	ENST00000298032.10	frameshift_truncation	c.1032_1033del	p.Cys344Ter	Patient 7			
	chr10	24602004	G	A	ARHGAP21	ENST00000396432.7	stop_gained	c.2821C>T	p.Arg941Ter	Patient 7		7,653333	39
	chr10	32451871	-	T	CCDC7	ENST00000639629.1	frameshift_elongation	c.230dup	p.Leu77PhefsTer6	Patient 7	0,008386581		
	chr10	42594348	C	T	ZNF33B	ENST00000359487.8	missense_variant	c.602G>A	p.Ser201Asn	Patient 7		0,104779	2,134
	chr10	43116704	A	C	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.2257A>C	p.Thr753Pro	Patient 7		3,966258	26,7
	chr10	43481522	C	T	ZNF487	ENST00000651159.1	missense_variant	c.227C>T	p.Thr76Ile	Patient 7		0,457773	6,057
	chr10	50009104	C	T	AGAP8	ENST00000412531.5	missense_variant	c.979C>T	p.His327Tyr	Patient 7		2,112016	20,2
	chr10	70780498	C	T	ADAMTS14	ENST00000373207.2	missense_variant	c.3317C>T	p.Pro1106Leu	Patient 7	0,027955272	0,939087	10,87
	chr10	71617355	G	A	CDH23	ENST00000224721.12	missense_variant	c.1098G>A	p.Ala366Thr	Patient 7	0,001996805	3,65739	25,2
	chr10	71773387	C	T	VSIR	ENST00000394957.8	missense_variant	c.73G>A	p.Ala25Thr	Patient 7	0,000199681	1,908444	18,55
	chr10	72881694	G	C	MCU	ENST00000357157.10	missense_variant	c.512G>C	p.Cys171Ser	Patient 7		0,047509	1,661
	chr10	73770011	C	T	SEC24C	ENST00000345254.9	missense_variant	c.2858C>T	p.Pro953Leu	Patient 7		4,013324	27,1
	chr10	74985143	G	A	KAT8B	ENST00000287239.10	missense_variant	c.2437G>A	p.Asp813Asn	Patient 7		4,211729	28,8
	chr10	75401355	CCGCCG	-	ZNF503	ENST00000372524.5	inframe_deletion	c.80_85del	p.Gly26_Gly27del	Patient 7			
	chr10	77403948	C	T	KCNMA1	ENST00000286628.14	missense_variant	c.454G>A	p.Val152Met	Patient 7		2,332116	21,8
	chr10	80162010	C	T	ANXA11	ENST00000422982.8	missense_variant	c.1105G>A	p.Glu369Lys	Patient 7	0,001797125	4,315789	29,7
	chr10	80366844	G	A	DYDC2	ENST00000256039.3	missense_variant	c.427G>A	p.Gly143Ser	Patient 7	0,01158147	0,597312	7,488
	chr10	84254334	C	T	RGR	ENST00000652092.2	missense_variant	c.521C>T	p.Thr174Ile	Patient 7		0,363602	5,019
	chr10	87792898	C	T	ATAD1	ENST00000308448.11	missense_variant	c.222G>A	p.Met74Ile	Patient 7		3,084034	23,6
	chr10	92349740	G	A	MARCHF5	ENST00000358935.3	missense_variant	c.623G>A	p.Arg208Gln	Patient 7		4,49455	32
	chr10	92806296	G	A	KIF11	ENST00000260731.5	missense_variant	c.109G>A	p.Ala37Thr	Patient 7		3,783872	25,8
	chr10	93066269	G	A	CYP28C1	ENST00000651965.1	missense_variant	c.1175G>A	p.Arg392His	Patient 7		4,229464	28,9
	chr10	93316767	C	T	MYOF	ENST00000359283.9	missense_variant	c.5645G>A	p.Arg1882Lys	Patient 7		1,749215	17,37
	chr10	93900811	G	A	SLC35G1	ENST00000427197.2	missense_variant	c.419G>A	p.Gly140Asp	Patient 7		3,929833	26,5
	chr10	94510108	C	T	TBC1D12	ENST00000225235.5	stop_gained	c.1818C>T	p.Arg540Ter	Patient 7		7,920461	40
	chr10	95356494	C	T	SORBS1	ENST00000607232.5	missense_variant	c.2041G>A	p.Val881Ile	Patient 7		2,022678	19,43
	chr10	96058044	C	T	CCNJ	ENST00000465148.3	missense_variant	c.955C>T	p.His319Tyr	Patient 7		2,08067	19,87

Tablo 4. 5 (devam)

Variant_Count (Tissue)	Variant	Match	Prediction			Functional_impact	MutationTaster		PnD-SNPg		VCF_Info			P-value
			Prediction	Prediction	Prediction		Rank_Score	Prediction	Prediction	Prediction	Prediction	Phred	VCF_filter	
["Lung", 4]	4	Exact Match	Damaging	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	19,5	PASS	het	0,0379	
			Neutral	Tolerated	low	0,44227	Damaging	Pathogenic	Damaging	50	PASS	het	0,1709	
			Damaging	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	28,6	PASS	het	0,5469	
			Neutral	Tolerated		0,39331	Damaging	Pathogenic	Neutral	26,7	PASS	het	0,3246	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,32829	Damaging	Benign	Neutral	47,2	PASS	het	0,493	
			Neutral	Tolerated	low	0,58761	Damaging	Pathogenic	Neutral	17,1	PASS	het	0,6244	
			Damaging	Tolerated	medium	0,58761	Damaging	Pathogenic	Neutral	51,2	PASS	het	0,0493	
			Neutral	Tolerated	medium	0,25168	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	18,6	PASS	het	0,8089	
["central nervous system", 1]	1	Exact Match	Neutral			0,81001	Automatic Disease Causing	Pathogenic		43,7	PASS	het	0,2094	
			Protein Change							53	PASS	hom		
["ovary", 3], ["kidney", 1], ["NS", 1], ["haematopoietic and lymphoid tissue", 1]	6	Protein Change	Neutral	Tolerated	low	0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	17,2	PASS	het	0,9806	
			Damaging	Damaging	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	54,6	PASS	het	0,0377	
			Neutral	Tolerated		0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	23,5	PASS	het	0,68	
			Neutral	Tolerated	medium	0,43662	Damaging	Pathogenic		21,4	PASS	het	0,2075	
			Neutral	Tolerated	medium	0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	41,2	PASS	het	0,7115	
["large intestine", 1]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	51,1	PASS	het	0,0111	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,81001	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	41,7	PASS	het	0,5436	
["haematopoietic and lymphoid tissue", 1]	1	Genomic Location	Damaging	Tolerated		0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	27	PASS	het	0,6757	
			Damaging	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	48,7	PASS	het	0,0183	
			Damaging	Damaging	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	39,7	PASS	het	0,0409	
										34,2	PASS	het		
["Lung", 1]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	low	0,38029	Damaging	Pathogenic	Neutral	38	PASS	het	0,1714	
			Damaging	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	49,1	PASS	het	0,0145	
["skin", 1]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	neutral	0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	55,7	PASS	het	0,9043	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,24173	Polymorphism	Benign	Neutral	26,1	PASS	het	0,6383	
			Damaging	Damaging	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	19,5	PASS	het	0,126	
["liver", 1]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated		0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	25,4	PASS	het	0,0339	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,4085	Damaging	Pathogenic	Neutral	37,8	PASS	het	0,3375	
["Lung", 1], ["large intestine", 1], ["endometrium", 1], ["up", 1]	5	Exact Match	Neutral	Tolerated	neutral	0,26315	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	25,8	PASS	het		
			Neutral	Tolerated	neutral	0,25714	Polymorphism	Benign	Neutral	21,1	PASS	het	0,4954	
["Lung", 1]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	high	0,58761	Damaging	Pathogenic	Damaging	27,4	PASS	het	0,0055	
			Neutral			0,81001	Automatic Disease Causing	Pathogenic		34	PASS	het	0,3576	
["large intestine", 1]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated		0,81001	Damaging	Pathogenic		59,1	PASS	het	0,3559	
			Damaging	Tolerated	neutral	0,47544	Damaging	Pathogenic	Neutral	16,1	PASS	het	0,2432	
			Damaging	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	44,1	PASS	het	0,0597	
["large intestine", 1]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	27,7	PASS	het	0,2091	
			Neutral	Tolerated	medium	0,4498	Damaging	Pathogenic	Neutral	45,3	PASS	het	0,2039	
			Damaging	Damaging	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	17,2	PASS	het	0,0169	
			Damaging	Damaging	low	0,58761	Damaging	Pathogenic	Neutral	34,6	PASS	het	0,1058	
			Neutral	Tolerated		0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	17,5	PASS	het	0,0094	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,19238	Polymorphism	Benign	Neutral	50,3	PASS	het	0,7298	
			Neutral	Tolerated		0,3157	Polymorphism	Benign	Neutral	28,7	PASS	het	0,9262	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,54805	Damaging	Pathogenic	Neutral	25,8	PASS	het	0,36	
			Neutral	Tolerated	neutral	0,25754	Automatic Polymorphism	Benign	Neutral	48,5	PASS	het	0,795	
			Neutral	Tolerated	medium	0,31166	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	53,1	PASS	het	0,1159	
["endometrium", 1]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	medium	0,31166	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	53,1	PASS	het	0,1159	
["stomach", 1], ["endometrium", 1]	2	Exact Match	Neutral	Damaging	low	0,08975	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	40,6	PASS	het	0,8458	
["skin", 1]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	medium	0,36597	Damaging	Pathogenic	Damaging	35,5	PASS	het	0,2399	



Şekil 4. 20: 11 nolu hastada RET genindeki baz dizisi

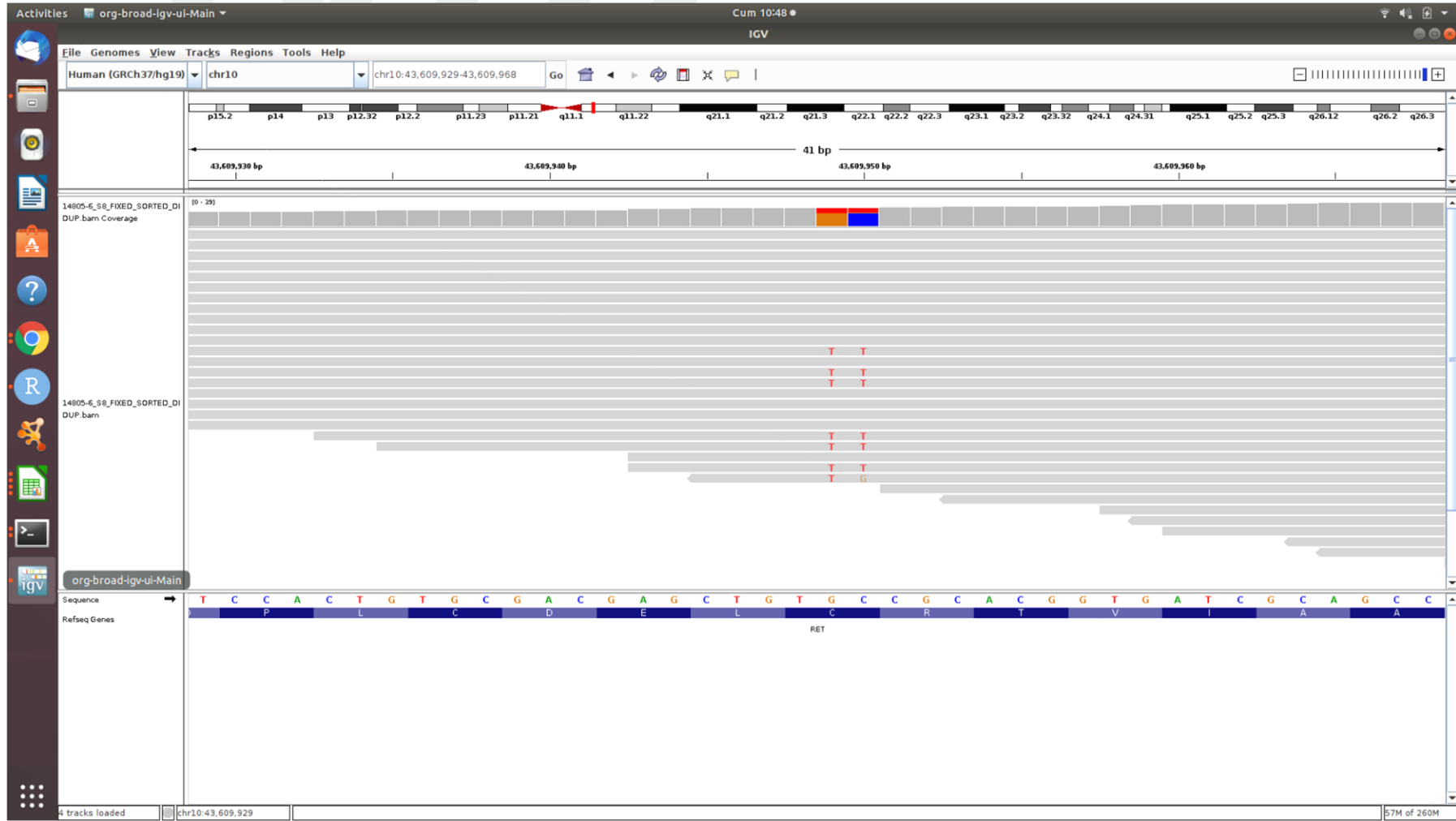
Tablo 4.6: 11 nolu hastada RET genindeki WES analizi

Variant_Annotation	Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	Samples	1000_Genomes AF	CADD_Exome Score	Phred
	chr10	5652924	T	C	ASB13	ENST00000357700.11	missense_variant	c.170A>G	p.His57Arg	Patient 11		3,823428	25,9
	chr10	7284026	C	T	SFMBT2	ENST00000361972.8	missense_variant	c.650G>A	p.Arg217His	Patient 11		3,12328	23,7
	chr10	15213153	G	A	FAM171A1	ENST00000378118.9	missense_variant	c.2435C>T	p.Ala812Val	Patient 11		3,330784	24,2
	chr10	19204380	G	A	MALRD1	ENST00000454679.7	missense_variant	c.2177G>A	p.Ser726Asn	Patient 11	0,033945887	1,89361	18,44
	chr10	22329261	A	G	COMMD3-BMI1	ENST00000602390.5	missense_variant	c.1129A>G	p.Met377Val	Patient 11		2,889846	23,2
	chr10	27935146	G	A	ARMC4	ENST00000305242.10	missense_variant	c.2359C>T	p.Arg787Cys	Patient 11	0,074880192	1,497277	15,72
	chr10	29467809	-	GGA	SVIL	ENST00000355867.8	inframe_insertion	c.5908_5910dup	p.Ser1970dup	Patient 11			
	chr10	38056438	A	G	ZNF33A	ENST00000432900.7	missense_variant	c.2314A>G	p.Ile772Val	Patient 11		0,17958	2,894
	chr10	43118458	G	T	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.2370G>T	p.Leu790Phe	Patient 11	0,000199681	2,593608	22,6
	chr10	44989894	G	A	RASSF4	ENST00000340258.10	missense_variant	c.858G>A	p.Ala220Thr	Patient 11		2,960902	23,3
	chr10	45303618	-	A	OR13A1	ENST00000553795.6	frameshift_elongation	c.805dup	p.Tyr269LeufsTer68	Patient 11	0,024980064		
	chr10	50095704	G	T	WASHC2A	ENST00000282633.10	missense_variant	c.1346G>T	p.Gly449Val	Patient 11		2,125268	20,3
	chr10	49922612	A	T	PARG	ENST00000402038.7	missense_variant	c.1513T>A	p.Leu505Met	Patient 11	0,000199681	1,622735	16,52
	chr10	60911362	C	T	RHOBTB1	ENST00000337910.10	missense_variant	c.181G>A	p.Val61Met	Patient 11		3,343827	24,2
	chr10	83193075	G	A	JMJD1C	ENST00000399262.7	missense_variant	c.5939C>T	p.Pro1980Leu	Patient 11	0,010583067	1,819947	17,88
	chr10	74097270	A	G	VCL	ENST00000211998.9	missense_variant	c.1810A>G	p.Thr604Ala	Patient 11		4,077105	27,6
	chr10	77805712	A	T	DLG5	ENST00000372391.7	missense_variant	c.5117T>A	p.Leu1708Gln	Patient 11		3,586621	24,9
	chr10	93587284	G	A	FFAR4	ENST00000371481.8	missense_variant	c.761G>A	p.Arg254His	Patient 11	0,014978038	2,42184	22,2
	chr10	94334208	A	G	NOC3L	ENST00000371361.3	missense_variant	c.2372T>C	p.Phe791Ser	Patient 11	0,001996805	3,702793	25,4
	chr10	95927292	G	C	CC2D2B	ENST00000646931.2	missense_variant	c.298G>C	p.Ser99Thr	Patient 11	0,006988818	0,638185	7,879
	chr10	97862967	G	A	PI4K2A	ENST00000370631.3	missense_variant	c.983G>A	p.Arg328Gln	Patient 11	0,005391374	3,706126	25,4
	chr10	97879799	A	C	AVPI1	ENST00000370626.4	missense_variant	c.107T>G	p.Leu36Arg	Patient 11	0,047723642	3,986378	26,9
	chr10	98244135	G	A	R3HCC1L	ENST00000612478.4	missense_variant	c.2356G>A	p.Gly786Ser	Patient 11		4,089582	27,7
	chr10	100945382	TAATGTTGCTGATT	-	SLF2	ENST00000238961.9	inframe_deletion	c.2817_2831del	p.Leu940_Leu944del	Patient 11			
	chr10	101526085	T	G	BTRC	ENST00000370187.8	missense_variant	c.629T>G	p.Leu210Arg	Patient 11		3,575801	25
	chr10	101579778	C	T	POLL	ENST00000370162.8	missense_variant	c.1403G>A	p.Gly468Asp	Patient 11	0,000199681	3,827591	26
	chr10	102146908	C	G	PPRC1	ENST00000278070.7	missense_variant	c.3916C>G	p.Pro1308Ala	Patient 11		2,99967	23,4
	chr10	103405088	G	C	PDCD11	ENST00000369797.8	missense_variant	c.469G>C	p.Gly157Arg	Patient 11	0,001996805	1,41488	15,18
	chr10	103417888	G	T	PDCD11	ENST00000369797.8	missense_variant	c.1867G>T	p.Ala823Ser	Patient 11	0,026757188	0,209198	3,229
	chr10	104187448	TTTCATC	-	CFAP43	ENST00000357060.8	frameshift_truncation	c.1726_1732del	p.Asp576SerfsTer77	Patient 11			
	chr10	104641622	G	A	SORCS3	ENST00000369701.8	missense_variant	c.295G>A	p.Gly99Ser	Patient 11	0,06629393	0,715899	8,601
	chr10	128123150	G	A	MKI67	ENST00000368654.8	missense_variant	c.112C>T	p.Arg38Cys	Patient 11		4,768175	33
	chr10	131311544	G	A	TCERG1L	ENST00000368642.4	missense_variant	c.92C>T	p.Ala31Val	Patient 11	0,000399361	2,140722	20,4
	chr10	132909222	G	A	CFAP46	ENST00000368586.10	missense_variant	c.2672C>T	p.Ser891Leu	Patient 11		0,462372	6,107
	chr10	132934777	G	A	CFAP46	ENST00000368586.10	missense_variant	c.841C>T	p.Arg281Cys	Patient 11	0,026757188	1,184314	13,51



Tablo 4. 6 (devam)

Variant_Count (Tissue)	Variant	Match	Predictior	Predictior	Predictior	Functional	MutationTaster		PhD-SNPg		VCF_Info		Zygotisity	P-value
							Rank_Score	Prediction	Prediction	Prediction	Phred	VCF_filter		
			Damaging	Damaging	Damaging	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	50,6	PASS	het	0,0111
[[["lung", 1], ["large intestine", 1]]	2	Exact Match	Damaging	Tolerated	Tolerated	medium	0,58781	Damaging	Pathogenic	Neutral	54,1	PASS	het	0,2411
[[["upper aerodigestive tract", 1], ["skin", 1]]	2	Exact Match	Neutral	Tolerated	Tolerated	low	0,50225	Damaging	Pathogenic	Neutral	36,4	PASS	het	0,3514
			Neutral	Tolerated	Tolerated		0,19599	Polymorphism	Benign	Neutral	53,3	PASS	het	0,9043
			Damaging	Tolerated	Tolerated		0,58781	Damaging	Pathogenic	Neutral	43,6	PASS	het	0,2207
[[["liver", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	Tolerated	neutral	0,08975	Automatic Polymorphism	Benign	Neutral	47,2	PASS	het	0,9304
											56,6	PASS	het	
			Neutral	Tolerated	Tolerated	low	0,2185	Polymorphism	Benign	Neutral	45,4	PASS	het	0,9103
[[["central nervous system", 1]]	1	Protein Change	Neutral	Damaging	Damaging	low	0,54805	Damaging	Pathogenic	Damaging	58,4	PASS	het	0,0053
[[["endometrium", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	39,1	PASS	het	0,1244
[[["lung", 2], ["haematopoietic and lymphoid ti	3	Protein Change									52,1	PASS	het	
			Neutral	Tolerated	Tolerated		0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	28,4	PASS	het	0,4503
			Neutral	Tolerated	Tolerated	low			Pathogenic		36,5	PASS	het	0,2407
[[["large intestine", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Damaging	Damaging	neutral	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	85,3	PASS	het	0,0382
			Damaging	Tolerated	Tolerated	neutral	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	42,3	PASS	het	0,6244
			Damaging	Tolerated	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	40,5	PASS	het	0,1083
			Damaging	Tolerated	Tolerated	medium	0,48831	Damaging	Pathogenic	Damaging	37,9	PASS	het	0,1033
[[["large intestine", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	Tolerated	medium	0,28342	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	47,3	PASS	het	0,7572
			Neutral	Tolerated	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	37,6	PASS	het	0,0943
			Neutral	Tolerated	Tolerated		0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	55,7	PASS	het	0,9328
[[["stomach", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	Tolerated	neutral	0,58781	Damaging	Pathogenic	Neutral	45,3	PASS	het	0,1342
[[["thyroid", 1], ["pancreas", 1], ["large intestin	3	Exact Match	Damaging	Tolerated	Tolerated	medium	0,49637	Damaging	Pathogenic	Damaging	50,7	PASS	het	0,3189
			Damaging	Tolerated	Tolerated	low	0,58781	Damaging	Pathogenic	Damaging	35,9	PASS	het	0,0126
											17,1	PASS	het	
			Damaging	Tolerated	Tolerated	high	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	54,5	PASS	het	0,0126
			Damaging	Tolerated	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	49,2	PASS	het	0,0829
			Neutral	Tolerated	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Benign	Neutral	49,6	PASS	het	0,2321
			Neutral	Tolerated	Tolerated	low	0,08975	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	49,1	PASS	het	0,6871
[[["soft tissue", 3], ["lung", 1]]	4	Exact Match	Neutral	Tolerated	Tolerated	neutral	0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	35,2	PASS	het	0,9043
											24,2	PASS	het	
			Neutral	Tolerated	Tolerated	neutral	0,08975	Automatic Polymorphism	Benign	Neutral	45,1	PASS	het	0,9304
			Damaging	Damaging	Damaging	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	26,2	PASS	het	0,0897
			Neutral	Tolerated	Tolerated	low	0,27314	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	45,3	PASS	het	0,597
			Neutral	Tolerated	Tolerated		0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	55,5	PASS	het	0,4884
[[["urinary tract", 2]]	2	Exact Match	Neutral	Tolerated	Tolerated		0,08975	Polymorphism	Benign	Damaging	55,5	PASS	het	0,5651



Şekil 4. 21: 13 nolu hastada RET genindeki baz dizisi

Tablo 4. 7: 13 nolu hastada RET genindeki WES dizisi

Variant_Annotation	Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	Samples	1000_Genomes AF	CADD_Exome Score	Phred
	chr10	864266	G	A	LARP4B	ENST00000316157.8	missense_variant	c.146C>T	p.Pro49Leu	Patient 13		4,259445	29,2
	chr10	5394110	G	A	TUBAL3	ENST00000380419.8	missense_variant	c.748C>T	p.Arg250Trp	Patient 13	0,044528754	2,26988	21,4
	chr10	5742385	C	A	TASOR2	ENST00000645567.1	missense_variant	c.3261C>A	p.Asn1087Lys	Patient 13		0,550027	7,018
	chr10	14820083	C	G	CDNF	ENST00000465530.2	missense_variant	c.461G>C	p.Trp154Ser	Patient 13	0,013578275	4,041384	27,3
	chr10	24473904	G	A	KIAA1217	ENST00000376454.8	missense_variant	c.1523G>A	p.Arg508His	Patient 13	0,002795527	4,11597	27,9
	chr10	37952793	ACATTCAGT	-	ZNF25	ENST00000302609.8	inframe_deletion	c.697_705del	p.Thr233_Cys235del	Patient 13			
	chr10	42593638	G	T	ZNF33B	ENST00000359467.8	missense_variant	c.1312C>A	p.Gln438Lys	Patient 13		0,301633	4,308
	chr10	43114501	G	T	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.1901G>T	p.Cys634Phe	Patient 13		4,321417	29,8
	chr10	48185600	C	T	FRMPD2	ENST00000374201.8	missense_variant	c.2312G>A	p.Arg771Gln	Patient 13	0,001597444	0,181953	2,92
	chr10	50009895	G	C	AGAP6	ENST00000412531.5	missense_variant	c.1770G>C	p.Gln590His	Patient 13		0,196677	3,086
	chr10	70145979	G	A	TYSND1	ENST00000287078.7	missense_variant	c.608C>T	p.Pro203Leu	Patient 13	0,027555911	1,586476	16,29
	chr10	70255211	G	T	NPFPR1	ENST00000277942.7	missense_variant	c.1039C>A	p.Arg347Ser	Patient 13	0,029752396	1,670543	16,83
	chr10	73803313	T	G	NDST2	ENST00000309979.11	missense_variant	c.2189A>C	p.Tyr730Ser	Patient 13		3,348968	24,3
	chr10	75107995	C	G	DUSP13	ENST00000372702.7	missense_variant	c.364G>C	p.Gly122Arg	Patient 13	0,012779553	1,720058	17,16
	chr10	77821284	C	T	DLG5	ENST00000372391.7	missense_variant	c.3200G>A	p.Arg1067His	Patient 13		2,401287	22,1
	chr10	80144342	-	AGA	PLAC9	ENST00000372263.4	inframe_insertion	c.283_283+1insAAG	p.Gly94_Asp95insGlu	Patient 13	0,020567093		
	chr10	80167303	C	T	ANXA11	ENST00000422982.8	missense_variant	c.572G>A	p.Arg191Gln	Patient 13	0,021964856	3,525757	24,8
	chr10	80609446	C	T	SH2D4B	ENST00000646907.1	missense_variant	c.883C>T	p.Arg295Cys	Patient 13	0,029952077	1,90401	18,52
	chr10	87158123	T	C	SHLD2	ENST00000298786.4	missense_variant	c.1601T>C	p.Leu534Pro	Patient 13		4,083541	27,6
	chr10	88815200	G	C	LIPM	ENST00000404743.9	missense_variant	c.687G>C	p.Leu229Phe	Patient 13	0,018570288	1,195483	13,6
	chr10	95384069	T	C	SORBS1	ENST00000607232.5	missense_variant	c.821A>G	p.Tyr274Cys	Patient 13	0,021964856	1,480253	15,61
	chr10	96984349	C	A	LCOR	ENST00000421806.3	missense_variant	c.3889C>A	p.Pro1297Thr	Patient 13		2,49571	22,4
	chr10	101018271	CTC	-	PDZD7	ENST00000619208.6	inframe_deletion	c.1348_1350del	p.Glu450del	Patient 13	0,000798722		
	chr10	104212153	C	T	CFAP43	ENST00000357060.8	missense_variant	c.589G>A	p.Val197Met	Patient 13	0,003394569	2,386485	22
	chr10	112166466	A	G	GPAM	ENST00000348367.9	missense_variant	c.1157T>C	p.Ile386Thr	Patient 13	0,007388179	2,637766	22,7
	chr10	124044732	C	T	CHST15	ENST00000435907.6	missense_variant	c.734G>A	p.Gly245Glu	Patient 13		2,335335	21,8
	chr10	125026332	GGGGCCTGGGTGAA-	-	CTBP2	ENST00000309035.11	frameshift_truncation	c.1415_1428del	p.Leu472GlnfsTer125	Patient 13			
	chr10	128109346	G	A	MKI67	ENST00000368654.8	missense_variant	c.2494C>T	p.Arg832Trp	Patient 13	0,013977636	2,379016	22
	chr10	132168227	C	A	JAKMIP3	ENST00000666210.1	missense_variant	c.2807C>A	p.Ala936Asp	Patient 13	0,008586262	0,068283	1,822

Tablo 4. 7 (devam)

Variant_Count (Tissue)	Variant_Match	Prediction	Prediction	Functional	MutationTaster		PhD-SNPg		VCF_Info			P-value	
					Rank_Score	Prediction	Prediction	Prediction	Phred	VCF_filter	Zygoticity		
		Damaging	Tolerated	medium	0,47118	Damaging	Pathogenic	Damaging	15,6	PASS	het	0,3054	
		Neutral	Tolerated	high	0,31366	Polymorphism	Pathogenic	Damaging	48,1	PASS	het	0,3391	
		Neutral	Damaging		0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	21,5	PASS	het	0,682	
		Damaging	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	48,8	PASS	het	0,3723	
["lung", 3]]	3	Exact Match	Damaging	Tolerated	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	46	PASS	het	0,0256
									16,4	PASS	het		
			Neutral	Tolerated	neutral	0,18612	Polymorphism	Benign	Neutral	51,3	PASS	het	0,7572
["thyroid", 2]]	2	Exact Match	Damaging	Damaging	medium	0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	45	PASS	het	0,0049
["lung", 2]]	2	Genomic Location	Neutral	Tolerated	neutral	0,08975	Polymorphism	Benign	Neutral	22	PASS	het	0,8492
			Neutral	Tolerated	neutral	0,34791	Damaging	Benign		17,2	PASS	het	0,6567
["pancreas", 1], ["large intestine", 1]]	2	Exact Match	Neutral	Tolerated	medium	0,08975	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	49,3	PASS	het	0,9749
			Damaging	Tolerated	neutral	0,26151	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	53,4	PASS	het	0,9876
			Damaging	Damaging	low	0,52396	Damaging	Pathogenic	Damaging	43,6	PASS	het	0,0543
["lung", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	low	0,81001	Damaging	Pathogenic	Neutral	54	PASS	het	0,7607
			Neutral	Tolerated	low	0,81001	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	49,2	PASS	het	0,661
									38,6	PASS	het		
["oesophagus", 1], ["pancreas", 1]]	2	Exact Match	Damaging	Tolerated	low	0,58761	Damaging	Pathogenic	Neutral	56,6	PASS	het	0,2885
			Neutral	Tolerated		0,58761	Damaging	Pathogenic	Damaging	44,3	PASS	het	0,3841
			Damaging	Tolerated		0,81001	Damaging	Pathogenic	Damaging	51,2	PASS	het	0,0032
			Neutral	Tolerated	low	0,2906	Polymorphism	Pathogenic	Neutral	43,1	PASS	het	0,5608
			Neutral	Tolerated	low	0,2854	Polymorphism	Benign	Damaging	47,1	PASS	het	0,3334
			Neutral	Tolerated		0,33852	Damaging	Pathogenic	Damaging	52,8	PASS	het	0,5508
["ovary", 1]]	1	Protein Change							46	PASS	het		
["haematopoietic and lymphoid tissue", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated		0,32163	Polymorphism	Benign	Neutral	43,9	PASS	het	0,1225
["haematopoietic and lymphoid tissue", 2]]	2	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	0,28097	Polymorphism	Benign	Neutral	48,4	PASS	het	0,1098
			Neutral	Tolerated	low	0,48557	Damaging	Pathogenic	Neutral	46,6	PASS	het	0,3144
									17,7	PASS	het		
["meninges", 7], ["lung", 4]]	11	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	0,08975	Polymorphism	Benign	Damaging	51,4	PASS	het	0,5392
									53,9	PASS	het		
["ovary", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	medium	0,31712	Polymorphism	Benign	Neutral	47,3	PASS	het	0,6071

4.2.1. RET Mutasyonu Gösteren Hastaların Analizi

1 nolu hasta; c.1902C>G p.Cys634Trp dizilimi ile missense mutasyonu göstermekte ve damaging kategorisinde yer almaktadır. Tanımlanan orta derecede bir fonksiyonel hasar olup patojeniktir. Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte pT1No olan 39 yaşındaki erkek hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 40 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

7 nolu hasta; c.2257A>C p.Thr753Pro dizilimi ile missense mutasyonu göstermekte ve damaging kategorisinde yer almaktadır. Tanımlanan orta derecede bir fonksiyonel hasar olup patojeniktir. Tüm hastalar içerisinde C hücre hiperplazisi gösteren tek hastadır. Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte pT1No olan 68 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 67 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

11 nolu hasta; c.2370G>T p.Leu790Phe dizilimi ile missense mutasyonu göstermekte ve damaging kategorisinde yer almaktadır. Tanımlanan düşük derecede bir fonksiyonel hasar olup patojeniktir. Tüm hastalar içerisinde amiloid birikimi en yoğun olan (skor3) ve orta şiddette desmoplazi (skor 2) gösteren tek hastadır. Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte, bilateral yerleşimli pT3N1 olan 66 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda sağ lateralde 5 adet, sol lateralde 9 adet olmak üzere toplam 14 adet lenf nodu metastazı vardır. Bu özelliği ile RET mutasyonu gösteren hastalar içerisinde tek lenf nodu metastazı olan hastadır. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 39 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

13 nolu hasta; c.1901G>T p.Cys634Phe dizilimi ile missense mutasyonu göstermekte ve damaging kategorisinde yer almaktadır. Tanımlanan orta derecede bir fonksiyonel hasar olup patojeniktir. Nekroz içermemesi ancak $>5/2\text{mm}^2$ mitoz içermesi ile yüksek gradelidir. Cerrahi sınırı da pozitif olup bu iki özelliği ile RET mutasyonu gösteren hastalar içinde taktır. Tubulopapiller suptipte pT2No olan 60 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili

(Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır.58 aylık takibi ile hastaliksız yaşamaktadır.

4.2.2. RET Mutasyonu Negatif Ancak Lenf Nodu Metastazı Olan Hastaların Analizi

2 nolu hasta; Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Tubulopapiller suptipte pT2N1 olan 64 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda sol lateralde 3 adet lenf nodu metastatiktir. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır.32 aylık takibi ile hastaliksız yaşamaktadır.

5 nolu hasta; Aynı lobda 4 adet odak içermektedir ve bu özelliği ile RET mutasyonu göstermeyen hastalar arasında tek multifokal olanıdır. Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte pT1N1 olan 26 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda bilateral santralde 4 adet, sağ lateralde 1 adet olmak üzere 5 adet lenf nodu metastatiktir. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır.68 aylık takibi ile hastaliksız yaşamaktadır.

8 nolu hasta; 5 cm çaplı tümörü ile çalışmadaki tüm hastalar arasında en büyük çapa sahip olanıdır. Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Spindle suptipte pT3N1 olan 38 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda, sağ lateralde 2, sağ santralde 2 adet olmak üzere 4 adet lenf nodu metastatiktir. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır.89 aylık takibi ile hastaliksız yaşamaktadır.

9 nolu hasta; Skor3 ile çalışmadaki tüm hastalar arasında dezmoplazisi en yoğun olanıdır. Kapsül invazyonu, lenfatik invazyon ve angioinvazyon göstermesi ile tüm hastalar içinde tektir. Pozitif cerrahi sınıra sahiptir ve ekstratiroidal yayılımı mevcuttur. Nekroz, yüksek mitoz (1 adet/2mm²) içermemesi ile düşük gradelidir. Ancak spindle suptipte pT3bN1b olan 60 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda, sol lateralde 4, sol santralde 3 adet olmak üzere 7 adet lenf nodu metastatiktir. Ayrıca tanıdan 1 ay sonra karaciğer metastazları tespit edilmiştir. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. Radyoterapi ve Dakarbazin tedavisi sırasında takibin 25. Ayında hastalık nedeni ile ex olmuştur.

12 nolu hasta; 4.5 cm çaplı tümörü ile çalışmadaki tüm hastalar arasında ikinci en büyük çapa sahip olanıdır. Pozitif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte pT3N1 olan 29 yaşındaki erkek hastanın boyun diseksiyonunda, sol lateralde 10, sağ santralde 1, sol santralde 6 adet olmak üzere 14 adet lenf nodu metastatiktir. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 65 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

4.2.3. RET Mutasyonu Negatif Ve Lenf Nodu Metastazı Olmayan Hastaların Analizi

3 nolu hasta; Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte pT1N0 olan 36 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 119 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

4 nolu hasta; Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Tubulopapiller suptipte pT1N0 olan 53 yaşındaki erkek hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 35 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

6 nolu hasta; Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Tubulopapiller suptipte pT1N0 olan 62 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 56 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

10 nolu hasta; Negatif cerrahi sınıra sahiptir ve nekroz, mitoz içermemesi ile düşük gradelidir. Folliküler suptipte pT1N0 olan 55 yaşındaki kadın hastanın boyun diseksiyonunda metastaz yoktur. Taramalarında MEN ilişkili (Feokromositoma, hiperparatiroidi vb) hastalığa rastlanmamıştır. 65 aylık takibi ile hastalıksız yaşamaktadır.

RET mutasyonu göstermeyen bazı olguların 10. kromozomlardaki ilgili genlere ait aminoasit dizisindeki değişimler, allelik frekanslar, mutasyonların tipi, patojenitesi, hasar derecesi, skorları gibi veriler şu şekildedir: (Tablolar; 4.8-4.10)

Tablo 4. 8: 9 nolu hastada (ex) 10. Kromozom üzerindeki WES analizi

Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	AF	Score	Phred
chr10	47485	A	G	TUBB8	ENST00000568584.5	missense_variant	c.907T>C	p.Cys303Arg		2,54904	22,5
chr10	7707220	C	T	ITIH2	ENST00000358415.9	missense_variant	c.179C>T	p.Ser60Leu	0,059704473	1,513833	15,83
chr10	13188915	C	T	MCM10	ENST00000484800.6	missense_variant	c.1253C>T	p.Ala418Val	0,009784345	3,387053	24,4
chr10	17321185	A	T	ST8SIA6	ENST00000377602.5	missense_variant	c.890T>A	p.Leu297Gln		3,908005	26,4
chr10	17453620	T	A	ST8SIA6	ENST00000377602.5	missense_variant	c.139A>T	p.Thr47Ser	0,012779553	1,132516	13,07
chr10	23006974	T	C	ARMC3	ENST00000298032.10	missense_variant	c.1822T>C	p.Ser608Pro	0,021565495	2,039852	19,56
chr10	27734759	C	T	MKX	ENST00000419761.6	missense_variant	c.535G>A	p.Glu179Lys	0,006389776	2,100871	20,1
chr10	52316358	G	T	DKK1	ENST00000373970.4	missense_variant	c.470G>T	p.Ser157Ile	0,000399361	2,315462	21,7
chr10	63215268	C	T	JMJD1C	ENST00000399262.7	missense_variant	c.1010G>A	p.Arg337Gln		2,528444	22,5
chr10	68516765	T	A	SLC25A16	ENST00000609923.6	missense_variant	c.209A>T	p.His70Leu		3,324738	24,2
chr10	70146249	A	G	TYSND1	ENST00000287078.7	missense_variant	c.338T>C	p.Leu113Pro	0,006988818	1,409349	15,14
chr10	70260713	T	C	NPPFR1	ENST00000277942.7	missense_variant	c.349A>G	p.Lys117Glu		4,177919	28,5
chr10	73911598	G	T	PLAU	ENST00000372764.4	missense_variant	c.43G>T	p.Val15Leu	0,007388179	1,904733	18,52
chr10	77830752	C	G	DLG5	ENST00000372391.7	missense_variant	c.1870G>C	p.Glu624Gln	0,005790735	3,30273	24,1
chr10	84214587	AGA	-	CDHR1	ENST00000623527.4	inframe_deletion	c.2552_2554del	p.Lys851del	0,003394569		
chr10	88764578	C	T	LIPN	ENST00000404459.1	missense_variant	c.395C>T	p.Ser132Leu	0,008785942	2,751182	22,9
chr10	94938797	A	T	CYP2C9	ENST00000260682.8	missense_variant	c.115A>T	p.Ile39Phe		0,257549	3,793
chr10	96547906	G	A	TM9SF3	ENST00000371142.9	missense_variant	c.1043C>T	p.Ala348Val		3,211302	23,9
chr10	97679682	C	T	AVPI1	ENST00000370626.4	missense_variant	c.224G>A	p.Arg75His		2,641943	22,7
chr10	100233276	C	T	CWF19L1	ENST00000354105.10	missense_variant	c.1568G>A	p.Arg523His	0,01557508	2,986006	23,4
chr10	100295066	G	A	PKD2L1	ENST00000318222.4	missense_variant	c.1414C>T	p.Arg472Cys	0,015175719	3,934093	26,5
chr10	101010745	G	A	PDZD7	ENST00000619208.6	missense_variant	c.2144C>T	p.Pro715Leu	0,005990415	1,804476	17,76
chr10	101064877	C	T	KAZALD1	ENST00000370200.5	missense_variant	c.872C>T	p.Pro291Leu		1,483752	15,63
chr10	102065872	C	T	HPS6	ENST00000299238.7	missense_variant	c.398C>T	p.Ala133Val	0,001397764	2,272833	21,4
chr10	118335142	G	A	FAM204A	ENST00000369183.9	missense_variant	c.425C>T	p.Pro142Leu		2,983502	23,4
chr10	122085379	G	A	TACC2	ENST00000369005.6	missense_variant	c.2879G>A	p.Arg960Lys	0,001797125	0,498987	6,494
chr10	122086975	C	T	TACC2	ENST00000369005.6	missense_variant	c.4475C>T	p.Pro1492Leu	0,081469649	1,320935	14,54
chr10	122570905	C	G	DMBT1	ENST00000338354.9	missense_variant	c.155C>G	p.Ser52Trp	0,065694888	2,234378	21,1
chr10	124623447	A	T	FAM53B	ENST00000337318.8	missense_variant	c.1064T>A	p.Val355Asp		2,213249	21
chr10	127892562	A	T	CLRN3	ENST00000368671.4	missense_variant	c.223T>A	p.Phe75Ile	0,036541534	3,530895	24,8
chr10	133230505	G	A	UTF1	ENST00000304477.3	missense_variant	c.217G>A	p.Gln73Arg	0,097444089	2,636942	22,7

Tablo 4. 8 (devam)

Variant_Count (Tissue)	Variant_Coun	Match	Prediction	Prediction	Functional_Impac	Prediction	Phred	VCF_filter	Zygoticity	P-value
[[["meninges", 16], ["upper aerodigestive tract", 2]]	18	Exact Match	Damaging	Damaging	high	Pathogenic	31,6	PASS	het	0,0213
[[["soft tissue", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	neutral	Pathogenic	50	PASS	het	0,8553
[[["thyroid", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	low	Pathogenic	45,3	PASS	het	0,8695
			Damaging	Tolerated	low	Pathogenic	41,7	PASS	het	0,1867
[[["lung", 4]]	4	Exact Match	Neutral	Tolerated	neutral	Benign	52,5	PASS	het	0,9617
[[["soft tissue", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	Benign	55,7	PASS	het	0,3619
[[["lung", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	Pathogenic	45,2	PASS	het	0,5469
			Neutral	Tolerated	low	Benign	47,6	PASS	het	0,5255
[[["skin", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	Pathogenic	21,8	PASS	het	0,2288
			Damaging	Tolerated	low	Pathogenic	50,3	PASS	het	0,0947
[[["haematopoietic and lymphoid tissue", 3], ["liver", 1]]	4	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	Benign	44,9	PASS	het	0,8553
			Damaging	Damaging	medium	Pathogenic	53,6	PASS	het	0,0045
[[["lung", 2], ["thyroid", 1]]	3	Exact Match	Neutral	Tolerated	medium	Pathogenic	53,9	PASS	het	0,942
[[["haematopoietic and lymphoid tissue", 2]]	2	Exact Match	Damaging	Tolerated	low	Pathogenic	57,5	PASS	het	0,0264
[[["urinary tract", 1]]	1	Protein Change					65,3	PASS	het	
			Neutral	Tolerated	medium	Pathogenic	66,9	PASS	het	0,36
			Neutral	Tolerated	low	Benign	45,1	PASS	het	0,2789
			Damaging	Tolerated	medium	Pathogenic	48,7	PASS	het	0,1643
[[["endometrium", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	Pathogenic	49	PASS	het	0,2592
[[["lung", 3]]	3	Exact Match	Neutral	Tolerated	low	Pathogenic	48	PASS	hom	0,8337
			Damaging	Tolerated	medium	Pathogenic	45,2	PASS	het	0,2635
[[["NS", 1], ["lung", 1]]	2	Exact Match		Tolerated		Benign	56,6	PASS	het	0,6006
[[["skin", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	neutral	Benign	18,2	PASS	het	0,595
			Neutral	Tolerated	low	Pathogenic	49,6	PASS	het	0,5492
[[["large intestine", 1]]	1	Exact Match	Neutral	Tolerated	medium	Pathogenic	52,9	PASS	het	0,3268
[[["lung", 2], ["haematopoietic and lymphoid tissue", 1]]	3	Exact Match		Tolerated	low	Benign	40,9	PASS	het	0,7494
				Tolerated	low	Pathogenic	59,1	PASS	het	0,6264
			Neutral	Tolerated	neutral	Benign	57,3	PASS	het	0,5372
[[["thyroid", 1]]	1	Genomic Locatio	Neutral	Tolerated	low	Pathogenic	46,1	PASS	het	0,2612
[[["thyroid", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Tolerated	medium	Pathogenic	47,6	PASS	het	0,4696
[[["soft tissue", 7], ["thyroid", 1], ["stomach", 1]]	9	Exact Match	Neutral	Tolerated	neutral	Benion	52,2	PASS	het	0,9557

Tablo 4. 9: 3 nolu hastada 10. Kromozom üzerindeki WES analizi

Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	AF	Score	Phred Score	
chr10	1217086	C	T	ADARB2	ENST00000381312.6	missense_variant	c.1547G>A	p.Arg516His		2,794808	23	0,017
chr10	4839754	A	-	AKR1E2	ENST00000298375.12	frameshift_truncation	c.608del	p.Gln203ArgfsTer4	0,001597444			
chr10	5001629	A	T	AKR1C2	ENST00000380753.8	missense_variant	c.137T>A	p.Phe46Tyr	0,064896166	0,591298	7,428	0,018
chr10	11999922	C	T	UPF2	ENST00000357604.10	missense_variant	c.1742G>A	p.Arg581Gln		4,127228	28	0,065
chr10	12814301	G	A	CAMK1D	ENST00000619168.4	missense_variant	c.748G>A	p.Asp250Asn		3,508497	24,7	0,04
chr10	13110400	T	A	OPTN	ENST00000378747.8	missense_variant	c.293T>A	p.Met98Lys	0,078674121	0,60879	7,598	0,024
chr10	16954524	T	C	CUBN	ENST00000377833.10	missense_variant	c.4720A>G	p.Met1574Val		0,401199	5,44	0,012
chr10	17849602	C	G	MRC1	ENST00000569591.3	missense_variant	c.1087C>G	p.Pro363Ala	0,008586262	3,009721	23,4	0,027
chr10	18527661	G	A	CACNB2	ENST00000324631.12	missense_variant	c.1018G>A	p.Ala340Thr		3,17125	23,8	0,027
chr10	18545933	C	T	NSUN6	ENST00000377304.7	stop_retained_variant	c.1410G>A	p.Ter470=		0,617738	7,684	
chr10	19280171	G	T	MALRD1	ENST00000454679.7	missense_variant	c.3204G>T	p.Gln1068His	0,004392971	2,234654	21,1	0,034
chr10	20880798	C	T	NEBL	ENST00000377122.8	missense_variant	c.476G>A	p.Ser159Asn		3,366459	24,3	0,029
chr10	25599039	G	A	GPR158	ENST00000376351.4	missense_variant	c.3413G>A	p.Gly1138Glu		2,381673	22	0,005
chr10	35031553	C	T	CUL2	ENST00000374749.7	missense_variant	c.1237G>A	p.Asp413Asn		3,503195	24,7	0,102
chr10	45003481	G	A	ZNF22	ENST00000298299.4	missense_variant	c.113G>A	p.Arg38Gln		1,758078	17,43	0,008
chr10	45440473	C	T	ALOX5	ENST00000374391.7	missense_variant	c.1025C>T	p.Ser342Leu		3,598591	25	0,055
chr10	45616447	G	A	ZFAND4	ENST00000344646.10	missense_variant	c.2173C>T	p.Pro725Ser	0,005391374	3,322208	24,2	0,038
chr10	47357335	G	A	RBP3	ENST00000584701.2	missense_variant	c.3622G>A	p.Gly1208Arg		4,203164	28,7	0,033
chr10	48240413	G	A	FRMPD2	ENST00000374201.8	missense_variant	c.647C>T	p.Thr216Ile		0,311306	4,42	0,004
chr10	48901836	C	T	WDFY4	ENST00000325239.11	missense_variant	c.7559C>T	p.Ala2520Val		1,151221	13,24	0,017
chr10	49627654	G	A	CHAT	ENST00000337653.6	missense_variant	c.980G>A	p.Gly327Glu	0,000199681	2,270502	21,4	0,012
chr10	58807019	C	T	BICC1	ENST00000373886.8	missense_variant	c.2237C>T	p.Pro746Leu		4,396252	31	0,051
chr10	59362453	G	A	FAM13C	ENST00000618804.5	missense_variant	c.8C>T	p.Ser3Phe		4,458232	32	0,036
chr10	60073712	C	T	ANK3	ENST00000280772.7	missense_variant	c.7169G>A	p.Gly2390Asp		3,597521	25	0,051
chr10	66280531	T	A	CTNNA3	ENST00000433211.7	missense_variant	c.1823A>T	p.Asp608Val		4,114699	27,9	0,042
chr10	66926939	T	C	LRRTM3	ENST00000361320.5	missense_variant	c.23T>C	p.Leu8Pro		2,810626	23	0,019
chr10	68174451	C	T	MYPN	ENST00000358913.9	missense_variant	c.2359C>T	p.Pro787Ser		0,873604	10,16	0,02
chr10	68886378	G	A	STOX1	ENST00000298596.11	missense_variant	c.2582G>A	p.Arg861Lys		1,476242	15,58	0,018
chr10	70598609	C	G	PRF1	ENST00000441259.2	missense_variant	c.1112G>C	p.Arg371Thr		1,141446	13,15	0,015
chr10	73053471	C	T	P4HA1	ENST00000263556.3	missense_variant	c.583G>A	p.Asp195Asn		2,451324	22,3	0,024

Tablo 4. 9 (devam)

Variant_Count (Tissue)	Variant_Count	Match	Prediction	Prediction	Functional_Impact	Prediction	Phred	VCF_filter	Zygosity	P-value
			Damaging	Damaging	low	Damaging	48,5	PASS	het	0,1982
							54,4	PASS	het	
			Tolerated	Tolerated	neutral	Automatic Polymorphism	48,6	PASS	het	0,4984
[["skin", 1]]	1	Exact Match	Tolerated	Tolerated	medium	Damaging	20,8	PASS	het	0,079
			Tolerated	Tolerated	low	Damaging	33	PASS	het	0,2416
[["haematopoietic and lymphoid tissue", 2], [4	Exact Match	Tolerated	Tolerated	neutral	Automatic Polymorphism	51,9	PASS	het	0,8089
			Tolerated	Tolerated	neutral	Polymorphism	52,1	PASS	het	0,8244
			Tolerated	Tolerated	medium	Damaging	40,9	PASS	hom	0,2203
[["large intestine", 1]]	1	Exact Match	Damaging	Damaging	low	Damaging	39,8	PASS	het	0,0731
[["lung", 1]]	1	Exact Match					17,1	PASS	het	
[["lung", 2]]	2	Exact Match	Damaging	Damaging		Polymorphism	58,5	PASS	het	0,1518
[["large intestine", 1]]	1	Genomic Location	Tolerated	Tolerated	medium	Damaging	29,5	PASS	het	0,0149
			Tolerated	Tolerated	medium	Polymorphism	17,3	PASS	het	0,4864
			Tolerated	Tolerated	low	Damaging	22,6	PASS	het	0,074
[["large intestine", 1]]	1	Exact Match	Tolerated	Tolerated	low	Polymorphism	21,3	PASS	het	0,8515
[["endometrium", 2]]	2	Exact Match	Damaging	Damaging	medium	Damaging	20,9	PASS	het	0,1225
			Tolerated	Tolerated	medium	Damaging	51,2	PASS	het	0,2651
					medium		48,2	PASS	het	0,0493
			Tolerated	Tolerated	low	Polymorphism	33,9	PASS	het	0,882
			Tolerated	Tolerated	neutral	Polymorphism	21,4	PASS	het	0,9778
			Tolerated	Tolerated	neutral	Damaging	39,7	PASS	het	0,078
			Tolerated	Tolerated	low	Damaging	37,1	PASS	het	0,0054
[["urinary tract", 1]]	1	Genomic Location	Tolerated	Tolerated	low	Damaging	35,2	PASS	het	0,0154
			Tolerated	Tolerated	low	Damaging	23,9	PASS	het	0,0947
[["breast", 1]]	1	Exact Match	Tolerated	Tolerated	low	Damaging	50,7	PASS	het	0,0045
			Tolerated	Tolerated	neutral	Damaging	47,8	PASS	het	0,0135
			Tolerated	Tolerated	medium	Polymorphism	18,2	PASS	het	0,7419
			Tolerated	Tolerated	low	Polymorphism	26	PASS	het	0,5849
			Damaging	Damaging	medium	Damaging	51	PASS	het	0,2375
			Tolerated	Tolerated	medium	Damaging	17,7	PASS	het	0,4971
[["skin", 1]]	1	Genomic Location	Tolerated	Tolerated	neutral	Damaging	23,5	PASS	het	0,1769
[["thyroid", 2], ["eye", 2], ["lung", 2], ["upper	10	Exact Match	Tolerated	Tolerated	neutral	Damaging	25,9	PASS	het	0,27
			Tolerated	Tolerated	low	Damaging	45,3	PASS	het	0,2173
							53	PASS	het	
			Damaging	Damaging	medium	Damaging	18,1	PASS	het	0,0017

Tablo 4. 10: 4 nolu hastada 10. Kromozom üzerindeki WES analizi

chr10	73053471	C	T	P4HA1	ENST00000263556.3	missense_variant	c.583G>A	p.Asp195Asn		2,451324	22,3	0,024
chr10	73541709	C	T	USP54	ENST00000339859.8	missense_variant	c.602G>A	p.Arg201Gln		2,782933	23	0,051
chr10	73674883	G	A	AGAP5	ENST00000374094.8	missense_variant	c.1777C>T	p.Arg593Trp		0,910046	10,54	0,007
chr10	73802480	C	T	NDST2	ENST00000309979.11	missense_variant	c.2623G>A	p.Glu875Lys		2,63252	22,7	0,035
chr10	74708444	G	A	ADK	ENST00000539909.6	stop_retained_variant	c.1088G>A	p.Ter363=	0,002595847	0,924111	10,7	
chr10	78025696	G	A	POLR3A	ENST00000372371.8	missense_variant	c.244C>T	p.His82Tyr		4,008994	27	0,077
chr10	87366280	C	T	NUTM2D	ENST00000381697.6	stop_gained	c.1777C>T	p.Gln593Ter		3,345182	24,2	
chr10	88913290	G	A	STAMBPL1	ENST00000371926.8	missense_variant	c.610G>A	p.Glu204Lys	0,013977636	3,216018	23,9	0,024
chr10	89402510	G	A	IFIT1	ENST00000371804.4	missense_variant	c.235G>A	p.Glu79Lys		3,720755	25,5	0,017
chr10	92621392	C	T	KIF11	ENST00000260731.5	missense_variant	c.1136C>T	p.Thr379Met		3,994165	26,9	0,037
chr10	93333862	G	A	MYOF	ENST00000359263.9	missense_variant	c.4615C>T	p.Pro1539Ser	0,006190096	3,469989	24,6	0,064
chr10	93622062	C	T	PDE6C	ENST00000371447.4	missense_variant	c.854C>T	p.Thr285Ile		3,106946	23,6	0,029
chr10	93635545	G	A	PDE6C	ENST00000371447.4	missense_variant	c.1318G>A	p.Asp440Asn		3,422593	24,5	0,014
chr10	94334233	C	T	NOC3L	ENST00000371361.3	missense_variant	c.2347G>A	p.Val783Ile		0,347363	4,834	0,006
chr10	96012620	C	T	CC2D2B	ENST00000646931.2	missense_variant	c.3317C>T	p.Thr1106Ile		2,869082	23,2	0,015
chr10	96196917	A	T	BLNK	ENST00000224337.9	missense_variant	c.1242T>A	p.Asn414Lys		1,970161	19,03	0,037
chr10	99784750	C	T	ABCC2	ENST00000647814.1	missense_variant	c.176C>T	p.Ser59Phe		1,033249	12,04	0,051
chr10	100154921	C	T	ERLIN1	ENST00000421367.7	missense_variant	c.764G>A	p.Arg255Gln		3,035512	23,5	0,028
chr10	100233267	C	T	CWF19L1	ENST00000354105.10	missense_variant	c.1577G>A	p.Arg526Gln	0,006789137	3,484556	24,7	0,024
chr10	102403210	C	T	PSD	ENST00000020673.6	missense_variant	c.3065G>A	p.Arg1022Gln		1,582655	16,26	0,014
chr10	103443301	G	A	PDCD11	ENST00000369797.8	missense_variant	c.5092G>A	p.Ala1698Thr		3,964865	26,7	0,04
chr10	107164204	C	T	SORCS1	ENST00000263054.10	missense_variant	c.323G>A	p.Arg108Lys		1,370766	14,88	0,007
chr10	110604285	G	A	SMC3	ENST00000361804.4	missense_variant	c.3637G>A	p.Asp1213Asn		4,30609	29,6	0,083
chr10	110887675	G	A	PDCD4	ENST00000280154.12	missense_variant	c.566G>A	p.Arg189Lys	0,002196486	1,584192	16,27	0,029
chr10	113575993	A	T	HABP2	ENST00000351270.4	missense_variant	c.320A>T	p.Lys107Met		3,377761	24,3	0,018
chr10	116547306	G	A	PNLIP	ENST00000369221.2	missense_variant	c.59G>A	p.Cys20Tyr		3,783761	25,8	0,021
chr10	117375196	G	A	POZD8	ENST00000334464.7	missense_variant	c.32C>T	p.Ala11Val	0,021765176	2,618651	22,7	0,005
chr10	118691296	G	A	CACUL1	ENST00000369151.8	stop_gained	c.994C>T	p.Gln332Ter		8,001004	40	
chr10	122086003	C	T	TACC2	ENST00000369005.6	missense_variant	c.3503C>T	p.Ser1168Phe		1,21149	13,73	0,015
chr10	124042301	C	T	CHST15	ENST00000435907.6	missense_variant	c.1033G>A	p.Gly345Arg		5,413466	34	0,039
chr10	125807469	T	A	UROS	ENST00000368797.10	missense_variant	c.338A>T	p.Asp113Val	0,00778754	2,317088	21,7	0,02
chr10	126425871	G	A	C10orf90	ENST00000284694.11	missense_variant	c.2093C>T	p.Ala698Val		3,729902	25,5	0,003

Tablo 4. 10 (devam)

Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontology	cDNA_change	Protein_Change	AF	Score	Phred	Score
chr10	5395388	C	T	TUBAL3	ENST00000380419.8	missense_variant	c.335G>A	p.Arg112Gln	0,000399361	2,83745	23,1	0,025
chr10	5401012	C	A	TUBAL3	ENST00000380419.8	stop_gained	c.79G>T	p.Glu277Ter		7,363161	38	
chr10	7717687	G	A	ITIH2	ENST00000358415.9	missense_variant	c.529G>A	p.Val177Met	0,000798722	3,741936	25,6	0,017
chr10	8058307	A	G	GATA3	ENST00000379328.9	missense_variant	c.244A>G	p.Ser82Gly		2,733	22,9	0,017
chr10	11463691	C	T	USP6NL	ENST00000379237.6	missense_variant	c.1306G>A	p.Glu436Lys		2,006456	19,31	0,02
chr10	12081526	C	G	DHTKD1	ENST00000263035.9	missense_variant	c.209C>G	p.Ala70Gly	0,003194888	2,544176	22,5	0,022
chr10	16890385	G	A	CUBN	ENST00000377833.10	missense_variant	c.8741C>T	p.Ala2914Val	0,006389776	4,060667	27,4	0,032
chr10	21733775	C	T	MLLT10	ENST00000307729.12	missense_variant	c.2504C>T	p.Thr835Ile	0,001597444	2,056563	19,69	0,023
chr10	24533161	C	T	KIAA1217	ENST00000376454.8	missense_variant	c.3338C>T	p.Pro1113Leu	0,014376997	2,970673	23,4	0,026
chr10	27169969	C	A	MASTL	ENST00000375940.8	missense_variant	c.1010C>A	p.Thr337Lys	0,026158147	0,200792	3,133	0,013
chr10	27170556	A	G	MASTL	ENST00000375940.8	missense_variant	c.1597A>G	p.Met533Val		1,159721	13,31	0,02
chr10	27170889	A	C	MASTL	ENST00000375940.8	missense_variant	c.1930A>C	p.Lys644Gln	0,003594249	2,384114	22	0,01
chr10	27211050	G	T	ACBD5	ENST00000396271.8	missense_variant	c.968C>A	p.Pro323Gln	0,026557508	1,925267	18,68	0,02
chr10	30028887	C	T	JCAD	ENST00000375377.2	missense_variant	c.1261G>A	p.Val421Ile		0,501189	6,517	0,005
chr10	30626888	T	C	LYZL2	ENST00000647634.2	missense_variant	c.28A>G	p.Ile10Val	0,003194888	0,286243	4,129	0,014
chr10	45826432	C	T	AGAP4	ENST00000616763.4	missense_variant	c.1544G>A	p.Arg515His		2,483785	22,4	0,041
chr10	47351134	G	A	RBP3	ENST00000584701.2	missense_variant	c.2650G>A	p.Val884Met		3,617048	25,1	0,015
chr10	50009669	G	A	AGAP6	ENST00000412531.5	missense_variant	c.1544G>A	p.Arg515His	0,000399361	2,269586	21,4	0,01
chr10	58196629	A	G	IPMK	ENST00000373935.4	missense_variant	c.698T>C	p.Ile233Thr		3,079511	23,6	0,034
chr10	69208749	C	T	SUPV3L1	ENST00000359655.9	missense_variant	c.2075C>T	p.Pro692Leu	0,006789137	0,828136	9,676	0,021
chr10	69483873	A	T	TSPAN15	ENST00000373290.7	missense_variant	c.279A>T	p.Gln93His	0,009784345	1,303417	14,41	0,006
chr10	72274773	A	G	DDIT4	ENST00000307365.4	missense_variant	c.284A>G	p.Asn95Ser		1,36161	14,82	0,015
chr10	73426607	C	G	MSS51	ENST00000299432.7	missense_variant	c.502G>C	p.Gly168Arg		5,44425	34	0,031
chr10	73517550	A	G	USP54	ENST00000339859.8	missense_variant	c.2876T>C	p.Val959Ala	0,001198083	1,058682	12,34	0,028
chr10	89307290	A	G	IFIT2	ENST00000371826.4	missense_variant	c.1334A>G	p.Lys445Arg	0,002196486	1,87189	18,27	0,014
chr10	90749298	G	A	HTR7	ENST00000336152.8	missense_variant	c.836C>T	p.Pro279Leu	0,001198083	2,764293	23	0,029
chr10	95414780	C	A	SORBS1	ENST00000361941.7	missense_variant	c.524G>T	p.Gly175Val	0,062899361	3,124748	23,7	0,034
chr10	97599155	T	C	HOGA1	ENST00000370646.9	missense_variant	c.407T>C	p.Val136Ala		3,288675	24,1	0,04
chr10	102139902	A	G	PPRC1	ENST00000278070.7	missense_variant	c.1394A>G	p.Lys465Arg	0,002795527	2,35688	21,9	0,027
chr10	103442334	G	T	PDCD11	ENST00000369797.8	missense_variant	c.4829G>T	p.Arg1610Leu	0,000599042	4,023101	27,1	0,065
chr10	119030228	C	G	NANOS1	ENST00000425699.3	missense_variant	c.427C>G	p.Leu143Val		1,586818	16,29	0,014

Tablo 4. 10 (devam)

Phred	Variant_Count (Tissue)	Variant_Coun	Prediction	Prediction	Functional_Impac	Phred	VCF_filter	Zygotosity	P-value
23,1			Damaging	Tolerated	medium	47,2	PASS	het	0,1566
38	[[“skin”, 1]]	1	Neutral			37,3	PASS	het	0,4101
25,6			Damaging	Tolerated	medium	48,7	PASS	het	0,2972
22,9			Damaging	Damaging	low	42,3	PASS	het	0,2445
19,31	[[“large intestine”, 1]]	1	Neutral	Tolerated	medium	45,6	PASS	het	0,58
22,5			Damaging	Tolerated	medium	49,1	PASS	het	0,0722
27,4	[[“pleura”, 1], [“lung”, 1], [“breast”, 1]]	3	Neutral	Tolerated	medium	49,8	PASS	het	0,3666
19,69			Neutral	Tolerated	low	52,7	PASS	het	0,0888
23,4			Neutral	Tolerated	medium	49,7	PASS	het	0,4111
3,133	[[“haematopoietic and lymphoid tissue”, 2], [“cer 3	3	Neutral	Tolerated	low	48,7	PASS	het	0,8761
13,31			Neutral	Tolerated	neutral	54,9	PASS	het	0,2407
22	[[“upper aerodigestive tract”, 2]]	2	Neutral	Tolerated	neutral	49	PASS	het	0,3435
18,68	[[“haematopoietic and lymphoid tissue”, 2]]	2	Neutral	Tolerated	low	40,3	PASS	het	0,1855
6,517			Neutral	Tolerated		50	PASS	het	0,826
4,129	[[“skin”, 3]]	3	Neutral	Tolerated	low	55	PASS	het	0,7358
22,4	[[“upper aerodigestive tract”, 3], [“lung”, 1], [“bili 6	6	Damaging	Tolerated	medium	44,8	PASS	het	0,4141
25,1			Neutral		medium	40,6	PASS	het	0,1798
21,4			Neutral	Tolerated	medium	48,9	PASS	het	0,1968
23,6			Damaging	Tolerated	medium	51,6	PASS	het	0,1159
9,676	[[“skin”, 1]]	1	Neutral	Tolerated	low	57,3	PASS	het	0,9575
14,41	[[“large intestine”, 1]]	1	Neutral	Tolerated	low	48,3	PASS	het	0,7358
14,82			Neutral	Tolerated	neutral	49,9	PASS	het	0,9074
34	[[“skin”, 1]]	1	Damaging	Tolerated	medium	50,9	PASS	het	0,0568
12,34	[[“lung”, 1]]	1	Neutral	Tolerated	low	44	PASS	het	0,8382
18,27	[[“haematopoietic and lymphoid tissue”, 1]]	1	Neutral	Tolerated	neutral	47,8	PASS	het	0,9638
23	[[“haematopoietic and lymphoid tissue”, 1]]	1	Damaging	Tolerated	medium	55,4	PASS	het	0,1176
23,7	[[“large intestine”, 1]]	1	Damaging	Tolerated	low	46,9	PASS	het	0,1129
24,1			Damaging	Damaging	medium	54	PASS	het	0,0379
21,9			Neutral	Tolerated	low	48,3	PASS	het	0,3666
27,1			Damaging	Tolerated	high	50,7	PASS	het	0,0054
16,29			Neutral	Tolerated	low	43,9	PASS	het	0,8733

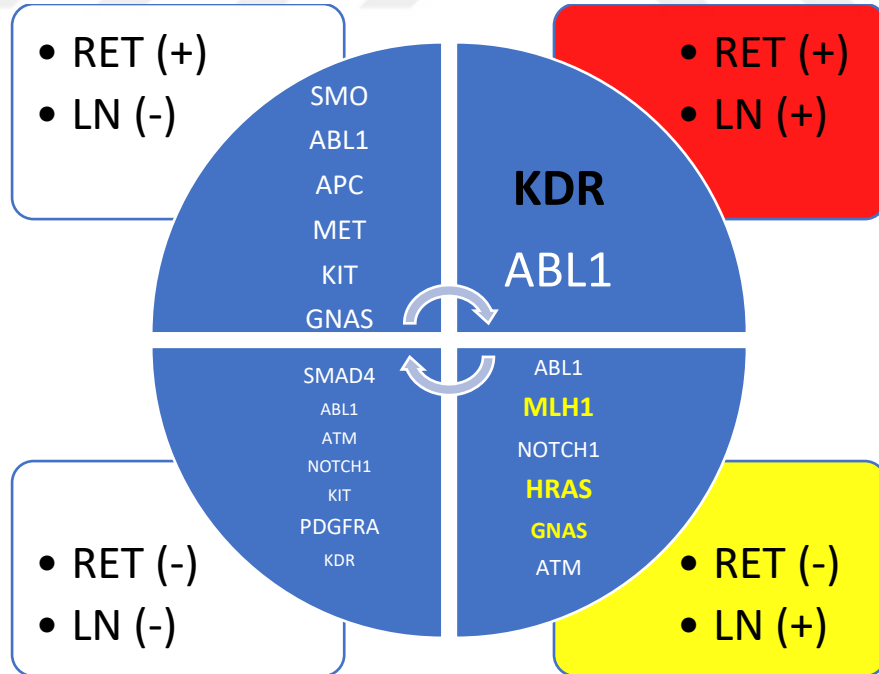
Çalışmanın 2. aşamasında metod kısmında belirtilen 63 genlik listede yer alan genlerden herhangi birinde sadece ilgili hastaya özel bir mutasyon olup olmadığına bakıldı. Tablo 4.11’de ortak ve belirleyici olan genler gösterildi:

RET mutasyonu (-) LN (-) olan hasta grubunda; *SMAD4, ABL1, ATM, NOTCH1, PDGFRA, KDR* genlerinde missense mutasyon, *KIT* geninde ise sonlandırıcı mutasyon (stop gained) görüldü.

RET mutasyonu (-) LN (+) olan hasta grubunda; *ABL1, MLH1, NOTCH1, HRAS, GNAS, ATM* genlerinde missense mutasyon görüldü.

RET mutasyonu (+) LN (+) olan hasta grubunda; *KDR* ve *ABL1* genlerinde missense mutasyon görüldü.

RET mutasyonu (+) LN (-) olan hasta grubunda; *SMO, ABL1, APC, MET, GNAS* genlerinde missense mutasyon, *KIT* geninde ise sonlandırıcı mutasyon (stop gained) görüldü.



Şekil 4. 22: RET mutasyonu ve lenf nodu metastazı durumuna göre gen mutasyonları

Tablo 4. 11: NGS analizinde hasta spesifik varyantlar

Variant_Annotation										1000_Genomes	CADD_Exome	
Chrom	Position	Ref_Base	Alt_Base	Gene	Transcript	Sequence_Ontolog	cDNA_change	Protein_Change	Samples	AF	Score	Phred
chr7	129212026	C	T	SMO	ENST00000249373.8	missense_variant	c.1939C>T	p.Pro647Ser	Patient 1	0,002995208	3,198095	23,9
chr9	130714339	A	G	ABL1	ENST00000372348.7	missense_variant	c.20A>G	p.Lys7Arg	Patient 1		2,803029	23
chr10	43114502	C	G	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.1902C>G	p.Cys634Trp	Patient 1		3,769394	25,7
chr9	136515524	C	T	NOTCH1	ENST00000651671.1	missense_variant	c.1862G>A	p.Arg621His	Patient 6	0,000599042	3,036301	23,5
chr9	136523109	-	GGAGGC	NOTCH1	ENST00000651671.1	inframe_insertion	c.439_483dup	p.Asn147_Ser161dup	Patient 6			
chr4	54727915	A	T	KIT	ENST00000288135.5	stop_gained	c.1867A>T	p.Lys623Ter	Patient 6		7,882092	40
chr5	112766328	A	T	APC	ENST00000257430.9	missense_variant	c.138A>T	p.Glu46Asp	Patient 7		3,782701	25,8
chr5	112839717	C	T	APC	ENST00000257430.9	missense_variant	c.4123C>T	p.His1375Tyr	Patient 7		3,374097	24,3
chr7	116763168	C	T	MET	ENST00000318493.11	missense_variant	c.2537C>T	p.Ser846Phe	Patient 7		3,779189	25,7
chr10	43116704	A	C	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.2257A>C	p.Thr753Pro	Patient 7		3,956258	26,7
chr16	68813425	ATG	-	CDH1	ENST00000261769.10	inframe_deletion	c.1256_1258de	p.Asp419del	Patient 7			
chr4	54738462	C	T	KIT	ENST00000288135.5	stop_gained	c.2836C>T	p.Arg946Ter	Patient 13		6,7554	36
chr5	112835165	G	A	APC	ENST00000257430.9	missense_variant	c.1958G>A	p.Arg653Lys	Patient 13		6,511168	36
chr10	43114501	G	T	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.1901G>T	p.Cys634Phe	Patient 13		4,321417	29,8
chr20	58853749	A	G	GNAS	ENST00000371100.8	missense_variant	c.484A>G	p.Met162Val	Patient 13	0,001996805	1,614745	16,47
chr3	37025815	G	A	MLH1	ENST00000231790.7	missense_variant	c.1217G>A	p.Ser406Asn	Patient 8	0,000399361	1,20801	13,7
chr9	136505767	G	A	NOTCH1	ENST00000651671.1	missense_variant	c.4129C>T	p.Pro1377Ser	Patient 8	0,006389776	0,058353	1,744
chr11	533874	T	A	HRAS	ENST00000311189.8	missense_variant	c.182A>T	p.Gln61Leu	Patient 8		3,884468	26,3
chr20	58854392	C	T	GNAS	ENST00000371100.8	missense_variant	c.1127C>T	p.Pro376Leu	Patient 8	0,018170927	2,126701	20,3
chr4	54273560	C	G	PDGFRA	ENST00000257290.10	missense_variant	c.1388C>G	p.Thr463Ser	Patient 10		1,226598	13,84
chr4	55106779	A	G	KDR	ENST00000263923.5	missense_variant	c.1444T>C	p.Cys482Arg	Patient 10	0,008985623	3,622067	25,1
chr9	130884406	G	A	ABL1	ENST00000318560.6	missense_variant	c.2116G>A	p.Gly706Ser	Patient 3	0,001597444	0,207275	3,207
chr11	108272729	C	G	ATM	ENST00000278616.8	missense_variant	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	Patient 3	0,009185304	2,708381	22,8
chr18	51058396	C	T	SMAD4	ENST00000342988.8	missense_variant	c.844C>T	p.His282Tyr	Patient 3		2,16917	20,6
chr9	130885205	C	T	ABL1	ENST00000318560.6	missense_variant	c.2915C>T	p.Ser972Leu	Patient 5	0,018570288	0,255974	3,774
chr4	55102484	C	T	KDR	ENST00000263923.5	missense_variant	c.2012G>A	p.Gly671Glu	Patient 11	0,000399361	1,841894	18,04
chr9	130884325	T	G	ABL1	ENST00000318560.6	missense_variant	c.2035T>G	p.Ser679Ala	Patient 11	0,000399361	0,281598	4,074
chr10	43118458	G	T	RET	ENST00000355710.8	missense_variant	c.2370G>T	p.Leu790Phe	Patient 11	0,000199681	2,593608	22,6
chr11	108345780	T	A	ATM	ENST00000278616.8	missense_variant	c.8456T>A	p.Val2819Asp	Patient 12		0,733395	8,76
chr9	136510659	G	A	NOTCH1	ENST00000651671.1	missense_variant	c.2734C>T	p.Aro912Trp	Patient 9	0,000399361	3,710465	25,4

4.3. BİYOLOJİK YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİ

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2021_Human_PathwayEnrichment) biyolojik yolak zenginleştirme analizine göre tiroid medüller kanser patogenezi ile ilişkili olabilecek yollar gözden geçirildi. PI3K-Akt sinyal yolağı (*CSF1R; PDGFRA; FLT3; PTEN; EGFR; NRAS; STK11; PIK3CA; ERBB4; ERBB2; KIT; KDR; AKT1; KRAS; JAK2; HRAS; JAK3; FGFR3; MET; TP53; FGFR2; FGFR1*), MAPK sinyal yolağı (*CSF1R; PDGFRA; FLT3; BRAF; EGFR; NRAS; ERBB4; ERBB2; KIT; KDR; AKT1; KRAS; HRAS; FGFR3; MET; TP53; FGFR2; FGFR1*), tiroid kanser yolağı (*RET; NRAS; CDH1; CTNNB1; BRAF; KRAS; HRAS; TP53*) ve tiroid hormon sinyal yolağı (*NRAS; NOTCH1; PIK3CA; SRC; AKT1; CTNNB1; KRAS; HRAS; TP53*) içinde yer alan genlerin tamamı çalışma listesindeki 63 gen panelinde yer almaktaydı (Tablo 4. 12).

RET gen mutasyonu (-) olan hastalarda lenf nodu metastazının belirleyicisi olarak MLH1 ve HRAS genleri dikkat çekmişti (Şekil 4.22). Kanser yolları tek tek gözden geçirildiğinde MLH1'in gastrik, kolorektal, endometrial, mismatch repair ve Fanconi anemisi ile ilişkili olduğu görüldü. HRAS'ın hemen hemen tüm yollarında bulunduğu bunlar arasında hepatosellüler karsinom, kök hücre yolağı, kanser karbon metabolizması yolağı ve Erb sinyal yolağında etkili olduğu fark edildi.

4.4. YAPAY ZEKA MODELLEMESİNİN KATKISI

Tüm hastalar bir yapay zeka örneği olan CHASMplus THCA kullanılarak değerlendirildi. İlgili yazılımda özellikle tiroid kanseri üzerine eğitilen modeli kullanıldı. Bu yazılım özetle bize sunulan data içerisinde ilgili hasta için driver veya passenger olabilecek mutasyonları gösterdi. Hasta grubumuzda bu yazılım ile 3 gen üzerinde önemli olma potansiyeline sahip mutasyonlar bulundu. Bu genlerden bir tanesi 63 genlik hedef gen listemiz içerisindeyken (*HRAS*) diğer ikisi (*MAP3K1* ve *EIF1AX*) bizim listemizde mevcut değildi.

Tablo 4. 12: Biyolojik yollar: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2021_Human_PathwayEnrichment) biyolojik yollar zenginleştirme analizindeki ilişkili genler

Term	Overlap	P-val	Adjusted P-value	Old P-val	Old Ad	Odds Rati	Combined S	Genes
Pathways in cancer	35/531	0	1,65165E-43	0	0	114,4145	11869,4147	ALK, RB1, RET, CSF1R, NOTCH1, FLT3, PTEN, EGFR, NRAS, CDH1, GNA11, ERBB2, ABL1, AKT1, VHL, JAK2, HRAS, JAK3, PDGFRA, SMAD4, BRAF, M
Central carbon metabolism in cancer	18/70	0	2,26394E-31	0	0	237,5451	17839,8727	RET, PDGFRA, FLT3, IDH1, PTEN, EGFR, NRAS, PIK3CA, ERBB2, KIT, AKT1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, TP53, FGFR2, FGFR1
Rap1 signaling pathway	20/210	0	5,00004E-26	0	0	77,04873	4807,09074	CSF1R, PDGFRA, SRC, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, CDH1, GNAQ, KIT, KDR, GNAS, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, FGFR2, FGFR1
PI3K-Akt signaling pathway	22/354	0	6,87717E-25	0	0	52,00747	3093,46848	CSF1R, PDGFRA, FLT3, PTEN, EGFR, NRAS, STK11, PIK3CA, ERBB4, ERBB2, KIT, KDR, AKT1, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3, FGFR3, MET, TP53, FGFR2, F
Endometrial cancer	14/58	0	6,46254E-24	0	0	191,9601	10945,1189	PTEN, BRAF, MLH1, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, CDH1, ERBB2, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53
Gastric cancer	17/149	0	1,84979E-23	0	0	85,09015	4746,64657	RB1, SMAD4, BRAF, MLH1, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, CDH1, ERBB2, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, MET, TP53, FGFR2
Prostate cancer	15/97	0	1,03529E-22	0	0	113,5918	6116,52561	RB1, PDGFRA, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, ERBB2, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53, FGFR2, FGFR1
Melanoma	14/72	0	1,03529E-22	0	0	145,5225	7808,16372	RB1, PDGFRA, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, CDH1, AKT1, KRAS, HRAS, MET, TP53, FGFR1
Non-small cell lung cancer	14/72	0	1,03529E-22	0	0	145,5225	7808,16372	ALK, RB1, RET, BRAF, EGFR, NRAS, PIK3CA, ERBB2, AKT1, KRAS, HRAS, JAK3, MET, TP53
Breast cancer	16/147	0	7,25236E-22	0	0	78,09702	4030,12405	RB1, NOTCH1, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, ERBB2, KIT, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53, FGFR1
Proteoglycans in cancer	17/205	0	2,75826E-21	0	0	59,57535	2989,06836	SRC, BRAF, PTPN11, EGFR, NRAS, PIK3CA, SMO, ERBB4, ERBB2, KDR, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, MET, TP53, FGFR1
Ras signaling pathway	17/232	0	2,1623E-20	0	0	52,02264	2498,47721	CSF1R, PDGFRA, FLT3, PTPN11, EGFR, NRAS, PIK3CA, KIT, ABL1, KDR, AKT1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, FGFR2, FGFR1
MAPK signaling pathway	18/294	0	2,72708E-20	0	0	44,25112	2111,42604	CSF1R, PDGFRA, FLT3, BRAF, EGFR, NRAS, ERBB4, ERBB2, KIT, KDR, AKT1, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, TP53, FGFR2, FGFR1
Bladder cancer	11/41	0	1,36567E-19	0	0	202,9194	9340,28495	RB1, NRAS, SRC, CDH1, ERBB2, BRAF, KRAS, HRAS, FGFR3, TP53, EGFR
Hepatocellular carcinoma	15/168	0	2,87117E-19	0	0	60,66176	2742,97059	RB1, SMAD4, SMARCB1, PTEN, BRAF, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, MET, TP53
Colorectal cancer	12/86	0	9,71015E-18	0	0	92,10347	3834,44079	NRAS, SMAD4, APC, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, BRAF, KRAS, MLH1, HRAS, TP53, EGFR
Signaling pathways regulating pluripotency of stem	13/143	0	9,19145E-17	0	0	58,30294	2292,67971	SMAD4, NRAS, APC, PIK3CA, AKT1, CTNNB1, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3, FGFR3, FGFR2, FGFR1
Glioma	11/75	0	1,55711E-16	0	0	94,95616	3678,53226	RB1, PDGFRA, NRAS, PIK3CA, PTEN, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS, TP53, EGFR
Chronic myeloid leukemia	11/76	0	1,72195E-16	0	0	93,4906	3607,29474	RB1, NRAS, SMAD4, PIK3CA, ABL1, AKT1, BRAF, PTPN11, KRAS, HRAS, TP53
ErbB signaling pathway	11/85	0	6,00411E-16	0	0	82,08296	3060,40504	NRAS, PIK3CA, SRC, ERBB4, ERBB2, ABL1, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS, EGFR
Human cytomegalovirus infection	14/225	0	7,58279E-16	0	0	39,69381	1468,753	RB1, PDGFRA, SRC, EGFR, NRAS, PIK3CA, GNA11, GNAQ, GNAS, AKT1, CTNNB1, KRAS, HRAS, TP53
MicroRNAs in cancer	15/310	0	2,08601E-15	0	0	31,23623	1122,74211	PDGFRA, NOTCH1, PTEN, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, ERBB2, ABL1, ATM, KRAS, HRAS, FGFR3, MET, TP53
Hepatitis B	12/162	0	1,75501E-14	0	0	45,264	1528,33488	RB1, NRAS, SMAD4, PIK3CA, SRC, AKT1, BRAF, KRAS, JAK2, HRAS, JAK3, TP53
Calcium signaling pathway	13/240	0	5,89511E-14	0	0	33,22597	1080,34633	RET, PDGFRA, EGFR, ERBB4, GNA11, GNAQ, ERBB2, KDR, GNAS, FGFR3, MET, FGFR2, FGFR1
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in	10/89	0	6,11973E-14	0	0	67,99179	2205,44329	ALK, NRAS, PIK3CA, PTEN, AKT1, PTPN11, KRAS, JAK2, HRAS, EGFR
FoxO signaling pathway	11/131	0	6,36467E-14	0	0	50,50069	1634,12373	NRAS, STK11, SMAD4, PIK3CA, PTEN, AKT1, BRAF, ATM, KRAS, HRAS, EGFR
Thyroid cancer	8/37	0	1,22593E-13	0	0	140,9302	4458,6625	RET, NRAS, CDH1, CTNNB1, BRAF, KRAS, HRAS, TP53
Human papillomavirus infection	14/331	0	1,22593E-13	0	0	26,27894	831,171585	RB1, NOTCH1, PTEN, EGFR, NRAS, APC, PIK3CA, GNAS, AKT1, CTNNB1, ATM, KRAS, HRAS, TP53
Focal adhesion	12/201	0	1,88852E-13	0	0	35,85306	1117,23975	PDGFRA, PIK3CA, SRC, ERBB2, PTEN, KDR, AKT1, CTNNB1, BRAF, HRAS, MET, EGFR
Acute myeloid leukemia	9/67	0	2,33362E-13	0	0	81,24093	2511,6522	CSF1R, NRAS, PIK3CA, FLT3, KIT, AKT1, BRAF, KRAS, HRAS
Renal cell carcinoma	9/69	0	2,98304E-13	0	0	78,525	2405,83207	NRAS, PIK3CA, AKT1, BRAF, PTPN11, KRAS, VHL, HRAS, MET

Bu genler üzerinde bulunan mutasyonlar ve bu mutasyonları hangi hastaların taşıdığına dair bilgiler “CHASM_THCA.xlsx” isimli excel tablosunda gösterildi (Tablo 4.13). Burada özellikle *MAP3K1* üzerindeki mutasyon (c.2416G >Ap.Asp806Asn) birçok hastamızda (1,2,3,5,6,9 ve 10 nolu) görülmüş olmakla birlikte sadece 5. hastada homozigot, diğerlerinde heterozigot olarak görüldü. *MPA3K1* genindeki mutasyonların tümü patojenik olup missense idi. Lenf nodu metastazı olan hastalardan üçü (2,5 ve 9 nolu) bu mutasyonu göstermekteydi.

63 genlik listemizde olmayan diğer gen *EIF1AX* olup yalnızca bir hastada (9 no) *EIF1AX* mutasyonu (c.221C>T p.Ser74Leu) mevcuttu. Patojenik ve missense mutasyonu olan bu hasta ileri evre (pT3N1M1) idi. Karaciğer metastazı nedeni ile takibin 25. ayında ex olmuştu.

Tablo 4. 14: Sporadik medüller tiroid kanserlerde RET mutasyon oranları

Yazar	Ülke	Hasta sayıları	Örnek	Metod	RET mut %	Gen sayısı veya ekzom
Agrawal ⁽¹⁷¹⁾	USA	17	Doku	NGS	70,5	21000
Aydoğan ⁽¹⁷²⁾	TR	154	Kan	PCR	5,2	1
Heilmann ⁽¹⁷³⁾	USA	34*	Doku	HC	88	315
Tiedje ⁽¹⁹⁾	GER	32	Doku	NGS	66	9
Wei ⁽¹⁷⁴⁾	USA	9	Doku	NGS	88	47 (WES)
Nikiforova ⁽¹⁷⁵⁾	USA	15*	Doku+İİA	NGS	46,6	12
Simbolo ⁽¹⁷⁶⁾	IT	20	Doku	NGS	65	50
Dvorakova ⁽¹⁷⁷⁾	CZ	48	Doku	PCR	48	10,11,15,16
Diwaker ⁽¹⁷⁸⁾	West Ind.	51	Kan	PCR	21	1
Qu Ning ⁽¹⁷⁹⁾	CN	18	Doku	NGS	27,8	45 (WES)
Altinay**	TR	13	Doku	NGS	30,8	63 (WES)

*sporadik ve herediter vakalar, **mevcut çalışma. PCR: Polimeraz zincir reaksiyon, NGS: Yeni nesil dizileme, HC: Hibrid yakalama, İİA: İnce İğne aspirasyon, WES: Tüm ekzom dizileme

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde her iki cinsteki kanserler arasında 9. sırada yer alan tiroid kanseri, kadınlar arasında meme kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır (1). Küresel insidans oranı kadınlarda erkeklerdekenden 3 kat yüksektir. Her iki cinsiyet için yüksek insidans oranları Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda, Doğu Asya ve Güney Avrupa'da iken kadınlar için Mikronezya/Polinezya ve Güney Amerika'dadır (2). Küresel Kanser Gözlem (GLOBOCAN) verilerine göre 2020 yılında tüm dünyada yaklaşık 586.202 yeni vaka ve 43.646 ölüm bildirilmiştir (2). GLOBOCAN 2020 verilerine göre Türkiye'de tiroid kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserler arasında 2. sırada olup 13 682 yeni vaka ile ülke genelinde tüm kanserler arasında 5. sırada, 795 ölümlle tüm ülkede kansere bağlı ölümler sıralamasında 21. sırada yer almaktadır (4).

Tiroid karsinomu tüm yaş gruplarında görülebilmekle birlikte en sık görüldüğü yaşlar dördüncü ve beşinci dekatlardır. Çoğu diferansiye ve yavaş seyirli olan tiroid karsinomlarının en agresif formlarından biri olan anaplastik karsinom, özellikle yedinci ve sekizinci dekatlarda görülür (31). Tiroid karsinomu, tiroid hormonu üreten foliküler hücrelerden veya kalsitonin üreten C hücrelerinden kaynaklanabilir. C hücreli olanlar medüller karsinom olarak adlandırılır ve sporadik olabilir veya multipl endokrin neoplazinin (MEN) bir parçası olarak ailesel bir formda ortaya çıkabilir. ABD'de 5.583 vakayı içeren çok merkezli prospektif bir kohort çalışmasında, foliküler hücre kaynaklı tiroid karsinomları arasında en sık görülen papiller karsinomdur (%81). Bunu foliküler karsinom (%10), Hurthle hücreli karsinom (%3,6) ve anaplastik karsinom (%1,7) izlemektedir (31).

Medüller tiroid karsinomu (MTK), tüm tiroid malignitelerinin %5-10'unu oluşturur ve vakaların %75'inde sporadik olarak ortaya çıkar, geri kalanı ise çoklu endokrin neoplazi (MEN) 2A, MEN2B veya ailesel MTK (FMTK) ile birlikte gelişir. Sporadik MTK öncelikle orta yaşlı erişkinlerde görülür ve kadınlarda erkeğe göre biraz daha fazladır. Çalışmada 13 olgunun yaş ortalaması 50,4±14,8, ortanca değeri 55 olup kadın/erkek oranı: 10/3=3,33'dür. Bu bulgular literatür verileri (48,180–182) ile paraleldir.

Tam bir tümör kapsülünün varlığı (enkapsülasyon), hastalığın lenfatik yayılmasının olmadığı güçlü bir göstergesidir (181). Geçenlerde yapılan bir araştırma enkapsüle tümörlerin lenf nodu metastazı göstermediğini ve daha iyi prognozla ilişkili olduğunu desteklemektedir (182). Çalışmamızdaki olguların 9'unda (%69) enkapsülasyon yokken, 2'sinde (%15) fokal, 2'sinde (%15) total enkapsülasyon mevcuttur. Enkapsüle tümörlerden birinde lenf nodu metastazı varken diğerinde yoktur. Benzer şekilde kapsül invazyonu olan 4 olguda lenf nodu metastazı varken 4 olguda lenf nodu metastazı yoktur. Enkapsüle olmayan veya fokal kapsüllü olan tümörlerden 6 tanesinde metastaz yokken 5 tanesinde lenf nodu metastazı vardır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak lenf nodu metastazı olan hastalarda kapsül invazyonu olmayanlara göre anlamlı derecede yüksektir. Ayrıca ex olan hastanın tümörünün fokal kapsüllü olması, enkapsüle olmayan tümörlerin daha kötü seyir göstereceğinin bir işareti olarak kabul edilebilir.

Sporadik MTK'da iki taraflı odakların yaygınlığı %0 ile %66,7 arasında geniş bir aralıkta bildirilmiştir (183). Mevcut seride multifokalite oranı %15 olup (2/13) hastalardan birinde tümör iki taraflıdır ve pT3'tür. Hastalık aynı lobda ya da istmusta multifokal olduğunda bilateralite oranı da artmaktadır. Yazarlar multifokalite gösteren hastalarda total tiroidektominin önemli olduğunu vurgulamaktadır (183).

Medüller tiroid kanserlerinin diğer tümörler ile ayırıcı tanısında zorluk yaratabilecek bir çok alt tipi vardır (41). Seride vakaların 7'si (%54) folliküler, 4'ü (%31) tubulopapiller, 2'si (%15) spindle hücreli medüller karsinom histolojik alt tiptedir. Alt tipler ile diğer parametreler arasında istatistiksel bir ilişki yoktur. Mulligan ve ark da histolojik alt tipin prognoz ile bir ilişkisi olmadığını yayınlamışlardır (128) . 2 olgudan ex olan bir hastanın spindle varyant olması bu grup tümörlerin daha kötü prognoz gösterdiğini düşündürmektedir. Ancak bazı yazarlar spindle alt tip ile sağkalım arasında bir farklılık olmadığını hatta iyi seyrettiğini belirtmişlerdir (184,185).

Dezmoplazisi olan medüller tiroid kanserlerinin lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunun gösterilmesinden sonra tümör histolojisinde bu parametrenin varlığı önemli olmuştur (113,114,180). Çalışmamızda olgular arasında biri orta derecede diğeri yoğun dezmoplazi gösteren iki olgu olup her ikisinde de lenf nodu metastazı vardır. Bu durum dezmoplazinin şiddetinden bağımsız olarak nodal tutulum ile ilişkisini doğrulamakta ve literatür ile paralellik göstermektedir. Çok merkezli bir çalışma, tümörlerinde

dezmoplastik stromal reaksiyon olmayan MTK hastalarında başlangıçtaki lateral boyun diseksiyonunun gereksiz olduğunu; dezmoplazinin cerrah için olağanüstü klinik önemi olan morfolojik bir parametre olarak yer alması gerektiğini gösteriyor (113).

Virchow ve Rijswijk tarafından yapılan çalışmalarda tiroide amiloid birikimine ilişkin ilk rapor, sistemik amiloidozlu bir hasta üzerinde 1800'lerin ortalarından kalmadır (186,187). Tiroid dokusunda bulunduğu, amiloid neredeyse her zaman medüller tiroid karsinomu (MTK) ile sınırlı bir özelliktir. Çalışmamızdaki olguların 6'sında (%46) amiloid varken, 7'sinde (%54) amiloid birikimi yoktur ve lenf nodu metastazı başta olmak üzere diğer parametrelerle anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. %85 oranında amiloid varlığı gösteren geniş bir seride de sağ kalım açısından bir fark bulunmamıştır (184).

Son zamanlarda yapılan bazı yeni çalışmalar, amiloid agregasyonunun, sonuçta tümör hücresi proliferasyonunu teşvik edecek olan sikline bağımlı kinaz 5'in (Cdk5) hiperaktivasyonuna yol açtığını göstermiştir (188,189). Hatta otörler papiller karsinomu olan hastaların tümörlerinde de amiloid birikimi olabileceğini bu durumun sadece medüller kansere özgü olmadığını bildirmişlerdir (190).

MTK'unun kalıtsal formları, genellikle C-hücresi hiperplazisi (CCH) zemininde multifokal hastalık olarak ortaya çıkan, eksik penetrasyona sahip RET proto-onkogeninin otozomal dominant mutasyonlarından kaynaklanır. Sporadik formlarda da CCH olabilir ki bu aile bireylerinin taranmasını gerektirir (48). Ancak Kaserer ve ark. (180) değindiği gibi bu kriterler, ailesel bir risk olup olmadığını tahmin etmede bireysel olarak hasta için güvenilir değildir. Olgularımız içerisinde yalnızca 1 hastada (%7,7) nodüler paternde neoplastik CCH izlenmiştir. 9 nolu hasta RET mutasyonu göstermekte olup MEN ile ilişkili değildir ve aile bireylerinin taramasında Kalsitonin yüksekliği görülmemiştir. 27 vakalık sporadik MTK serisinde 8 fizyolojik 3 neoplastik (%11,1) CCH izlenmiştir (48).

İnsanlarda öncelikle tiroidin parafoliküler hücreleri (C hücreleri) tarafından üretilen Kalsitonin (tirokalsitonin), kalsiyum ve fosfor metabolizmasına katılan 32 amino asitlik lineer bir polipeptit hormondur (molekül ağırlığı 3,421 Kd) ve CALC1 geninin (CALC) bir ürünü olan daha büyük bir pre-propeptitin proteolitik bölünmesiyle oluşur (191). Bussolatinin (52) domuz ve köpek tiroid dokusunda immünfloresan yöntemle C hücrelerinde Kalsitonin varlığını göstermesinden sonra tiroid medüller kanserlerde Kalsitoninin serum ve dokuda tespiti büyük önem kazandı.

Çalışmada Kalsitonin immünohistokimya boyanma yoğunluğu; 6 hastada (%46) %50'den az boyanma gösterirken 7 hastada (%54) %50'ye eşit veya daha fazla boyanma gösterdi. Bu oranlar 32 olguluk serilerinin 25'ine Kalsitonin immünohistokimyası uygulayan ve 13'ünde (%52) yoğun-kuvvetli, 12'sinde (%48) hafif-orta boyanma bulan otorlerinki ile uyumlu idi (192). Mevcut çalışmada %50≤ Kalsitonin boyanma yoğunluğunun lenf nodu metastazı ve sağ kalım ile ilişkisi tespit edilemedi, ancak RET mutasyonu gösteren 4 hastadan 3'ünde Kalsitonin boyanma yoğunluğu %50 ve üzerinde idi. Bazı yazarlar (57'si sporadik 65 vakalık MTK serisinde) düşük kalsitonin immünohistokimya boyanmasının kötü prognostik faktör olduğunu belirttiler (191). Bazı yazarlar ise prokalsitonin ekspresyonunun RET mutasyonu, evre ve prognozla ilişkisi olduğunu belirttiler (193).

Hücre sel bileşim (iğsi hücreye karşı yuvarlak hücre), pleomorfizm, amiloid birikiminin boyutu ve kalsitonin boyanmasının kapsamı dahil olmak üzere daha önce yapılmış çok sayıda histolojik ve immünohistokimyasal parametre, potansiyel prognostik parametreler olarak incelenmiştir, ancak çok değişkenli analizlerde hiçbirinin anlamlı olduğu kanıtlanmamıştır (110,184,193).

MTK, vakaların çoğunda tanımlanan pozitif lenf nodları ile nodal tutulum için yüksek bir eğilime sahiptir (194,195). Araştırmacılar hastaların %40-75'inde nodal hastalık bildirmiştir (196,197). Mevcut çalışmada lenf nodu tutulum oranı %46'dır. Çalışmamızda lenf nodu metastazı ile histopatolojik parametreler ve sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Literatürde ortalama 23.5 ay takip edilen 58'i sporadik toplam 65 MTK'in OS'ı 10 ve 20 yıl için sırası ile %63 ve %44 dür (197). AJCC evrelemesinin metastatik lenf nodu sayısını yansıtmadığı düşüncesi ile geçenlerde 2627 hasta üzerinde yayınlanan bir araştırma MTK için yapılan metastaz sayısının prognoz ile ilişkisini araştırmış ve 11-20 arası pozitif lenf nodu sayısının 1-10 arası pozitif lenf nodu sayısına göre daha kötü bir sağkalım gösterdiğini belirtmişlerdir (108). Ancak çalışmamızda 14 lenf nodu metastazı olan 11 ve 12 nolu hastalar takiplerinde hastaliksız yaşarken 6 lenf nodu metastazı olan 9 nolu hasta Karaciğer metastazı nedeniyle ex olmuştur. Bu hastanın uzak metastaz nedeniyle ölmesi ve sınırlı sayıdaki hasta sayısı ile şüphesiz yukarıdaki çalışmaya karşıt görüş sergilenemez.

Medüller tiroid kanser için en önemli prognostik faktörlerden biri de evredir (110,111). Çalışmada lenf nodu metastazı olmayan hastaların %85,7'sinin evre durumu

pT1 iken; lenf nodu metastazı olanların %66,7'sinin evresi pT3'tür. Lenf nodu metastazı olan hastalar daha yüksek evrededir. ($p<0,05$). Lenf nodu metastazı ve evre arasındaki ters ilişki literatürde de benzer şekildedir (108, 198).

MTK'unun en etkin tedavisi cerrahi olduğu için tümörün temiz bir cerrahi sınır ile eksizyonu önem arz eder (108). Yazarlar pozitif rezeksiyon sınırının hastalığın rekürrensini öngörmede anlamlı bir faktör olduğunu belirtmişlerdir (109). Çalışmadaki hastaların 3'ünde (%23) tümör cerrahi sınırdan pozitifdir. Cerrahi sınır durumu diğer bütün parametrelerle anlamlı bir ilişki göstermemekle birlikte ex olan bir olguda pozitif sınır ve ekstratiroidal yayılım dikkat çekmektedir.

Erkek cinsiyet, ileri yaş, artmış tümör çapı gibi ileri hastalığı gösteren birçok risk faktörü vardır (199). Medüller kanserlerde ekstratiroidal yayılım (ETE), lenf nodu metastazını öngörmeden prognoza kadar önemli bir parametredir (200,201). ETE, tümörün tiroid bezinin dışında ve yakın veya çevre dokulara yayılması olarak tanımlanır. Diferansiye ve medüller tiroid kanserleri için Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC), evreleme sisteminin bir parçası olarak ETE'yi içerir (45, 202). T3'ü "tiroidle sınırlı en büyük boyutu 4 cm'den büyük tümör veya minimum ETE'li herhangi bir tümör", T4a'yı "tiroid kapsülünün ötesine büyüyerek cilt altı yumuşak dokuları, larenksi, trakea, özofagus veya tekrarlayan laringeal siniri" ve T4b'yi "prevertebral fasyayı işgal eden veya karotid arteri veya mediastinal damarları" tutan tümör olarak tanımlar. Çalışmada vakaların 2 tanesinde (%15,3) ekstratiroidal yayılım mevcuttur ve her iki tümör de pT3N1b dir. ETE ile diğer parametreler arasında bir ilişki olmamakla birlikte lenf nodu metastazı olmayan 7 hastanın hiçbirinde ETE izlenmemiştir.

Bilimin güncel gelişmeleri ve ilerlemesine iyi bir örnek olacak şekilde tez çalışması sırasında güzel bir gelişme yaşandı: Bugüne kadar gradelemesi yapılmayan Tiroid Medüller kanserlerde tanımlanan yeni kriterlere göre artık derecelendirmeye gidildi. Memorial Sloan Kettering Cancer Center'den Bin Xu ve ark. (164) 2022 yılı ilk çeyreğinde medüller kanserlerin mitoz ve/veya Ki 67 proliferasyon indeksine, nekroz durumuna göre gradeleme yapılabileceğini ve bunun uluslararası geçerliliği olan kabul edilebilir bir sistem olduğunu çok merkezli bir çalışma ile gösterdiler. Buna göre aşağıdaki özelliklerden en az bir tanesini içeren tümörler high grade diğerleri low grade olarak derecelendirildi; 2 mm²'de 5 ya da daha fazla mitoz ($\geq 5/ 2\text{mm}^2$), Ki-67 proliferasyon indeksi %5'e eşit ya da daha büyük (≥ 5 Ki67), ya da nekroz içerenler.

Güncel kriterlere göre yeniden değerlendirilen tümörlerin hiçbirinde nekroz yok iken iki vakada 2 mm²'de 5 ya da daha fazla mitoz vardı. DSÖ 2022 sınıflamasına göre bu 2 olgu (%15) high grade iken, 11'i (%85) low grade olarak sınıflandırıldı. Dördü de farklı RET mutasyonu gösteren tümörlerden 3'ü (%75) low grade iken yalnızca 1'i (%25) high grade idi. Gerek sağ kalım gerekse diğer parametreler arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Henüz çok yeni bir değerlendirme metodu olduğu için literatürde sınırlı sayıda araştırma görüldü. Yazarlar 44 vakalık sporadik MTK serilerinde grade ve mutasyon arasında anlamlı bir fark bulmadılar (203). Geçenlerde 2526 vakalık SEER veri içeren bir araştırma bu konuda daha çok çalışma yapılması gerektiğini gösterdi (204).

Literatürde 289 hastanın 20 yıl süre ile izlendiği (ortalama 8,9 yıl) uzun takipli hasta serisinde pT1 evresinde %67'ye ulaşan kür varken bu oran pT4'de %50'ye düşmektedir (205). Mevcut çalışmada ortalama 5,2 yıl izlenen hastalar arasında evre ve DFS/OS bakımından bir farklılık görülmemektedir. Ancak lenf nodu metastazı olan hastalarda olmayanlara göre daha yüksek evrenin görülmesi arasındaki anlamlı ilişki, hasta sayısı artırıldığında sağkalım ile de dolaylı bir ilişki olabileceğini göstermektedir. RET mutasyonu (+/-) ve lenf nodu metastazı (+/-) hastalar arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark yoktur. Şüphesiz bunda hasta sayısının az olması en büyük etkidir. 58'i sporadik toplam 65 hastanın ortalama 23,5 yıl izlendiği bir başka çalışmada 10 ve 20 yıllık OS sürelerinin sırası ile %63 ve %44 olması medüller tiroid karsinomu ile ilişkili önemli morbidite ve mortalite nedeniyle, erken tanı ve tümörün rezeksiyonunun önemine değinir (197).

5.1. MOLEKÜLER BULGULAR

Diğer kanser türlerine benzer şekilde tiroid kanseri başlangıcı ve ilerleme, aktive edici ve inaktive edici somatik mutasyonlar, gen ekspresyon paternlerinde değişiklik, mikroRNA (miRNA) düzensizliği ve anormal gen metilasyonu dahil olmak üzere çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin kademeli olarak birikmesi yoluyla gerçekleşir (18,99). Bu değişiklikler arasında, biriken verilerin çoğu somatik mutasyonlarla ilgilidir; bunların çoğu, dönüşüm sürecinin erken evrelerinde meydana gelir ve kanser gelişimi için gereklidir. Tiroid kanseri, kritik genlerin sıklıkla iki farklı moleküler mekanizma yoluyla mutasyona uğradığı bir tür neoplaziyi temsil eder: nokta mutasyonu veya kromozomal yeniden düzenleme (18,44,99). Tiroid kanserindeki çoğu mutasyon, MAPK yolunun ve PI3K-AKT yolunun efektörlerini içerir. MAPK aktivasyonu, tümör başlangıcı için çok

önemlidir. Bu yolları etkileyen mutasyona uğramış genler hücre zarı reseptörü tirozin kinazları RET, NTRK1 ve hücre içi sinyal transdüserleri olan BRAF ve RAS'kodlar (18,44).

Parafoliküler C hücrelerinden köken alan MTK'unun hem sporadik hem de kalıtsal formları vardır. Vakaların yaklaşık %75'i sporadik %25'i kalıtsaldır. Kalıtsal MTK, çoklu endokrin neoplazi tip 2 (MEN2) sendromlarında ortaya çıkar. MEN2'nin üç ana alt tipi mevcuttur: tip 2A (MEN-2A), tip 2B (MEN-2B) ve ailesel MTK (FMTK). Sporadik ve MEN-2B ile ilişkili MTK, MEN-2A ile ilişkili MTK'den daha agresif kabul edilir. FMTK'nin prognozu değişkendir, ancak az sayıda veri rapor edilmiştir (100). Moleküler onkoloji temelli bu çalışmada endokrin yoğun tersiyer bir merkezde sporadik MTK'larda moleküler değişimlerin NGS ile tespiti; tüm ekzom analizinin yapılması, lenf nodu metastazı gösteren ve göstermeyen hastaların ilgili genlerinde mutasyonlarının belirlenmesi, histopatolojik parametreler ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlandı.

Yeterli ve kaliteli oranda DNA içeren tümör örneklerinde ticari uygulanan akciğer- tiroid gen paneline ilave daha önceki araştırmacıların (174) incelediği 47 gen yerine 47 gene ilaveten moleküler patogeneze önemli 16 gen daha ilave ederek toplam 63 gene ait tüm ekzom analizi yapıldı.

Reseptör tirozin kinaz RET, gen füzyonları veya nokta mutasyonları ile onkojenik olarak aktive edilebilir (9,206). RET füzyonları, akciğer kanserlerinin %1-2'si, papiller tiroid kanserlerinin %10-20'sine kadar ve nadiren diğer birçok solid tümör dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde meydana gelir (53). RET mutasyonları çoğu medüller tiroid kanserini (yaklaşık %80) etkiler ve çok sayıda hasta tümörünün yeni nesil sekanslama (NGS) ile yapılan analizi, tiroid dışı diğer tümör tiplerinde düşük frekansta RET değişikliklerini ortaya koymuştur (129). Çalışmamızda 13 hastadan 4 tanesinde (%30,8) RET mutasyonu görüldü.

Literatürde kan/parafin doku/taze doku üzerinde NGS ile tespit edilen RET mutasyonu %5,2-88 arasında değişkenlik göstermektedir (19,171,173-178,208). Hasta sayıları, yöntem ve ülkelere ilişkin veriler Tablo 4.14'de gösterildi. Mevcut çalışmada RET geni ve üzerindeki aminoasit dizilimlerine göre görülen tüm RET mutasyonları yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardı (c.1902C>G p.Cys634Trp, c.2257A>C p.Thr753Pro, c.2370G>T p.Leu790Phe, c.1901G>T p.Cys634Phe). Ülkemizde MTK ile ilgili iki çalışma PCR temellidir. Aydoğan ve ark. (172) tarafından kan örneklerinde

yapılan çok merkezli çalışmada yazarlar 154 sporadik MTK içinde 8 hastada (%5,2) RET mutasyonu (3'ünde Cys634Arg, 3'ünde Val804Met, birinde Cys618Ser, birinde Y790Phe) buldular. Literatürdeki en düşük RET mutasyonu oranına sahip çalışmaya kıyasla NGS temelli olan çalışmamızda %30,8 RET mutasyon oranının ülkemiz verisini daha iyi yansıttığını düşünüyoruz. Aynı zamanda aminoasit değişimlerinin de tamamen farklı olduğunu görüyoruz. Herediter MTK'ları içeren çok merkezli EUROMEN çalışması, Avrupa popülasyonundaki en yaygın RET mutasyonunun %67,6 sıklık ile Cys634 olduğunu göstermiştir (208). Serimiz içerisinde 1 ve 13 nolu hastaların mutasyonunun p.Cys634Trp olması (%50) bu kadar az sayıdaki hasta içerisinde bile bu mutasyon tipine rastlanabileceğini gösterdi.

Kodonların tespitinde önemli bir yeri olan gen analizi 2010 yılından önce real-time PCR ve mikroarray gibi yöntemler ile sınırlı idi (12). Tüm genlerin eş zamanlı analizi hem kompleks bir prosestir hem de geniş kapsamlı teknolojiler gerektirmektedir (13,14). Günümüzde yeni nesil dizileme (next-generation sequencing, NGS) teknolojileri; DNA, RNA, mikro-RNA gibi hücre içerisindeki moleküller hakkında düşük maliyetle, hızlı ve buna paralel olarak çok büyük miktarda veri elde edilmesini sağlamıştır (12,14). NGS teknolojisi, tek bir örnekten alınan ve milyonlarca parçaya ayrılmış olan bir DNA molekülünün her bir parçasının aynı anda ve uyum içerisinde paralel olarak işlenmesini temel alan bir metottur (12–14). Beraberinde getirdiği avantajlar ile pek çok alanda yürütülen biyolojik araştırmaların vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Genomun yalnızca %2'lik kısmı protein kodlaması yaptığından genomun tümünü analiz etmek yerine sadece protein kodlayan kısımları yani tüm ekzomu analiz etmek, günümüzde DNA mutasyonlarını taramanın en iyi yolu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda RET geni dahil yukarıda sıralanan 63 gende tüm ekzomun analiz edilmesi planlandı. 2 hastada (%50) ekzom 11, iki hastada (%50) ekzom 13'de mutasyon görüldü.

RET mutasyonunun hem sporadik hem de kalıtsal MTK'da nedensel bir olay olduğu bildirilmiştir (206). 10,11,15 ve 16. ekzomlardaki RET mutasyonları sporadik MTK ile ilişkiliyken, 5,8,10,11,12 ila 16 ve 19. ekzomlardakiler kalıtsal MTK ile ilişkilidir (209). Literatürdeki çalışmaların çoğu ailesel MTK'ler ile ilişkili olup sporadik olanlar ya sınırlıdır, ya da seri içerisinde hasta dağılımı net verilmemiştir. Bir kısmında ise sadece mutasyon oranı verilmiş olup hangi kodonda/ekzomda olduğu belirtilmemiştir.

Tablo 20'deki sporadik MTK'ları içeren serilerdeki mutasyonlara bakıldığında; ülkemizden Aydoğan ve ark.nın ekzom 10'da %38 oranında mutasyon buldukları görülmektedir. Simbolo ve ark (176) NGS temelli 50 geni çalıştıkları %65 oranında RET mutasyonu olan 20 vakalık serilerinde 10 (%50) hastada M918T (ekzom 16) mutasyonu bulurken 1 (%10) hastada C630F ve 1 hastada (%10) C634R (ekzom 10) mutasyonu buldular. Tiedje ve ark (19) NGS temelli 9 geni çalıştıkları %66 oranında RET mutasyonu olan 32 vakalık serilerinde 8 hastada (%25) M918T (ekzom 16) mutasyonu tespit ettiler. Wei ve ark (174) NGS temelli 47 geni çalıştıkları %88 oranında RET mutasyonu olan 9 vakalık serilerinde 8 (%89) hastada M918T (ekzom 16) mutasyonu budular. Heilmann ve ark (173) HC temelli 315 geni çalıştıkları %88 oranında RET mutasyonu olan 34 vakalık serilerinde (sporadik+kalıtsal) 21 hastada (%70) M918T (ekzom 16) mutasyonu tespit ettiler. Qu ve ark (179) NGS temelli kanser ilişkili genleri çalıştıkları %27,8 oranında RET mutasyonu olan 18 vakalık serilerinde 2 hastada (%40) C634R (ekzom 10) mutasyonu bulurken 1 (%20) hastada M918T (ekzom 16), 1 hastada (%20) A883F (ekzom 15), 1 hastada (%20) C630G (ekzom 11) mutasyonu budular.

Serimizdeki hastaların hiçbirinde RET geninde M918T mutasyonu bulmadık. Ülkemizden Aydoğan ve ark (172) da sporadik MTK'larda bu mutasyonu tespit etmediklerini, herediter MTK'de ise sadece 2 hastada M918T mutasyonu bulduklarını yayınladılar. Yine ülkemizde bir MEN2B hastasında ekzom 16'da M918T mutasyonu olup olgu sunumu olarak raporlanmıştır (210). Erdoğan ve ark. (211) da 56 hastalık çok merkezli PCR temelli Turkmen çalışmalarında M918T mutasyonu görmediklerini üçü kodon 634 (ekzom 11), biri kodon 618 (ekzom 10) ve ikisi kodon 804 (ekzom 14) olmak üzere 6 (%10,7) germline RET mutasyonu tespit ettiklerini belirttiler. Bu veriler ATA (American Thyroid Association) kriterlerine göre en yüksek risk kategorisine alınan M918T mutasyonun ülkemizde belkide çok az görüldüğünü göstermekte ancak bunun daha kararlı söylenebilmesi için geniş serilerle ispatı gerekir.

Sporadik MTK'daki somatik RET kodon M918T mutasyonu, agresif bir klinik seyir ve kötü bir prognoz habercisi gibi görünmektedir. ATA (American Thyroid Association) risk kategorisine göre medüller kanserler en yüksek (HST), yüksek (H) ve orta (MOD) olmak üzere 3 risk kategorisine bölünmüştür (100). ATA-HST kategorisi, MEN2B ve RET kodon M918T mutasyonuna sahip hastaları, ATA-H kategorisi, RET kodon C634 mutasyonu ve RET kodon A883F mutasyonu olan hastaları ve ATA-MOD

kategorisi, C634, A883F ve M918T dışında RET kodon mutasyonu olan hastaları içerir. Serimizde C634 mutasyonu gösteren 2 hasta (1 ve 13 nolu) olup sırası ile 40 ve 58 aylık takiplerinde hastaliksız yaşamaktadır.

Yakın tarihli bir çalışmada (212) sporadik MTK'u olan 160 hastanın, somatik RET kodon M918T mutasyonlarının prevalansının tümör boyutuna bağlı olarak değiştiği; <1 cm olan 53 hastanın 6'sı (%11,3); 1–2 cm olan 68 hastanın 8'i (%11,8); 2–3 cm olan 22 hastanın 7'si (%31,8); ve >3 cm olan 17 hastanın 10'unun (%58,8) M918T mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir. Bu veriler, RET'in tek başına sporadik MTK'da onkogenез başlatıcısı olarak mı hareket ettiği yoksa daha sonra MTK başlangıcında önemli bir rol oynayan diğer genlerle birlikte tümör büyümesinin bir itici gücü olarak aktive edilip edilmediği sorusunu gündeme getirmektedir. Bu bulgular için alternatif bir açıklama, M918T mutasyonlu tümörlerin yüksek bir büyüme oranına sahip olmaları ve daha büyük olduklarında teşhis edilme olasılıklarının daha yüksek olmasıdır. Mevcut çalışmada RET mutasyonu gösteren 4 hastanın tümör çapları sırası ile; 1,8-1,9-2,2 ve 2,3 tü. 4 cm ve üzerinde olan iki hastada da RET mutasyonu görülmedi.

Araştırmamızda RET mutasyonu pozitif hastalarda lenf nodu metastazı olan ve olmayan gruptaki diğer gen mutasyonları karşılaştırıldı: Nodal metastazı olmayan grupta; SMO, ABL1, APC, MET, KIT, GNAS nokta mutasyonları görülürken nodal metastazı olan grupta; ABL1 ve KDR genlerinde nokta mutasyonları görüldü. RET mutasyonu negatif hastalardan nodal metastazı olmayan grupta; SMAD4, ABL1, ATM, NOTCH1, KIT, PDGFRA, KDR genlerinde nokta mutasyon görülürken nodal metastazı olan grupta ABL1 MLH1 NOTCH1 HRAS GNAS ATM genlerinde nokta mutasyon tespit edildi. Bu durum hasta sayıları az olmakla birlikte RET mutasyonu pozitif hastalarda KDR mutasyonunun nodal tutulumu öngörebileceğini düşündürdü. Rodriguez-Antona ve ark. (213) MTK hastalarının primer tümör dokusuna kıyasla metastatik dokularda daha yüksek bir KDR protein ekspresyonu bildirmiştir. Tiedje ve ark da (19) MTK'da daha yüksek bir KDR mRNA sayısının daha agresif bir tümör biyolojisini yansıttığını, yüksek VEGFC ve FLT1 ekspresyonunun ise takipler sonunda hastaliksız durumla uyumlu olduğunu gösterdiler. Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR-2) olarak da bilinen KDR, (bir tip IV reseptör tirozin kinaz) bir VEGF reseptörüdür. VEGFR-2 için yüksek afiniteye sahip bir multikinaz inhibitörü olan Vandetanib (ZD6474), faz III ZETA çalışmasının sonuçlarından sonra, agresif ve semptomatik, rezeke edilemeyen, lokal

olarak ilerlemiş veya metastatik MTK'unun tedavisi için onaylanmıştır (17). Onkoloji ekibi total tiroidektomileri yapılan hastalardan lenf nodu metastazı olan altı hastaya Vandatanib tedavisi vermişti. Bu hastaların takiplerinde tümör progresyonu görülmedi. Dikkat çekici bir nokta Vandatanib verilen hastalardan yalnızda birinde (11 nolu hasta) KDR nokta mutasyonu vardı ve bu hasta aynı zamanda nodal tutulum gösteren hastalar içinde RET mutasyonu pozitif olan tek hastaydı. Acaba ilaç bu hastada mı gerçekten etkiliydi? Çünkü anjiogenezis RET mutant olan medüller kanserlerde en yüksek bulunmuştu (214).

Bu bilgiler yüksek KDR ekspresyonu varlığında VEGF reseptör kinaz inhibitörü ajanların kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak RET918 mutasyonu var ise tedaviye istenilen cevabın alınamayabileceği de bilinmelidir. Tiedje ve ark. (19) 32 sMTK arasında 10'u Vandetanib ile tedavi edilen hastalardan RET918 mutasyonunu barındıran 5'inin kısmi yanıt gösterdiğini belirttiler.

Çalışmamızda RET mutasyonu negatif hastalar arasında MLH1, HRAS ve GNAS mutasyonlarının yalnızca nodal tutulumu olanlarda görülmesi, bu mutasyonların lenf nodu metastazını öngörebileceğini düşündürmektedir. Literatürde GNAS ve MLH1 mutasyonlarına ilişkin bir veri bulunmamakla birlikte yazarlar RET mutasyonu yokluğunda %56 (117), %50 (118) oranında H-RAS, %12 (117), %31 (118) oranında KRAS mutasyonu görülebileceğini belirttiler. RAS mutasyon oranının bu kadar yüksek olması sporadik medüller kanser tümörögenesinde alternatif genlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda yalnızca bir hastada (1/9;%11) KRAS mutasyonu tespit ettik.

Çalışmanın bir özelliği olarak tümör progresyonunda itici güç oluşturabilecek diğer genler biyolojik yolak zenginleştirme analizi ile araştırıldı. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2021_Human_PathwayEnrichment) biyolojik yolak zenginleştirme analizine göre tiroid medüller kanser patogenezi ile ilişkili olabilecek yolaklar gözden geçirildi (168). PI3K-Akt sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, tiroid kanser yolağı ve tiroid hormon sinyal yolağı içinde yer alan genlerin tamamı çalışma listesindeki 63 gen panelinde yer almaktaydı. Qu ve ark. (179) çalışmalarında biyolojik yolak zenginleştirme analizi ile hücre döngüsü, HIPPO, MYC, Notch, NRF2, PI3K, TGF-Beta, Reseptör Tirozin Kinaz (RTK)-RAS, TP53 ve Wnt genlerini incelediler

ve hastaların %44,4'ünde (n=8) hippo yolunun (hücre proliferasyonu ve apoptozis) genlerinde (FAT1, FAT4, LATS2 vb) değişiklikler gösterdiğini tespit ettiler.

Mevcut çalışmanın bugüne kadarki yapılan araştırmalardan bir farkı da yapay zeka modellemesinin kullanılmasıdır. Son teknolojik gelişmeler, yapay zekanın (AI) farklı disiplinlerde artan şekilde uygulanmasına yol açmıştır ki bunlardan biri de onkolojidir (215). 32 kanser türünden 8.657 örneğe uygulanan CHASMPplus, 240 gende 4.000'den fazla benzersiz driver mutasyonu tanımlayan ve ayrıca spesifik kanser türleri ile ayırt edilen bir modellemedir (169, 215). Çalışmamızda özellikle tiroid kanseri üzerine eğitilen bu yazılım bize sunulan veri içerisinde ilgili hasta için driver veya passanger olabilecek mutasyonları gösterdi ve sonuçta HRAS, MAP3K1 ve EIF1AX genleri üzerinde önemli olma potansiyeline sahip mutasyonlar bulundu. Bu genlerden HRAS, 63 genlik hedef gen listesi içerisindeyken MAP3K1 ve EIF1AX listede mevcut değildi.

MAP3K1 genindeki mutasyon (c.2416G>A p.Asp806Asn) (1,2,3,5,6,9 ve 10 nolu) 7 hastada (7/13;% 53,8) görülmüş olmakla birlikte sadece 5. hastada homozigot, diğerlerinde heterozigottu. MAP3K1 genindeki mutasyonların tümü patojenik olup missense idi. Lenf nodu metastazı olan hastalardan üçü (2,5 ve 9 nolu) bu mutasyonu göstermekteydi. Hücre içi tirozin kinaz yollarının aktivasyonu, RET mutasyon durumu ile ilişkilendirilmiştir. Maliszewska ve ark. (216) M918T RET mutasyonunu barındıran sporadik MTK'da Wnt, Notch, NFκB, JAK/STAT ve MAPK sinyal yollarında yer alan genlerin yukarı regülasyonunu bildirmiştir. MAPK yolu, medüller tiroid karsinomunda RET reseptörü tirozin kinaz yoluyla aktive edildiğinden, BRAF ve aşağı akış mitojen aktive edici kinazların (MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3) ekspresyonu otörlerce araştırıldı. İlginç bir şekilde, BRAF'ın mRNA sayısı, metastatik hastalığı olan hastaların tümörleri ile karşılaştırıldığında, ameliyattan sonra hastalısız olarak iyileşen hastaların MTK'lerinde önemli ölçüde daha yüksek olduğu görüldü (19). Aksine, mitojen aktive edici kinazların mRNA sayıları her iki alt grupta da benzerdi.

MAPK aktivasyon mekanizması, foliküler hücre kaynaklı tümörlerde medüller tiroid kanserinden farklılık gösterir. Foliküler hücre kaynaklı tümörlerde, örn. papiller tiroid kanserine, BRAF mutasyonları sıklıkla neden olur. Medüller tiroid kanserinde, MAPK aktivasyonu, RET mutasyonları yoluyla gerçekleştirilir (18,44,99). Ancak MAP3K1 mutasyonu gösteren olgularımız içerisinde yalnızca bir tanesinde RET mutasyonu vardı. Bu durum bize RET dışı kaynaklı bazı genler aracılığı ile de MAPK

aktivasyonu olabileceğini gösterdi. Çalışmamızda lenf nodu metastazı gösteren 7 hastadan 3'ünde MAP3K1 mutasyonu olması bu mutasyonun lenf nodu metastazını öngörebileceğini göstermesi bakımından önemli idi.

63 genlik listemizde yer almayan diğer gen EIF1AX olup yalnızca bir hastada (9 no) EIF1AX mutasyonu (c.221C>T p.Ser74Leu) görüldü. Patojenik ve missense mutasyonu olan bu hasta ileri evre (pT3N1M1) idi. Karaciğer metastazı nedeni ile takibin 25. ayında ex olmuştu. Literatürde EIF1AX mutasyonunun MTK'lerde hiç görülmediği (217) hem benign hem de malign tümörlerde görüldüğü (218) yönünde değişik yayınlar mevcuttur. Bir diğer çalışma EIF1AX mutasyonu görülen tümörlerde diğer mutasyonların da (EIF1AX+RAS+TERT+TP53) olabileceğine dikkat çekmektedir (219). Serimizdeki 9 nolu hastada RAS, TERT ve P53 mutasyonları görmedik. Translasyon başlatma kompleksinin bir bileşeni olan EIF1AX mutasyonları, ilerlemiş tiroid kanserlerinde RAS ile birlikte ortaya çıkar ve tümör oluşumunu destekler (220). EIF1AX A113 splice, EIF2a'nın ATF4 ile indüklenen bir defosforilasyonunu çalıştırarak protein sentezinin artmasına neden olur. ATF4 ayrıca mTOR'u aminoasite duyarlı hale getirmek için c-MYC ile işbirliği yapar, böylece mTOR kinaz inhibitörlerine karşı güvenlik açığı oluşturur (220, 221). Ex olan hastada acaba EIF1AX mutasyonu biliniyor olsaydı mTOR inhibitörlerinden fayda görebilir miydi sorusu akla geliyor. Yapay zeka bu güvenlik açığını bularak sağkalıma katkı sağlayabilir miydi?

Çalışmanın zayıflığı retrospektif dizaynı ve sınırlı sayıda hasta içermesidir. Parafin bloklardan on yıl üzeri olanların preanalitik hataları nedeniyle bazı hastalardan az miktarda DNA elde edilmiş olması kısıtlayıcı faktörlerdendir. Tüm hastaların takip bilgilerine ulaşılmış olmakla birlikte tedaviyi/izlemi bırakan birkaç hastanın olması sağ kalım analizlerini olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte tiroid akciğer gen paneline ilave edilenler ile birlikte toplam 63 genin tüm ekzomunun incelenmesi, biyolojik yolak zenginleştirme analizi yapılması ve sporadik MTK'lerde ilk defa yapay zeka modellemesinin uygulanması ki bu yolla farklı ve anlamlı mutasyonlar bulunması araştırmanın kuvvetli ve benzersiz yanlarındanadır.

Sonuç olarak, NGS temelli ve WES ile sporadik tiroid medüller kanserlerin incelendiği ülkemizin bu ilk çalışmasında RET mutasyonu varlığında veya yokluğunda lenf nodu metastazını öngörebilecek farklı gen mutasyonları tespit edildi. İlâveten tiroid-akciğer gen panelinde yer almayan genlerden MAP3K1 ve EIF1AX gibi tümör

progresyonunda yer alabilecek ve prognostik önemi olan mutasyonlar tespit edildi. Vandatanib gibi antianjiogenik ilaç kullanımında KDR mutasyonunun önemli olabileceği gösterildi. Bu veriler eşliğinde gen panellerinin genişletilmesi ve anti VEGF2 resptör tirozin kinaz blokeri kullanılacağında KDR mutasyonunun sorgulanmasının faydalı olacağı düşünülebilir. ATA tarafından en yüksek risk kategorisinde belirtilen RET M918T mutasyonunun ülkemizde görülme sıklığını tespit edebilmek ve medüller kanser için hazırlanacak rehber tedavilere girebilmesi için daha geniş hasta sayısını içeren ilave çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, 01.01.2007-31.12.2019 yılları arasında Bakırköy Dr. Sadi Konuk Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği'nde ince iğne aspirasyonu ile medüller tiroid kanseri tanısı alan, sonrasında tiroidektomi materyalinde MTK tanısı doğrulanan ve yeni nesil dizileme (NGS) için yeterli DNA kalitesine sahip 13 olguda, 63 gen panelinin ve tüm ekzom analizinin (WES) yapılması, lenf nodu metastazı gösteren ve göstermeyen hastaların mutasyonlarının belirlenmesi, histopatolojik parametreler ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Elde edilen verilerin sonucuna göre:

- ❖ Hastaların tanı anındaki yaşı ortalaması 50,4 ile literatürde bildirilen yaşla uyumludur.
- ❖ Kadın/erkek oranı: 10/3=3,33 olup literatürde bildirilen oran ile uyumludur.
- ❖ Hastaların %46'sında nodal tutulum mevcut olup literatür ile uyumludur
- ❖ RET mutasyonu gösteren hasta oranı %30,8 olup ülkelere göre değişkenlik göstermektedir.
- ❖ RET mutasyonu en sık kodon 634 (ekson 11) nokta mutasyonu olup literatür ile uyumludur.
- ❖ Hiçbir hastada M918T mutasyonu bulunmamış olup bu durum literatür ile uyumlu değildir. Ülkemize ait çok merkezli geniş bir seri ile bu mutasyonun varlığı araştırılmalıdır.
- ❖ RET mutasyonu durumu ile lenf nodu metastazı olma durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- ❖ Lenf nodu metastazı olma durumu ile evre durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır.
- ❖ Lenf nodu metastazı ile kapsül invazyonu durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır.
- ❖ Yapay zeka, sunulan veri içerisinde ilgili hasta için driver veya passanger olabilecek mutasyonları göstermiş ve sonuçta *HRAS*, *MAP3K1* ve *EIF1AX* genleri üzerinde önemli olma potansiyeline sahip mutasyonlar bulunmuştur.

❖ Lenf nodu metastazı gösteren 7 hastadan 3'ünde *MAP3K1* mutasyonu olması bu mutasyonun lenf nodu metastazını öngörebileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

❖ Ex olan ileri evre bir hastada patojenik ve missense *EIF1AX* mutasyonu (c.221C>T p.Ser74Leu) görülmüştür.

❖ RET mutasyonu pozitif hastalarda *KDR* mutasyonunun nodal tutulumu öngörebileceği düşünülmüştür.

❖ RET mutasyonu negatif hastalar arasında *MLH1*, *HRAS* ve *GNAS* mutasyonlarının yalnızca nodal tutulumu olanlarda görülmesi, bu mutasyonların lenf nodu metastazını öngörebileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı. (IARC) "International Agency of Research on Cancer" (İnternet). Erişim 04.03.2023, <https://gco.iarc.fr/today/home>.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* 2021;71(3):209–249.
3. Surveyans Epidemiyoloji ve Nihai Sonuçlar. (SEER) "Surveillance Epidemiology and End Results" (İnternet). Erişim 04.03.2023, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>.
4. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı. (IARC) "International Agency of Research on Cancer" (İnternet). Erişim 04.03.2023, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>.
5. Livolsi VA. *Surgical pathology of the thyroid*. Philadelphia: Saunders; 1990.
6. Lloyd RV, Douglas BR, Young WF. *Endocrine Diseases*. American Registry of Pathology and the Armed Forces Institute of Pathology Washington, DC; 2002. doi:10.55418/1881041735.
7. Bongiovanni M, Nobile A. Pathology. In: Giovanella L, Treglia G, Valcavi R, eds. *Atlas of Head and Neck Endocrine Disorders*. Cham: Springer International Publishing; 2016:31–38.
8. Khan A. *Surgical pathology of endocrine and neuroendocrine tumors*. New York, NY: Humana Press; 2009.
9. Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2021;17(5):296–306.
10. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, eds. *WHO classification of tumours of endocrine organs*. 4th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2017.
11. Kiesewetter B, Riss P, Scheuba C, Raderer M. How I treat medullary thyroid cancer. *ESMO Open* 2021;6(3):100183.
12. Hutchison CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* 2007;35(18):6227–6237.
13. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26(10):1135–1145.
14. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 2008;5(1):16–18.
15. Yang A, Zhang W, Wang J, Yang K, Han Y, Zhang L. Review on the Application of Machine Learning Algorithms in the Sequence Data Mining of DNA. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:1032.
16. Giani AM, Gallo GR, Gianfranceschi L, Formenti G. Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:9–19.
17. Wells SA, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol* 2012;30(2):134–141.
18. Chernock RD, Hagemann IS. Molecular pathology of hereditary and sporadic medullary thyroid carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2015;143(6):768–777.
19. Tiedje V, Ting S, Walter RF, Herold T, Worm K, Badziong J, et al. Prognostic markers and response to vandetanib therapy in sporadic medullary thyroid cancer patients. *European Journal of Endocrinology* 2016;175(3):173–180.
20. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development* 2017;144(12):2123–2140.
21. Van Vliet G, Polak M, eds. *Thyroid gland development and function*. Basel ; New York: Karger; 2007.
22. Murray D. The Thyroid Gland. In: Kalman K, Asa SL, eds. *Functional Endocrine Pathology*. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell; 1998:295–380.
23. G. Gauger, Leigh W. Delbridge, Norm P. Incidence and Importance of the Tubercle of Zuckerkandl in Thyroid Surgery. *The European Journal of Surgery* 2001;167(4):249–254.
24. McNicol AM, Lewis PD. The Endocrine System. In: Lewis PD, ed. *Systemic Pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996:131–85.
25. Standring S, Gray H, eds. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. Forty-second edition. Amsterdam: Elsevier; 2021.
26. Kay C, Abrahams S, McClain P. The weight of normal thyroid glands in children. *Arch Pathol*. 1966 Oct;82(4):349-52. PMID: 5954048.
27. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "thyroid gland". *Encyclopedia Britannica*, 16 Jan. 2023, <https://www.britannica.com/science/thyroid-gland>. Accessed 5 February 2023.
28. Mescher AL, Junqueira LCU. *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 13. ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2013.

29. Mills SE, ed. *Histology for pathologists*. Fifth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020.
30. Kendall CH, Sanderson PR, Cope J, Talbot IC. Follicular thyroid tumours: a study of laminin and type IV collagen in basement membrane and endothelium. *J Clin Pathol* 1985;38(10):1100–1105.
31. Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, et al. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 2000;89(1):202–217.
32. Baloch ZW, Livolsi V. Pathology of Thyroid Gland. In: Livolsi V, Asa SL, eds. *Endocrine pathology*: Churchill Livingstone;2002:61–88.
33. Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001;163(2):143–156.
34. Rastogi T, Devesa S, Mangtani P, Mathew A, Cooper N, Kao R, et al. Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. *Int J Epidemiol* 2008;37(1):147–160.
35. Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B, Forouhar F, Whalen G, Malchoff DM. Familial papillary thyroid carcinoma is genetically distinct from familial adenomatous polyposis coli. *Thyroid* 1999;9(3):247–252.
36. Furukawa K, Preston D, Funamoto S, Yonehara S, Ito M, Tokuoka S, et al. Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. *Int J Cancer* 2013;132(5):1222–1226.
37. Nikiforov YE. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol* 2006;17(4):307–317.
38. Bhatti P, Veiga LHS, Ronckers CM, Sigurdson AJ, Stovall M, Smith SA, et al. Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: an update from the childhood cancer survivor study. *Radiat Res* 2010;174(6):741–752.
39. LiVolsi VA, Asa SL. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* 1994;4(2):233–236.
40. Dal Maso L, Bosetti C, La Vecchia C, Franceschi S. Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer Causes Control* 2009;20(1):75–86.
41. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol* 2022;33(1):27–63.
42. Chudley AE. History of genetics through philately--Carl Linnaeus (Carl von Linné). *Clin Genet* 2001;60(2):104–106.
43. Ambrose CT. Carolus Linnaeus (Carl von Linné), 1707-1778: the Swede who named almost everything. *Pharos Alpha Omega Alpha Honor Med Soc* 2010;73(2):4–10.
44. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(10):569–580.
45. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017;67(2):93–99.
46. Albores-Saavedra JA, Krueger JE. C-cell hyperplasia and medullary thyroid microcarcinoma. *Endocr Pathol* 2001;12(4):365–377.
47. Perry A, Molberg K, Albores-Saavedra J. Physiologic versus neoplastic C-cell hyperplasia of the thyroid: separation of distinct histologic and biologic entities. *Cancer* 1996;77(4):750–756.
48. Guyétant S, Josselin N, Savagner F, Rohmer V, Michalak S, Saint-André J-P. C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma: clinicopathological and genetic correlations in 66 consecutive patients. *Mod Pathol* 2003;16(8):756–763.
49. Horn RC. Carcinoma of the thyroid. Description of a distinctive morphological variant and report of seven cases. *Cancer* 1951;4(4):697–707.
50. Hazard JB, Hawk WA, Crile G. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* 1959;19(1):152–161.
51. Williams ED. Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Pathol* 1966;19(2):114–118.
52. Bussolati G, Pearse AG. Immunofluorescent localization of calcitonin in the “C” cells of pig and dog thyroid. *J Endocrinol* 1967;37(2):205–209.
53. Tashjian AH, Melvin EW. Medullary carcinoma of the thyroid gland. Studies of thyrocalcitonin in plasma and tumor extracts. *N Engl J Med* 1968;279(6):279–283.
54. Melvin KE, Miller HH, Tashjian AH. Early diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland by means of calcitonin assay. *N Engl J Med* 1971;285(20):1115–1120.
55. de Lellis RA, Wolfe HJ. The pathobiology of the human calcitonin (C)-cell: a review. *Pathol Annu* 1981;16(Pt 2):25–52.

56. Pacini F, Fontanelli M, Fugazzola L, Elisei R, Romei C, Di Coscio G, et al. Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(4):826–829.
57. DeLellis RA. Multiple endocrine neoplasia syndromes revisited. Clinical, morphologic, and molecular features. *Lab Invest* 1995;72(5):494–505.
58. Matias-Guiu X, DeLellis RA, Moley JF et al. (2017) Medullary thyroid carcinoma. In: R.A. DeLellis, R.V. Lloyd, P.U. Heitz and C. Eng (Ed.) Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. WHO Classification of Tumours (pp. 86–91) IARC Press, Lyon.
59. Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000;88(5):1139–1148.
60. Barbosa SL-S, Rodien P, Leboulleux S, Niccoli-Sire P, Kraimps J-L, Caron P, et al. Ectopic adrenocorticotrophic hormone-syndrome in medullary carcinoma of the thyroid: a retrospective analysis and review of the literature. *Thyroid* 2005;15(6):618–623.
61. Gagel RF, Tashjian AH, Cummings T, Papanthanasopoulos N, Kaplan MM, DeLellis RA, et al. The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2a. An 18-year experience. *N Engl J Med* 1988;318(8):478–484.
62. Verga U, Fugazzola L, Cambiaghi S, Pritelli C, Alessi E, Cortelazzi D, et al. Frequent association between MEN 2A and cutaneous lichen amyloidosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59(2):156–161.
63. Verdy M, Weber AM, Roy CC, Morin CL, Cadotte M, Brochu P. Hirschsprung's disease in a family with multiple endocrine neoplasia type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982;1(4):603–607.
64. DeLellis RA, Wolfe HJ, Gagel RF, Feldman ZT, Miller HH, Gang DL, et al. Adrenal medullary hyperplasia. A morphometric analysis in patients with familial medullary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 1976;83(1):177–196.
65. Carney JA, Sizemore GW, Tyce GM. Bilateral adrenal medullary hyperplasia in multiple endocrine neoplasia, type 2: the precursor of bilateral pheochromocytoma. *Mayo Clin Proc* 1975;50(1):3–10.
66. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995;267(5196):381–383.
67. Carney JA, Sizemore GW, Hayles AB. Multiple endocrine neoplasia, type 2b. *Pathobiol Annu* 1978;8:105–153.
68. Fardon JR, Leight GS, Dille WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS, et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg* 1986;73(4):278–281.
69. Elisei R, Romei C, Cosci B, Agate L, Bottici V, Molinaro E, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(12):4725–4729.
70. Zaatari GS, Saigo PE, Huvos AG. Mucin production in medullary carcinoma of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107(2):70–74.
71. Sletten K, Westermark P, Natvig JB. Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J Exp Med* 1976;143(4):993–998.
72. Khurana R, Agarwal A, Bajpai VK, Verma N, Sharma AK, Gupta RP, et al. Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2004;145(12):5465–5470.
73. Kini SR. *Thyroid cytopathology: an atlas and text*. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
74. DeLellis RA, Nunnemacher G, Wolfe HJ. C-cell hyperplasia. An ultrastructural analysis. *Lab Invest* 1977;36(3):237–248.
75. Hales M, Rosenau W, Okerlund MD, Galante M. Carcinoma of the thyroid with a mixed medullary and follicular pattern: morphologic, immunohistochemical, and clinical laboratory studies. *Cancer* 1982;50(7):1352–1359.
76. LiVolsi VA. Mixed thyroid carcinoma: a real entity? *Lab Invest* 1987;57(3):237–239.
77. Papotti M, Negro F, Carney JA, Bussolati G, Lloyd RV. Mixed medullary-follicular carcinoma of the thyroid. A morphological, immunohistochemical and in situ hybridization analysis of 11 cases. *Virchows Arch* 1997;430(5):397–405.
78. Katoh R, Jasani B, Williams ED. Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid. A report of three cases with immunohistochemical and ultrastructural studies. *Histopathology* 1989;15(3):211–224.
79. Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J. Poorly differentiated (“insular”) thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans’ “wuchernde Struma.” *Am J Surg Pathol* 1984;8(9):655–668.

80. Albores-Saavedra J, Gorraez de la Mora T, de la Torre-Rendon F, Gould E. Mixed medullary-papillary carcinoma of the thyroid: a previously unrecognized variant of thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 1990;21(11):1151–1155.
81. Volante M, Papotti M, Roth J, Saremaslani P, Speel EJ, Lloyd RV, et al. Mixed medullary-follicular thyroid carcinoma. Molecular evidence for a dual origin of tumor components. *Am J Pathol* 1999;155(5):1499–1509.
82. Matias-Guiu X. Mixed medullary and follicular carcinoma of the thyroid. On the search for its histogenesis. *Am J Pathol* 1999;155(5):1413–1418.
83. Papotti M, Volante M, Komminoth P, Sobrinho-Simões M, Bussolati G. Thyroid carcinomas with mixed follicular and C-cell differentiation patterns. *Semin Diagn Pathol* 2000;17(2):109–119.
84. Bejarano PA, Nikiforov YE, Swenson ES, Biddinger PW. Thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in thyroid neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(3):189–194.
85. Katsetos CD, Jami MM, Krishna L, Jackson R, Patchefsky AS, Cooper HS. Novel immunohistochemical localization of 28,000 molecular-weight (Mr) calcium binding protein (calbindin-D28k) in enterochromaffin cells of the human appendix and neuroendocrine tumors (carcinoids and small-cell carcinomas) of the midgut and foregut. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118(6):633–639.
86. Scopsi L, Ferrari C, Pilotti S, Holst JJ, Rehfeld JF, Fossati G, et al. Immunocytochemical localization and identification of prosomatostatin gene products in medullary carcinoma of human thyroid gland. *Hum Pathol* 1990;21(8):820–830.
87. Sunday ME, Wolfe HJ, Roos BA, Chin WW, Spindel ER. Gastrin-releasing peptide gene expression in developing, hyperplastic, and neoplastic human thyroid C-cells. *Endocrinology* 1988;122(4):1551–1558.
88. Roth KA, Bensch KG, Hoffman AR. Characterization of opioid peptides in human thyroid medullary carcinoma. *Cancer* 1987;59(9):1594–1598.
89. Uribe M, Fenoglio-Preiser CM, Grimes M, Feind C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. Clinical, pathological, and immunohistochemical features with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1985;9(8):577–594.
90. Faggiano A, Talbot M, Lacroix L, Bidart JM, Baudin E, Schlumberger M, et al. Differential expression of galectin-3 in medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(6):813–819.
91. Mendelsohn G, Wells SA, Baylin SB. Relationship of tissue carcinoembryonic antigen and calcitonin to tumor virulence in medullary thyroid carcinoma. An immunohistochemical study in early, localized, and virulent disseminated stages of disease. *Cancer* 1984;54(4):657–662.
92. Mizukami Y, Kurumaya H, Nonomura A, Michigishi T, Terahata S, Noguchi M, et al. Sporadic medullary microcarcinoma of the thyroid. *Histopathology* 1992;21(4):375–377.
93. Matias-Guiu X, LaGuetta J, Puras-Gil AM, Rosai J. Metastatic neuroendocrine tumors to the thyroid gland mimicking medullary carcinoma: a pathologic and immunohistochemical study of six cases. *Am J Surg Pathol* 1997;21(7):754–762.
94. Shikama Y, Osawa T, Yagihashi N, Kurotaki H, Yagihashi S. Neuroendocrine differentiation in hyalinizing trabecular tumor of the thyroid. *Virchows Arch* 2003;443(6):792–796.
95. Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI, et al. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* 1987;328(6130):527–528.
96. Sobol H, Narod SA, Nakamura Y, Boneu A, Calmettes C, Chadenas D, et al. Screening for multiple endocrine neoplasia type 2a with DNA-polymorphism analysis. *N Engl J Med* 1989;321(15):996–1001.
97. Gardner E, Papi L, Easton DF, Cummings T, Jackson CE, Kaplan M, et al. Genetic linkage studies map the multiple endocrine neoplasia type 2 loci to a small interval on chromosome 10q11.2. *Hum Mol Genet* 1993;2(3):241–246.
98. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 1993;119(4):1005–1017.
99. Barletta JA, Nosé V, Sadow PM. Genomics and Epigenomics of Medullary Thyroid Carcinoma: From Sporadic Disease to Familial Manifestations. *Endocr Pathol* 2021;32(1):35–43.
100. Wells SA, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015;25(6):567–610.
101. Kawai K, Iwashita T, Murakami H, Hiraiwa N, Yoshiki A, Kusakabe M, et al. Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Cancer Res* 2000;60(18):5254–5260.
102. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(1):380–393.

- 103.Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 2005;15(6):531–544.
- 104.Saggiorato E, Rapa I, Garino F, Bussolati G, Orlandi F, Papotti M, et al. Absence of RET gene point mutations in sporadic thyroid C-cell hyperplasia. *J Mol Diagn* 2007;9(2):214–219.
- 105.Komminoth P, Roth J, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Seelentag WK, Heitz PU. RET proto-oncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(6):2041–2046.
- 106.Eng C, Mulligan LM. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. *Hum Mutat* 1997;9(2):97–109.
- 107.Wells SA, Chi DD, Toshima K, Dehner LP, Coffin CM, Dowton SB, et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994;220(3):237–247; discussion 247-250.
- 108.Moses LE, Oliver JR, Rotsides JM, Shao Q, Patel KN, Morris LGT, et al. Nodal disease burden and outcome of medullary thyroid carcinoma. *Head Neck* 2021;43(2):577–584.
- 109.Park H, Park SY, Park J, Choe JH, Chung MK, Woo S-Y, et al. Prognostic Value of Preoperative Serum Calcitonin Levels for Predicting the Recurrence of Medullary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:749973.
- 110.Schröder S, Böcker W, Baisch H, Bürk CG, Arps H, Meiners I, et al. Prognostic factors in medullary thyroid carcinomas. Survival in relation to age, sex, stage, histology, immunocytochemistry, and DNA content. *Cancer* 1988;61(4):806–816.
- 111.Al-Qurayshi Z, Khadra H, Chang K, Pagedar N, Randolph GW, Kandil E. Risk and survival of patients with medullary thyroid cancer: National perspective. *Oral Oncol* 2018;83:59–63.
- 112.Leboulleux S, Travagli JP, Caillou B, Laplanche A, Bidart JM, Schlumberger M, et al. Medullary thyroid carcinoma as part of a multiple endocrine neoplasia type 2B syndrome: influence of the stage on the clinical course. *Cancer* 2002;94(1):44–50.
- 113.Koperek O, Scheuba C, Cherenko M, Neuhold N, De Micco C, Schmid KW, et al. Desmoplasia in medullary thyroid carcinoma: a reliable indicator of metastatic potential. *Histopathology* 2008;52(5):623–630.
- 114.Scheuba C, Kaserer K, Kaczirek K, Asari R, Niederle B. Desmoplastic stromal reaction in medullary thyroid cancer-an intraoperative “marker” for lymph node metastases. *World J Surg* 2006;30(5):853–859.
- 115.Barbet J, Champion L, Kraeber-Bodéré F, Chatal J-F, GTE Study Group. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6077–6084.
- 116.Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(3):682–687.
- 117.Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(5):E863-868.
- 118.Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A, Broutin S, Dupuy C, Leboulleux S, et al. Somatic RAS mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a previously unidentified exon. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(10):E2031-2035.
- 119.Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010;20(8):863–871.
- 120.Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985;42(2):581–588.
- 121.Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988;3(5):571–578.
- 122.Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* 1995;11(10):2039–2045.
- 123.Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(4):361–373.
- 124.de Graaff E, Srinivas S, Kilkenny C, D'Agati V, Mankoo BS, Costantini F, et al. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev* 2001;15(18):2433–2444.
- 125.Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 1998;21(6):1291–1302.

126. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, et al. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 1989;4(12):1519–1521.
127. Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* 1989;4(6):805–806.
128. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363(6428):458–460.
129. Kato S, Subbiah V, Marchlik E, Elkin SK, Carter JL, Kurzrock R. RET Aberrations in Diverse Cancers: Next-Generation Sequencing of 4,871 Patients. *Clin Cancer Res* 2017;23(8):1988–1997.
130. Pierce BA. *Genetics: a conceptual approach*. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
131. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54(18):4855–4878.
132. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 2005;6(10):729–742.
133. (Internet). Erişim 04.03.2023, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mutation>.
134. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171(4356):737–738.
135. Sanger F. The free amino groups of insulin. *Biochem J* 1945;39(5):507–515.
136. Wu R, Kaiser AD. Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 1968;35(3):523–537.
137. Brownlee GG, Sanger F, Barrell BG. The sequence of 5 s ribosomal ribonucleic acid. *J Mol Biol* 1968;34(3):379–412.
138. Min Jou W, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature* 1972;237(5350):82–88.
139. Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac operator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70(12):3581–3584.
140. Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, et al. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 1976;260(5551):500–507.
141. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977;265(5596):687–695.
142. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94(3):441–448.
143. Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E. Fully automated nucleic acid extraction: MagNA Pure LC. *Clin Chem* 2001;47(6):1124–1126.
144. Fiebelkorn KR, Lee BG, Hill CE, Caliendo AM, Nolte FS. Clinical evaluation of an automated nucleic acid isolation system. *Clin Chem* 2002;48(9):1613–1615.
145. Williams SM, Meadows CA, Lyon E. Automated DNA extraction for real-time PCR. *Clin Chem* 2002;48(9):1629–1630.
146. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014;30(9):418–426.
147. Alkan C, Sajjadian S, Eichler EE. Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nat Methods* 2011;8(1):61–65.
148. Korlach J, Gedman G, Kingan SB, Chin C-S, Howard JT, Audet J-N, et al. De novo PacBio long-read and phased avian genome assemblies correct and add to reference genes generated with intermediate and short reads. *Gigascience* 2017;6(10):1–16.
149. de Koning APJ, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet* 2011;7(12):e1002384.
150. Miga KH, Koren S, Rhie A, Vollger MR, Gershman A, Bzikadze A, et al. Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature* 2020;585(7823):79–84.
151. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc* 2010;2010(6):pdb.prot5448.
152. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem* 2015;61(1):124–135.
153. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med* 2020;9(1):132.
154. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19(1):4–23.

- 155.Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques* 2014;56(2):61–77.
- 156.Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 2015;13(5):278–289.
- 157.Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol* 2021;82(11):812–819.
- 158.Sakharkar MK, Chow VTK, Kanguane P. Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* 2004;4(4):387–393.
- 159.Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141(11):1544–1557.
- 160.Tetreault M, Bareke E, Nadaf J, Alirezaie N, Majewski J. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15(6):749–760.
- 161.Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998;8(3):175–185.
- 162.Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19(3):341–365.
- 163.Zhou Q, Su X, Ning K. Assessment of quality control approaches for metagenomic data analysis. *Sci Rep* 2014;4:6957.
- 164.Xu B, Fuchs TL, Ahmadi S, Alghamdi M, Alzumaili B, Bani M-A, et al. International Medullary Thyroid Carcinoma Grading System: A Validated Grading System for Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Oncol* 2022;40(1):96–104.
- 165.Koperek O, Scheuba C, Puri C, Birner P, Haslinger C, Rettig W, et al. Molecular characterization of the desmoplastic tumor stroma in medullary thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2007;31(1):59–67.
- 166.Albores-Saavedra J, Rose GG, Ibanez ML, Russell WO, Grey CE, Dmochowski L. THE AMYLOID IN SOLID CARCINOMA OF THE THYROID GLAND. STAINING CHARACTERISTICS, TISSUE CULTURE, AND ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS. *Lab Invest* 1964;13:77–93.
167. (Internet). Erişim 04.03.2023, https://documents.cap.org/protocols/Thyroid_4.3.0.0.REL_CAPCP.pdf.
168. (Internet). Erişim 04.03.2023, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
169. (Internet). Erişim 04.03.2023, <https://karchinlab.github.io/CHASMplus>.
- 170.Tokheim C, Karchin R. CHASMplus Reveals the Scope of Somatic Missense Mutations Driving Human Cancers. *Cell Syst* 2019;9(1):9–23.e8.
- 171.Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettgowda C, Roberts NJ, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(2):E364–369.
- 172.Aydoğan Bİ, Yüksel B, Tuna MM, Navdar Başaran M, Akkurt Kocaeli A, Ertörer ME, et al. Distribution of RET Mutations and Evaluation of Treatment Approaches in Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma in Turkey. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2016;8(1):13–20.
- 173.Heilmann AM, Subbiah V, Wang K, Sun JX, Elvin JA, Chmielecki J, et al. Comprehensive Genomic Profiling of Clinically Advanced Medullary Thyroid Carcinoma. *Oncology* 2016;90(6):339–346.
- 174.Wei S, LiVolsi VA, Montone KT, Morrissette JJD, Baloch ZW. Detection of Molecular Alterations in Medullary Thyroid Carcinoma Using Next-Generation Sequencing: an Institutional Experience. *Endocr Pathol* 2016;27(4):359–362.
- 175.Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(11):E1852–1860.
- 176.Simbolo M, Mian C, Barollo S, Fassan M, Mafficini A, Neves D, et al. High-throughput mutation profiling improves diagnostic stratification of sporadic medullary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2014;465(1):73–78.
- 177.Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2008;284(1–2):21–27.
- 178.Diwaker C, Sarathi V, Jaiswal SK, Shah R, Deshmukh A, Thomas AE, et al. Hereditary medullary thyroid carcinoma syndromes: experience from western India. *Fam Cancer* 2021;20(3):241–251.
- 179.Qu N, Shi X, Zhao J-J, Guan H, Zhang T-T, Wen S-S, et al. Genomic and Transcriptomic Characterization of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2020;30(7):1025–1036.

- 180.Kaserer K, Scheuba C, Neuhold N, Weinhäusel A, Haas OA, Vierhapper H, et al. Sporadic versus familial medullary thyroid microcarcinoma: a histopathologic study of 50 consecutive patients. *Am J Surg Pathol* 2001;25(10):1245–1251.
- 181.Miccoli P, Minuto MN, Ugolini C, Molinaro E, Basolo F, Berti P, et al. Clinically unpredictable prognostic factors in the outcome of medullary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(4):1099–1105.
- 182.Contarino A, Dolci A, Maggioni M, Porta FM, Lopez G, Verga U, et al. Is Encapsulated Medullary Thyroid Carcinoma Associated With a Better Prognosis? A Case Series and a Review of the Literature. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:866572.
- 183.Essig GF, Porter K, Schneider D, Arpaia D, Lindsey SC, Busonero G, et al. Multifocality in Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma: An International Multicenter Study. *Thyroid* 2016;26(11):1563–1572.
- 184.Papotti M, Sambataro D, Pecchioni C, Bussolati G. The Pathology of Medullary Carcinoma of the Thyroid: Review of the Literature and Personal Experience on 62 Cases. *Endocr Pathol* 1996;7(1):1–20.
- 185.Wang YX, Yang SJ. Spindle cell variant of medullary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of four cases. *Diagn Pathol* 2021;16(1):112.
- 186.Virchow R. Cellular pathology: Lecture VIII. Blood and lymph. *CA Cancer J Clin* 1975;25(2):93–97.
- 187.van Rijswijk MH, Donker AJ, Ruinen L, Marrink J. Treatment of renal amyloidosis with dimethylsulphoxide (DMSO). *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1979;16:500–505.
- 188.Cakir M, Grossman AB. Medullary thyroid cancer: molecular biology and novel molecular therapies. *Neuroendocrinology* 2009;90(4):323–348.
- 189.Lin H, Chen M-C, Chiu C-Y, Song Y-M, Lin S-Y. Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells. *J Biol Chem* 2007;282(5):2776–2784.
- 190.Pinto A, Nosé V. Localized amyloid in thyroid: are we missing it? *Adv Anat Pathol* 2013;20(1):61–67.
- 191.Pyke CM, Hay ID, Goellner JR, Bergstralh EJ, van Heerden JA, Grant CS. Prognostic significance of calcitonin immunoreactivity, amyloid staining, and flow cytometric DNA measurements in medullary thyroid carcinoma. *Surgery* 1991;110(6):964–970; discussion 970-971.
- 192.Saglietti C, La Rosa S, Sykietis GP, Letovanec I, Bulliard J-L, Piana S, et al. Expression of Prox1 in Medullary Thyroid Carcinoma Is Associated with Chromogranin A and Calcitonin Expression and with Ki67 Proliferative Index, but Not with Prognosis. *Endocr Pathol* 2019;30(2):138–145.
- 193.Ma S, Wang H, Li W, Yan Z, Luo X, Lu P. The correlation between the expression of ATF4 and procalcitonin combined with the detection of *RET* mutation and the pathological stage and clinical prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2022;100(1):19–25.
- 194.Jin LX, Moley JF. Surgery for lymph node metastases of medullary thyroid carcinoma: A review. *Cancer* 2016;122(3):358–366.
- 195.Polistena A, Sanguinetti A, Lucchini R, Galasse S, Monacelli M, Avenia S, et al. Timing and extension of lymphadenectomy in medullary thyroid carcinoma: A case series from a single institution. *Int J Surg* 2017;41 Suppl 1:S70–S74.
- 196.Saad MF, Ordonez NG, Rashid RK, Guido JJ, Hill CS, Hickey RC, et al. Medullary carcinoma of the thyroid. A study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine (Baltimore)* 1984;63(6):319–342.
- 197.Gharib H, McConahey WM, Tieggs RD, Bergstralh EJ, Goellner JR, Grant CS, et al. Medullary thyroid carcinoma: clinicopathologic features and long-term follow-up of 65 patients treated during 1946 through 1970. *Mayo Clin Proc* 1992;67(10):934–940.
- 198.Hyer SL, Vini L, A'Hern R, Harmer C. Medullary thyroid cancer: multivariate analysis of prognostic factors influencing survival. *Eur J Surg Oncol* 2000;26(7):686–690.
- 199.Nilubol N, Zhang L, Kebebew E. Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid* 2013;23(6):695–702.
- 200.Zhou T-H, Zhao L-Q, Zhang Y, Wu F, Lu K-N, Mao L-L, et al. The Prediction of Metastases of Lateral Cervical Lymph Node in Medullary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:741289.
- 201.Oh H-S, Kwon H, Song E, Jeon MJ, Song DE, Kim TY, et al. Preoperative Clinical and Sonographic Predictors for Lateral Cervical Lymph Node Metastases in Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2018;28(3):362–368.
- 202.Edge SB, American Joint Committee on Cancer, eds. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
- 203.Najdawi F, Ahmadi S, Capelletti M, Dong F, Chau NG, Barletta JA. Evaluation of grade in a genotyped cohort of sporadic medullary thyroid carcinomas. *Histopathology* 2021;79(3):427–436.

204. Le M-K, Kawai M, Odate T, Vuong HG, Oishi N, Kondo T. Metastatic Risk Stratification of 2526 Medullary Thyroid Carcinoma Patients: A Study Based on Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Endocr Pathol* 2022;33(3):348–358.
205. Cupisti K, Wolf A, Raffel A, Schott M, Miersch D, Yang Q, et al. Long-term clinical and biochemical follow-up in medullary thyroid carcinoma: a single institution's experience over 20 years. *Ann Surg* 2007;246(5):815–821.
206. de Groot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27(5):535–560.
207. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun* 2014;5:4846.
208. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roehrer H-D, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003;349(16):1517–1525.
209. Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PMF, Seamons R, Calderon FRO, Wittwer CT, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Hum Mutat* 2009;30(4):548–556.
210. Altaykan A, Ersoy-Evans S, Emre S, Orhan D, Güçer S, Erkin G. Multiple endocrine neoplasia type 2b associated with lichen nitidus. *Eur J Dermatol* 2007;17(4):292–294.
211. Erdogan MF, Gürsoy A, Ozgen G, Cakir M, Bayram F, Ersoy R, et al. Ret proto-oncogene mutations in apparently sporadic Turkish medullary thyroid carcinoma patients: Turkmen study. *J Endocrinol Invest* 2005;28(9):806–809.
212. Romei C, Ugolini C, Cosci B, Torregrossa L, Vivaldi A, Ciampi R, et al. Low prevalence of the somatic M918T RET mutation in micro-medullary thyroid cancer. *Thyroid* 2012;22(5):476–481.
213. Rodríguez-Antona C, Pallares J, Montero-Conde C, Inglada-Pérez L, Castelblanco E, Landa I, et al. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr Relat Cancer* 2010;17(1):7–16.
214. Verrienti A, Tallini G, Colato C, Boichard A, Checquolo S, Pecce V, et al. RET mutation and increased angiogenesis in medullary thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(8):665–676.
215. Kann BH, Hosny A, Aerts HJWL. Artificial intelligence for clinical oncology. *Cancer Cell* 2021;39(7):916–927.
216. Maliszewska A, Leandro-Garcia LJ, Castelblanco E, Macià A, de Cubas A, Gómez-López G, et al. Differential gene expression of medullary thyroid carcinoma reveals specific markers associated with genetic conditions. *Am J Pathol* 2013;182(2):350–362.
217. Karunamurthy A, Panebianco F, J Hsiao S, Vorhauer J, Nikiforova MN, Chiosea S, et al. Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(4):295–301.
218. Simões-Pereira J, Moura MM, Marques IJ, Rito M, Cabrera RA, Leite V, et al. The role of EIF1AX in thyroid cancer tumourigenesis and progression. *J Endocrinol Invest* 2019;42(3):313–318.
219. Karslioglu French E, Nikitski AV, Yip L, Nikiforova MN, Nikiforov YE, Carty SE. Clinicopathological features and outcomes of thyroid nodules with EIF1AX mutations. *Endocr Relat Cancer* 2022;29(8):467–473.
220. Hinnebusch AG. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75(3):434–467, first page of table of contents.
221. Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res* 2015;5(4):1281–1294.

EK

Etik Kurul Onayı

BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sporadik Medüller Tiroid Karsinomlarında Yeni Nesil Dizileme (NGS) Yöntemiyle Moleküler Değişimlerin Tespiti ve Klinikopatolojik Parametreler İle Kolerasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2019/300

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08.07.2019	00	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	08.07.2019	00	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU	08.07.2019	00	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	49.950 TL Araştırma Bütçesi BAP Başvurulacaktır.				
	BİYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER	<input type="checkbox"/>					
KARAR BELGELERİ	Karar No: 2019-14 -	Tarih: 22.07.2019					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirlenen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tamsayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Uz.Dr.Gülsüm Oya Hergünel

Urvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Sınıfı		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Uz.Dr.Gülsüm Oya HERGÜNEL	Anestezi ve Reanimasyon	BEAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Sadık Sami HATİPOĞLU	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	BEAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Meltem Vural	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	BEAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Asuman GEDİKBAŞI	Biyokimya	I.O.İst. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ufuk EMERLİ	Plastik, Rek. Ve Estetik Cerrahi	I.O.İst. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Gülay ÖZGÖN	Farmakolog	Nesiller Genetik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Kaya Sami NİZAMOĞLU	Halk Sağlığı	İst. Sağ. Müd.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Emre Şahin	Biyomedikal Mühendisliği	İst. Sağ. Müd.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Özkan TÜM	Hukuk	İst. Sağ. Müd.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Cengiz KEZİLABDULLAH	Sivil Vamandaş	Diyadin Sağlık Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Uz.Dr.Gülsüm Oya Hergünel
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.