

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
SİTOPATOLOJİ BİLİM DALI

"ÖNEMİ BELİRSİZ ATİPİ/ÖNEMİ BELİRSİZ FOLİKÜLER LEZYON"
"FOLİKÜLER NEOPLAZİ/FOLİKÜLER NEOPLAZİ KUŞKUSU"
"MALİGNİTE KUŞKUSU" TANILI
TİROİD İNCE İĞNE ASPİRASYON MATERYALLERİNDE
MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME VE BRAF VE NRAS MUTASYON ANALİZİ
(2009-2010 Yılları Arasındaki Olgular Üzerinde Retrospektif Çalışma)

YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. Gülay AYDOĞDU

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Pınar FIRAT

İSTANBUL, EKİM 2013



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
SİTOPATOLOJİ BİLİM DALI

"ÖNEMİ BELİRSİZ ATİPİ/ÖNEMİ BELİRSİZ FOLİKÜLER LEZYON"
"FOLİKÜLER NEOPLAZİ/FOLİKÜLER NEOPLAZİ KUŞKUSU"
"MALİGNİTE KUŞKUSU" TANILI
TİROİD İNCE İĞNE ASPIRASYON MATERYALLERİNDE
MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME VE BRAF VE NRAS MUTASYON ANALİZİ
(2009-2010 Yılları Arasındaki Olgular Üzerinde Retrospektif Çalışma)

YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. Gülay AYDOĞDU

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Pınar FIRAT

İSTANBUL, EKİM 2013

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No:32111.

İ.Ü Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık, yan dal uzmanlık eğitimime bilgi ve tecrübeleriyle yön veren, bu süreçte karşılaştığım her türlü sıkıntıyı destek, güven ve motivasyonu sayesinde aştığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Patoloji Anabilim Dalı ve Sitopatoloji Bilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Dilek Yılmazbayhan başta olmak üzere Sn. Prof. Dr. Mehmet Ağan'a, Sn. Prof. Dr. Rıdvan İlhan'a, Sn. Prof. Dr. Işın Kılıçaslan'a, Sn. Prof. Dr. Bilge Bilgiç'e, Sn. Prof. Dr. Nesimi Büyükbabani'ye, Sn. Prof. Dr. Öner Doğan'a, Sn. Prof. Dr. Ekrem Yavuz'a, Sn. Prof. Dr. Yersu Kapran'a, Sn. Doç. Dr. Mine Güllüoğlu'na, yan dal uzmanlık eğitimi ve tez çalışmam boyunca manevi desteğiyle hep yanımda olan tüm içtenliğiyle deneyimlerini aktaran, hocam ve tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Pınar Fırat'a, Sn. Doç. Dr. Yasemin Özlük ve uzmanlık eğitimine birlikte devam ettiğim yol arkadaşlarım Dr. Davut Şahin, Dr. Dilek Ece ve tüm doktor arkadaşlarıma, istatistiksel değerlendirmeleri nezaket ve sabırla gerçekleştiren Sn. Prof. Dr. Nurhan İnce'ye, çalışmamın teknik aşamalarında beni yalnız bırakmayan Sn. Julide Hoccoğlu'na, Sn. Hilal Yılmaz'a, Sn. Serdar Aday'a, Sn. Balabey Kalaçay'a, Sn. Necati Üzümlü'ne ve tüm patoloji çalışanlarına, sonsuz destek ve sevgileriyle hep yanımda olan aileme ve eşime...

teşekkür ederim...

II

KISALTMALAR

İİA: İnce iğne aspirasyonu

BRAF: B-type Raf kinase

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

MPBFT: Malignite potansiyeli belirsiz foliküler tümör

MPBİDT: Malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör

AUS/FLUS: Önemi belirsiz atipi veya önemi belirsiz foliküler lezyon

FN/FNK: Foliküler neoplazi veya foliküler neoplazi kuşkusu

MK: Malignite kuşkusu

PPD: Pozitif prediktif değer

NPD: Negatif prediktif değer

TD: Tanı doğruluğu

MNG: Multinodüler guatr

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MEK: Mitogen extracellular kinase

RBD: RAS bağlayıcı domain

PCR: Polimerase Chain Reaction

PK: Papiller karsinom

Med.K: Medüller karsinom

FVPK: Foliküler varyant papiller karsinom

III

İÇİNDEKİLER

I- ÖZET ve ABSTRACT.....	1
II- GİRİŞ.....	5
III- GENEL BİLGİLER.....	6
A- Tiroid Tümörleri.....	6
1. Epidemiyoloji.....	6
2. Patogenez.....	6
3. Histopatolojik Sınıflandırma.....	8
a. Papiller Karsinom.....	9
b. Foliküler Karsinom.....	11
c. Medüller Karsinom.....	12
d. Anaplastik Karsinom.....	12
B- Tiroid Tümörlerinin Tanısında İnce İğne Aspirasyon Sitolojisi.....	13
1. İnce İğne Aspirasyon Sitolojisinin Tanıdaki Yeri.....	13
2. Tiroid İnce İğne Aspirasyonlarının Raporlanması ve Bethesda Sistemi.....	15
3- Bethesda Sistemi'nde Tanımlanan Tanı Kategorilerine Ait Sitomorfolojik Özellikler...	18
C- Tiroid Karsinomlarında Belirlenen Moleküler Değişiklikler.....	20
1. BRAF Mutasyonları.....	24
2. RAS Mutasyonları.....	27
IV- GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
A- Sitomorfolojik Parametreler ve Değerlendirme Ölçütleri.....	30
B- BRAF ve NRAS Gen Mutasyon Analizi.....	32
C- Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	33
D- Ekler.....	34
V- BULGULAR.....	42
A- Demografik ve Klinik Bulgular.....	42
B- Sitolojik ve Histopatolojik Tanıların Karşılaştırılması.....	43
C- Sitomorfolojik Bulgular.....	44
D- Moleküler Analiz Sonuçları.....	54
VI- TARTIŞMA.....	61
VII- SONUÇLAR.....	78
VIII- KAYNAKLAR.....	83

I- ÖZET

AMAÇ

Tiroid ince iğne aspirasyonlarının (İİA) değerlendirmesinde standardizasyonu sağlamak amacıyla kullanılan Bethesda Raporlama Sistemi yetersiz, benign ve malign tanı kategorileri yanı sıra %5-42 oranında, giderek artan malignite riski taşıyan, ancak kesin tanıya yönlendirmeyen önemi belirsiz atipi veya önemi belirsiz foliküler lezyon (AUS/FLUS), foliküler neoplazi veya foliküler neoplazi kuşkusu (FN/FNK) ve malignite kuşkusu (MK) olarak adlandırılan üç adet indetermine kategori içermektedir. Son yıllarda bu grupta yer alan olgu sayısını azaltmaya yönelik çalışmalar ve ek incelemeler arayışına girilmiştir. Çalışmamızda Bethesda Sistemi'nin maligniteyi öngörmedeki rolünün değerlendirilmesi, indetermine kategoride tanı alan ve izleminde malignite saptanan olgularda malignite tanısına yönelmemizi sağlayabilecek sitomorfolojik kriterlerin belirlenmesi, papiller karsinoma oldukça spesifik bir moleküler değişiklik olan BRAF ve foliküler varyant papiller karsinoma (FVPK) yönelik bir marker olan NRAS mutasyon analizleri yapılarak, tanı doğruluğunu arttırıcı yönde etkisi olup, olmadıklarının belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu amaçla, 2009-10 yılları arasında İTF Patoloji Anabilim Dalı'nda tiroid ince iğne aspirasyonu indetermine kategoride tanı alan ve tiroidektomisi bulunan 113 olgu derlendi; sitolojik örnekler tekrar değerlendirilip kategorize edildi ve 98 tiroid İİA materyali çalışmaya alındı. Olgular yaş, cinsiyet, nodül çapı ve malign tümörleri saptamada önemi olan 11 sitomorfolojik kriter yönünden incelendi. Ayrıca tiroidektomi sonucu papiller karsinom (PK) ve "malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör" (MPBİDT) tanısı alan olguların İİA materyallerine BRAF, AUS/FLUS tanılı olgulara da NRAS mutasyon analizi yapıldı.

BULGULAR

İstatistiksel değerlendirmede benign ve malign grup arasında yaş ortalamaları, cinsiyet ve nodül çapı açısından anlamlı bir ilişki mevcut değildi; malignite oranları AUS/FLUS kategorisi için %37.5, FN/FNK kategorisi için %62, MK kategorisi için %86 olarak belirlendi. Olgulara Bethesda Sistemi'ne göre verilen tanımlar ile malignite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.00$).

Papiller karsinom en sık saptanan malignite olup, olgularının büyük bir kısmını (%72) FVPK'un oluşturduğu görüldü. Değerlendirilen 11 adet sitomorfolojik kriterden 4'ü;

psödoinklüzyon ($p=0,007$), nükleer yarıklanma ($p=0,000$), üst üste yığılma ($p=0,002$) ve nükleer köşelenme ($p=0,016$) malignite ile ilişkili bulunurken, 7'si; hipokromazi, oval nükleus, nükleus boyutu, izole iri nükleus varlığı, nükleol varlığı, patern, kolloid varlığı ile malignite arasında anlamlı ilişki gözlenmedi. Ayrıca nükleer yarıklanma ve üst üste yığılmanın maligniteyi öngörmeye bağımsız risk faktörleri oldukları saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan dört parametrenin her birine '1' değeri verilerek oluşturulan skor skalasında toplam skoru sadece 1 olan olguların bile malign olma olasılığının, skoru 0 olan olgulara göre anlamlılık gösterecek derecede yüksek olduğu ($p=0,0001$), skurun 3 olması halinde en az MK (spesifisite %85), 4 olması halinde ise malign tanısı (spesifisite %97) verilebileceği belirlendi. Mikrofoliküler patern varlığı dışında hiçbir kriter FVPK ile anlamlı ilişki göstermedi.

BRAF mutasyon analizinde malign grupta yer alan olguların %10.1'inde (6/61) BRAF^{V600E} mutasyonu, NRAS mutasyon analizinde ise olguların %8'inde NRAS kodon 61 mutasyonu saptandı. FVPK'lı olgularda BRAF^{V600E} mutasyon oranı %6.9, diğer varyantlarda % 18.7, yalnızca papiller gelişim sergileyen olgular (8 klasik varyant, 1 Warthin benzeri varyant) dikkate alındığında ise %33 olduğu belirlendi. BRAF^{V600E} mutasyonu gösteren olguların tamamı (6 olgu) MK kategorisinde yer almaktaydı. BRAF mutasyonunun sitomorfolojik parametreler ile ilişkisini değerlendirmek amacı ile yaptığımız istatistiksel analizde nükleer yarıklanma ve psödoinklüzyonunun BRAF^{V600E} mutasyonunu ile anlamlı bir ilişki gösterdiği saptandı ($p=0,038$, $p=0,019$).

SONUÇ

AUS/FLUS, FN/FNK ve MK kategorileri malignite olasılığı açısından giderek artan bir risk skalası oluşturmaktadır. Psödoinklüzyon, yarıklanma, nükleer üst üste yığılma ve nükleer köşelenme malignite varlığını belirlemede öne çıkan morfolojik bulgulardır. Malignite riski açısından oldukça uyarıcı olan bu kriterler kullanılarak oluşturulacak bir skorlama sisteminin tanı doğruluğunu arttırmada faydalı olabileceği, buna karşın malignite oranları yüksek serimizde BRAF ve NRAS mutasyon analizlerinin tanıya oldukça sınırlı bir katkı sağladığı belirlenmiştir. Sitolojik özellikleri arada kalan olgularda malignite riskini öngörmeye, detaylı morfolojik değerlendirme ve Bethesda kategorizasyonun en güvenilir sonuçları verdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Tiroid, papiller karsinom, ince iğne aspirasyonu, Bethesda Sistemi, BRAF

ABSTRACT

OBJECTIVES

The Bethesda System which has been proposed to increase the standardization in reporting thyroid fine needle aspiration (FNA) cytologies describes three undetermined categories with an increasing risk of malignancy: Atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance (AUS/FLUS), follicular neoplasia/suspicious for follicular neoplasia (FN/SFN) and suspicious for malignancy (SM). The ratio of these categories ranges between 5-42% in different series. Several studies are being conducted in recent years searching for the aid of ancillary tests or looking for other parameters to decrease the number of cases diagnosed as AUS/FLUS, FN/SFN and SM by cytology. The aim of this study is to identify the role of undetermined categories of the Bethesda System in predicting the malignancy, to evaluate the morphologic criteria which are more important than the others to detect malignancy, and to determine whether BRAF and NRAS mutation analysis increase the diagnostic accuracy since BRAF mutation is a rather specific molecular alteration for papillary thyroid carcinoma (PTC) and NRAS mutation is said to be a marker for follicular variant papillary carcinoma (FVPC).

MATERIALS & METHODS

Hundred and thirteen undetermined cases diagnosed in Istanbul Faculty of Medicine Department of Pathology during the years 2009 and 2010 with a histopathological follow-up were retrieved from the archives and reevaluated. Cases with more than one aspiration and which were re-categorised as either benign, malignant or non-diagnostic were excluded from the study. Totally 98 cases were included and examined for the malignancy rates in different categories, the relation between malignancy and clinical features, the presence of 11 cytomorphological criteria, and their distribution in benign and malignant cases. BRAF mutation analysis were performed on FNA materials of all cases which were shown to be PTC or “well differentiated tumor with undetermined malignant potential” (WDT-UMP) by thyroidectomy. In addition to BRAF, also NRAS mutation analysis were done on cases with an AUS/FLUS diagnosis in cytology and PTC or WDT-UMP in thyroidectomy.

RESULTS

Malignancy rates for AUS/FLUS, FN/SFN, and SM were determined as 37.5%, 62%, and 86% respectively. There was a statistically significant correlation between Bethesda categories and malignancy ($p=0.00$). On the other hand, no statistically significant relation was detected between age, sex, nodule diameter and malignancy.

Papillary carcinoma was the most frequent malignancy, and 72% of these cases were FVPCs. Four of the 11 cytomorphological criteria were found to be significantly related to malignancy: pseudoinclusion ($p=0,007$), nuclear grooves ($p=0,000$), overlapping ($p=0,002$) and angulated nuclei ($p=0,016$). The other criteria (hypochromasia, oval nuclei, nuclear size, large isolated nuclei, nucleoli, pattern, colloid) showed no statistically significant correlation with malignancy. Nuclear grooves and overlapping were identified as independent predictive parameters for the presence of malignancy. If 1 point is given to each significant morphologic criteria to form a scoring system, even the cases with score 1 was found to carry a high malignancy risk comparing to the cases with score 0 ($p=0,0001$). When a case has score 3 it could be classified at least as SM (specificity 85%), when the score is 4 it could be categorized as malignant since the specificity is 97%. Except microfollicular pattern, none of the morphological criteria showed significant correlation with FVPC.

BRAF^{V600E} mutation was detected in 10.1% of the malignant cases, and NRAS codon 61 mutation was found in 8% of the malignant cases diagnosed as AUS/FLUS on cytology. BRAF^{V600E} mutation rate was 6.9% in FVPCs, 18.7% in all other papillary carcinoma variants, and 33% in cases showing papillary growth pattern (8 classical variants, 1 Warthin-like variant). All the cases with BRAF^{V600E} mutation has been categorized as SM. Presence of nuclear grooves and pseudoinclusions showed a statistically significant correlation with BRAF^{V600E} mutation ($p=0,038$, $p=0,019$).

CONCLUSION

AUS/FLUS, FN/SFN and SM categories of Bethesda showed an increasing risk of malignancy. The morphologic criteria significantly correlated with malignancy were inclusion, nuclear groove, overlapping and angulated nuclei. Using a scoring system composed of these criteria might be helpful in increasing the diagnostic accuracy. BRAF^{V600E} and NRAS mutation analysis identified only few malignant cases showing a very limited value. Morphologic evaluation and categorisation seems to be the most reliable method for predicting malignancy in cases with unequivocal cytologic features.

Key words: Thyroid, Papillary carcinoma, Fine needle aspiration, Bethesda System, BRAF

II- GİRİŞ

İnce iğne aspirasyon (İİA) sitolojisi tiroid nodüllerinin değerlendirmesinde standart olarak kullanılan, sensitivite ve spesifisite oranları oldukça yüksek (%83, %92) bir tanı yöntemidir (1). Aspirasyon ve preparasyon aşamasında ortaya çıkan teknik problemler ve sitomorfolojik tanı kriterlerinin net bir şekilde gözlenmediği, benign/malign ayırımının yapılamadığı olguların kaçınılmaz olarak oluşturduğu ara kategorilerin varlığı yöntemin başarısını sınırlayan en önemli faktörlerdir.

Günümüzde tiroid İİA materyallerinin değerlendirmesinde, örneklerin patologlar tarafından benzer biçimde yorumlanması ve standart terminoloji ile raporlanması ihtiyacından doğan, 6 tanı kategorisine sahip Bethesda Sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak tanı kategorilerinin 3'ünü ve aspirasyonların %5-42'sini malignite riskleri sırası ile %5-15, %15-30, %50-75 olan AUS/FLUS, FN/FNK ve MK ara kategorileri oluşturmaktadır (2).

Bölümümüzde tiroid İİA'larının raporlanmasında 2009 yılından beri Bethesda Sistemi kullanılmaktadır. Çalışmamızın ilk aşamasında Bethesda Sistemi'nin maligniteyi öngörmedeki rolünün belirlenmesi, ara kategorilerde tanı alan ve izleminde malignite saptanan olguları daha güvenle saptamak için detaylı sitolojik inceleme yapılarak, malignite tanısına yönelmemizi sağlayabilecek sitomorfolojik kriterlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Son yıllarda ara kategorilerde tanı doğruluğunu arttırabilmek amacı ile üzerinde çalışılan ek testler arasında moleküler analizler ön plana çıkmaktadır (3, 4, 5). BRAF nokta mutasyonu genel olarak papiller karsinom olgularında en sık karşılaşılan ve oldukça yüksek spesifisiteye sahip moleküler değişiklik olup, %30-70 oranında görülmektedir (6, 7). Çalışmamızın ikinci aşamasında sitolojik tanısı ara kategorilerde yer alan ve tiroidektomisi papiller karsinom tanısı alan olgulara BRAF mutasyon analizi uygulayarak, serimizde mutasyon oranını belirlenmesi ve sitolojik tanıya katkısının araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca papiller karsinomun foliküler varyant alt tipinde en sık karşılaşılan moleküler değişiklik RAS nokta mutasyonu (6) olduğundan, malignite riski en düşük, ancak sitomorfolojik kriterleri en heterojen ve klinisyenlerin takip sürecinde en çok zorlandıkları grup olan AUS/FLUS kategorisine NRAS mutasyon analizinin eklenmesi, mutasyon oranının saptanması ve tanıya olası katkısının belirlenmesi de moleküler çalışmanın diğer bölümünü oluşturmaktadır.

III- GENEL BİLGİLER

A- TİROİD TÜMÖRLERİ

1. EPİDEMİYOLOJİ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl yaklaşık 122.000 yeni tiroid kanseri olgusu tanımlanmaktadır. İnsanlarda görülen kanserlerin %1'ini oluşturan tiroid kanserleri benign tiroid tümörlerine kıyasla daha seyrek görülmekle beraber, en sık görülen endokrin malignitelerdir (8, 9, 10). 1973'ten itibaren insidansı yaklaşık %50 oranında artan tiroid kanseri, kadınlarda en hızlı, erkeklerde ise 2. en hızlı artış eğilimi gösteren kanserdir (4). Bu artışın hastalığın insidansındaki gerçek bir artıştan çok, radyolojik görüntüleme yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde, subklinik nodüllerin daha yüksek oranda saptanması sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (11).

Çoğunlukla genç ve orta yaşlı bireylerde tanı alan tiroid kanserleri, çocuklarda nadir görülür. Papiller karsinom genellikle 4-5. dekadın ilk yıllarında, foliküler ve medüller karsinom 5. dekatta, az diferansiye ve indiferansiye tipleri ise 6. dekatta tanı alır. Kadınlarda erkeklere oranla 2-4 kat daha fazla görülmesine rağmen, bu fark çocuklukta ve yaşlı bireylerde gözlenen kanserlerde ortadan kalkmaktadır (1, 8, 10, 12). Tiroid kanserlerinin %10'u 21 yaş altında görülür. Çocuklarda klinik olarak belirlenen bir tiroid nodülünün karsinom olma riski yetişkinlerden 4 kat daha fazladır (%20). Tiroid karsinomlarının en agresif formları yaşlılarda, metastaz yapmış olsalar bile en iyi prognozlu olanları ise çocuklarda görülür (1).

2. PATOGENEZ

Tiroid kanserlerinin patogenezinde çevresel, genetik ve hormonal faktörlerin rol oynadıkları düşünülmektedir. Çevresel faktörler genotoksik ve non-genotoksik olmak üzere 2 gruba ayrılır. Tiroid iyot bağımlı bir organ olduğundan, radyoaktif iyodun DNA hasarına sebep olan genotoksik etkileri ve iyot eksikliği sonucu gelişen TSH stimülasyonuna bağlı non-genotoksik etkilerine maruz kalmaktadır (1, 8).

Papiller karsinom hem eksternal radyasyon, hem de terapötik amaçla uygulanan internal radyasyon ile en yakın ilişkili tiroid kanseridir ve bu olguların çoğunda RET geni yeniden düzenlenmesi vardır (1, 8, 12, 13). Foliküler karsinomun etyolojisinde ise ön planda yetersiz iyot alımı ile genetik yatkınlık yer almaktadır (10). 1986 yılında yaşanan Çernobil nükleer kazasından sonraki 4-6 yıl içerisinde 30-100 kat artan papiller karsinom olgularının genellikle çocuklarda görülmesi en duyarlı dönemin çocukluk çağı olduğunu ortaya koymuştur. Bir yaş altı çocuklarda papiller karsinom gelişiminin rölatif riski 237, 10 yaş üzeri çocuklarda ise 6

olarak belirlenmiştir. Bu durum radyoaktif iyoda eksternal maruziyet yanı sıra inek sütü ve diğer gıdalarla alınan radyoaktif iyot etkisi ile açıklanmaya çalışılmıştır (8).

Genetik yatkınlık özellikle medüller karsinom için söz konusudur. Yaklaşık %25'i, MEN 2A ve MEN 2B sendromlarının bir komponenti olarak veya ailesel tiroid kanseri formunda ortaya çıkmaktadır. Bu olguların tamamına yakınında RET onkogeninin mutasyonu gözlenmektedir (8, 12). Genetik mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, son yıllarda medüller karsinom dışındaki tiroid karsinomlarında da (papiller, foliküler ve anaplastik karsinom) ailesel yatkınlık olabileceği belirlenmiştir (10). Familial adenomatöz polipozis'te APC geninin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları ve Cowden hastalığında (multipl hamartomatöz lezyonlar) PTEN gen değişiklikleri tiroid kanserine kalıtsal yatkınlıkla ilişkilidir (12).

Papiller karsinomunun lenfositik tiroidit ile dikkat çekici bir birlikteliği mevcuttur. Bu durum muhtemelen lenfositik tiroiditin karsinoma zemin hazırlamasından ziyade, karsinomun aktive ettiği patogenetik mekanizmalar ve otoimmün yanıt sonucu gelişmektedir. Tiroid lenfomalarının ise genellikle daha önce var olan tiroidit zemininde gelişmesine rağmen, tiroiditin papiller karsinom riskini arttırdığına dair herhangi bir veri yoktur (6, 8, 12).

Tiroid karsinomları sıklıkla kadınlarda görüldüğünden, patogenezinde hormonal faktörlerin etkili oldukları düşünülmektedir. Seks hormonları benign ve malign tiroid folikül epitel hücreleri üzerinde yer alan hormon reseptörlerine direkt olarak bağlanabilir. Gebelik de tiroid karsinomu açısından olası bir risk faktörüdür. Ancak seks hormonlarının karsinogenezdeki rolü kesin olarak ispatlanmamıştır (1, 13).

Endemik olarak diyetle iyot eksikliği bulunan bölgelerde tiroid nodülleri ve özellikle foliküler karsinom olmak üzere bazı tiroid karsinomları daha sık görülmekte, oranı %45'e kadar çıkmaktadır. Bu lezyonların insidansı iyotlu tuz kullanımı ile birlikte belirgin şekilde düşmüştür (1, 10).

3. TİROİD TÜMÖRLERİNİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMASI

Tiroid tümörleri karsinomlar, adenomlar ve ilişkili tümörler, lenfoid ve mezenkimal lezyonları içeren diğer tümörler olmak üzere üç grupta ele alınmaktadır. Tiroid karsinomları tiroidin en sık görülen malign tümörleri olup, morfolojik ve klinik olarak dört ana gruba ayrılır;

1- Papiller karsinom (%75-80), 2- Foliküler karsinom (%10-20), 3- Medüller karsinom (%5) ve 4- İndiferansiye (Anaplastik) karsinom (<%5).

Tiroid karsinomlarının çoğu folikül epitelinden gelişir, medüller karsinom ise C (parafoliküler) hücrelerinden köken alır (6, 8). Foliküler tümörlerin vücudun diğer bölümlerinde olduğu gibi benign veya malign formları mevcuttur, ancak C hücreli tümörün medüller karsinomun prekanseröz evresi olarak kabul edilen değişik dönemlerdeki C hücre hiperplazisi dışında benign formu yoktur (10). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2004) tarafından düzenlenen tiroid tümörleri sınıflaması Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Tiroid tümörlerinde DSÖ 2004 sınıflandırması (8)

Tiroid karsinomları	Tiroid adenomları ve ilişkili tümörler
• Papiller karsinom • Foliküler karsinom • Az diferansiye karsinom • İndiferansiye (anaplastik) karsinom • Skuamöz hücreli karsinom • Mukoepidermoid karsinom • Eozinofili ile birlikte seyreden sklerozan mukoepidermoid karsinom • Müsinöz karsinom • Medüller karsinom • Mikst medüller ve foliküler hücreli karsinom • Timus benzeri diferansiasyon gösteren iğsi hücreli tümör • Timus benzeri diferansiasyon gösteren karsinom	• Foliküler adenom • Hiyalinize trabeküler tümör Diğer tiroid tümörleri • Teratom • Primer lenfoma ve plazmasitom • Ektopik timoma • Anjiyosarkom • Düz kas tümörleri • Periferik sinir kılıfı tümörleri • Paraganglioma • Soliter fibröz tümör • Foliküler dendritik hücreli tümör • Langerhans hücreli histiyositozis • Sekonder tümörler

a. Papiller Karsinom

(1). Histolojik özellikler

Tiroidin foliküler hücre diferansiasyonu ve karakteristik nükleer özellikler gösteren malign epitelyal tümörü olarak tanımlanır. Karakteristik nükleer özellikleri; nükleer hipokromazi, uzunlamasına nükleer yarıklanma (groove), psödoinklüzyon, kontur düzensizliği,

iri oval nükleuslar ve nükleer üst üste yığılmadır (overlap). Yapısal olarak iyi diferansiye fibrovasküler korlar içeren dallanmalar gösteren papilla yapıları oldukça tipiktir, ancak foliküler, solid/trabeküler veya mikst paternde de olabilir. Psammom cisimleri olarak adlandırılan konsantrik lameller kalsifikasyonlar, infiltratif büyüme paterni gösteren desmoplastik stroma, lenfositik infiltrasyon, skuamöz diferansiasyon odakları gözlenebilen diğer histolojik değişikliklerdir (6, 8, 10).

(2). Sitolojik özellikler (Klasik tip ve varyantlar için)

Papillalar veya tek katlı sinsityal tabakalar halinde dağılım gösteren folikül hücrelerinde iri, oval, düzensiz, bazen molding yapan, yarıklanmalar, intranükleer psödoinklüzyonlar, tek ya da birden çok mikronükleol içeren, tozsu kromatin yapısına sahip nükleuslar, değişken miktarda kolloid, bazen psammom cisimleri, multinükleer dev hücreler, Hürthle hücre hiperplazisi ve skuamöz metaplaziler gözlenir (14, 15).

(3). Varyantlar

Papiller karsinomların önemli bir kısmı klasik varyanttan farklı yapısal ve/veya sitolojik özellikler sergiler. Tanımı gereği, varyantlar papiller karsinomun temel nükleer özelliklerine sahiptir, ancak patern, sitoplazmik özellikler ya da zemin özellikleri açısından farklılıklar gösterir (14).

(a) Foliküler varyant: Tümörün tamamı ya da tamamına yakını papiller karsinomun nükleer özelliklerine sahip hücrelerden oluşan küçük-orta boy foliküllerden meydana gelir. En sık görülen varyant olup, klasik nükleer özelliklerin fokal olduğu durumlarda ‘foliküler paternli tiroid lezyonları’ ile ayırımı sorun oluşturmaktadır (14, 16, 17).

(b) Makrofoliküler varyant: Folikül yapılarının %50’sinden fazlasının makrofoliküller halinde bulunduğu varyanttır (8). Tek katlı atipik epitelyum tabakaları ve/veya değişik boyutlarda foliküllerden oluşur. Kesin tanı için papiller karsinomun tatmin edici nükleer değişikliklerinin olması gerekir (18).

(c) Kistik varyant: Baskın olarak kistik yapıda, ince, sulu kolloid, çok sayıda makrofaj ve hipervakuollü tümör hücrelerinden oluşan düzensiz kenarlı küçük gruplar halinde bulunur, bu varyantta da kesin tanı için papiller karsinomun tatmin edici nükleer değişikliklerinin bulunması gerekir (19).

(d) Onkositik varyant: Nükleer özellikleri papiller karsinom için karakteristik olan, ancak yaygın olarak onkositik (bol granüler sitoplazmalı, poligonal) hücrelerden oluşan tümörlerdir (20).

(e) Warthin benzeri varyant: Parotis bezinin Warthin tümörüne benzeyen iyi sınırlı, papiller yapılar yapan ve lenfoid foliküller içeren tiroid tümörüdür. Papiller karsinomun nükleer özelliklerini taşıyan hücreler onkositiktir, papillalar ve dağınık hücreler halinde bulunur. Zeminde lenfoplazmasitik hücreler bulunur, lenfositler fibrovasküler korları infiltr ederler ve tümör hücrelerinin yakınında yer alırlar (21).

(f) Uzun hücreli (Tall cell) varyant: Uzunlukları, genişliklerinin en az üç katı olan, sitoplazmaları geniş, yoğun ve granüler, nükleusları papiller karsinom özellikleri taşıyan, papiller fragmanlar halinde dağılım gösteren hücrelerden oluşur. Multipl intranükleer psödoinklüzyonlar (sabun köpüğü görünümü) görülebilir. Bu tanının verilebilmesi için karakteristik hücrelerin tümörün en az %50'sini oluşturması gerekir (22).

(g) Kolumnar hücreli varyant: Sellüler yaymalarda papillalar, kümeler ve ince tabakalar, bazen de küçük tübüller şeklinde dağılım gösteren, papiller karsinomun karakteristik nükleer özelliklerini bulunduran elonge ve çok katlı hücreler gözlenir. Kromatin soluk değil, daha koyudur, kolloid genellikle görülmez, yarıklanma ve inklüzyonlar daha az dikkat çekicidir. (22).

(h) Hiyalinize Trabeküler Tümör: Folikül hücresinden köken alan, trabeküler büyüme, belirgin intratrabeküler hiyalinizasyon ve papiller karsinomun nükleer özelliklerini gösteren nadir bir tümördür. Yaymalarda amiloid benzeri bir stroma çevresinde radyal dizilim gösteren çok sayıda inklüzyon ve yarıklanma içeren koheziv neoplastik hücreler gözlenir. Tartışmalı bir neoplazi olup, papiller karsinomun bir varyantı olduğu da düşünülmektedir. İİA örneğinde tanı koymak çok zordur (23).

(i) Diffüz sklerozan varyant: Histolojik olarak yoğun skleroz ile karakterize bu nadir alt tipe ait İİA örneklerinde klasik papiller karsinom nükleer özelliklerine ek olarak, hafif atipik monomorfik küçük lenfositler, metaplazik skuamöz hücreler ve bol miktarda psammom cismi bulunması bu alt tip için tanımlayıcıdır (22).

(j) Diğer nadir varyantlar: Papiller karsinomun başka histolojik varyantları da bulunmaktadır (solid, hobnail, kribriiform morular, gibi), ancak bunların İİA'daki sitolojik özellikleri çok az tanımlandığından papiller karsinomdan ayrımı zordur (8, 14).

b. Foliküler Karsinom

(1). Histolojik özellikler

Tiroidin foliküler hücre diferansiasyonu gösteren, ancak papiller karsinomun nükleer özelliklerini taşımayan malign epitelyal tümörleridir. Foliküler yapılar yanı sıra solid ve trabeküler büyüme paterni de gösterebilir. Kapsüllü/minimal invaziv (kapsül ve/veya damar invazyonu) ve yaygın invaziv foliküler karsinom olmak üzere iki gruba ayrılır (8, 10). Şüpheli kapsül invazyonu olan ancak damar invazyonu ve papiller karsinoma özgü nükleer özellikler gözlenmeyen kapsüllü foliküler tümörler malignite potansiyeli belirsiz foliküler tümör (MPBFT), şüpheli kapsül invazyonuna, papiller karsinom kuşkusu taşıyan nükleer özelliklerin de eşlik ettiği tümörler ise, malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör (MPBİDT) olarak adlandırılır (6).

(2). Sitolojik özellikler

Çoğu hücresel kalabalıklaşma ve/veya mikrofolikül oluşumu ile karakterize yapısal değişiklikler gösteren, papiller karsinomun nükleer özelliklerini taşımayan ve sitolojik atipi gözlenebilen folikül hücrelerinden ibaret, kolloidden fakir sellüler yaymalarla karakterizedir (14). İnce iğne aspirasyon sitolojisi birçok tiroid patolojisinde (örn: papiller karsinom, lenfositik tiroidit) tanısal olmakla birlikte, foliküler lezyonlar için daha ziyade tarama testi niteliğindedir. Foliküler adenom ve foliküler karsinom ortak sitomorfolojik özellikler taşıdıklarından, kesin tanı konulabilmesi için genellikle histopatolojik inceleme gerekir. Sitolojik olarak tiroid sitolojisi raporlamasında kullanılan Bethesda Sistemi'ne göre FN/FNK kategorisinde toplanan bu olguların büyük bölümü foliküler adenom veya adenomatöz nodül tanısı alırken, %15-30'u FVPK (malign olguların %27-68'i) ve foliküler karsinom tanısı alır (1, 10, 14, 24, 25, 26, 27).

c. Medüller Karsinom

(1). Histolojik özellikler

Farklı yapısal özellikler göstermekle birlikte en tipik büyüme paterni ince fibrovasküler korlarla ayrılmış, solid adacıklar, trabeküler veya insüler yapılardır. Neoplastik hücreler iğsi, oval şekillidir, kromatini nöroendokrin hücrelere özgü ince granüler yapıdadır. %80 olguda stromada amiloid görülür (10, 13).

(2). Sitolojik özellikler

Orta derecede ya da belirgin sellüler yaymalarda, tek tek veya sinsityal kümeler halinde hafif-orta derecede pleomorfizm gösteren, plazmasitoid, poligonal, yuvarlak ve/veya iğsi şekilli hücreler tipiktir. Sitoplazma granüler görünümündedir, nükleuslar, yuvarlak ve sıklıkla eksantrik yerleşimli olup, ince ya da kaba granüler (tuz-biber) kromatine sahiptir. Amiloid sıklıkla mevcuttur (14, 15).

d. Anaplastik Karsinom

(1). Histolojik özellikler

Skumoid, iğsi ve dev hücrelerden veya bu hücrelerin kombinasyonlarından oluşan yüksek dereceli, pleomorfik, epitelyal kökenli bir malignitedir. Genellikle veziküler bizar nükleuslar sıktır, makronükleoller görülebilir. Bir kısmı atipik, çok sayıda mitoz, yaygın nekroz mevcuttur (10, 22). Olguların 1/3'ünde diferansiye tiroid karsinomları ile ilişkilidir. Bu durum mevcut bir diferansiye tiroid karsinomunun dediferansiasyonu sonucu gelişebileceğini düşündürmektedir (15).

(2). Sitolojik özellikler

Örneklenen bölgenin morfolojik özelliklerine göre değişken derecede hücresellik söz konusudur. Nekroz veya kanama görülebilir. Lökositler çok sayıda olabilir. İğsi, dev hücreler, bir kısmı multinükleollü bizar hücreler, atipik mitoz sıktır. Diferansiye bir tiroid tümörü komponenti içeriyorsa, bu komponente ait hücreler izlenebilir. Bu yüzden klinik olarak anaplastik karsinom kuşkulu olgularda aspirasyon birkaç kez yinelenmelidir (14, 22).

B- TİROİD TÜMÖRLERİNİN TANISINDA İNCE İĞNE ASPIRASYON

SİTOLOJİSİ

1. TANIDAKİ YERİ

Genel popülasyonun %7'sinde palpabl tiroid nodülleri bulunur. Yüksek çözünürlüklü ultrasonografi kullanıldığında bu oran %60'a çıkmaktadır (28). Tiroid karsinomları genellikle tiroid nodülü içerisinden gelişir, ancak genel olarak nodüllerde malignite oranı düşüktür (%5-15). Bu nedenle benign ve malign nodülleri birbirinden ayıran duyarlı ve güvenilir bir tarama yöntemi kullanılması, uygun klinik yaklaşımın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (16, 28, 29, 30).

Tiroid iğne biyopsisi 1930'ların başında ABD'de Hayes Martin, Edward Ellis ve Fred Steward tarafından geliştirildi, ancak 18 gauge'lik kalın iğneler kullandıklarından teknik nedenlerle kullanımı yaygınlaşmadı. 1952 yılında İsveç'ten bir klinisyen, Nils Söderström ince iğne kullanarak aspirasyon tekniğini modifiye etti. Önce Avrupa ve İskandinavya'da daha sonra Amerika'da kullanımı yaygınlaşmaya başladı (1). Günümüzde ince iğne aspirasyonu özellikle ötiroid hastalarda ultrason ile belirlenen tiroid nodüllerinin değerlendirilmesinde dünya genelinde sıklıkla uygulanan ve altın standart olarak kabul edilen bir tanı yöntemidir (25, 26).

Güvenli, ucuz, minimal invaziv, kolaylıkla uygulabilen ve tekrarlanabilen, tanı doğruluğu oldukça yüksek bir test olan İİA'nın temel fonksiyonu malign nodülleri saptayarak zaman kaybetmeksizin hastayı cerrahiye yönlendirmek, benign nodüle sahip hastaları ise gereksiz cerrahi girişimlerden korumaktır (14, 29, 31, 32, 33, 34).

İİA'nın tiroid nodüllerinin değerlendirmesi amacı ile rutin kullanıma girmesinden sonra, bazı morbidite riskleri (%2 oranında laringeal sinir felci, %5 oranında kalıcı hipoparatiroidizm) ve nadiren mortalite ihtimali bulunan tiroid operasyonları %35-75 oranında azalırken, saptanan kanser sayısı 2-3 kat artmıştır (1).

İİA sitolojisi tiroid kanserlerinin tanısında en sensitif ve spesifik tarama testidir. Birçok meta-analiz çalışması İİA sitolojisinde pozitif sonuçların malignite ihtimalini %85-90'a çıkardığını, benign sonuçların ise %1'lere düşürdüğünü bildirmektedir. Genellikle iyi prognozlu olan diferansiye tiroid kanserleri yanlış negatif olarak yorumlanabilmekle birlikte, agresif kanserler için bu durum oldukça nadirdir (1).

Maliyet-fiyat açısından diğer tarama testlerine oranla avantajlı olan İİA biyopsisinde hemoraji, enfeksiyon, nekroz ve kist formasyonu gibi komplikasyonlar oldukça seyrek görüldüğünden, güvenli bir yöntem olduğu kabul edilmektedir (31, 35). Çocukluk ve adolesan dönem tiroid nodüllerinde de güvenle kullanılmaktadır (36).

İİA sitolojisinin asıl kullanım alanı soliter bir nodülde veya multinodüler guatrda klinik/radyolojik olarak kuşkulu nodül varlığında neoplazi olasılığını değerlendirmektir; ancak diffüz guatr ve tiroiditlerde de tümör varlığını araştırmak veya mevcut benign hastalığı desteklemek, multipl endokrin neoplazi sendromlu bireylerde medüller karsinom taraması yapmak amacı ile de kullanılabilir. Bir diğer endikasyon da anaplastik karsinom veya lenfoma gibi klinik olarak aşikar veya inoperabl tümörlerde tanıyı kesinleştirmektir (1).

Klinisyenler İİA sitolojisini genellikle konvansiyonel tanı yöntemleri ile şüpheli buldukları olgularda gereksiz cerrahi girişimlerden kaçınmak amacı ile kullanırlar. Bu sebeple, çoğu klinik şüphe taşıdığından zaten cerrahiye aday hastaların yanlış pozitif sonuçlarından ziyade, kanser tanısı gecikeceğinden, yanlış negatif sonuçların klinik olarak daha anlamlı olduğu düşünülmektedir (1). Yanlış pozitif sonuçların oranı tiroidektomi materyalleri üzerinden kolaylıkla verilebilir, ancak yanlış negatifliğin belirlenmesi, hastaların tamamı cerrahiye yönlendirilmediğinden kesin olarak belirlenemez. Genel olarak bu oranın %5 olduğu tahmin edilmektedir ama %20-%40 arasında olabileceğini belirten yayınlar da mevcuttur (37, 38).

Başarılı bir İİA'nın temel koşulları; aspirasyonun tecrübeli bir operatör tarafından yapılması, hücreden zengin bir materyal eldesi, teknik kalitesi yüksek bir preparasyon ve doğru değerlendirmedir (39). Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların en önemli sebebi genellikle non-neoplastik grupta tanı verilen yetersiz veya kalitesiz örneklerdir (40). Bir cm.den küçük, 3-4 cm.den büyük lezyonlar, derin yerleşimli tümörler, kistik lezyonlar da yanlış negatif sonuçlarla ilişkilidir. Yanlış negatif tanılarının en sık sebebi örnekleme hatalarıdır. Kistler, guatr, atipi gösterebilen Hürthle hücrelerinin görüldüğü benign lezyonlar ve foliküler lezyonlar tanı hatalarına sebep olmaktadır (1).

Tiroid İİA sitolojisinin yanlış negatiflik oranı %0,3-%12,7 (ortalama %5), yanlış pozitiflik oranı %0-%14 (ortalama %1), sensitivitesi %43-%100 (ortalama %83), spesifisitesi %52-%100 (ortalama %92), pozitif prediktif değeri %34-%100 (ortalama %75), negatif prediktif değeri %83-%99 (ortalama >%95), tanı doğruluğu %75-%100 (ortalama >%95)'dir. Yetersizlik oranı ise %0-%25 (ortalama %5-%10) arasındadır (1) (Tablo 2).

Tablo 2. Tiroid İİA sitolojilerine ait parametreler (1)

	En düşük oran, %	En yüksek oran, %	Ortalama, %
Yanlış negatiflik	0,3	12,7	5
Yanlış pozitiflik	0	14	1
Sensitivite	43	100	83
Spesifisite	52	100	92
PPD	34	100	75
NPD	83	99	>95
Tanı doğruluğu	75	100	>95
Yetersizlik oranı	0	25	5-10

Kısaltmalar: PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

Konvansiyonel sitoloji ilk ve en sık kullanılan teknik olmakla birlikte, 1996 yılından itibaren sitolojik materyalleri toplama ve preparasyonda alternatif bir yöntem olan sıvı bazlı sitoloji de kullanılmaya başlanmıştır (41). Bu yöntemin en önemli avantajları yayma preparatları kandan ve inflamasyondan arındırması ve fiksasyon kalitesini arttırmasıdır. Dezavantajları ise konvansiyonel morfolojik özelliklerde değişiklikler oluşturmaları, artifisyonel hücresel büzüşmelere ve nükleer membran düzensizliklerine yol açarak yanlış tanıya neden olabilmesidir (42).

2. TİROİD İNCE İĞNE ASPIRASYONLARININ RAPORLANMASI ve BETHESDA SİSTEMİ

Tiroid nodülü olan ötiroid hastaların değerlendirilmesinde temel rol oynayan İİA'lar yorumlanırken klinisyene verilecek mesajların açık, net ve klinik olarak anlaşılır terimler ile ifade edilmesi çok önemlidir (14). Her olguda benign/malign ayırımını kesin olarak yapmak mümkün olmamakta; morfolojik özellikleri ile arada kalan pek çok olgu ortaya çıkmaktadır. Ara olgular, kesin tanı için histopatolojik incelemeyi gerektiren foliküler adenom/foliküler karsinom ile sınırlı değildir; İİA tekniğinin doğası gereği tanı kriterlerinin tamamını taşımayan diğer malign tümörler ya da maligniteyi taklit edebilen reaktif değişiklikler sitolojik tanıda kuşkulu ara kategorilerin oluşmasına neden olmaktadır. Geçmiş yıllarda farklı dernek ve organizasyonlar tarafından İİA sonuçlarını yorumlamaya yönelik birçok sınıflandırma şeması yayınlanmıştır. Bu şemaların birçoğu genellikle birbiri ile eşleşmeyen 4-6 tanı kategorisinden oluşmaktadır. Özellikle net tanı konulamayan şüpheli kategorilerden kaynaklanan bu durum hem patoloğlar arasında hem de patoloğ-klinisyen diyalogunda farklı algılamalara neden olmaktadır (43).

Tiroid İİA örneklerinin patoloğlar tarafından benzer biçimde yorumlanması ve standart terminoloji ile raporlanması ihtiyacından doğan Bethesda Sistemi, 2007 yılında Amerikan Ulusal Kanseri Enstitüsü'nün (National Cancer Institute, NCI) ev sahipliğinde Bethesda'da gerçekleştirilen 'Tiroid İnce İğne Aspirasyon Sitolojisi Konferansı'nda ayrıntıları ile ortaya konmuş, tanımlar, kriterler ve açıklayıcı notlar içeren bir rehber kitap (The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology) yayınlanmış ve günümüzde dünya genelinde yaygın olarak kullanılır duruma gelmiştir (14).

Bethesda Sistemi İİA örneklerinin 6 basamaklı tanı kategorisi üzerinden değerlendirilmesini önermektedir. Bu kategoriler; tanısal olmayan veya yetersiz, benign, önemi belirsiz atipi veya önemi belirsiz foliküler lezyon (AUS/FLUS), (AUS VE FLUS terimleri sırası ile *Atypia*

of Undetermined Significance ve Follicular Lesion of Undetermined Significance terimlerinin kısaltmaları olup, dilimizde bu şekilde kullanıldıklarından Türkçe kısaltma kullanılmamıştır) foliküler neoplazi veya foliküler neoplazi kuşkusu (FN/FNK; Hürthle hücreli lezyonlar dahil), malignite kuşkusu (MK) ve malign'dir (14, 24, 44). Bethesda Sistemi'nde önerilen tanı kategorileri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Bu kategorilerin her birinde beklenen (tanısal olmayan/yetersiz kategorisi hariç) malignite oranları da Bethesda Sistemi'nde belirlenmiş; her bir kategori için klinik yaklaşım önerileri getirilmiştir. Giderek artan malignite oranları -benign kategoriden başlayarak- sırası ile; %0-3, %~5-15, %15-30, %60-75, %97-99'dur (14, 24, 44).

Bethesda Sistemi'nde kategorilere göre malignite oranları ve klinik yaklaşım önerileri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Tiroid sitopatolojisi raporlamasında Bethesda Sistemi; önerilen tanı kategorileri (14)

I- Tanısal olmayan ya da yetersiz

Sadece kist sıvısı

Asellüler örnek

Diğer (hücreleri örten kan, pıhtılaşma atefaktları, vs.)

II- Benign

Benign foliküler nodül ile uyumlu (adenomatoid nodül, kolloidal nodül, vs.)

Lenfositik tiroidit (Hashimoto tiroiditi) ile uyumlu (klinik bulgular uyumlu ise)

Granülomatöz (subakut) tiroidit ile uyumlu

Diğer

III- Önemi Belirsiz Atipi veya Önemi Belirsiz Foliküler Lezyon

IV- Foliküler Neoplazi veya Foliküler Neoplazi Kuşkusu

Hürthle hücreli (onkositik) tip ise belirtiniz.

V- Malignite Kuşkusu

Papiller karsinom kuşkusu

Medüller karsinom kuşkusu

Metastatik karsinom kuşkusu

Lenfoma kuşkusu

Diğer

VI- Malign

Papiller tiroid karsinomu
Az diferansiye karsinom
Medüller tiroid karsinomu
İndiferansiye (anaplastik) karsinom
Skvamöz hücreli karsinom
Karma özellikler taşıyan karsinom
Metastatik karsinom
Non-Hodgkin lenfoma
Diğer

Tablo 4. Tiroid sitopatolojisi raporlamasında Bethesda Sistemi; tanı kategorilerine göre malignite riski ve önerilen klinik yaklaşım (14)

Tanı Kategorisi	Malignite Riski (%)	Genel Klinik Yaklaşım
Tanısal olmayan ya da yetersiz		Ultrason eşliğinde İİA tekrarı
Benign	0-3	Klinik izlem
Önemi Belirsiz Atipi/Önemi Belirsiz Foliküler Lezyon	~5-15	İİA tekrarı
Foliküler Neoplazi/Foliküler Neoplazi Kuşkusu	15-30	Cerrahi lobektomi
Malignite Kuşkusu	60-75	Totale yakın tiroidektomi/ lobektomi
Malign	97-99	Totale yakın tiroidektomi

3. BETHESDA SİSTEMİ'NDE TANIMLANAN TANI KATEGORİLERİNE AİT SİTOMORFOLOJİK ÖZELLİKLER

a. Tanısal olmayan veya yetersiz

Bir tiroid ince iğne aspirasyonu, tercihen tek bir preparatta, her biri en az on hücre içeren ve net gözlenebilen (iyi fikse, iyi boyanmış ve üzeri kan kitlesi, vs. ile örtülü olmayan) en az altı foliküler hücre grubundan oluşuyorsa yeterli, bu kriterlerin birini dahi karşılamıyorsa yetersiz/tanısal olmayan kabul edilir. Bu durumun istisnaları mevcuttur:

1- Sitolojik atipi içeren örneklerde folikül hücreleri için minimum sayı kriteri uygulanmaz.

2- Sadece çok sayıda inflamatuvar hücre içeren örneklerde (lenfositik tiroidit, tiroid absesi veya granülomatöz tiroidit gibi durumlarda) folikül hücreleri için minimum sayı kriteri uygulanmaz, benign kabul edilir.

3- Bol ve kalın kolloid içeren örnekler benign ve değerlendirme için yeterli kabul edilir (14, 24, 44).

b. Benign

Değerlendirme için yeterli, belirgin kolloid ve değişen oranlarda benign görünümlü foliküler hücrelerin gözlemlendiği sitolojik örnekler için kullanılır. Benign foliküler nodül (nodüler guatr, hiperplastik/adenomatoid nodül, kolloidal nodül) ve tiroiditleri (lenfositik tiroidit, granülomatöz tiroidit) içerir (1, 14, 24, 44).

c. Önemi Belirsiz Atipi veya Önemi Belirsiz Foliküler Lezyon

Önemi belirsiz atipi/önemi belirsiz foliküler lezyon kategorisi benign bir değişiklik olarak yorumlanamayacak ölçüde yapısal ve/veya nükleer atipi içeren, ancak foliküler neoplazi açısından kuşkulu ya da malign olarak sınıflandırılmayan hücrelerden (foliküler, lenfoid veya diğer) oluşan örnekler için kullanılır. Belirsizliğin önemli bir nedeni kalitesiz yaymalardır (hücreden fakir veya kan ve pıhtı ile örtülü yaymalar). Bu kategori oldukça heterojendir, bu nedenle AUS/FLUS tanısının uygun olacağı en sık senaryolar özetlenmiştir:

1- Hücreden ve kolloidten fakir yaymada mikrofoliküler yapıların baskın oluşu veya hücresel yaymalarda olağanın üzerinde mikrofolikülün bulunması, ancak mikrofolikül oranının her iki durumda da FN/FNK tanısı için yeterli düzeyde olmaması .

- 2- Hücreden veya kolloidden fakir olup, baskın olarak Hürthle hücresi içeren örnekler
- 3- Hücrel atipinin artefaktlar (kuruma, kalabalıklaşma, kan kitlesi ile örtülü oluşu) nedeni ile değerlendirilememesi.
- 4- Klinik bulguların ön planda lenfositik tiroidit veya multinodüler guatrı (MNG) düşündürdüğü, sadece Hürthle hücrelerinden oluşan hücrel örnekler.
- 5- Genel olarak benign görünümlü, ancak papiller karsinomu düşündüren fokal nükleer atipi barındıran örnekler (özellikle Hashimoto tiroiditi olan ya da bol kolloidle birlikte benign görünümlü folikül hücresi içeren örnekler).
- 6- Atipik kist döşeyici epitel hücreleri içeren, ancak genel olarak benign görünümlü örnekler.
- 7- Radyoaktif iyot ve ilaç kullanımı, kistik dejenerasyon, kanamaya ikincil rejenerasyon gibi durumlara bağlı folikül hücrelerinin küçük bir kısmının nükleer irileşme ve sıklıkla belirgin nükleol içerdiği örnekler.
- 8- Atipik lenfoid hücreler içeren, ancak atipi düzeyi malignite kuşkusu kategorisi için yeterli olmayan örnekler.
- 9- Sınıflandırılmayan örnekler (1, 14, 24, 44).

d. Foliküler Neoplazi veya Foliküler Neoplazi Kuşkusu

Çoğu hücrel kalabalıklaşma ve/veya mikروفolikül oluşumu ve dağınık izole hücreler ile karakterize, yapısal değişiklikler gösteren, papiller karsinomun nükleer özelliklerini taşımayan folikül hücrelerinden ibaret, kolloidden fakir sellüler yaymalardır. Folikül hücreleri normalden biraz iri olabilir, genellikle uniformdur, nükleuslar hafif hiperkromatiktir. Sadece veya tamamına yakını Hürthle hücrelerinden oluşan sellüler yaymalar da 'Foliküler neoplazi/Hürthle hücreli tip' veya 'Foliküler neoplazi kuşkusu/Hürthle hücreli tip' tanısı altında bu kategoride yer alır (1, 14, 24, 44).

e. Malignite kuşkusu

Bir örnekte bazı morfolojik özellikler kuvvetle maligniteyi düşündürüyor, ancak bulgular kesin sonuç için yeterli değil ise (fokal oluşu, sadece bir veya iki karakteristik özellik

varlığı, düşük hücresellik vs.) örnek bu kategoriye dahil edilir. Kuşku edilen malignitenin tipi belirtilmelidir (1, 14, 24, 44).

f. Malign

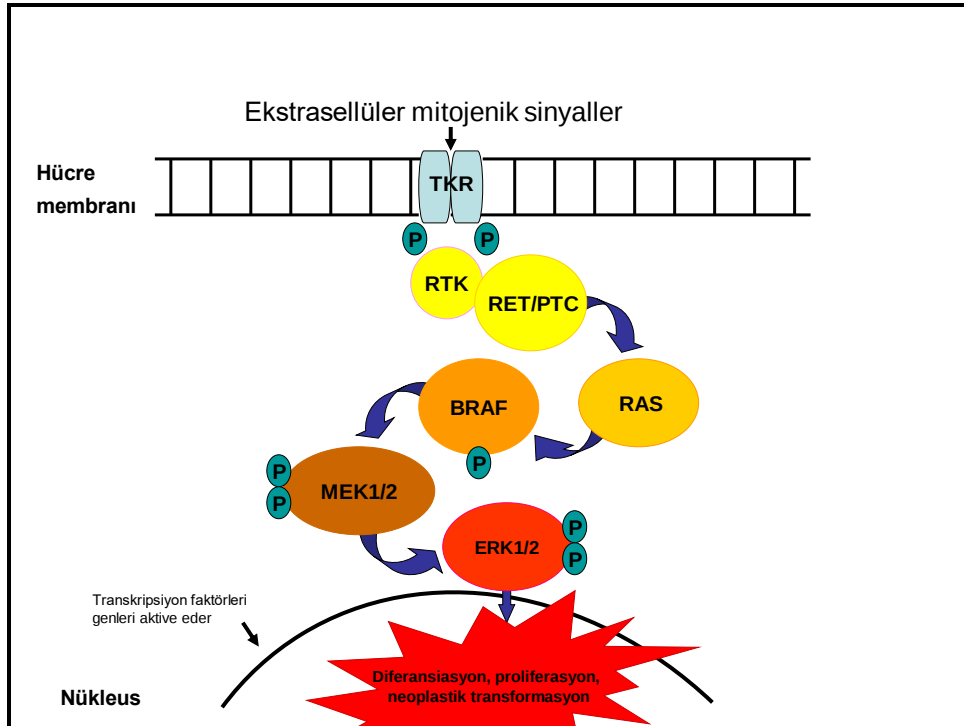
Herhangi bir tiroid veya tiroid dışı maligniteye ait karakteristik özellikler taşıyan örnekler bu grupta yer alır.

C- TİROİD KARSİNOMLARINDA BELİRLENEN MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

Son yıllarda moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmelerin tiroid tümörlerine de yansması sayesinde belirlenen spesifik mutasyonlar, söz konusu tümörlerde tanıya, prognozun belirlenmesine ve daha doğru bir sınıflama oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır (10).

Tiroid karsinomlarının en sık görülen iki tipi, papiller ve foliküler karsinomda bilinen mutasyonların büyük bölümünü 4 tip mutasyon oluşturmaktadır. Bunlar; BRAF ve RAS nokta mutasyonları, RET/PTC ve PAX8/peroksizom proliferatör-aktif edici reseptör γ (PPAR γ) yeniden düzenlenmesidir (7, 45).

Papiller karsinomda oluşan BRAF, RAS nokta mutasyonları ve RET/PTC yeniden düzenlenmesi MAPK (mitogen activated protein kinase) sinyal ara yolunu aktive eder (Şekil 1)



Şekil 1. MAPK (Mitogen activated protein kinase) sinyal ara yolu.

Nikiforov YE'nin Arch Pathol Lab Med. Dergisinde 2011 yılında yayınlanan çalışmasından uyarlanmıştır (45).

Bu ara yol ekstrasellüler sinyalleri (hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler) membranda bulunan tirozin kinaz reseptörlerinden bir dizi adaptör protein ve intrasitoplazmik kinazlar; RAS, RAF (tiroid folikül hücrelerinde özellikle BRAF), MEK ve ERK, aracılığı ile nükleusa iletir. Aktive edilen ERK nükleusta gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini fosforile eder, gen ekspresyonu sonucunda diferansiasyon, proliferasyon, büyüme ve apoptoz gerçekleşir (45). Tiroid karsinomlarında bu ara yolun aberan aktivasyonu RAS ve BRAF genlerinde nokta mutasyonları ile RET/PTC ve TRK yeniden düzenlenmeleri sonucu oluşur. Bu mutasyonlar papiller karsinomların >%70'inde bulunur ve birbirini dışlayan mutasyonlardır. RET/PTK-1 klasik morfolojili sporadik olgularda, RET/PTK-3 ise radyasyon ile ilişkili solid formlarda daha sık görülmektedir (13). TRK yeniden düzenlenmesi de papiller karsinomda ortaya konan, ancak prevalansı düşük (<%5) bir mutasyondur. Foliküler karsinomların da ~%75'inde RAS nokta mutasyonu ve PAX8/ PPAR γ yeniden düzenlenmesi saptanır, bu mutasyonlar da birbirini dışlayan mutasyonlardır (7, 34, 45, 46).

Tiroid karsinomlarında saptanan bir başka genetik değişiklik de PI3K/AKT sinyal iletilici ara yolu üzerinden etki eder. İyi diferansiye tiroid karsinomlarında nadir görülmekle birlikte, az diferansiye tiroid karsinomlarında daha sıktır. Az diferansiye ve anaplastik tip karsinomlarda bilinen diğer mutasyonlar da TP53 ve CTNNB1 genlerini etkiler. Bu mutasyonlar da iyi diferansiye tiroid karsinomlarında nadirdir (6, 8, 34). Hem ailesel hem de sporadik olarak gelişebilen medüller karsinomda sıklıkla RET geninde nokta mutasyonlar mevcuttur (45).

Sık görülen tiroid tümörlerinde belirlenen mutasyonlar Tablo 5'te gösterilmiştir

Tablo 5. Tiroid tümörlerinde belirlenen mutasyonlar ve prevelansları (6, 45)

TÜMÖR TİPİ	MUTASYON	PREVELANS (%)
PAPİLLER KARSİNOM (KONVANSİYONEL TİPLER)	BRAF	30-70
	RET/PTC	20-40
	RAS	0-10
	TRK	0-10
PAPİLLER KARSİNOM (FOLİKÜLER VARYANT)	RAS	25-45
	RET/PTC	5-10
	BRAF	5-10
	PAX8/ PPAR γ	0-30
FOLİKÜLER KARSİNOM	RAS	30-50
	PAX8/ PPAR γ	20-50
	PIK3CA	5-10
	PTEN	5-10
AZ DİFERANSİYE TİROİD KARSİNOMU	RAS	20-50
	TP53	15-40
	B-Catenin (CTNNB1)	0-25
	BRAF	5-15
ANAPLASTİK TİROİD KARSİNOMU	TP53	50-80
	B-Catenin (CTNNB1)	5-65
	RAS	10-50
	BRAF	10-40
	PIK3CA	5-25
	PTEN	5-20
MEDÜLLER KARSİNOM	RET (AİLESEL FORM)	>95
	RET (SPORADİK)	40-50

1. BRAF MUTASYONLARI

RAF gen ailesinde (A-Raf, B-Raf, C-Raf) yer alan BRAF proteini, RAS proteini tarafından stimüle edilen, serin/treonin kinaz proteinini kodlayan ve MAPK sinyal ara yolunda hücre içi sinyal iletiminde rol alan bir moleküldür (45, 47). Üç izoformunda da CR1 (RAS bağlayıcı domain ve sisteinden zengin domain), CR2 (N-terminal düzenleyici domain) ve CR3 (C-terminal kinaz katalitik domain) bölgeleri ortaktır, çok sayıda düzenleyici fosforilasyon bölgesi içerir (48).

Raf aktivasyonu membranda gerçekleşen kompleks bir süreçtir. RAS , Raf'ın RAS bağlayıcı domainine (RBD) dimerik adaptörler (14-3-3 proteinleri) aracılığı ile bağlanır. BRAF inaktif durumdayken fosforile halde bulunan fosforilasyon bölgeleri içerir (S365, S729). Dimerik proteinler bu bölgelere bağlanarak RAS'ın RBD'ye bağlanmasını sağlar. İnaktif BRAF'ın membranın iç kısmında N-terminal 14-3-3 bağlayıcı kısmının defosforilasyonu ve 14-3-3 proteinlerinin ayrılması, ardından aktivasyon segmentinde bulunan T599 ve S602'nin fosforilasyonu sonucu BRAF'ın aktivasyonu başlar. İnaktif BRAF'ın, aktivasyon kangalında bulunan G596-V600 rezidüleri ile P kangalında (ATP bağlayıcı uç) bulunan G464-V471 rezidülerinin hidrofobik bağlantılarla oluşturdukları, ATP'nin bağlanmasının engellendiği karakteristik bir yapısı vardır. T599'un fosforilasyonu sonucu bu bağlantılar parçalanır, ATP bağlanır ve BRAF aktive olur (4).

MEK1/2 BRAF'ın fizyolojik efektörleridir, BRAF serin rezidülerini fosforile ederek MEK'i aktive eder. MEK, ERK1/2'yi T202 ve Y204 rezidülerinden fosforile ederek aktive eder. Sitoplazma ve nükleusta bulunan substratlar aktive olur, ERK'nın nükleer translokasyonu, transkripsyon faktörlerini fosforile eder ve düzenleyici genlerin ekspresyonu gerçekleşir. ERK regülasyonu biyolojik homeostazın sağlanmasında kritik bir aşamadır. ERK sinyal yolunun hiperaktivasyonu, hücre siklusunda duraklamaya, aberan aktivasyonu tümör gelişimine sebep olabilir (4).

BRAF molekülünde A-Raf ve C-Raf'a oranla daha sık mutasyon saptanmasının belirlenebilen nedenleri şunlardır:

1- RAF'ın 3 izoformunda da aktivasyon mekanizması benzerdir, farklı olarak A-Raf ve C-Raf ilave kinazlara ihtiyaç duyar ve CR3'ün N-terminal ucunda (N-bölgesi) fosforilasyon basamakları daha fazladır (4).

2- Raf kinaz aktivasyonu için N bölgesinin negatif yüklü olması gerekir. BRAF sürekli negatif yüklüdür. Sonuç olarak; BRAF aktivasyona hazırdır ve sadece RAS aktivasyonuna ihtiyaç duyar (4).

3- BRAF en yüksek bazal kinaz aktivitesine sahip Raf proteinidir ve MEK'in en güçlü Raf aktivatörüdür. Ayrıca V600E mutasyonunun kinaz aktivitesi yabani tip göre 460 kat daha fazladır ve aktivasyon için RAS'a ihtiyaç duymaz, efektörlerini sürekli aktive edebilir (49).

Melanom, kolorektal adenokarsinom, over kansinimleri gibi bazı kansinimlerde da belirlenen onkogenik BRAF mutasyonu, papiller kansinom olgularının %30-70'inde bildirilmiş olup, ortalama prevalansı %45'tir ve papiller kansinom olgularında en sık karşılaşılan moleküler değişiklikler (6, 7). 40'tan fazla tipi belirlenen (50) BRAF mutasyonlarının çoğu (>%90) 1799 numaralı nükleotidin ekzon 15 bölgesinde timidinin adenine transversiyonu sonucunda kodon 600'de glutamik asidin, valinin yerini alması ile oluşur (BRAF^{V600E}). Bu mutasyon sonucunda gerçekleşen BRAF kinaz aktivasyonu, MAPK sinyal ara yolunun kronik stimölasyonuna neden olur ve bu durum foliköl epitel hücreleri için tümörojenik etki oluşturur. Papiller kansinimlerin %1-2'sinde BRAF^{K601E} nokta mutasyonları, kodon 600 civarında fokal insersiyon ve delesyonlar, özellikle radyasyon hasarı ile ilişkili AKAP9-BRAF yeniden düzenlenmeleri belirlenmiştir (6, 10, 45).

Tiroid tümörlerinde BRAF mutasyonu papiller kansinom yanı sıra papiller kansinom zemininde gelişen az diferansiye kansinom ve anaplastik kansinomda da görülebilmektedir (6). Ayrıca iki adet struma ovarii olgusunda da BRAF mutasyonu belirlenmiştir (51, 52). BRAF^{V600E} mutasyonu foliküler kansinom ve benign tiroid tümörlerinde görülmediğinden papiller kansinoma oldukça spesifik bir mutasyondur (%99.8) (45).

Tiroidde gözlenen BRAF mutasyonu papiller patern ile kuvvetli bir ilişki gösterdiğinden, papilla formasyonlarının sık görüldüğü klasik tip (~%60) ve 'tall cell' varyantta (%70-80), foliküler varyanta oranla çok daha sıktır (%10). Nadir görülen BRAF^{K601E} mutasyonları ise sıklıkla foliküler varyant papiller kansinomda görülmektedir (7, 10).

Sitolojik olarak tanı güçlüğü yaşanan, indetermine kategoriye dahil edilmiş olgularda BRAF mutasyon analizinin %15-39 oranında kesin tanıya yönlendirebileceğı ortaya konmuş (45) ve yapılan birçok çalışmada İİA materyallerine uygulanan BRAF^{V600E} mutasyon analizinin, tanı doğruluğunu arttırabileceğı gösterilmiştir (3, 5, 29, 32, 53). Ancak BRAF

mutasyonunun indetermine kategoride değerlendirilen İİA'larda tanı doğruluğunu anlamlı derecede arttırmadığını dile getiren makaleler de mevcuttur (50, 54, 55).

BRAF mutasyonu papiller karsinomda prognostik bir marker olarak da kullanılabilir. BRAF^{V600E} mutasyonu tiroid dışı yayılım, lenf nodu tutulumu veya uzak metastaz, ileri evre hastalık gibi agresif klinikopatolojik özelliklerle ilişkili bulunmuştur (1, 6, 41, 56, 57). Bazı çalışmalarda BRAF^{V600E} mutasyonunun tedavi başarısızlığı, nüks ve mortalite açısından bağımsız risk faktörü olduğu belirlenmiştir, ama aynı özellikler diğer BRAF mutasyonları için söz konusu değildir (10, 45). BRAF mutasyonu ile kötü prognoz arasında böyle bir ilişkinin kurulamayacağını savunan yayınlar da mevcuttur (50).

BRAF mutasyonunun prognostik önemi, daha iyi prognozlu olacağı öngörülen - mikrokarsinomları da kapsayan- T1 tümörler için daha büyük anlam taşımaktadır. Çünkü bu tümörlerde de agresif klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi gösterilmiştir (7, 41, 45).

BRAF^{V600E} mutasyonu pozitif olan tümörlerde agresif klinikopatolojik davranışın sebepleri:

- Tümöral hücrelerin damar ve çevre dokuya invazyon kapasitelerini artırır.
- Genetik insitabiliteye sebep olarak ikincil genetik değişiklikleri kolaylaştırır.
- Tümör süpresör genlerinden RASSF1A (ras-associated factor 1), TIMP3, DAPK, SLC5A8, RARβ2'yi hipermetilasyon ile etkisizleştirir.
- Tümörögenizde rol alan Mikro-RNA'ların ekspresyonunda değişikliklere sebep olur.
- Anjiyogenik etkili VEGF'nin ekspresyonu artırır.
- Yüzey reseptörü olan c-Met protein ekspresyonunda artışa neden olarak onkogenezi, tümör progresyonunu ve metastazı indükler.
- Tiroid hormon sentezinde ve iyot transportunda folikül hücrelerine iyot uptake'inde rol alan genlerin ekspresyonunu azaltır ve radyoaktif iyot direnç oluşturur.

Sonuçta; BRAF mutasyonu sadece tümörögenezi başlatmaz aynı zamanda tümörün progresyonundan, agresif karakter kazanmasından ve tedaviye direncinden de sorumludur (50).

BRAF mutasyonunun diagnostik ve prognostik değeri belirlendikten sonra, uygulanacak cerrahi tedavinin şekli ve cerrahi sonrası tedavi yaklaşımlarının belirlenmesine etkisi olup, olamayacağı sorusu gündeme gelmiştir. Daha fazla sayıda çalışma ve prospektif klinik araştırmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte, preoperatif olarak BRAF^{V600E} mutasyonu olan

nodüllere yaygın cerrahi rezeksiyon ve daha yüksek doz RI tedavisi uygulanması, TSH'nın daha az supresyonu ve yakın takip önerilmektedir (45).

2. RAS MUTASYONLARI

RAS proteini MAPK sinyal ara yolunda görev alan bir moleküldür. Bu sinyal ara yolu, RAS proteininin aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla RAF, MEK ve ERK proteinleri aracılığıyla bir kinaz kaskadı oluşur. Ras proteininin aktif hale geçmesi için posttranslasyonel modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. Hücreye büyüme sinyali geldiğinde, RAS-GDP, RAS-GTP haline dönüşür. Aktif olan RAS, RAF proteinini harekete geçirerek mitogenez sürecini başlatır, hücre bölünmesi gerçekleştikten sonra RAS proteini inaktif hale geçer (58). RAS geninde oluşan nokta mutasyonlar, GTP'ye afinite artışına (kodon 12/13) veya otokatalitik GTP'az fonksiyonlarının inaktivasyonuna (kodon 61) neden olur (10). RAS proteini, normal dokuda proliferasyon ve diferensiyasyon sinyallerinde önemli bir role sahipken, mutant genin oluşturduğu RAS proteini, birçok kanser tipinde etkili potansiyel onkogenik bir proteindir (46, 58).

İlk olarak 1988'de tanımlanan RAS protoonkogeni (NRAS, KRAS, HRAS) nokta mutasyonları folikül epitelinden kaynaklanan tümörlerinde değişik oranlarda görülmektedir (59). Tiroid tümörlerinde tanımlanan ilk moleküler değişiklik olan RAS mutasyonları papiller karsinomlarda rölatif olarak daha seyrek olup, ortalama %10-20 civarında belirlenir ve mutasyonların tamamına yakını FVPPK olgularıdır. Aynı zamanda bu olgularda kapsül varlığı daha sık, papiller karsinomun nükleer özellikleri daha az belirgin ve lenf nodu metastazı da daha seyrektir (7, 10).

Kodon 12/13 ve kodon 61 mutasyonlarından herhangi biri (en sık NRAS kodon 61 ve HRAS kodon 61) konvansiyonel tip foliküler karsinomların %40-50'sinde, konvansiyonel tip foliküler adenomların %20-40'ında bulunur (45). Mutasyon saptanan adenomlar genellikle mikrofoliküler paterni baskın olanlardır (46). Onkositik tümörlerde insidansı düşük olarak bildirilmiştir. Bu oran karsinomlar için %15-25, adenomlar için %0-4 civarındadır. Adenomatöz nodüller ve guatr nodüllerinin de az bir kısmında RAS mutasyonları belirlenmiştir, ancak bu nodüllerin koloidden zengin makrofoliküler morfolojilerine rağmen, gerçek neoplaziler oldukları ve foliküler adenom olarak adlandırılmaları gerektiği düşünülmektedir (10).

RAS mutasyonlarının masum klinik gidişli olduğu bilinen kapsüllü foliküler varyant papiller karsinomlarda sık görüldüğü bilinmektedir. Ancak bazı çalışmalarda tiroid tümörlerinde belirlenen RAS mutasyonlarının dediferansiasyon ve daha kötü prognoz ile korele olduğu ortaya konmuştur. Papiller ve foliküler karsinomda uzak metastazlar (özellikle kemik) ile anlamlı bir ilişki kurulmuştur. Bu sebeple, RAS mutasyonunun dediferansiasyon ve metastaz ihtimali taşıyan, yaygın invaziv iyi diferansiye tiroid karsinomlarının bir bölümüne işaret ettiği düşünülmektedir (10, 60). Ancak bu mutasyon tiroid tümörlerinde prognostik bir marker olarak kullanılamaz ve bir tiroid nodülünde RAS mutasyonunun saptanması malign tanısı koydurmaz, neoplaziye işaret eder (10).

Tiroid İİA örneklerinde 2. sıklıkla karşımıza çıkan RAS mutasyonunun önemi genellikle sitolojik olarak tanı güçlüğü yaşanan FVPK olgularına yönelik moleküler bir marker olarak tanımlanmasından kaynaklanmaktadır. Malignite açısından pozitif prediktif değeri %74-88 olarak belirlenmiştir. Bir tiroid nodülünde RAS mutasyonunun varlığı, malignite tanısı koydurmamakla birlikte, kuvvetle neoplaziye işaret eder. RAS mutasyonu saptanan benign olguların foliküler adenom, foliküler karsinom veya FVPK olgularının öncü lezyonları olabileceği, bu sebeple bu lezyonların da cerrahi eksizyonunun uygun olacağı ileri sürülmektedir (45).

IV- GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, Ocak 2009-Aralık 2010 tarihleri arasında, tiroid ince iğne aspirasyonu ile “kuşkulu sitolojik bulgular”, AUS/FLUS, FN/FNK veya MK tanısı alan ve ardından tiroidektomi uygulanan tüm olgular çalışma materyali olarak belirlendi. Arşiv kayıtlarında bu özelliklere sahip 110 hastaya ait toplam 113 İİA olduğu görüldü. Aynı yıllar içinde incelenen ve “benign”, “malign” veya “tanısal olmayan materyal” olarak değerlendirilen tiroid İİA’lar çalışmaya dahil edilmedi.

Bu olgulara ait preparatlar arşivden çıkarılarak mikroskopik olarak tekrar değerlendirildi ve Bethesda Sistemi'ne göre yeniden tanı verildi. Altı aspirasyon “papiller karsinom”, 4 aspirasyon “benign sitolojik bulgular” tanısı alarak çalışmadan çıkarıldı. İki aspirasyon yetersiz bulunduğundan, 3 aspirasyon da aynı nodüle ait tekrarlayan aspirasyonlar olduğundan çalışma dışı bırakıldı. Sonuç olarak çalışma kapsamına 98 hastaya ait 98 tiroid İİA materyali alındı.

Çalışmaya alınan İİA'ların 91'i İstanbul Tıp Fakültesi Radyoloji, 3'ü Endokrin, 2'si Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda, 1'i dış merkezde yapılan aspirasyonlardı. Bir aspirasyon dış merkezde incelenerek bölümümüze konsültasyon amacı ile gönderilmişti. Radyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan aspirasyonlarda uygulanan standart yöntem, Gereç ve Yöntem- Ek1'de özetlenmiştir.

Olguların İİA materyallerine ait patoloji raporları incelenerek yaş, cinsiyet, aspire edilen nodülün çap ve lokalizasyonuna dair bilgilere ulaşıldı. Çap ve lokalizasyon, tiroidektomi raporlarında tanımlanan makroskopik/mikroskopik bulgular ile karşılaştırıldı; nodüller eşleştirilerek aspire edilen nodüllerin histopatolojik tanıları belirlendi. İnce iğne aspirasyonu ve tiroidektomi raporlarındaki kayıtlara göre aynı lobda yer alan ve çapları arasında en fazla ± 0.5 cm'lik fark bulunan nodüller aynı/eş nodül olarak kabul edildi.

Çalışmaya alınan 98 olguda yaş, cinsiyet ve nodül çapının malignite ile ilişkisi araştırıldı. Aspire edilen nodül çapları ≤ 10 mm (1), 11-20 mm (2), 21-30 mm (3) ve >30 (4) mm olmak üzere 4 kategoriye ayrıldı.

Olguların sitolojik ve histopatolojik tanıları karşılaştırıldı. Bethesda Sistemi'ne göre verilen sitolojik tanıların izleminde saptanan malignite oranları belirlendi. Bethesda kategorilerinin malignite riskini öngörmeye anlamlı bir dağılım gösterip göstermediği sorgulandı.

İnce iğne aspirasyonları değerlendirilirken, başta papiller karsinom olmak üzere malign tümörleri saptamada önemi olan sitomorfolojik kriterler belirlendi ve çalışmaya alınan tüm İİA materyalleri, bu kriterlerin varlığı açısından tekrar değerlendirildi.

A- Sitomorfolojik parametreler ve değerlendirme ölçütleri

Hipokromazi, oval nükleus, nükleer yarı, nükleusların üstüste yığılması, nükleer köşelenme, psödoinklüzon, nükleer boyut, izole iri hücrelerin görülmesi, nükleol varlığı, kolloid miktarı, mikrofoliküllerin izlenmesi ve oranı detaylı mikroskopik incelemede kullanılacak parametreler olarak seçildi.

Hipokromazi, oval nükleus, nükleer yarı, üstüste yığılma, nükleer köşelenme iki kategoriye ayrılarak (var/yok) incelendi. Çalışma kapsamındaki sitolojik materyaller, kesin malignite tanısı verilememiş, ara kategorilerde değerlendirilmiş olgular olduğundan, bu

sitomorfolojik parametrelerin yaygın değil, fokal olarak bulunacağı öngörülerek, %10'luk eşik değer esas alındı; %10 ve üzerinde görüldüğü durumlar 'var' olarak kabul edildi.

Nükleusun en az yarısını kaplayan, keskin sınırlı sitoplazmik invajinasyonlar pseudo-inklüzyon olarak kabul edilerek bir hücrede varlığı yeterli görüldü.

Nükleus boyutu, <1 eritrosit, 1-2 eritrosit ve >2 eritrosit olmak üzere 3 kategori üzerinden değerlendirildi. Boyut belirlenirken hücrelerin en az %70-80'i için geçerli olması esas alındı.

Fokal ($\leq$ %10) nükleer irileşmeler (>2 eritrosit) gösteren olgular ayrıca belirlendi.

Nükleol varlığı 3 kategoride ele alındı. Hücrelerin %10'undan azında nükleollerin seçilmesi nükleol yok olarak kabul edilirken, %10'nundan fazlasında görüldüğünde nükleol varlığı '1', hücrelerin tamamına yakınında veya makronükleollerin gözlenmesi durumunda '2' olarak kabul edildi.

Kolloid varlığı 3 kategoride incelendi: Yok ise '0', var ama az miktarda ise '1', yaymaların büyük bölümünde seçiliyor ise '2' olarak değerlendirildi.

Olgularda mikrofoliküler pattern varlığı araştırıldı. Mikrofoliküler pattern mevcut değilse "0", yaymalar hiposellüler olmasına karşın ~%90 mikrofolikül yapısı içeriyorsa '1', sellüler yaymalarda ~%50 mikrofoliküler pattern gözleniyorsa '2', yine sellüler yaymalarda ~%90 mikrofolikül saptanıyorsa '3' olarak ele alındı.

Çalışmada değerlendirilen sitomorfolojik parametreler ve değerlendirme ölçütleri tablo 6'da özetlenmiştir.

Tüm mikroskopik incelemelerde X4, X10, X20, X40, X100 objektifler ve 10X/20L oküler içeren Olympus BX-51 T32PO1 model ışık mikroskopu kullanıldı. Elde edilen sonuçlar aynı model mikroskoba adapte DP71 dijital kamera ile fotoğraflandı.

Tablo 6. Çalışmada değerlendirilen sitomorfolojik parametreler

A- Hipokromazi	G- Nükleer boyut
Yok: 0	<1 eritrosit: 0
Var: 1	1-2 eritrosit: 1
B- Oval nükleus	>2 eritrosit, yaygın: 2
Yok: 0	H- İzole iri hücreler
Var: 1	Yok: 0
C- Nükleer yarık	Var: 1
Yok: 0	İ- Nükleol varlığı
Var: 1	Yok: 0
D- Üst üste yığılma	Var: 1
Yok: 0	Belirgin: 2
Var: 1	J- Kolloid
E- Nükleer psödoinklüzyon	Yok: 0
Yok: 0	Az: 1
Var: 1	Çok: 2
F- Nükleer köşelenme	K- Patern analizi
Yok: 0	Mikrofoliküler patern yok: 0
Var: 1	Hiposellüler, mikrofolikül yapısı ~%90: 1
	Sellüler, mikrofolikül yapısı ~%50: 2
	Sellüler, mikrofolikül yapısı ~%90: 3

Yukarıda tanımlanan sitomorfolojik parametrelerin malign tümör varlığı ile ilişkisi araştırıldı. Malign-benign ayırımında anlamlı bulunan parametrelerin tiroid kanserinin tanısı için sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif, negatif prediktif ve tanı doğruluğu değerleri belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı sitolojik parametrelerin, malignite riskini öngörebilecek bağımsız faktörler olup olmadığı değerlendirildi.

Anlamlı bulunan parametrelerin toplamı üzerinden bir skor sistemi oluşturuldu ve elde edilen skorların küçükten büyüğe doğru tiroid kanserlerini saptamadaki sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif, negatif prediktif ve tanı doğruluğu değerleri belirlendi.

Sitomorfolojik parametrelerin foliküler varyant ve diğer papiller karsinom alt tiplerine dağılımında anlamlı bir fark olup olmadığı araştırıldı.

B- BRAF ve NRAS gen mutasyon analizi

Tiroidektomi sonucu papiller karsinom ve MPBİDT tanısı alan olguların İİA materyallerine BRAF mutasyon analizi yapıldı. Sitolojik tanısı AUS/FLUS olan olgularda BRAF mutasyonu yanı sıra NRAS mutasyonu da araştırıldı.

Moleküler analiz için olguların sellülarite oranları göz önüne alınarak 1-3 adet preparat seçildi ve görüntü arşivi oluşturmak amacıyla fotoğraflandı. Seçilen yayma preparatlar kullanılarak sırası ile DNA izolasyonu, PCR ile DNA amplifikasyonu, BRAF ve NRAS gen mutasyonlarını saptamak için pyrosekanslama yöntemi ile DNA dizi analizi yapıldı. Moleküler analiz aşamaları ve kullanılan yöntemler Gereç ve Yöntem- Ek2’de detaylı olarak açıklanmıştır.

Tiroidektomi öncesi İİA’sı AUS/FLUS, FNK veya MK olarak değerlendirilmiş olgulardan oluşan bu seride yer alan papiller karsinom veya MPBİDT olgularında saptanan BRAF mutasyon oranları belirlendi ve bu testler preoperatif dönemde yapılmış olsa idi malign olguların seçimine katkısının ne kadar olacağı araştırıldı. Sitolojik tanısı AUS/FLUS olan olgularda aynı sorgulama NRAS gen mutasyonu için de yapıldı.

BRAF^{V600E} mutasyonu varlığının yukarıda tanımlanan sitomorfolojik parametreler ile ilişkisi değerlendirildi; mutasyon varlığını öngörmede herhangi bir parametrenin önemi olup olmadığı araştırıldı.

C- Kullanılan istatistiksel yöntemler

Çalışmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, III) 18.0 programı kullanılarak incelendi. Sitomorfolojik parametrelerin malignite, papiller karsinom alt tipi ve BRAF mutasyon analizi sonuçları ile ilişkisi araştırılırken χ^2 testi kullanıldı. Parametrelerin malignite riskini öngörmede bağımsız faktörler olup olmadığını belirlemek için multivaryans lojistik regresyon analizi uygulandı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sitomorfolojik parametrelerin sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve tanı doğruluğu değerleri dört gözlü tablo kullanılarak aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

$$(\text{Gerçek pozitif} / \text{Gerçek pozitif} + \text{Yanlış negatif}) \times 100 = \text{Sensitivite}$$

$$(\text{Gerçek negatif} / \text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış pozitif}) \times 100 = \text{Spesifisite}$$

$$(\text{Gerçek pozitif} / \text{Gerçek pozitif} + \text{Yanlış pozitif}) \times 100 = \text{Pozitif prediktif değer}$$

$$(\text{Gerçek negatif} / \text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış negatif}) \times 100 = \text{Negatif prediktif değer}$$

$$(\text{Gerçek pozitif} + \text{Gerçek negatif}) / (\text{Gerçek pozitif} + \text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış pozitif} + \text{Yanlış negatif}) \times 100 = \text{Tanı doğruluğu}$$

GEREÇ VE YÖNTEM EK.1

RADYOLOJİ EŞLİĞİNDE YAPILAN ASPIRASYONLARDA UYGULANAN YÖNTEM

- 1- Aspirasyon radyolog tarafından ultrasonografi eşliğinde lezyonun lokalizasyonu belirlendikten sonra 21-22 gauge'lik iğne kullanılarak yapılır.
- 2- Elde edilen materyal bir sitoteknolog tarafından lamlara yayılır, en az biri havada, geri kalanı %96'lık etil alkolde fikse edilir.
- 3- Her nodül için en az 3 yayma preparat hazırlanır. Etil alkolde fikse edilen yaymalardan biri hızlandırılmış hematoksilin-eozin yöntemi ile boyanarak incelenir, aspirasyon materyalinin yeterliliğine karar verilir. Yeterli ise işlem sonlandırılır, yetersiz ise en fazla üç kez tekrarlanır.
- 4- İşlem sonunda iğne ve enjektör içerisinde kalan materyal hücre bloğu hazırlanmak üzere %50'lik etil alkol içerisine yıkanır.
- 5- Sitoloji laboratuvarına getirilen yayma preparatlar tanısal inceleme için Papanicolaou (PAP) ve May-Grünwald-Giemsa (MGG) ile boyanır.

GEREÇ VE YÖNTEM EK. 2

MOLEKÜLER ANALİZ YÖNTEMİ

DNA İzolasyonu (BRAF ve NRAS)

Çalışmaya dahil edilen örneklerden DNA ekstraksiyon kiti (QiaAmp® DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen GmbH) kullanılarak genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

- Preparatlar ksilen içerisinde etüve alınır ve lameller açılana kadar 56°C’de bekletilir (yaklaşık 2 gece) bekletilir.
- Preparatlar üzerine lizis buffer damlatılır, bistüri ile kazınır, eppendorf tüpüne alınır.
- 180 ml ATL buffer - 20 ml proteinaz K eklenir, vortekslenir, etüvde 56°C’de 1 gece bekletilir.
- Vortekslenip içine 200 ml AL buffer ile 200 ml %96’lık alkol eklenir, vortekslenir. Örneklerin tamamı kolon tüplere yüklenir.
- 14000 devirde 2 dk. santrifüj edilir, tüpler değiştirilip 500 ml AW1 buffer eklenir, santrifüj edilir.
- Tüpler değiştirilip 500 ml AW2 eklenir, 14000 devirde 2 dk. santrifüj edilir.
- Tüpler tekrar değiştirilir, boş olarak 14000 devirde 2 dk. santrifüj edilir.
- Kolonlar eppendorf tüpü içine yerleştirilir, 200 ml ATE buffer eklenir, 2-3 dk. beklenir.
- 14000 devirde 2 dk. santrifüj edilir.
- Hazır olan örneklerin DNA konsantrasyonu spektrofotometre (NanoDrop) ile ölçülür. DNA konsantrasyonları 2-15 ng/ml arasında olmalıdır.

PCR Reaksiyonu (BRAF ve NRAS)

- theascreen® BRAF Pyro Kit içerisinde PyroMark PCR Miks, PCR Primer Kodon 600, PCR Primer Kodon 464-469 ve unmethylated Control DNA oda sıcaklığına getirilerek eritilir.

(NRAS için; theascreen® NRAS Pyro Kit içerisinde PyroMark PCR Miks, PCR Primer Kodon 12-13, PCR Primer Kodon 61 ve unmethylated Control DNA)

► Her örnek için 2 adet PCR tüpü hazırlanır (BRAF için; kodon 600 ve kodon 464-469, NRAS için; kodon 12-13, ve kodon 61).

► EK 2. Tablo 1’de belirtilen şekilde PCR miksleri hazırlanır.

EK 2. Tablo 1. PCR primer ve mikslерinin konsantrasyonlarının hesaplanması

Reaktif	Miktar (µl)	Örnek sayısı (n)	Toplam Miktar (µl)
PyroMark PCR Miks	12,5	n	12,5xn
BRAF; PCR Primer Kodon 600 veya PCR Primer Kodon 464-469	1	n	1xn
NRAS; PCR Primer Kodon 12-13 veya PCR Primer Kodon 61			
Yüksek Saflıkta H ₂ O	6,5	n	6,5xn
Toplam	20	n	20xn

► Miksler uygun tüplere 20’şer µl dağıtılır ve üzerine 5 µl DNA eklenir.

PCR Ürünlerinin Sekans için Hazırlanması (BRAF ve NRAS)

a- Başlamadan önce yapılacaklar

► Bu aşamadan sonra kullanılacak her türlü su Mili-Q cihazından elde edilen 18Ω ultra saf su olmalıdır.

► Denatürasyon Buffer, Annealing Buffer, Wash Buffer, Sepharose-High Performance, PyroMark Gold Reagent oda sıcaklığına getirilir.

NOT: PyroMark Gold Reagent içerisinde substrat ve enzim liyofilize halde bulunmaktadır. İlk kez açıldığında 620 µl ultra saf su ile çözülür ve tek kullanımlık miktarlarda tüplere paylaştırılarak alüminyum folyoya sarılır ve -20°C'ye kaldırılır. Dondurulan enzim ve substrat en fazla iki kere çözülebilir.

► 10X Wash Buffer 1X'e seyreltilir.

► %70 etanol hazırlanır.

b- Vakum İstasyonunun Hazırlanması

► Küvetler, ilgili malzemeler (%70 etanol, Denatürasyon Buffer, 1X Wash Buffer, Ultra saf su) ile doldurulur.

► Vakum çalıştırılır. H₂O-II yazılı küvetteki suyun tamamen çekilmesi sağlanır.

c- PCR Ürünlerinin Streptavidin ile İmmobilizasyonu

► Costar Plate 3'lü olarak ve seal, costar plate'i kapatacak büyüklükte kesilir.

► Hem kodon 600, hem de kodon 464-469 PCR ürünleri için EK 2. Tablo 2'de belirtilen konsantrasyonlarda karışımlar hazırlanır (NRAS için; kodon 12-13, ve kodon 61).

EK 2. Tablo 2. Streptavidin mikslerinin konsantrasyonları

Reaktif	Miktar (µl)	Örnek sayısı (n)	Toplam Miktar (µl)
Streptavidin High Performance	2	n	2xn
Binding Buffer	40	n	40xn
Yüksek Saflıkta H₂O	28	n	28xn
Toplam	70	n	70xn

► Miks costar plate kuyularına 70'er µl dağıtılır ve üzerine 10 µl PCR ürünü eklenir.

► Costar Plate'in üzeri seal ile kapatılır.

► Thermal Shaker’a yüklenir, 10 dk. 1400 rpm’de oda sıcaklığında çalıştırılır.

d- Sekans Primerlerinin Hazırlanması

► Promark Q24 Plate, plate holder’in üzerine konulur.

► Seq Primer Kodon 600 ve Seq Primer Kodon 464-469 için sekans primerleri ayrı tüplerde EK 2. Tablo 3’te belirtilen şekilde de hazırlanır (NRAS için; Seq Primer Kodon 12-13 ve Seq Primer Kodon 61).

EK 2. Tablo 3. Sekans primerleri ve Annealing Buffer konsantrasyonları

Reaktif	Miktar (µl)	Örnek sayısı (n)	Toplam Miktar (µl)
Annealing Buffer	24,2	n	24,2xn
BRAF; Seq Primer Kodon 600 veya Seq Primer Kodon 464-469	0,8	n	0,8xn
NRAS; Seq Primer Kodon 12-13 veya Seq Primer Kodon 61			
Toplam	25	n	25xn

► Hazırlanan miks PyroMark Plate’in uygun kuyularına 25’er µl dağıtılır, PyroMark Plate vakum istasyonuna yerleştirilir.

e- PCR ürünlerinin Sekans Primeri ile Bağlanması

► Vakum açılır, Thermal Shaker’dan çıkan PCR ürünleri hızlıca vakuma çekilir.

► Sırası ile 5 sn. %70 etanol, 5 sn. denatürasyon Buffer, 10 sn. Washing Buffer vakumla çekilir.

► Vakum ters çevrilir ve kapatılır.

► Vakum 1 dk. hafifçe sarsılarak PCR ürünlerinin PyroMark Plate içerisinde bulunan sekans primerleri ile bağlanması sağlanır.

- PyroMark Plate 80°C’de 3-4 dk. +4°C’de 15 dk. bekletilir.

f- Kartuşun Hazırlanması

- Nükleotidler kısaca vortekslenir ve spin santrifüj edilir.
- Kartuşun uygun pozisyonlarına uygun miktarlarda nükleotid, enzim ve substrat eklenir.
- Kartuş ve PyroMark Plate cihaza yerleştirilir, cihaz çalıştırılır.

Değerlendirme

- BRAF ve NRAS mutasyon analizleri PyroMark Q24 yazılımı kullanılarak yapılır. Basamaklar her iki mutasyon için de ortaktır.

- 1- İşlenmiş olan çalışma dosyasını içeren USB belleği bilgisayarın USB portuna takılır.
- 2- Windows Explorer kullanarak USB bellekteki çalışma dosyası bilgisayar üzerinde istenilen lokasyona aktarılır.
- 3- Ya ‘file’ menüsünden ‘Open’ seçilerek ya da kısa yol tarayıcısından dosya üzerine çift tıklayarak PyroMark Q24 yazılımının AQ modunda çalışma dosyası açılır.
- 4- Çalışmayı analiz etmek için analiz butonlarından birisine tıklanır.
- 5- Mutasyon raporu oluşturmak için menü içerisinden ‘AQ Analysis Results’ ya da ‘AQ Full Report’ seçilir.

- BRAF geninde kodon 600, kodon 464 ve kodon 469’da bulunan ve EK 2. Tablo 4’te pozisyonları ve deteksiyon limitleri verilen mutasyonlar analiz edilir.

- NRAS geninde kodon 12, kodon 13 ve kodon 61’de bulunan ve EK 2. Tablo 5’te pozisyonları ve deteksiyon limitleri verilen mutasyonlar analiz edilir.

- BRAF ve NRAS mutasyon analiz sonuçları deteksiyon limitleri ile karşılaştırılır ve aşağıda belirtilen şekilde analiz edilir.

- Mutasyon frekansı < Deteksiyon limiti: Yabanıl tip
- Mutasyon frekansı $\geq$ Deteksiyon limiti ve $\leq$ Deteksiyon limiti + %3 birim : Potansiyel düşük dereceli mutasyon
- Mutasyon frekansı > Deteksiyon limiti + %3 birim: Mutasyon

► Potansiyel düşük dereceli mutasyon saptanması durumunda iki kopya normal bir örnekle çift olarak tekrar analiz edilir. Eğer tekrarlar da orijinal analizlerle aynı sonucu verirse ve normal kontrollerden farklı olarak görülüyorsa, örnek bu mutasyon için pozitif kabul edilir. Sadece bir örnek dahi yabancı tipte dönüşüyorsa mutasyon negatif kabul edilmelidir.

EK 2. Tablo 4. BRAF geninde kodon 600, kodon 464 ve kodon 469’da tanımlanan mutasyonların pozisyonları ve deteksiyon limitleri

MUTASYON	AMİNOASİT DEĞİŞİKLİĞİ	DETEKSİYON LİMİTİ
Kodon 600 (GTG)		
GAG	V600E	2,0
GGG	V600G	2,0
GCG	V600A	3,0
GTA	V600M	1,8
Kodon 464 (GGA)		
GAA	G464E	3,5
Kodon 466 (GGA)		
GTA	G466V	2,9
Kodon 469 (GGA)		
GCA	G469A	3,8

EK 2. Tablo 5. NRAS geninde kodon 12, kodon 13 ve kodon 61’de tanımlanan mutasyonların pozisyonları ve deteksiyon limitleri

MUTASYON	AMİNOASİT DEĞİŞİKLİĞİ	DETEKSİYON LİMİTİ
Kodon 12 (GGT)		
AGT	G12A	3,4
TGT	G12C	2,6
CGT	G12D	2,4
GAT	G12R	3,8
GTT	G12S	8,8
GCT	G12V	2,5
Kodon 13 (GGT)		
AGT	G13A	3,2
TGT	G13C	3,2 (4)*
CGT	G13D	2,3
GAT	G13R	2,8
GTT	G13S	2,0 (5)*
GCT	G13V	2,8
Kodon 61 (CAA)		
AAA	Q61E	6,7
CGA	Q61H	2,2
CTA	Q61K	2,1
CAT	Q61L	1,9
CAC	Q61P	8,0
CAG	Q61R	5,8

*: Ölçülen bir frekans $\geq$ Deteksiyon Limiti ile sonuçlanan bir örnekteki en düşük mutasyon seviyesi.

V- BULGULAR

A- Demografik ve klinik bulgular

Çalışmaya alınan 98 olgunun 78'i kadın, 20'si erkek olup, yaşları 8 ile 68 arasında değişmekteydi. Tiroidektomi sonucu benign tanı alan ve yaşları 8 ile 62 arasında değişen 34 hastanın yaş ortalaması 43,17 iken, malign veya MPBİDT tanısı alan toplam 64 hastanın yaşları 10 ile 68 arasında değişmekteydi ve ortalama yaş bu grupta 45,16 olarak belirlendi. Benign grupta yer alan hastaların 27'si kadın (%35), 7'si erkek (%35), malign gruptakilerin ise 51'i kadın (%65), 13'ü erkekti (%65).

Nodül çapları değerlendirildiğinde benign tanıli olgularda ortalama çapın 19,07 mm, malign tanıli olgularda ise 17,44 mm olduğu görüldü. Nodül çapları ayrıca 4 gruba ayrılarak da incelendi. Benign olguların 6'sı 1. grupta (≤ 10 mm), 13'ü 2. grupta (11-20 mm), 7'si 3. grupta (21-30 mm), 4'ü 4. gruptaydı (>30 mm). Malign olgularda ise sıralama 23, 22, 12, 6 şeklindeydi. Benign tanı alan beş olguda nodül çapları belirlenemediğinden incelemeye alınmadı. Olgulara ait demografik ve klinik özellikler tablo 7'de özetlenmiştir.

İstatistiksel değerlendirmede benign ve malign grup arasında yaş ortalamaları, cinsiyet ve nodül çapı açısından anlamlı bir ilişki saptanmadı (sırası ile; $p=0.609$, $p=0.974$, $p=0.455$).

TABLO 7. Malign ve benign olarak gruplara ayrılan olguların demografik ve klinik özellikleri

	MALİGN*	BENİGN	P değeri
YAŞ (n=98)			
Ortalama $\pm$ SD	45,16 $\pm$ 15,97	43,17 $\pm$ 14,00	0,609
CİNSİYET (n=98)			
KADIN	51 (%65)	27 (%35)	0,974
ERKEK	13 (%65)	7 (%35)	
NODÜL ÇAPI (n=90)			
≤ 10 mm	23 (%79)	6 (%21)	0,455
11-20 mm	22 (%63)	13 (%37)	
21-30 mm	12 (%63)	7 (%37)	
>30 mm	6 (%60)	4 (%40)	

*MPBİDT tanısı alan 2 olgu malign grupta ele alınmıştır.

B- Sitolojik ve histopatolojik tanıların karşılaştırılması

Çalışma kapsamına alınan 98 olgunun sitolojik olarak tekrar değerlendirilmesinde, ilk incelemede 34'ü AUS/FLUS, 23'ü FN/FNK, 36'sı MK, 5'i 'kuşkulu sitolojik bulgular' tanısı almış bu olguların 34'ü AUS/FLUS, 21'i FN/FNK, 43' ü MK olarak kategorize edildi. Toplam 12 olguda kategoriler arasında tanı değişikliği yapılmış oldu. Üç AUS olgusundan 1'i FN/FNK, 2'si MK, 7 FN/FNK olgusundan 2'si AUS/FLUS, 5'i MK, 2 MK olgusu ise AUS olarak sınıflandırıldı. Ayrıca ilk değerlendirmede Bethesda Sistemi kullanılmayıp, 'kuşkulu sitolojik bulgular' tanısı verilen 5 aspirasyondan 4'üne FN/FNK, 1'ine MK tanısı verildi.

Olgulara ait tiroidektomi materyallerinin histopatolojik tanıları patoloji raporları üzerinden incelendiğinde, hedef lezyonlardan 62'sinin malign (61 papiller karsinom, 1 medüller karsinom), 2'sinin malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör (MPBİDT), 34'ünün benign olarak raporlandığı belirlendi.

Malignite oranlarının AUS/FLUS kategorisi için %37.5, FN/FNK kategorisi için %62, MK kategorisi için %86 olduğu görüldü ve olgulara Bethesda Sistemi'ne göre verilen tanıları ile malignite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.00$). (Tablo 8)

TABLO 8. Olguların Bethesda kategorilerine dağılımı ve bu kategorilerde tiroidektomi sonrası saptanan malignite oranları

BETHESDA KATEGORİSİ	MALİGN (n=62) (Tiroidektomi)	BENİGN (n=34) (Tiroidektomi)	TOPLAM (n=96)*	p değeri
AUS/FLUS	12 (%37.5)	20 (%62.5)	32 (%100)*	0,000
FN/FNK	13 (%62)	8 (%38)	21 (%100)	
MK	37 (%86)	6 (%14)	43 (%100)	

* Tiroidektomide malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör tanısı verilen 2 olgu histopatolojik olarak malign/benign ayırımı yapılamamış olduğundan malignite oranları belirlenirken hesaplamaların dışında bırakılmıştır.

Tiroidektomi materyalleri papiller karsinom tanısı alan 61 olgunun 44'ü (%72) foliküler varyant, 17'si (%28) diğer varyantlar (9'u klasik varyant, 4'ü onkositik varyant, 1'i Warthin

benzeri varyant, 1'i solid varyant, 1'i makrofoliküler varyant, 1'i anaplastik tipe transformasyon gösteren papiller karsinom) olarak tiplendirilmişti. Olgular arasında ayrıca 2 MPBİDT, 1 medüller karsinom bulunmaktaydı.

Benign tanı alan olguların ise 18'i multinodüler hiperplazi, 9'u nodüler hiperplazi, 4'ü tiroidit, 3'ü adenom (Hürthle hücreli, foliküler ve mikrofoliküler adenom) tanısı almıştı.

Bethesda Sistemi'ne göre gruplandırılan olguların histopatolojik tanıları tablo 9'da özetlenmiştir.

TABLO 9. Bethesda Sistemi'ne göre gruplandırılan olguların histopatolojik tanıları

	Nodüler Hiperplazi		Tiroidit	Adenom	PK	MPBİDT	Med.K	Toplam
	Tek	Multipl						
AUS/FLUS	4	11	2	3	11	2	1	34
FN/FNK	2	4	2	-	13	-	-	21
MK	3	3	-	-	37	-	-	43
TOPLAM	9	18	4	3	61	2	1	98

Kısaltmalar: MPBİDT (Malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör), Med.K: Medüller karsinom.

İnce iğne aspirasyon materyalleri yeterlilik açısından incelendiğinde 40 olguda yayma kalitesi, fiksasyon ve hücreliliğin yeterli olduğu görüldü; 49 olguda (6'sı benign, 43'ü malign) fiksasyon kusuru ve hücrelerin büyük bölümünün pıhtı içine gömülü oluşuna bağlı teknik problemlerin bulunduğu, 9'unda ise (4'ü benign, 5'i malign) hiposellülarite nedeni ile değerlendirmenin güçleştiği dikkati çekti.

C- Sitomorfolojik bulgular

Ayrıntılı sitolojik inceleme yapılan 98 İİA materyalinde 11 sitomorfolojik parametre (hipokromazi, oval nükleus, nükleer yarıklanma ve üst üste yığılma, nükleer köşelenme,

psödoinklüzyon varlığı, nükleus boyutu, izole iri nükleus varlığı, nükleol varlığı, patern, kolloid varlığı) araştırıldı.

Tüm olgular arasında hipokromazi 68 olguda (%69), oval nükleus 69 olguda (%70), nükleer yarıklanma 46 olguda (%47), üst üste yığılma 58 olguda (%59), nükleer köşelenme 18 olguda (%18), psödoinklüzyon 11 olguda (%11) belirlendi. Malign olguların ise 48'inde (%75) hipokromazi, 49'unda (%77) oval nükleus, 39'unda nükleer yarıklanma (%61), 45'inde (%70) üst üste yığılma, 16'sında (%25) nükleer köşelenme, 11'inde (%17) psödoinklüzyon gözlemlendi.

Nükleus boyutu üç kategori üzerinden değerlendirildi. Olguların 26'sında (%27) 1 eritrositten küçük, 61'inde (%62) 1-2 eritrosit boyutunda, 11'inde (%11) yaygın olarak 2 eritrositten büyük olarak saptandı. Benign olguların 12'sini (%35) nükleer irileşmenin gözlenmediği olgular, 20'sini (%59) 1-2 eritrosit boyutunda nükleuslar içeren olgular, 2'sini de (%6) iki eritrositten büyük nükleusların gözlemlendiği olgular oluşturmaktaydı. Malign olgularda bu oran sırası ile %22 (14 olgu), %64 (41 olgu) ve %14 (9 olgu)'tür.

İzole iri nükleuslar içeren 15 olgu (%15) saptandı. Bu olguların 7'sinin (%47) benign grupta, 8'inin ise (%53) malign grupta yer aldığı görüldü. İzole iri nükleusların izlendiği olgular benign grubun %21'ini, malign grubun ise %13'ünü oluşturmaktaydı.

Nükleol 30 olguda (%31) gözlenmiş olup, 18'i malign grupta yer almaktaydı. Biri benign, diğeri malign 2 olguda ise belirgin görünümde olduğu dikkati çekti.

Patern analizinde 39'u malign tanı alan 57 olguda (%58) belirgin mikrofoliküler patern saptanmadı. Mikrofoliküler patern gözlenen 41 olgunun (%42), 11'i (%11) hiposellüler olup ~%90 mikrofoliküler görünüm sergilemekteydi, 16'sı (%17) hem sellüler olup, hem ~%90 mikrofolikül yapısı içermekteydi. Ondört olguda (%14) ise sellüler materyalde ~%50 mikrofolikül yapısı izlenmekteydi. Mikrofoliküler paterni baskın ancak hiposellüler olan 11 olgunun 6'sı, hem sellüler olup hem mikrofoliküler paterni baskın olan 16 olgunun 9'u ve sellüler olup kısmen mikrofoliküler patern sergilenen 14 olgunun 10'u malign olgulardı.

Kolloid varlığı değerlendirildiğinde 69 (%70) aspirasyonda kolloid olmadığı, -46'sı malign karakterli- 13 aspirasyonda (%13) az miktarda, 16 aspirasyonda (%17) ise çok miktarda bulunduğu belirlendi. Her iki grupta da 9'ar tane tiroidektomisi malign tanı alan aspirasyon mevcuttu.

Sitomorfolojik parametrelerin benign-malign ayırımındaki olası rolünü araştırmak amacıyla yapılan istatistiksel analizde, nükleer yarıklanma ($p=0,000$), nükleer üst üste yığılma ($p=0,002$), nükleer köşelenme ($p=0,016$) ve psödoinklüzyon varlığı ($p=0,007$) ile malignite arasında anlamlı ilişki bulundu. Buna karşın, hipokromazi ($p=0,078$), oval nükleus ($p=0,056$), nükleus boyutu ($p=0,231$), fokal iri nükleus varlığı ($p=0,290$), patern ($p=0,656$), nükleol ($p=0,729$) ve kolloid varlığı ($p=0,696$) ile anlamlı ilişki saptanmadı. Olgulara ait sitomorfolojik bulguların detayları Tablo 10'da özetlenmiştir.

Malignite ile ilişkili bulunan dört parametrenin sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve tanı doğruluğu değerleri sırası ile; nükleer yarıklanma için %61, %79, %85, %52, %67, nükleer üst üste yığılma için %70, %62, %78, %53, %67, nükleer köşelenme için %25, %94, %89, %40, %49, psödoinklüzyon için %17, %100, %100, %39, %46 olarak belirlendi (Tablo 11).

İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu 4 parametrenin her birine 1 değeri verilerek bir skor skalası oluşturuldu. Malignite ile anlamlı ilişki gösterebilecek minimum skor araştırıldı. Sonuç olarak; skoru sadece 1 olan olguların bile malign olma olasılıklarının, skoru 0 olan olgulara göre anlamlılık gösterecek derecede yüksek olduğu belirlendi ($p=0,0001$). Toplam skor 1 ve üzeri olduğunda sensitivite %90, NPD %75 iken, 2 ve üzeri olduğunda sensitivite %55'e, NPD %50'ye, 3 ve üzeri olduğunda sensitivite %27'ye, NPD %41'e düşmektedir. Aynı sıralama ile spesifisite %53'ten, %85 ve %97'ye, PPD %78'den, %88, %94'e yükselmektedir. Tanı doğruluğu ise skor arttıkça azalmaktadır (%78, %65, %51) (Tablo 13).-Çalışmamızda toplam skoru üç olan 7, dört olan 1 olgu bulunmaktaydı. Bu olgulardan 16'sı MK, 1'i AUS/FLUS, 1'i de FN/FNK kategorisinde tanı almıştı.

Multivaryans lojistik regresyon analizinde ise nükleer yarıklanma ($p=0,030$) ve üst üste yığılmanın ($p=0,029$) maligniteyi öngörmede bağımsız risk faktörleri oldukları belirlendi (Odds oranları sırası ile 3,2 (%95 CI=1,1-9,2) ve 2,9 (%95 CI=1,1-7,8) (Tablo 12) .

Patolojik olarak papiller karsinom tanısı alan olgularda, sitomorfolojik parametrelerin foliküler varyant ve diğer alt tiplere dağılımı incelendi; bu gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı araştırıldı. Nükleer özellikler ve kolloid varlığı ile aralarında anlamlı bir ilişki gözlenmezken, sellüler olsun veya olmasın, baskın olarak mikrofoliküler patern içeren olguların foliküler varyant açısından istatistiksel olarak anlam taşıdığı belirlendi ($p=0,027$).

TABLO 10. Histopatolojik olarak malign ve benign gruplara ayrılan olguların sitomorfolojik özellikleri

	MALİGN (n=64)	BENİGN (n=34)	P değeri
HİPOKROMAZİ			
Yok	16 (%25)	14 (%41)	0,078
Var	48 (%75)	20 (%59)	
OVAL NÜKLEUS			
Yok	15 (%23)	14 (%41)	0,056
Var	49 (%77)	20 (%59)	
YARIKLANMA			
Yok	25 (%39)	27 (%79)	0,000
Var	39 (%61)	7 (%21)	
NÜKLEER ÜST ÜSTE YIĞILMA			
Yok	19 (%30)	21 (%62)	0,002
Var	45 (%70)	13 (%38)	
NÜKLEER KÖŞELENME			
Yok	48 (%75)	32 (%94)	0,016
Var	16 (%25)	2 (%6)	
PSÖDOİNKLÜZYON			
Yok	53 (%83)	34 (%39)	0,007
Var	11 (%17)	0 (%0)	
NÜKLEUS BOYUTU			
<1 eritrosit	14 (%22)	12 (%35)	0,231
1-2 eritrosit	41 (%64)	20 (%59)	
Yaygın >2 eritrosit	9 (%14)	2 (%6)	
İZOLE İRİ NÜKLEUS (fokal >2 eritrosit)			
Yok	56 (%88)	27 (%79)	0,290
Var	8 (%12)	7 (%21)	
NÜKLEOL			
Yok	46 (%72)	22 (%65)	0,729
Var	17 (%26)	11 (%32)	
Belirgin	1 (%2)	1 (%3)	
MİKROFOLİKÜLER PATERN			
Yok	39 (%61)	18 (%53)	0,656
~%90 A*	6 (%9)	5 (%15)	
~%50 B*	10 (%16)	4 (%12)	
~%90 B*	9 (%14)	7 (%20)	
KOLLOİD			
Yok	46 (%72)	23 (%68)	0,696
Az	9 (%14)	4 (%12)	
Çok	9 (%14)	7 (%20)	

A*: Hiposellüler yaymalar, B*: Sellüler yaymalar.

TABLO 11. Nükleer yarıklanma, nükleer üst üste yığılma, nükleer köşelenme ve psödoinklüzyonun sensitivite, spesifisite, PPD, NPD ve TD oranları

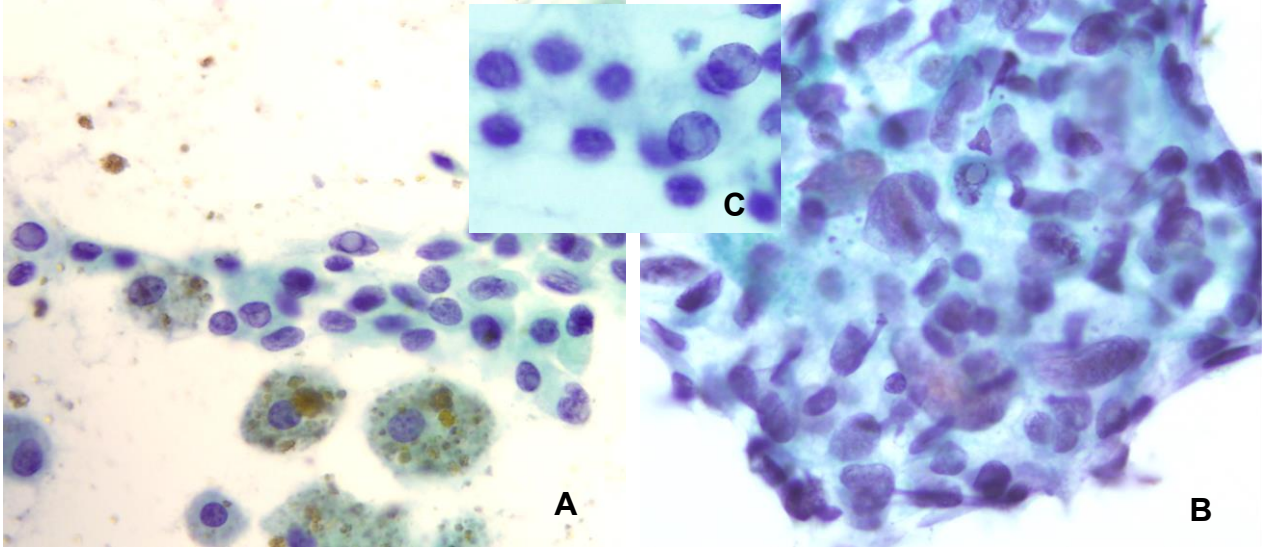
	SENSİTİVİTE (%)	SPESİFİSİTE (%)	PPD (%)	NPD (%)	TD (%)
NÜKLEER YARIKLANMA	61	79	85	52	67
NÜKLEER ÜST ÜSTE YIĞILMA	70	62	78	53	67
NÜKLEER KÖŞELENME	25	94	89	40	49
PSÖDOİNKLÜZYON	17	100	100	39	46

TABLO 12. Multivaryans lojistik regresyon analizi sonucunda bağımsız değişken olarak belirlenen sitomorfolojik parametreler

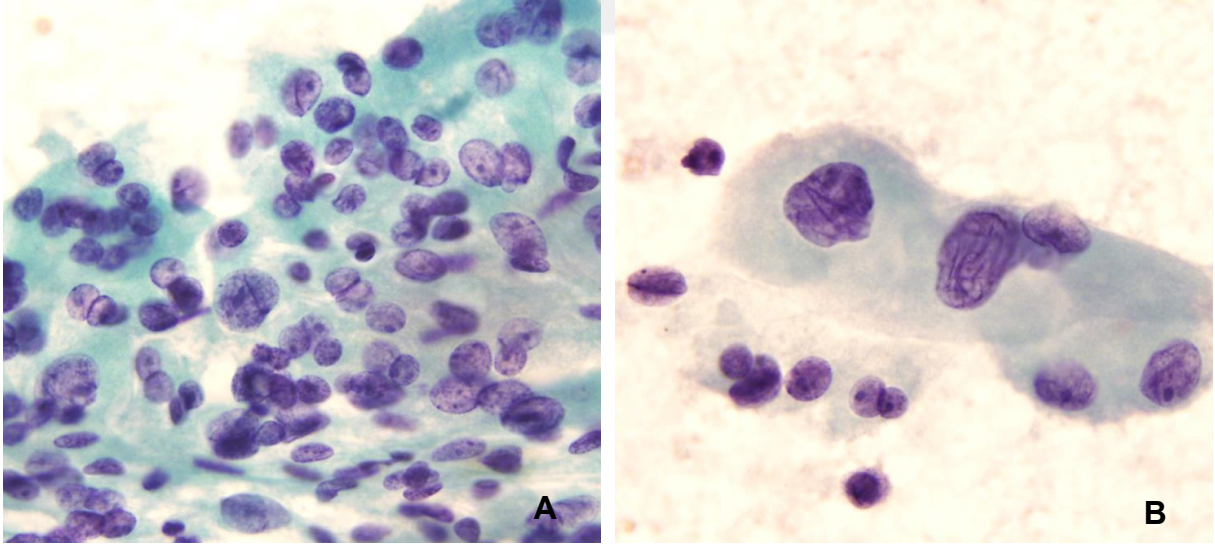
	Odds oranı	%95 Güven aralığı	P değeri
Nükleer yarıklanma	3,2	1,1-9,2	0,030
Nükleer üst üste yığılma	2,9	1,1-7,8	0,029

TABLO 13. Toplam skora göre belirlenen sensitivite, spesifisite, PPD, NPD ve TD oranları

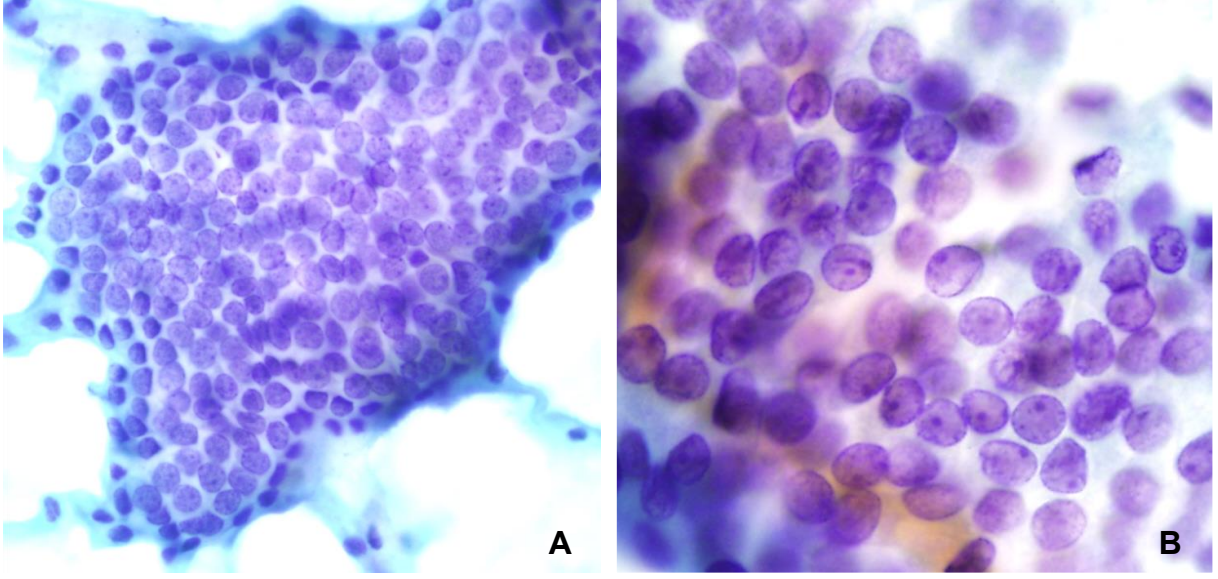
TOPLAM SKOR	SENSİTİVİTE (%)	SPESİFİSİTE (%)	PPD (%)	NPD (%)	TD (%)
1 ve üzeri (n=74)	90	53	78	75	78
2 ve üzeri (n=40)	55	85	88	50	65
3 ve üzeri (n=18)	27	97	94	41	51



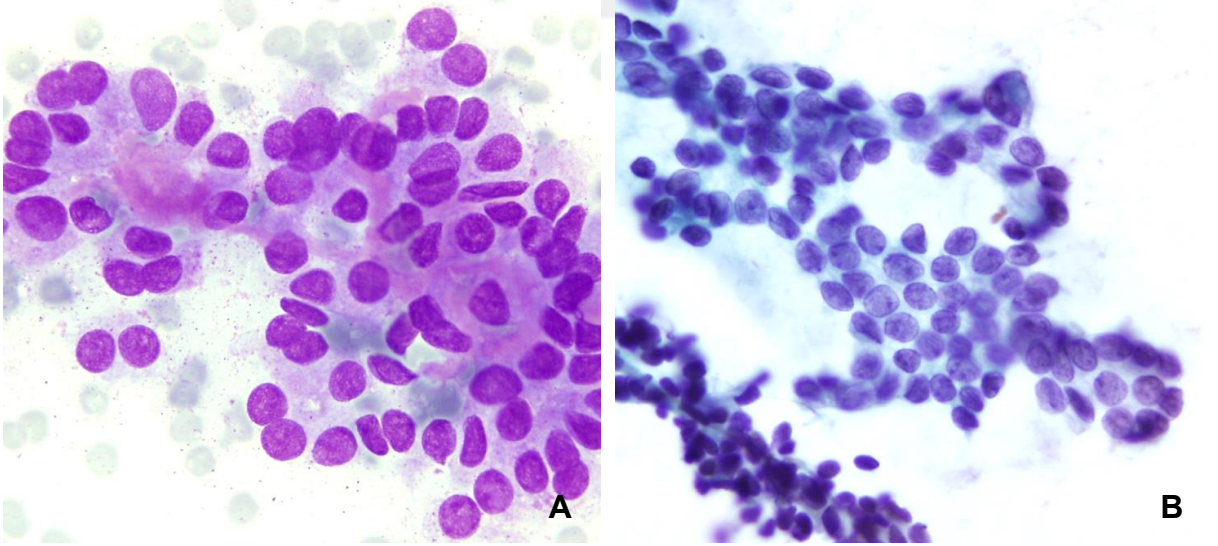
Resim 1. Nükleer psödoinklüzyon/psödoinklüzyon benzeri yapılar. **Sitolojik Tanı:** A- Malignite Kuşkusu, B- Malignite Kuşkusu, C- Foliküler Neoplazi. **Patoloji Tanısı:** A,B,C- Papiller Karsinom (A- Prot. No: 23563-09, PAP, X400, B- Prot. No: 2187-09, PAP, x1000, C- Prot. No:2903-10, PAP, x1000).



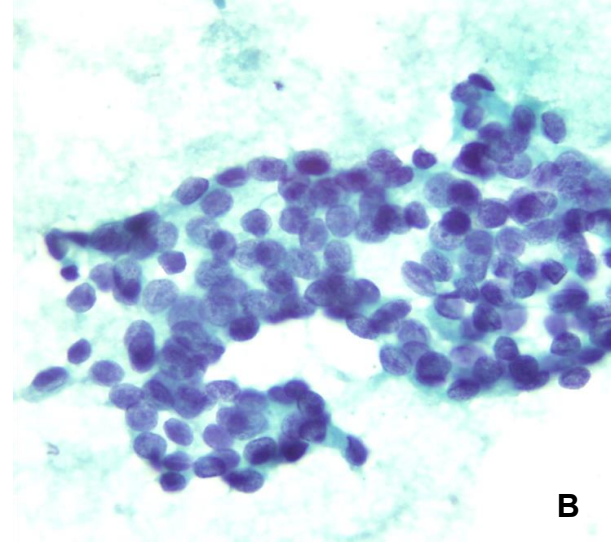
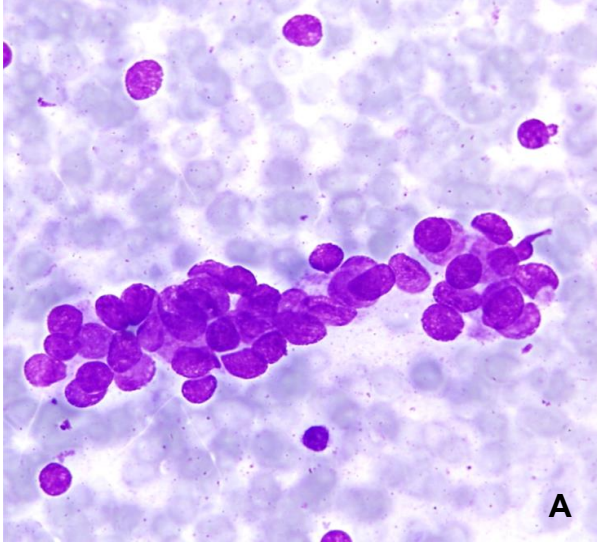
Resim 2. Nükleer yarıklar. **Sitolojik Tanı:** A, B- Foliküler Neoplazi, Hürthle Hücreli Tip. **Patoloji Tanısı:** A, B- Papiller Karsinom (A, B- Prot. No: 1109-10, PAP, x1000).



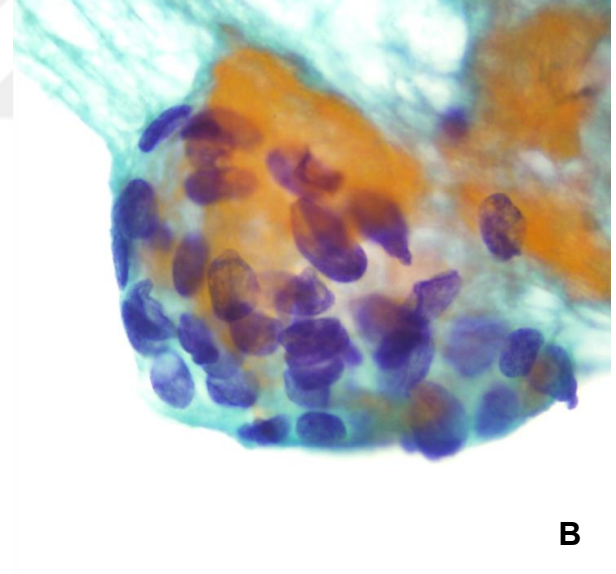
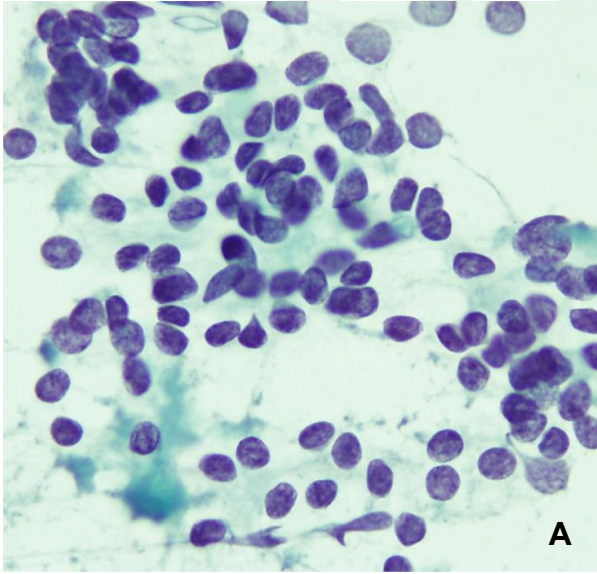
Resim 3. Nükleer hipokromazi. **Sitolojik Tanı:** A- Malignite Kuşkusu, B- Malignite Kuşkusu. **Patoloji Tanısı:** A, B-Papiller Karsinom (A- Prot. No: 29893-09, PAP, x400, B- Prot. No: 35470-09, PAP, x1000).



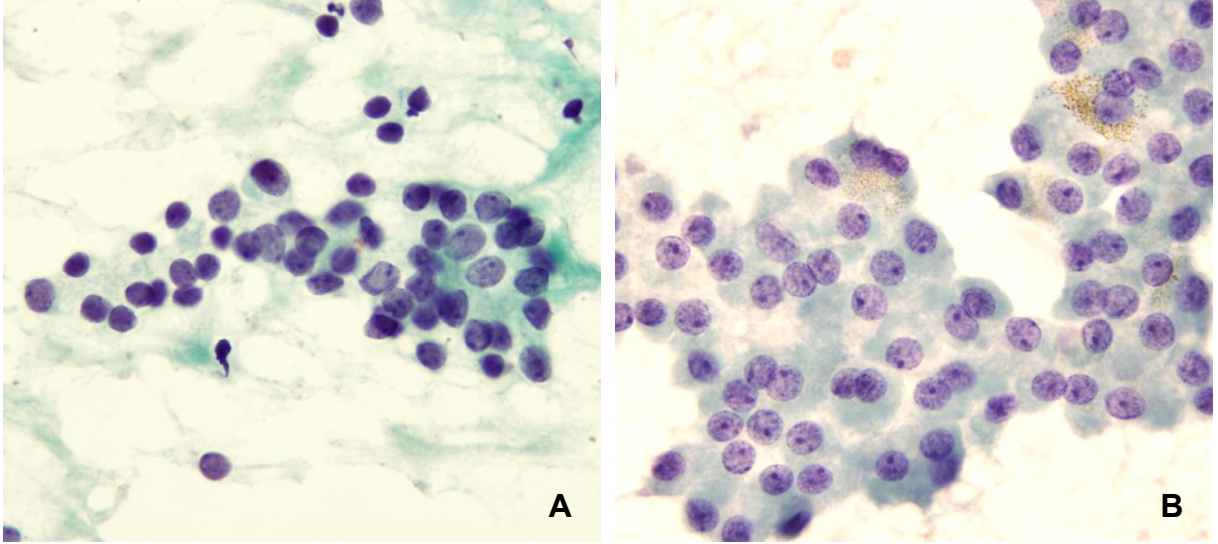
Resim 4. **Sitolojik Tanı:** Nükleuslarda oval görünüm. A- Malignite Kuşkusu, B- Malignite Kuşkusu. **Patoloji Tanısı:** A,B- Papiller Karsinom (A- Prot. No: 31540-10, MGG, x1000, B- Prot. No: 35470-09, PAP, x400).



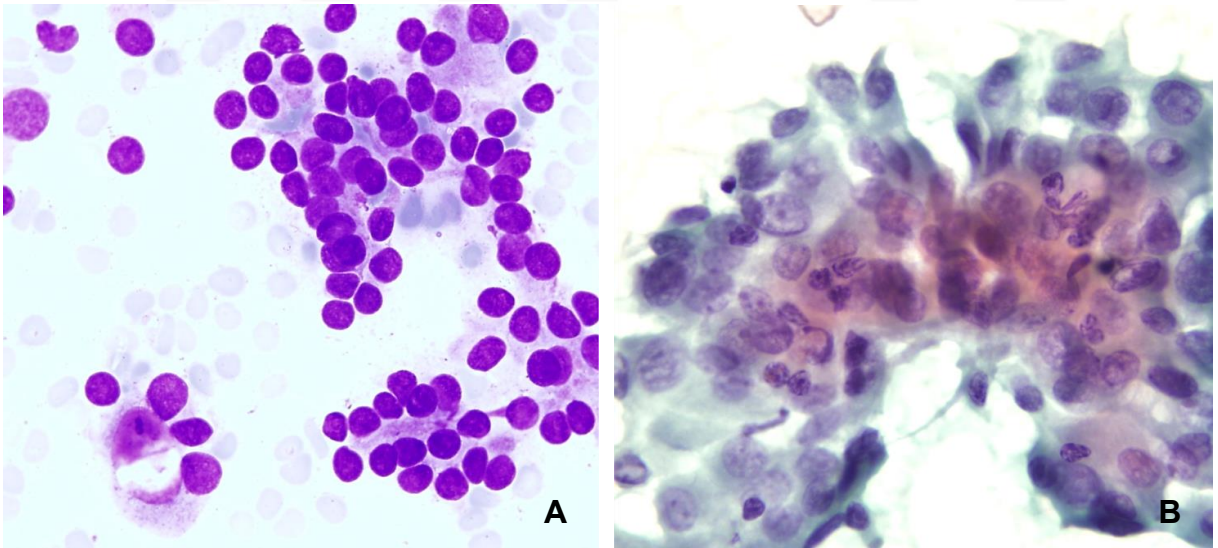
Resim 5. Nükleer üst üste yığılma. **Sitolojik Tanı:** A- Malignite Kuşkusu, B- Önemi Belirsiz Foliküler Lezyon. **Patoloji Tanısı:** A- Papiller Karsinom, B- MPBİDT (A- Prot No: 21399-09, MGG, x1000, B- Prot. No: 34903-10, PAP, x400).



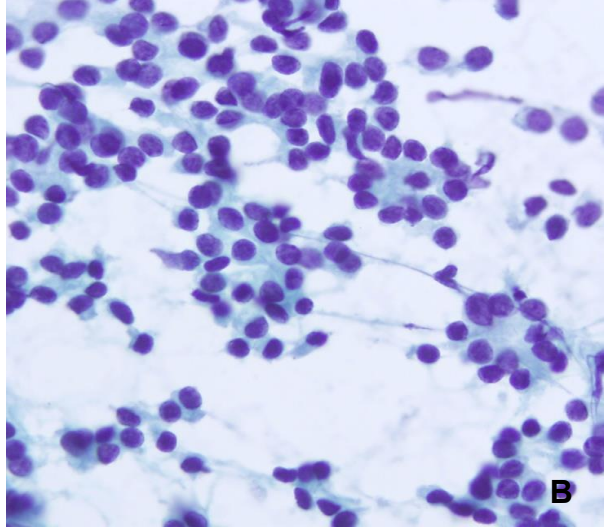
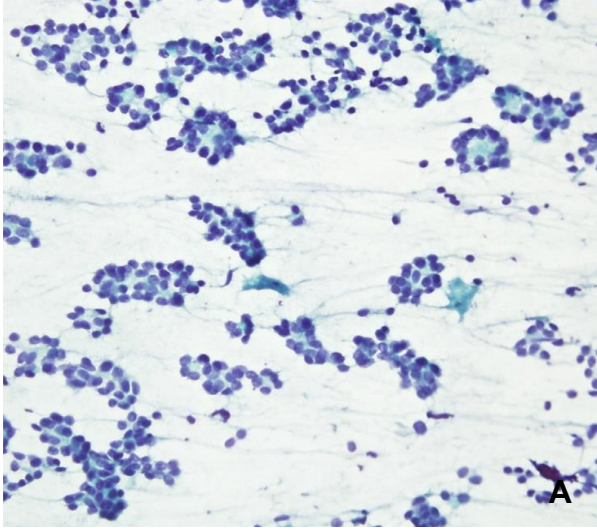
Resim 6. Nükleer köşelenme. **Sitolojik Tanı:** A- Foliküler Neoplazi Kuşkusu, B- Önemi Belirsiz Atipi. **Patoloji Tanısı:** A, B- Papiller Karsinom (A- Prot No: 21815-10, PAP, x400, B- Prot. No: 7409-09, PAP, x1000).



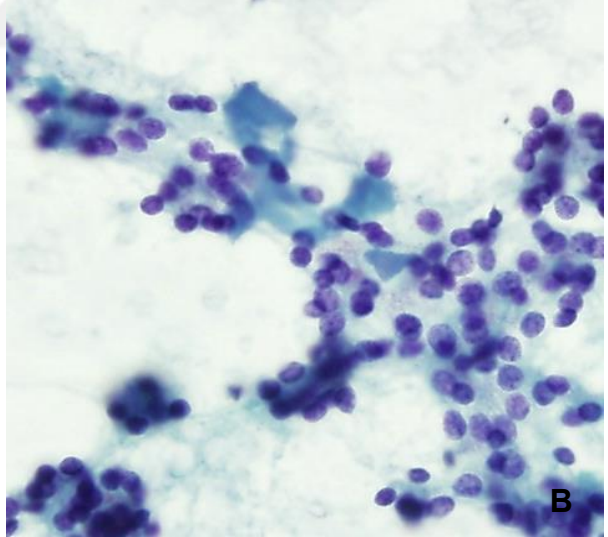
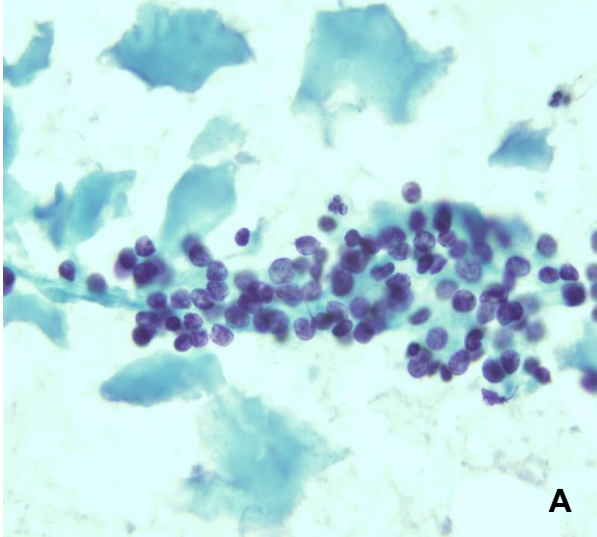
Resim 7. Nükleol varlığı. Sitolojik Tanı: A- Foliküler Neoplazi Kuşkusu, B- Foliküler Neoplazi Kuşkusu, Hürthle Hücreli Tip. **Patoloji Tanısı:** A, B- Papiller Karsinom (A- Bazı nükleuslarda seçilebilen, bir kısmı nükleer membrana yakın yerleşimli nükleoller, Prot No: 21815-10, PAP, x400, B- Nükleusların tamamına yakınında gözlenen belirgin nükleoller, Prot. No: 1109-10, PAP, x1000).



Resim 8. Nükleer irileşme. Sitolojik Tanı: A- Önemi Belirsiz Foliküler Lezyon, B- Malignite Kuşkusu. **Patoloji Tanısı:** A, B- Papiller karsinom (A- 1-2 eritrosit boyutunda nükleuslar, Prot No:38504-10, MGG, x400, B- Yaygın olarak 2 eritrositten büyük olarak gözlenen nükleuslar, Prot. No:33784-09, PAP, x1000).



Resim 9. Mikrofoliküler patern. **Sitolojik Tanı:** A- Malignite Kuşkusu, B- Foliküler Neoplazi. **Patoloji Tanısı:** A, B- Papiller karsinom (A- Prot No: 27703-09, B- 42192-10).



Resim 10. Yoğun sakızsı kolloid. **Sitolojik Tanı:** A, B- Foliküler Neoplazi. **Patoloji Tanısı:** A, B- Papiller Karsinom (A, B- Prot No: 21693-10, x400).

D- Moleküler analiz sonuçları

Çalışmamızın moleküler incelemeleri kapsayan bölümünde, histopatolojik olarak papiller karsinom tanısı almış 61 olgu ve malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör tanısı almış 2 olguya BRAF gen mutasyonlarını saptamak amacı ile pyrosekanslama yöntemi ile DNA dizi analizi yapıldı. Biri foliküler varyant, diğeri klasik varyant iki olguda DNA miktarı yetersiz olduğundan sonuç alınamadı. Toplam 6 olguda BRAF^{V600E} mutasyonu (kodon 600, nükleotid 1799, GTG>GAG) saptandı. Mutasyon varlığı belirlenen olgular alt tiplere ayrılarak incelendiğinde, foliküler varyant papiller karsinom olgularının 3'ünde (3/43-%6.9) klasik tip papiller karsinom olgularının 2'sinde (2/8 %25) ve Warthin benzeri varyant papiller karsinom olgusunda (1/1) mutasyon varlığı belirlendi. Onkositik varyant (4), makrofoliküler varyant (1), solid varyant(1) ve anaplastik tipe transformasyon gösteren (1) papiller karsinom olgularında mutasyon saptanmadı. MPBİDT tanısı alan 2 olguda da mutasyon izlenmedi. Papilla yapıları ile karakterli 9 olgu (8 klasik varyant, 1 Warthin benzeri varyant) ayrıca ele alındığında mutasyon oranının %33'e yükseldiği gözlemlendi (3/9) (Tablo 14).

BRAF^{V600E} mutasyonu saptanan olgularda öne çıkan sitomorfolojik parametreleri araştırmak amacı ile yapılan değerlendirmede, mutasyon varlığı ile nükleer yarıklanma ve psödoinklüzyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu belirlendi (p=0,038, p=0,019). Nükleer yarıklanma ve inklüzyonun sensitivite, spesifisite, PPD, NPD ve TD değerleri sırası ile; %100, %44, %16, %100, %97 ve %50, %87, %30, %94, %84 olarak belirlendi (Tablo 15).

BRAF^{V600E} mutasyonu belirlenen olguların 6'sı da MK kategorisinde tanı almasına rağmen, sitolojik tanı kategorisi ile mutasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

BRAF^{V600E} mutasyonu dışında 2 örnekte (onkositik varyant ve makrofoliküler varyant papiller karsinom olguları) BRAF^{G464E} (kodon 464, nükleotid 1391, GGA>GAA) mutasyonu, 2 örnekte de (onkositik varyant papiller karsinom ve MPBİDT olguları) BRAF^{G469A} (kodon 469, nükleotid 1406, GGA>GCA) mutasyonları belirlendi.

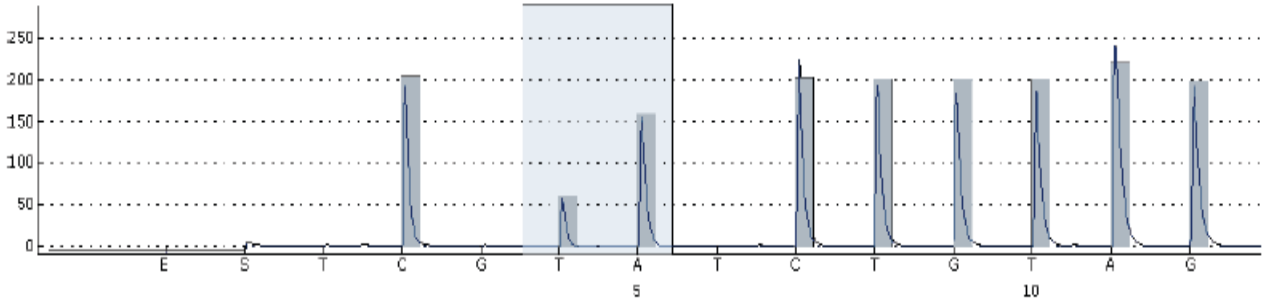
TABLO 14. BRAF^{V600E} mutasyon oranları

Papiller Karsinom Varyantları	BRAF ^{V600E} (+) (n=6)	BRAF ^{V600E} (-) (n=55)	TOPLAM (n=61)
Foliküler varyant	3 (%6,9)	40 (%93,1)	43 (%100)
Klasik varyant	2 (%25)	6 (%75)	8 (%100)
Warthin benzeri varyant	1 (%100)	0	1 (%100)
Onkositik varyant	0	4 (%100)	4 (%100)
Makrofoliküler varyant	0	1 (%100)	1 (%100)
Solid varyant	0	1 (%100)	1 (%100)
Anaplastik tipe transformasyon gösteren varyant	0	1 (%100)	1 (%100)
Malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör	0	2 (%100)	2 (%100)

TABLO 15. Psödoinklüzyon ve nükleer yarıklanmanın sensitivite, spesifisite, PPD, NPD ve TD oranları

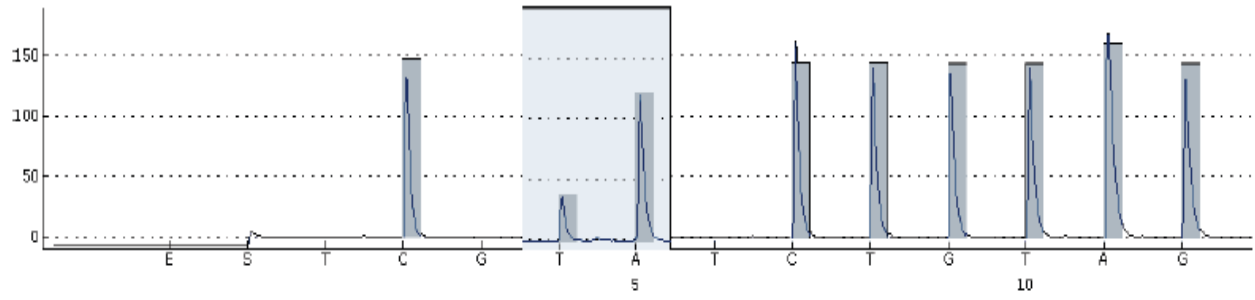
	SENSİTİVİTE (%)	SPESİFİSİTE (%)	PPD (%)	NPD (%)	TD (%)
PSÖDOİNKLÜZYON	50	87	30	94	84
NÜKLEER YARIKLANMA	100	44	16	100	97

AUS/FLUS kategorisinde NRAS mutasyonu araştırılabilen 12 olgunun sadece 1'inde (foliküler varyant papiller karsinom olgusu) NRAS kodon 61'de (nükleotid 182) CAA>CGA nokta mutasyon saptandı (%8).



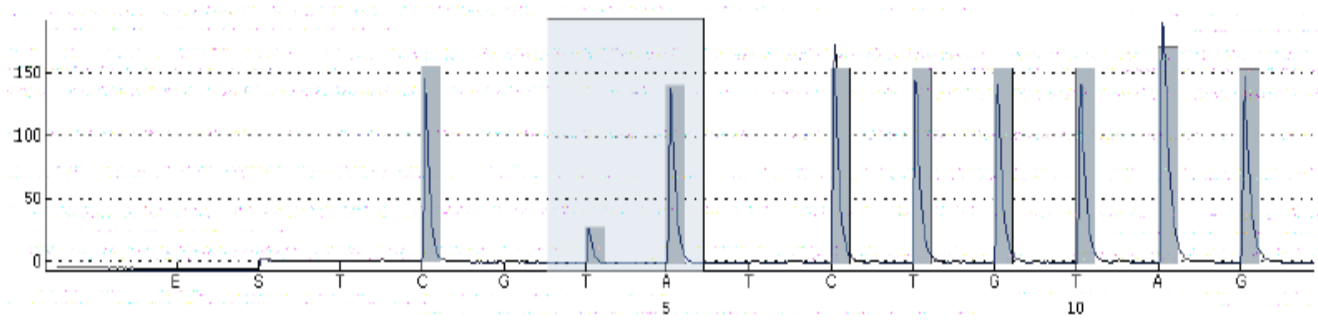
Result	Mutation
Frequency	29,2 % units (LOD: 2,4 % units)
Nucleotide Substitution	1799T>A
Amino Acid Substitution	V600E
Quality	Passed

Grafik 1. 8247-09 prot. no'lu olguda saptanan BRAF geni Kodon 600 (nükleotid 1799) GTG>GAG mutasyonuna ait Pyrogram ve 'plug-in' sonuçları.



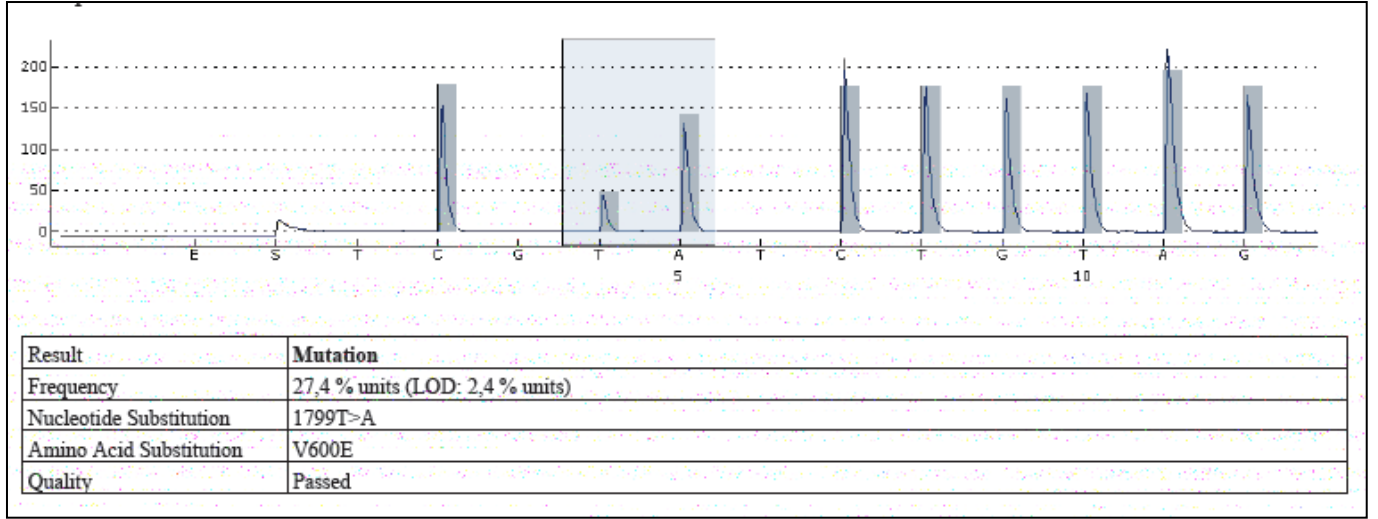
Result	Mutation
Frequency	25,0 % units (LOD: 2,4 % units)
Nucleotide Substitution	1799T>A
Amino Acid Substitution	V600E
Quality	Passed

Grafik 2. 23675-09 prot. no'lu olguda saptanan BRAF geni Kodon 600 (nükleotid 1799) GTG>GAG mutasyonuna ait Pyrogram ve 'plug-in' sonuçları.

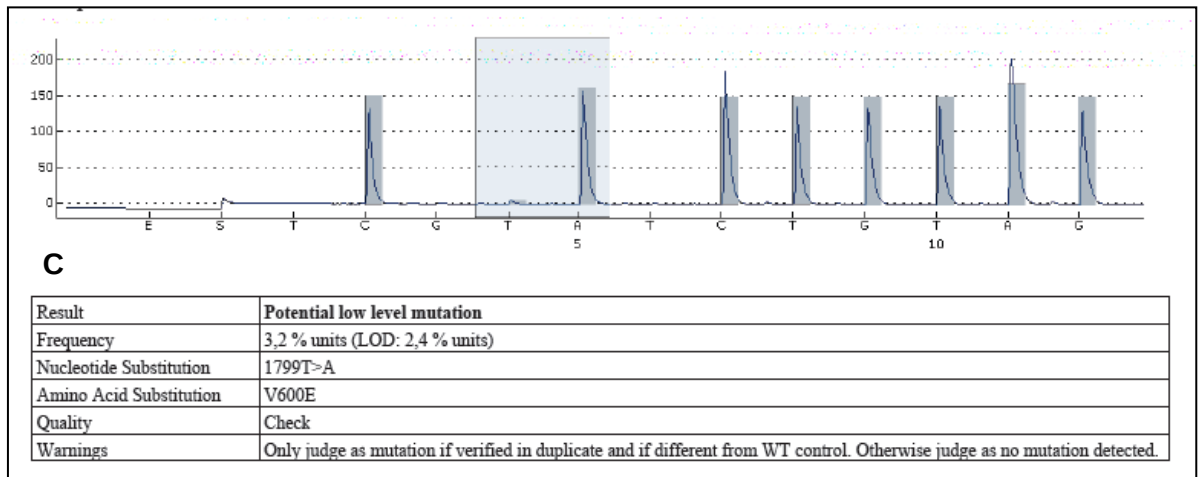
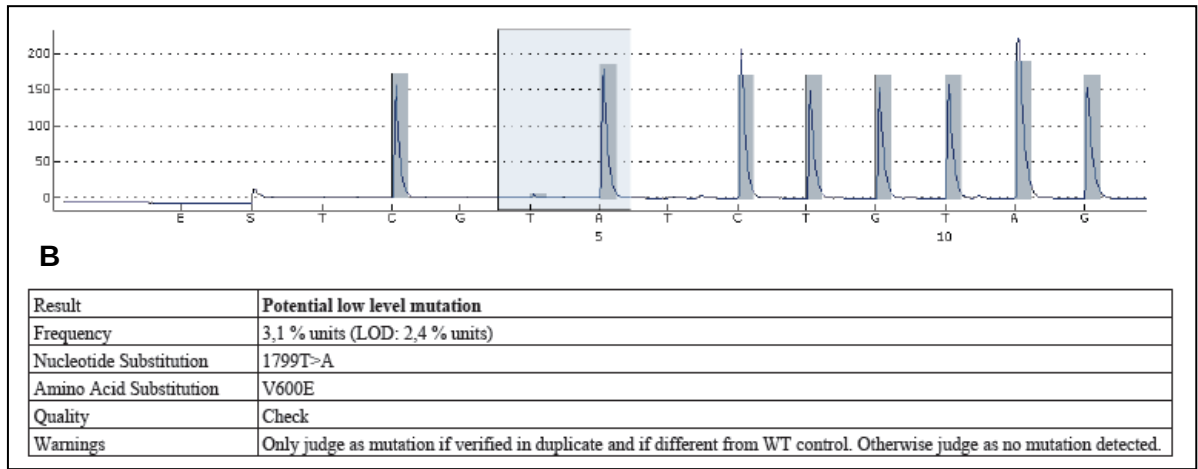
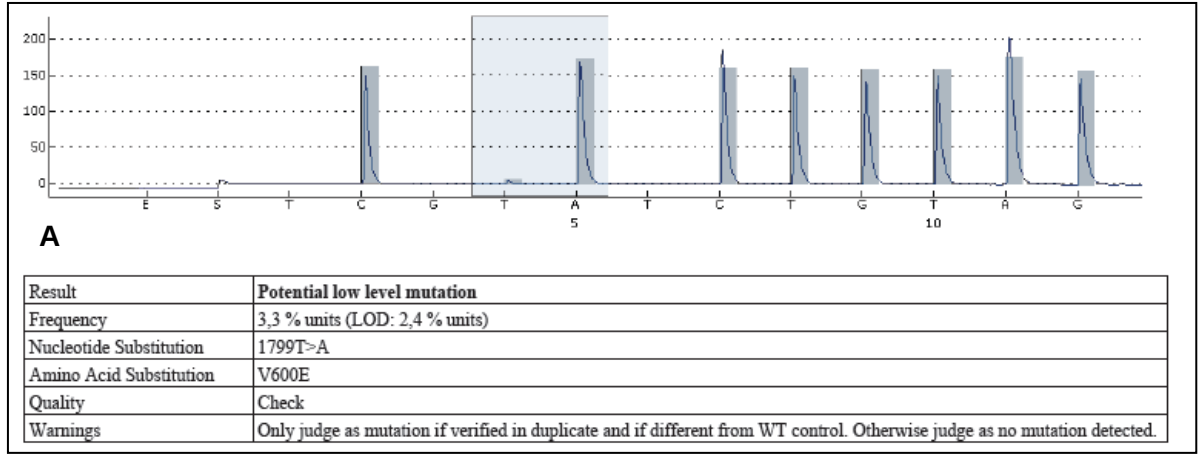


Result	Mutation
Frequency	18,4 % units (LOD: 2,4 % units)
Nucleotide Substitution	1799T>A
Amino Acid Substitution	V600E
Quality	Passed

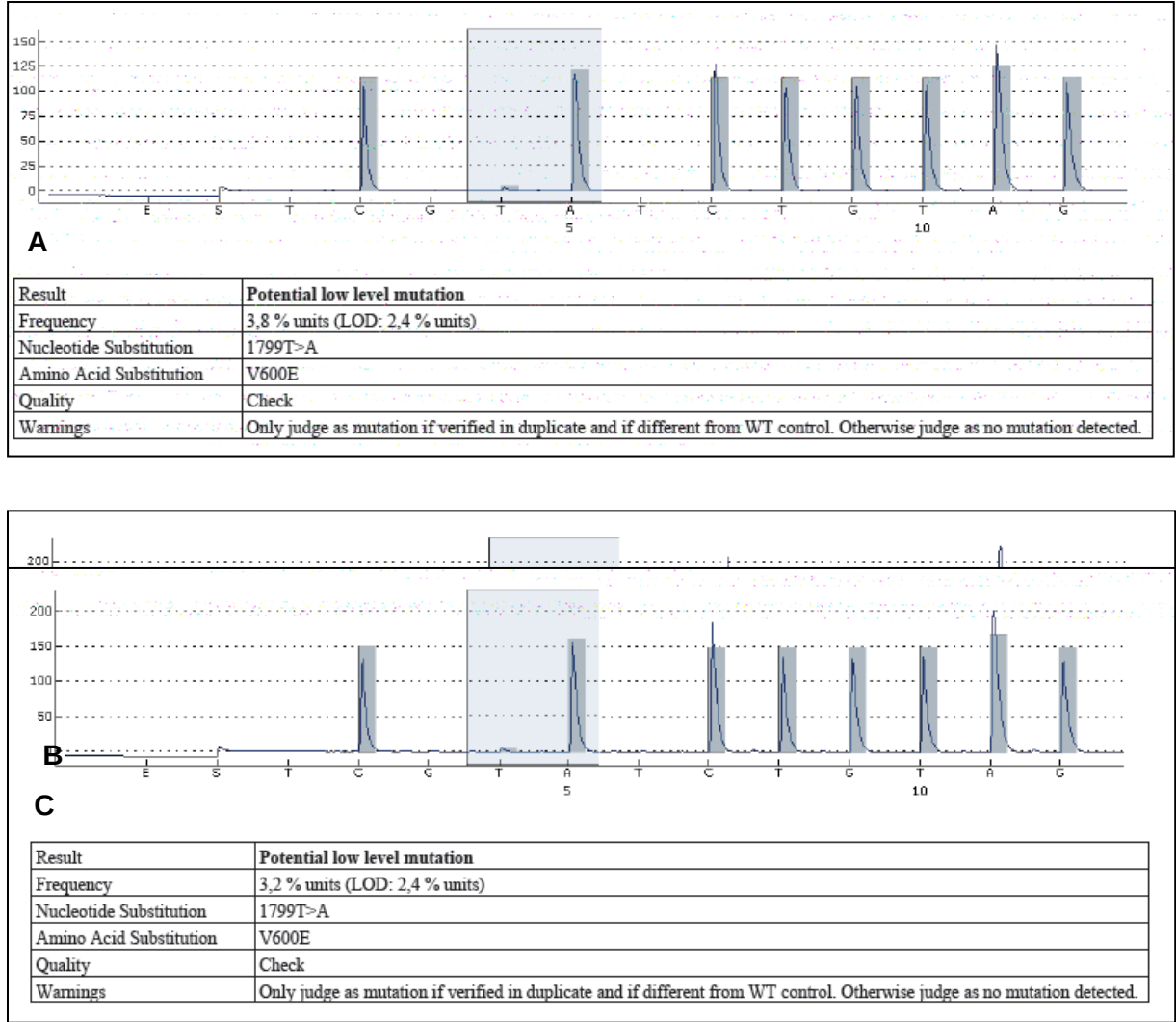
Grafik 3. 39087-09 prot. no'lu olguda saptanan BRAF geni Kodon 600 (nükleotid 1799) GTG>GAG mutasyonuna ait Pyrogram ve 'plug-in' sonuçları.



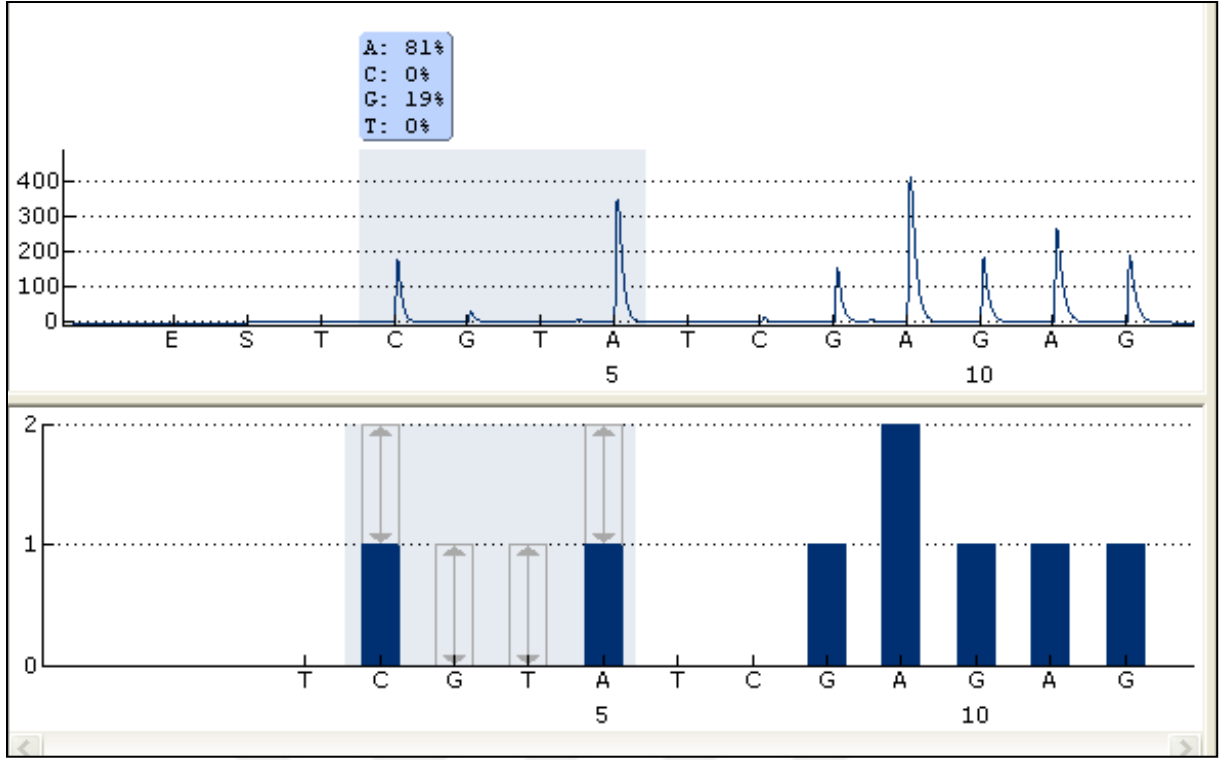
Grafik 4 . 39306-10 prot. no'lu olguda saptanan BRAF geni Kodon 600 (nükleotid 1799) GTG>GAG mutasyonuna ait Pyrogram ve 'plug-in' sonuçları.



Grafik 5. A, B, C- ‘Potansiyel düşük pozitif mutasyon’ saptanıp, iki kez tekrarlanan ve aynı sonuç elde edilmesi üzerine Pyromark Q24 yazılım ve değerlendirme protokolleri doğrultusunda pozitif kabul edilen 28994-10 prot. no’lu olguda, BRAF geni Kodon 600 (nükleotid 1799) GTG>GAG mutasyonuna ait Pyrogram ve ‘plug-in’ sonuçları.



Grafik 6. A, B, C- ‘Potansiyel düşük pozitif mutasyon’ saptanıp, iki kez tekrarlanan ve aynı sonuç elde edilmesi üzerine Pyromark Q24 yazılım ve değerlendirme protokolleri doğrultusunda pozitif kabul edilen 33784-09 prot. no’lu olguda, BRAF geni Kodon 600 (nükleotid 1799) GTG>GAG mutasyonuna ait Pyrogram ve ‘plug-in’ sonuçları.



Grafik 7. 26825-09 prot. no'lu olguda saptanan NRAS kodon 61 (nükleotid 182) CAA>CGA mutasyonuna ait Pyrogram ve Histogram sonuçları.

VI- TARTIŞMA

Toplumda yetişkin popülasyonda klinik bulgu veren palpabl tiroid nodüllerinin insidansı %4-7 oranında belirlenirken, değerlendirmeye ultrasonografik inceleme ve otopsi serileri de eklenince aslında bu oranın 10 katına ulaşabileceği öngörülmektedir (1, 61). Kadınlarda, yaşlı bireylerde (65 yaş üzerindeki bireylerin yaklaşık %50'sinde), radyasyona maruz kalanlarda, diyetinde iyot eksikliği veya fazla miktarda guatrojen besin bulunan bireylerde daha sık görülen tiroid nodüllerine ait ince iğne aspirasyon örnekleri ve tiroid rezeksiyon materyalleri patologların günlük pratikte çok sık karşılaştıkları spesimenlerdir (8).

Tiroid nodüllerinin büyük bölümü benign olmakla birlikte yaklaşık %5'i malign karakterlidir (28). Tiroid kanserlerinin %80'inden fazlasını oluşturan papiller karsinomda 10 yıllık sağ kalım oranı %93, 10-20 yıl içerisinde nüks oranı %20-30 olarak belirlenmiş, hastalığa bağlı nedenlerle ölüm oranının %10'a ulaşabildiği gösterilmiştir (56, 61).

Takip ve tedavi sürecinde, çok sayıda benign tiroid nodülü arasından malign olma ihtimali daha yüksek olan nodüllerin belirlenmesi klinik açıdan oldukça önemli bir aşamadır. Geçtiğimiz yıllarda bu amaçla kullanılan görüntüleme yöntemleri ve sintigrafik incelemelerin yerini günümüzde büyük ölçüde ultrasonografi eşliğinde yapılan ince iğne aspirasyonu almıştır. Güvenilir, ucuz, minimal invaziv, kolaylıkla uygulabilen ve tekrarlanabilen, tanı doğruluğu oldukça yüksek bir test olan İİA tiroid nodüllerinin tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (25, 26, 28, 63, 64). İnce iğne aspirasyonunun rutin kullanıma girmesinden sonra cerrahi girişimler %25 oranında azalırken, cerrahi spesmenlerde saptanan karsinomların oranı %15'ten %30'a yükselmiştir (65). Bu artışın yarısından papiller mikrokarsinomlar sorumludur (66). Karsinom insidansındaki artışa rağmen, mortalite oranlarının aynı seviyede kalmasının sebeplerinden birinin mikrokarsinomların büyük bölümünün prognozunun oldukça iyi olması, diğerinin ise aşırı tanı olabileceği düşünülmektedir. Dolayısı ile morfolojik olarak malign olguların tanısı yanı sıra biyolojik olarak daha agresif davranış gösterme potansiyeli olan karsinomların saptanması da önem kazanmaktadır (1).

Tiroid İİA'larının değerlendirmesi günümüzde yaygın olarak Bethesda Sistemi'ne göre yapılmaktadır. Bethesda Sistemi, malignite olasılığı üst kategorilere doğru giderek artan altı basamaklı bir raporlama sistemidir (14). Literatüre bakıldığında, benign ve malign tanılarda yüksek pozitif ve negatif prediktif değerlere sahip olan İİA'ların %5-42'sinin indetermine kategoride tanı aldığı görülmektedir. İndetermine grupta yer alan olguların önemli bir kısmına

cerrahi girişim uygulanmaktadır. Sonuçta, rezeksiyondan sonra benign tanı alan hastalara gereksiz cerrahi girişim uygulanmış olmakta; malign tanı alan hastalarda ise ikinci operasyon zorunluluğu doğabilmektedir (67). Ancak yöntemin doğası gereği indetermine grup varlığını korumaktadır; olguların tümünde kesin olarak benign-malign ayırımını yapmak mümkün olmamaktadır.

İnce iğne aspirasyonu, papiller karsinom, medüller karsinom, indifferansiye karsinom ve lenfomadan oluşan tiroid malignitelerine yönelik bir tanı testi olarak, buna karşılık foliküler karsinoma yönelik bir tarama testi olarak kullanılmaktadır (61). Selüler hiperplastik nodül, foliküler adenom ve foliküler karsinomu birbirinden ayıran güvenilir bir sitolojik kriter bulunmamaktadır; kesin tanı için kapsül varlığı ve invazyonun değerlendirildiği histopatolojik inceleme gereklidir. Bu grup ile örtüşen bir diğer lezyon FVPK'dur. Foliküler varyant papiller karsinomun karakteristik nükleer özelliklerinin bazı olgularda belirgin olmayışı veya fokal varlığı diğer foliküler lezyonlardan (selüler hiperplastik nodül, foliküler adenom, foliküler karsinom) ayırımında yaşanan güçlüğü temel sebepleridir (61, 63, 68, 69, 70, 71). Çalışma grubumuzda yer alan papiller karsinom olgularının büyük bir kısmının da (%72) FVPK oluşu bu açıdan dikkat çekicidir.

İndetermine grup, foliküler lezyonlarla sınırlı değildir. İnce iğne aspirasyonu ile kesin tanı verilebilen ancak hücresel yetersizlik, preparat kalitesini olumsuz etkileyen faktörler, bazı olguların sitolojik tanı kriterlerinin tümünü taşınamaması gibi nedenlerle de olgular kesin tanı alamayıp, indetermine grupta değerlendirilebilirler.

Bethesda Sistemi indetermine grubu 3'e ayırmaktadır: AUS/FLUS, FN/FNK ve MK. Bu kategoriler için öngörülen malignite riskleri sırası ile %5-15, %15-30, %60-75'tir (2).

Çalışma grubumuz tiroid İİA'sı indetermine grupta değerlendirilmiş 78 kadın (%80), 20 erkek (%20) hastadan oluşmaktadır. Tiroidektomi sonucu benign tanı alan olguların 27'si kadın (%35), 7'si erkek (%35), malign tanı alanların ise 51'i kadın (%65), 13'ü erkektir (%65). Cinsiyet dağılımı değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak her iki grupta da kadın hasta sayısının erkek hastaların dört katı olduğu(6, 8), ancak benign ve malign tanıların her iki cinsiyette de aynı oranda görüldüğü belirlenmiştir. Literatürde erkek cinsiyetin malignite açısından bir risk faktörü olduğu (63, 65, 69), erkeklerde belirlenen bir nodülün, kadınlara oranla iki kat daha fazla malignite riski taşıdığı gösterilmiştir (1). Ancak sonuçlarımıza benzer şekilde, cinsiyetin malignite riski açısından anlam taşımadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (72, 73).

Diğer bir klinik parametre olan yaş ile papiller karsinom ilişkisi değerlendirildiğinde, tümörün geniş bir yaş dağılımı göstermekle birlikte, genellikle 4-5. dekatta tanı aldığı ancak 20 yaş altında ve 60 yaş üzerindeki hastalarda belirlenen nodüllerin malignite risklerinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir (8, 10, 12). Olgularımızın yaş ortalamaları benzer şekilde benign grupta 43, malign grupta 45 olup, kadın ve erkekler arasında belirgin farklılık saptanmamıştır. Raber ve ark.'nın 120, Miller ve ark.'nın 107 olgudan oluşan serilerinde de yaşın papiller karsinom riskini arttıran bir faktör olmadığı belirlenmiştir (72, 73). Rago ve ark.'nın 34.120 hasta üzerinden klinik parametreler ile papiller karsinom ilişkisini araştırdıkları geniş bir çalışmada, karsinomun benign nodüler hastalıklara oranla daha genç yaşta tanı aldıkları sonucuna varılmıştır (65). Deveci ve ark.'nın sunmuş oldukları 339 olguyu içeren seride de malignite riskinin 40 yaş altında, 40 yaş üstüne oranla anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (69).

Dört gruba ayırarak değerlendirmeye aldığımız tümör çaplarının, benign ve malign grup arasında belirgin bir farklılık göstermediği, genel ortalamaya baktığımızda ise tümör çaplarının her iki grupta da birbirine yakın değerlerde (19 ve 17 mm) olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar literatürde daha önce de bildirilmiştir (69, 72, 73). Baloch ve ark.'nın 184 foliküler neoplazi olgusunu değerlendirdikleri retrospektif bir çalışmada 3 cm üzerindeki nodüllerde malignite riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (63). Nodül çapı büyüdükçe malignite oranının arttığını bildiren başka yayınlar da mevcuttur ancak bu durumun büyük nodüllerde İİA'nın sensitivitesinin daha yüksek oluşu ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir (1). Ancak nodül çapı büyüdükçe (>3 cm) sensitivitenin azaldığını bildiren çalışmalar da vardır. Renshaw AA'nın 501 papiller karsinom olgusu üzerinde yaptığı çalışmada tümör çapı ile İİA'nın sensitivitesinin korele olduğu, 1-3 cm çapındaki tümörlerde sensitivitenin yüksek, 0,5 cm'den küçük ve 3 cm'den büyük tümörlerde ise sensitivitenin daha düşük olduğu bildirilmiştir (74). Benzer şekilde Jo ve ark.'nın 996 tiroid karsinomunu değerlendirdikleri serilerinde de klasik varyant papiller karsinom olgularında İİA sensitivitesinin genel olarak %88, 1,1-2,9 cm çaplı tümörlerde %91, 1 cm'nin altında ve 3 cm'nin üzerindeki tümörlerde ise %88 ve %77 olduğu belirlenmiştir. Foliküler varyant papiller karsinom olgularında ise sensitivite genel olarak daha düşük olup (%78), en yüksek sensitivite oranı (%79) 1,1-2,9 cm çaplı tümörlerde bildirilmiştir (75).

Sonuç olarak; literatürde cinsiyet, yaş ve tümör çapını içeren klinik parametrelerin malignite ile ilişkisi hakkında farklı görüşler bulunmakla birlikte, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu faktörlerin hiçbirinin malignite riskini arttırmadığı görüşünü destekler niteliktedir.

İstatistiksel değerlendirmede benign ve malign grup arasında yaş ortalamaları, cinsiyet ve nodül çapı açısından anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.609$, $p=0.974$, $p=0.455$). Çalışma grubumuzun 98 olgu içeren nispeten küçük bir grup oluşu, İİA uygulanan tüm olguları kapsamaması, yalnızca sitolojik olarak indetermine kategorilerde yer alan olguları içermesinin bu sonuca katkıda bulunmuş olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda malign grupta yer alan 62 olgunun 61'inin (%98.3) histopatolojik olarak papiller karsinom (1 olgu medüller karsinom) tanısı aldığı görülmektedir. Papiller karsinomların %72'sini FVPK oluşturmaktadır. Bu oran indetermine kategoride tanı alan örneklerin değerlendirildiği diğer serilerin sonuçları ile uyumludur ve papiller karsinomun sitolojik değerlendirmesinde tanı güçlüğüne en sık foliküler varyant papiller karsinomda yaşandığını doğrular niteliktedir (63, 76, 77). Foliküler varyant papiller karsinom, sitolojik tanı güçlüğü yaratan bir lezyondur. Bu olguların ancak bir kısmı papiller karsinom ya da papiller karsinom kuşkusu tanısı alabilmekte; önemli bir kısmı FN/FNK ve AUS/FLUS olarak değerlendirilirken, %10-17'si sitolojide "benign" olarak yorumlanmaktadır (78, 79, 80).

Bethesda Sistemi'ne göre benign ve malign kategoriler arasında kalan ve indetermine grup olarak adlandırdığımız AUS/FLUS, FN/FNK, MK kategorileri için malignite oranları çalışmamızda sırası ile %37.5, %62 ve %86 olarak belirlenmiştir. Bu kategorilerin, literatürle uyumlu olarak artan bir risk skalası oluşturduğu görülmüş; malignite ile ilişkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.00$). Ancak 2007 yılında Bethesda'da ayrıntıları ile sunulan bu raporlama sisteminde tahmini malignite oranları her üç kategori için de daha düşük olarak belirtilmiştir (%5-15, %15-30, %60-75) (14). Daha sonraki yıllarda literatürde yer alan serilerde de benzer oranlar bildirilmiş; Bongiovanni ve ark. tarafından 2012'de yayınlanan, 8 çalışmanın sonuçlarını derleyen meta-analizde malignite oranlarının AUS/FLUS, FN/FNK, MK için sırası ile %15,9, %26,1, %75,2 olduğu gösterilmiştir (76, 77, 81). Bununla birlikte farklı oranlar bildiren yayınlar da mevcuttur. Theoharis ve ark.'nın 3207 tiroid İİA'ını inceledikleri serilerinde kategorilere göre belirledikleri malignite riskleri sırası ile %48, %34 ve %87'dir. AUS/FLUS kategorisinde belirlenen çarpıcı yükseklik, bu olguların sadece bir bölümünün (%30) opere edilmiş olması ile ilişkilendirilmiştir (82). Renshaw'un 1331 tiroid rezeksiyonunu değerlendirdiği çalışmasında ise MK kategorisi için belirlediği malignite oranının serimizde elde ettiğimiz orandan daha yüksek olduğu (%99) belirlenmiştir (83). Sevgen ve ark.'nın Bethesda Sistemi'nin indetermine olgularda malignite riskini belirlemedeki etkinliğini değerlendirdikleri 655 olguluk serilerinde ise malignite oranları sırası ile %18,9, %45,7 ve %71 olarak belirlenmiştir (84).

Çalışmamızda belirlediğimiz oranlara en yakın sonuçları elde eden araştırmacılar, yine İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2004-2007 yıllarında rapor edilmiş 515 hastaya ait 581 tiroid İİA'yı değerlendiren Özlük ve ark.'dır (27). İnce iğne aspirasyonlarını Bethesda Sistemi'ne göre yeniden kategorize ettikleri çalışmalarında belirledikleri oranlar AUS/FLUS kategorisinde %36, FN/FNK kategorisinde %66, MK kategorisinde %81'dir. Oranların yüksekliğini histolojik takipleri bulunan ve çalışmaya dahil edilen hasta popülasyonunun klinik ve radyolojik olarak yüksek risk grubunda oluşu ile açıklamaktadırlar (27). İstanbul Tıp Fakültesi'nin bir referans merkezi olması bu tür olguların oranını artırıyor olabilir ve aynı enstitüden birbiri ardına yapılan çalışmaların benzer sonuçları bu düşüncüyü doğrular niteliktedir.

Sitolojik olarak AUS/FLUS tanısı alan olguların izlemi için önerilen aspirasyon tekrarıdır (14). Ancak bu olgular, sitolojik tanıdan bağımsız olarak diğer klinik ve radyolojik risk faktörlerini taşıdıkları için direkt tiroidektomiye alınmış olabilirler. Nitekim bu grupta yer alan olgularımızın yalnızca 1 tanesinin çift aspirasyonu olduğu görülmektedir. Bu durum serimizde bir taraflılık oluşturmaktadır. Yine İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan yayınlanan 2010-2011 yıllarını kapsayan kişisel bir seride, AUS/FLUS grubunda tiroidektomi sonrası malignite oranı %36 iken, sitolojik izlemi olan olgular da dahil edildiğinde aynı seride AUS/FLUS kategorisi için malignite oranının %14.8'e düştüğü görülmektedir ve bu oran Bethesda'nın önerdiği sınırlar içindedir (85).

Malignite oranlarının yüksek olmasının diğer bir nedeni de, yaygın olarak AUS/FLUS kategorisi için geçerli olan, ancak diğer kategorilerde de görülebilen, İİA tekniğine bağlı olarak, büyük bölümü kan ve fibrin tabakaları ile örtülü, yetersizlik sınırında yer alan örneklerde karşılaşılan değerlendirme güçlüğü olabilir. Çalışmamızda yer alan İİA'lar teknik kalite açısından değerlendirilmiş; %50'sinin büyük oranda kanamalı örnekler olduğu, epitel hücrelerinin pıhtı içine gömülü olması nedeniyle hücresel detayların yeterince seçilemediği görülmüştür. Olguların bir kısmında (%9.1) ise hücresellik düşüktür. Serimizde, Bethesda kategorilerinin malignite oranlarını yükselten, teknik kısıtlılık nedeni ile morfolojik özelliklerin yorumlanmasındaki güçlük ve bazı olguların bu nedenle bir alt kategoride tanı alması olabilir. Radyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan aspirasyonlarda hastabaşı yeterlilik değerlendirmesi yapılmaktadır. Bu süreç fiksasyon kusurlarını ortadan kaldırmakta, hücre miktarının yeterli olmasını sağlamakta, ancak aspirasyon tekniğine bağlı aşırı kanamalı materyalin oranını azaltmamaktadır. Büyük oranda kanamalı/pıhtılı materyalde, FVPK'ların saptanmasında

hücrel detaydan bağımsız olarak büyük önemi olan baskın mikrofoliküler paternin algılanması güçleşmekte, nükleer özelliklerin değerlendirilmesi hataya açık hale gelmektedir.

Bu seride malignite oranlarının yüksek bulunması, kategoriler arasında, yanlış pozitif tanıdan korunmaya yönelik bir kayma olması ile de açıklanabilir. En az FN/FNK veya MK olarak değerlendirilmesi gereken bazı olguların hatalı olarak AUS/FLUS kategorisine yerleştirilmesi; mikrofoliküler paternin öne çıktığı FN/FNK olgularında nükleer özellikler değerlendirilirken geride kalınması söz konusu olabilir. Bu ve benzeri çalışmaların deneyimi artıracığı düşünülmektedir.

Serimizdeki malignite oranlarının literatürdeki çalışmalardan farklı oluşunun nedenlerinden birinin de histopatolojik değerlendirmede yaşanan gözlemciler arası farklılıklar olabileceği akla gelmektedir. Foliküler adenom/foliküler varyant papiller karsinom, foliküler karsinom/foliküler varyant papiller karsinom ayırımında histopatolojik incelemenin de güçlükler taşıdığı, patoloğlar arasında yorum farklılıkları olduğu bildirilmektedir (86, 87, 88).

Çalışmamızda FN/FNK kategorisi için belirlenen malignite oranının daha önceki çalışmalarda belirlenen oranların iki katından fazla oluşu oldukça dikkat çekici bir bulgudur. Ancak FN/FNK kategorisinde yaşanan tanı güçlüğü, literatürde yaygın olarak kabul gören bir konu olup, malignite riskinin %20-60 arasında değiştiğini bildiren yayınlar mevcuttur (76). Bu kategori için tanımlanan sitomorfolojik özelliklerin bütün foliküler paternli lezyonlar için geçerli olabilmesi, sitolojik kriterlerin yorumlanmasında enstitüler ve araştırmacılar arası değişkenliğin yüksek oluşu, kesin tanı için histopatolojik değerlendirmeye ihtiyaç duyulması ve benzer güçlüklerin burada da mevcut olması nedeniyle malignite risklerinin de heterojen bir dağılım gösterdiği düşünülmektedir (63, 69, 89). Bu çalışmada sitolojik olarak FN/FNK tanısı alan malign olguların %77'sinin FVPPK, geride kalan %23'ünün onkositik varyant oluşu ve bu olguların da foliküler patern sergilemesi, papiller karsinomun bu varyantlarına yukarıda bahsedilen belirsizliklerden dolayı, bir alt kategoride (FN/FNK) tanı verilmiş olması yüksek malignite oranlarını açıklayabilir. Ayrıca tüm seride toplam 2 foliküler adenom olgusunun bulunması ve hiçbir foliküler karsinom (onkositik tip dahil) olgusunun yer almayışı da histopatolojik değerlendirme açısından ilgi çekicidir. Serimizde AUS/FLUS ve FN/FNK kategorilerinde saptanan malignite oranları, Wu ve ark'nın 1382 olguluk serilerinde aynı kategoriler için belirledikleri sırasıyla %44 ve %67'lik neoplazi (adenom ve karsinomlar birlikte ele alındığında) oranları ile kısmen benzerlik göstermektedir (90).

Olgularımız arasında AUS/FLUS kategorisinde değerlendirdiğimiz iki tane MPBİDT bulunmaktadır. Malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör histolojik olarak papiller karsinom şüphesi taşıyan nükleuslara sahip iyi diferansiye folikül hücrelerinden oluşan kapsüllü bir tümördür (1, 6). Dolayısıyla tanımı itibari ile literatürle de uyumlu olarak indetermine kategoride yer almasının doğru yaklaşım olduğunu düşünmekteyiz (91). Ozluk ve ark.'nın çalışmasında indetermine kategoride yer alan 102 olgunun 8'i MPBİDT tanısı almış, bu olguların 1'i AUS/FLUS, 6'sı FN/FNK, 1'i MK kategorisinde gruplandırılmıştır (27).

Serimizde AUS/FLUS tanısı alan bir medüller karsinom olgusu da yer almaktadır. Bu olguda yaygın köşelenmeler gösteren, fokal iri ve oval nükleuslara sahip hücreler belirlenmiş, ancak hiposellüler nitelikteki örnekte, hücrelerin natürü belirlenemediğinden olgu bu kategoriye dahil edilmiştir. Literatürde de benzer şekilde AUS/FLUS olarak yorumlanan medüller karsinom olguları mevcuttur (84).

Çalışmamızda yanıt aradığımız sorulardan biri de 'indetermine kategoride yer alan olguların sitolojik değerlendirmesinde ele alınan sitomorfolojik parametrelerden öne çıkan veya maligniteyi daha kuvvetle düşündürecek bir veya birkaç parametre belirlenebilir mi?' sorusuydu. Bu amaçla 9'u nükleer olmak üzere 11 parametre (hipokromazi, oval nükleus, nükleer yarıklanma, nükleer üst üste yığılma, nükleer köşelenme, psödoinklüzyon varlığı, nükleus boyutu, izole iri nükleuslar, nükleol varlığı, patern, kolloid varlığı) belirlendi. Büyük bir kısmı, daha önce literatürde tanımlanan papiller karsinomun klasik sitomorfolojik özellikleri arasından seçildi (10, 15, 61, 92, 93, 94). Olguların tamamı indetermine grupta yer aldığından ve bu seri İİA tanısı papiller karsinom olan olguları kapsamadığından, nükleer kriterlerin yaymalarda yaygın olarak mevcut olmayışı, genellikle fokal olarak bulunması nedeniyle %10 hücrede görülmeleri eşik değer olarak kabul edildi.

Çalışma grubundaki olguların 68'inde, malign olguların ise 48'inde (%75) belirlenen hipokromazi, literatürde nükleer berraklaşma olarak da tanımlanmakta ve en sık görülen kromatin paterni olarak karşımıza çıkmaktadır (1, 10). Bu oran literatürde daha önceki çalışmalarla ortaya konulan %37-%100'lik oran ile uyumlu niteliktedir (68, 92, 94, 95, 96). Literatürde aynı zamanda papiller karsinoma spesifik olmadığı da bildirilen bu bulgu (1, 96), serimizde yer alan benign olguların %59'unda saptanmış, yapılan istatistiksel değerlendirmede benign-malign ayırımında anlamlı bir rolü bulunmamıştır. Yehuda ve ark.'nın 111 olgu içeren serilerinde malign olguların %37'sinde, benign olguların ise %16'sında belirlenen hipokromazinin bu ayırmada sinsityal doku fragmanları, nükleer irileşme, multipl mikronükleol

ve/veya makronükleol, psödoinklüzyon ve yarıklanma varlığı ile birlikte değerlendirildiğinde malign tanısına yönlendirebileceği vurgulanmıştır (95).

Malign olguların %77'sinde, benign olguların ise %59'unda belirlenen oval nükleus, papiller karsinom için tanımlanan nükleer özelliklerden biridir, uzamış, oval nükleuslara genellikle kontur düzensizliği de eşlik eder (1, 14, 15, 61). Ancak yapılan istatistiksel değerlendirmede malignite açısından anlamlı bulunmayan bu özelliğin, papiller karsinomda veya benign lezyonlara ait İİA'larda hangi oranda bulunduğu dair literatür verisine ulaşılammıştır.

Papiller karsinom olgularında genellikle gözlenen bir özellik de nükleer irileşmedir (1, 13, 14, 15, 92). Serimizde nükleus boyutu 3 gruba ayrılarak ele alınmıştır. Benign ve malign örneklerin çoğunda (%59 ve %64)) nükleuslar 1-2 eritrosit boyutundadır. Farklı olarak; malign olguların %14'ünde nükleuslar yaygın olarak 2 eritrosit boyutundan büyük iken, benign olgularda bu oran %6'dır. Grupları tek tek ele aldığımızda literatür verileri ile uyumlu olarak nükleus boyutu arttıkça malignite oranının yükseldiği belirlenmiştir (%54, %67, %82). Ancak istatistiksel incelemede nükleus boyutunun malignite açısından anlamlı değer taşımadığı saptanmıştır. Hem benign hem de malign olguların büyük bölümünün, orta derecede irileşmenin gözleendiği 2. grupta yer alması ve diğer gruplarda olgu sayısının nispeten az oluşunun bu sonuçtan sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

İzole iri nükleuslar görüldüğünde ve natürleri belirlenemediğinde olgular AUS/FLUS olarak yorumlanabilmektedir. Bu nedenle olgularımızda varlığı ayrıca araştırılan izole iri nükleusların malign-benign ayırımında anlamlı olmadığı görülmüş, benign olguların %21'inde, malign olguların %12'sinde saptanmıştır.

Wu ve ark.'ı 69 benign ve malign olgu içeren serilerinde nükleer irileşmeyi 2 eritrosit boyutundan büyük olarak tanımlamış, benign olgularda hücrelerin en az %25-50'sinde, papiller karsinom olgularında ise en az %50-75'inde belirlemiştir ve spesifik olmamakla birlikte, yaygın olarak görüldüğü örneklerde, beraberinde sinsityal tabakalar, ince kromatin ve nükleer yarıklanma da izleniyorsa papiller karsinom açısından neredeyse tanısal olduğunu öne sürmüşlerdir (68). Diğer bir çalışmada Baloch ve ark.'ı eritrositlerin 2-3 katından büyük nükleusları foliküler varyant papiller karsinom olgularının tamamında gözlemlemiş ve neoplazi varlığına işaret eden bir bulgu olarak yorumlamışlardır (71). Kefeli ve ark.'nın çalışmasında ise 64 İİA örneğinde nükleer hacim, nükleer çap, maksimum çap, minimum çap, maksimum çap/minimum çap oranı analiz edilmiş, papiller karsinom ve benign lezyonlar arasında tüm

analizlerin, foliküler neoplaziler ve papiller karsinom arasında ise sadece maksimum çap/minimum çap oranının anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir (97). Shih ve arkadaşları serilerinde nükleus/sitoplazma oranı 2/3'ten büyük olan olguları 'iri nükleus' olarak sınıflamış, olguların %32'sinde belirlemiş ve 10 yıllık rekürrens ile anlamlı bir korelasyon kurmuşlardır (94).

Papiller karsinom genellikle sayısı 1-3 arasında değişen küçük, ancak belirgin, nükleer membrana yakın yerleşimli mikronükleol veya makronükleol varlığı ile karakterizedir (1, 14, 95). Örneklerimizin 30'unda nükleol saptanmış olup, bunların 28'i mikronükleol yapısındadır. Bu olguların %60'ı malign, %40'ı benign grupta yer almaktadır. Nükleol saptanmayan grupta da malign olgular ön plandadır (%68). Birbirine yakın bu oranlardan anlaşılabileceği üzere istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir sonuca ulaşılammıştır. Weber ve ark.'nın 57 olgu içeren çalışmasında 3'ü benign 5 olguda makronükleol gözlenmiş, sonuçlarımızı destekler nitelikte malignite ile ilişki kurulamamıştır (96). Örneklerimizde belirlediğimiz oranlara benzer oranlar saptanmasına rağmen (malign grupta %71, benign grupta %41) , Yehuda ve ark.'nın çalışmasında mikronükleol varlığı malignite ile ilişkili bulunmuş, mikronükleol varlığına, yarıklanma ve kromatin berraklaşmasının eşlik ettiği olgularda malignite oranı %83 olarak bildirilmiştir (95). Benzer şekilde Zhang ve ark.'ı da mikronükleol varlığını, papiller karsinom açısından anlamlı bir parametre olarak sunmuşlardır (93).

Mikroskopik incelemede değerlendirilen parametrelerden biri de kolloid varlığı olup, olguların büyük bölümünde (%70) kolloid görülmemiştir. Az miktarda kolloid gözlenen olguların %69'u, çok miktarda sulu kolloid gözlenen olguların %56'sı malign grupta yer almaktadır. Papiller karsinomda zeminde genellikle az miktarda kolloid bulunur. Örneklerimizde belirlendiği gibi kolloidin bol oluşu veya hiç olmayışının papiller karsinomu ekarte ettirmediği bilinmektedir (1, 14). Yoğun, yapışkan, 'sakızısı' olarak tabir edilen koloidin tanısal önemi olduğu, ancak malign örneklerin %25'inden azında gözlendiği, benign lezyonlarda ise nadiren bulunduğu bildirilmiştir (1). Lee ve ark.'nın sıvı bazlı İİA örnekleri içeren çalışmasında da papiller tiroid karsinomunun, benign foliküler neoplazilere oranla anlamlı derecede az kolloid içerdiği bildirilmiştir (42). Baloch ve ark.'nın FVPK olgularını kapsayan çalışmasında tüm örneklerde bol miktarda sulu kolloid yanı sıra yuvarlak yoğun kolloid 'top'ları saptanmış ve genellikle benign lezyonlarla ilişkilendirilen bol miktarda sulu kolloidin yanlış negatif tanılara sebep olabileceğine dikkat çekilmiştir (71). Wu ve ark.'nın serisinde lojistik regresyon analizinde bol, yoğun kolloidin, sitolojik atipi varlığı durumunda FVPK için pozitif belirleyici olduğu öne sürülmüştür (68).

Foliküler paternli lezyonların büyük bölümü indetermine kategoride yer aldığından (70) ve serimizin %72'sini FVPK tanıli olgular oluşturduğundan patern analizi de sitomorfolojik parametreler çerçevesinde çalışmamıza dahil edilmiştir. Malign grupta yer alan örneklerin %61'inde, benign grupta yer alan örneklerin ise %53'ünde mikrofoliküler patern saptanmamış, benign ve malign örnekler arasında patern analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte, papiller karsinom alt tiplerine bakıldığında, hücresellik göz önüne alınmaksızın dahi mikrofoliküler patern varlığının FVPK ile anlamlı ilişki gösterdiği belirlenmiştir ($p=0,027$)

Mikrofoliküler patern sergileyen lezyonlar hücrel atipi taşımadıklarında, hiperplastik nodül, foliküler adenom ve foliküler karsinom ayırımı yapılamayacağından FN/FNK, hücresellik düşükse AUS/FLUS kategorisinden indetermine gruba dahil edilirler; ancak hücrel atipi varsa FVPK ihtimali ortaya çıkar ve örneğin hücresellik ve atipinin şiddetine bağlı olarak AUS/FLUS, MK veya malign kategorisinde değerlendirilebilirler (61). Literatürle uyumlu olarak serimizde yer alan örneklerde hücrel nitelikli ve mikrofoliküler paterni baskın 19 malign olgunun 11'i FN/FNK, 6'sı MK, 2'si AUS/FLUS kategorisinde değerlendirilmiş, bu olguların 16'sı FVPK tanısı almıştır. Hücrel nitelikli ve mikrofoliküler paterni baskın 11 benign olgunun ise 8'i FN/FNK, 2'si MK, 1'i AUS/FLUS kategorisinde tanı almıştır.

Nükleer membran düzensizliği (yarıklanma ve çentiklenmeler) papiller karsinom tanısında en sık başvuru, ayırd edici nükleer kriterlerden biridir (10, 14, 15). Karakteristik olmakla beraber, fokal yarıklanma varlığı papiller karsinom dışı tiroid tümörlerinin %70-80'inde, non-neoplastik tiroid lezyonlarının %50-60'ında görülebilir (98). Literatürde genellikle oval nükleusların uzun eksenine paralel seyreden derin, kahve çekirdeğini andıran yarı/çentik yapılarının varyant farkı gözetmeksizin, tüm papiller karsinomların %90'ından fazlasında gözlenebileceği bildirilmiştir (1, 42, 68, 98).

Nükleer yarıklanma malign olgularımızın %61'inde gözlenmiş olup, bu olgularda malignite oranı %85 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel incelemede sensitivitesinin %61, spesifitesinin %79 olduğu görülmüş, literatürle uyumlu biçimde malignite ile ilişkili bulunmuş (93, 95) ve multivaryans lojistik regresyon analizinde maligniteyi öngörmede bağımsız risk faktörü olduğu saptanmıştır. Ancak çok daha düşük yarıklanma oranları bildiren araştırmacılar da vardır. Örneğin, Baloch ve ark.'nın FVPK olgularını içeren serisinde yarıklanma %29 oranında gözlenmiş, bu durum papiller karsinomun karakteristik nükleer özelliklerini taşıyan alanlarının özellikle ince iğne ile örneklenme oranı daha düşük olan kapsül

altı bölgede yama şeklinde dağılabileceği ve İİA'ya yansımayabileceği şeklinde açıklanmıştır (71). Weber ve ark.'ı nükleer yarık saptanan olgularında malignite oranını %42 olarak bildirmiş ve yarıklanma varlığının ancak diffüz olduğu durumlarda papiller karsinomu kuvvetle destekleyebileceğini ileri sürmüşlerdir (96).

Nükleer köşelenme; açılanma olarak tarif edebileceğimiz, nükleer membran düzensizliğinin daha özel bir formu olarak çalışmaya dahil edilen parametrelerden biridir. İnsan tümörlerinin bir bölümünde nükleer membranda düzensizlik oluşmakta ve düzensizliğin tarzı bazı tümörlere ve ara yollara spesifik olabilmektedir. Transkripsiyon ve replikasyonda önemli rol oynayan nükleer membranda ortaya çıkan değişiklikler, papiller karsinom patogenezinde rol alan RET/PTC ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur (99). Nükleer köşelenme çalışmamızda malign grupta yer alan örneklerin %25'inde belirlenmesine rağmen, pozitif prediktif değeri %89 olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak malignite ile arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Nükleer düzensizlikler literatürde %37-100 arasında değişen oranlarda bildirilmesine rağmen (1, 2, 42), nükleer köşelenmeye dair pek fazla veriye ulaşamamıştır. Shih ve ark.'ı örneklerinde gözlenen nükleer membran düzensizliklerini açılanma olarak yorumlamış ve olgularının %60'ında gözlemlemiştir (94).

Çalışmamızda papiller karsinom tanısında en spesifik (%100) nükleer kriter olarak psödoinklüzion belirlenmiş, malignite ile anlamlı ilişkisi istatistiksel olarak ortaya konmuştur. İntranükleer sitoplazmik invajinasyon olarak da adlandırılan bu nükleer özellik, dikkatli bir inceleme sonucunda papiller karsinomların büyük bölümünde, ancak az sayıda (<%5) tümör hücresinde görülebilir (1, 98) ve papiller karsinomun en önemli tanısal kriterlerinden biri olarak bilinmektedir (1, 10, 13). Bununla birlikte psödoinklüzionun papiller karsinoma spesifik olmadığı, medüller karsinom, az diferansiye tiroid karsinomu, anaplastik karsinom, metastatik karsinom ve nadir olarak benign tiroid lezyonlarında da görülebileceği bildirilmiştir (1, 14). Serimizde psödoinklüzion görülen 11 olgudan 9'u MK kategorisinde değerlendirilmiştir. Diğer iki olguya daha düşük risk kategorilerinde yer verilmesi bir tanı/kategorizasyon hatası olarak kabul edilebilir. Papiller karsinom için oldukça spesifik bir kriter olduğu daha önce literatürde de belirtilmiş olan bu bulgunun varlığında en az MK tanısının verilmiş olması gerekirdi, tanı aşamasında psödoinklüzionlar gözden kaçırılmış olabilir diye düşünüldü. Papiller karsinomda psödoinklüzion görülme oranları farklı serilerde %10-96 arasında değişkenlik göstermektedir; FVPK'da oran %12'ye düşmekte, foliküler varyant dışı papiller karsinomlarda %30'a yükselmektedir. Çalışmaların tümünde ortak görüş psödoinklüzionun çok seyrek hücrede,

bazen sadece bir hücrede görülebileceği ve varlığı halinde papiller karsinomun diğer özelliklerinin dikkatle aranması gerektirir (42, 68, 71, 93, 95, 98).

Psödoinklüzyon oranı örneklerimizde literatürde bildirilenlerin büyük bölümünden daha düşük oranda (%17) bulunmuştur. FVPK'da bu oran %12'ye düşmekte, foliküler varyant dışı papiller karsinomlarda ise bu oran %30'a yükselmektedir. Bu durumun sebeplerinden biri, serimizin tüm İİA olgularını kapsamaması, direkt papiller karsinom tanısı almış olguların bu seride yer almaması, serinin büyük bir kısmını oluşturan FVPK'larda genellikle papiller karsinomun tipik nükleer özelliklerinin bulunmayışı ve psödoinklüzyonların saptanmasının daha güç hale gelişi, örneklerimizde yaygın olarak izlenen yoğun kan ve fibrin tabakası içerisinde psödoinklüzyonların seçilememesi olabilir.

İİA örneklerinde papiller karsinom hücreleri tipik olarak kalabalık ve üst üste yığılan nükleuslardan oluşan sinsitya benzeri yassı tabakalar şeklinde dağılım gösterir ve bu özellik malign hücreleri benign epitel hücrelerinden ayırd etmeye yardımcı olur (14). Serimizde üst üste yığılma olguların %70'inde saptanmış, izlenebildiği olgularda malignite oranı %78 olarak belirlenmiştir. Ayrıca malignite ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterdiği, hatta maligniteyi öngörmede bağımsız risk faktörlerinden biri olduğu ortaya konmuştur. Wu ve ark.ı nükleer üst üste yığılma gösteren yassı sinsityal tabakaların papiller karsinomda (sonuçlarımıza benzer şekilde genellikle %50-75 arasında), foliküler lezyonlara ve non-neoplastik lezyonlara (%50'nin altında) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek oranda görülebildiğini bildirmişlerdir (68). Üst üste yığılma, Weber ve ark. ının malignite kuşkusu taşıyan atipik epitel hücreleri içeren örneklerinde %77 oranında, fokal olarak saptanmış ve bu olgularda malignite oranı %41 olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımızdan farklı olarak malignite ile anlamlı bir ilişki kurulamamış ve nükleol varlığı, yarıklanma, hipokromazide olduğu gibi sadece yaygın olarak görülmesi halinde anlamlı olabileceği öne sürülmüştür (96).

Literatürde papiller karsinom tanısı koymaya yardımcı birçok sitomorfolojik parametre tartışılmış, ancak bu parametrelerin tek başına tanısal olmadıkları, yaygın ya da bir arada olduklarında tanısal olabilecekleri sonucu genel olarak kabul görmüştür (14). Das ve Sharma'nın papiller formasyon, inklüzyon varlığı, nükleer yarıklanma, ince kromatin yapısı, psammom cisimleri olmak üzere 5 sitomorfolojik kriter üzerinden kurguladıkları çalışmalarında, bu parametrelerden 3 veya daha fazlasının varlığı durumunda papiller karsinom tanısına daha kolay ulaşılabileceği bildirilmiştir (92). Biz de çalışmamızda malignite ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösteren nükleer yarıklanma, psödoinklüzyon, üstüste yığılma

ve nükleer köşelenme kriterlerinin her birine 1 puan vererek bir skor skalası oluşturduk. Bu kriterlerin herhangi birinin varlığı halinde sensitivitenin %90, negatif prediktif değerin %75 olduğu, skor arttıkça bu oranların azaldığı ama spesifisite ve pozitif belirleyici değerin yükseldiği belirlendi. Dolayısıyla bu skorun 3 olması halinde en az MK (spesifisite %85), 4 olması halinde ise malign tanısı (spesifisite %97) verilebileceği gösterilmiş ve indetermine kategoride yer alan olgularda skorlama sisteminin kullanılmasının tanı doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırabileceği düşünülmüştür. Ayrıca serimizde nükleer yarıklanma ve üstüste yığılmanın multivaryans lojistik regresyon analizinde maligniteyi öngörmeye bağımsız risk faktörleri oldukları belirlendiğinden, sadece bu kriterlerin saptanması durumunda bile patologun malignite ihtimalinin yüksek olduğunu bilerek raporunu düzenlemesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada maligniteyi öngörmeye anlamlı bulunan sitomorfolojik kriterler, indetermine grup temelinde tanımlanmıştır ve yalnızca %10 hücrede görülmeleri yeterli kabul edilmiştir. Aynı kriterlerin, yanlış negatif ve yanlış pozitif tanıları en aza indirmede etkili olup olmadığının araştırılması için, benzer bir çalışmayı tüm İİA'ları kapsayan bir seride tekrarlanmanın yararlı olacağı düşünülmüştür.

Son yıllarda ek testlerin indetermine grupta tanı doğruluğunu arttırabileceği düşüncesiyle yapılan çalışmalarda moleküler testlerin ön plana çıktığı gözlenmektedir (3, 4, 5). Papiller karsinom olgularında en sık karşılaşılan moleküler değişiklik, olguların %30-70'inde belirlenen, papiller karsinoma yüksek oranda spesifik BRAF nokta mutasyonudur (6, 7). Çalışmamızda tiroidektomisi papiller karsinom tanısı alan olgulara BRAF mutasyon analizi uygulanarak, sitolojisi indetermine grupta yer alan olgularda mutasyon analizinin sitolojik tanıya katkısı araştırılmıştır.

Foliküler varyant papiller karsinomu, diğer papiller karsinom varyantlarından ayıran bir özelliği de moleküler profilidir. BRAF mutasyonu FVPK'da sadece %5-15 oranında belirlenirken, RAS nokta mutasyonları %25-45 oranında görülmektedir (6, 7, 54, 55, 100). Serimizde yer alan papiller karsinomların büyük bir kısmının foliküler varyant olması nedeniyle, AUS/FLUS kategorisinde çalışmaya ilave edilen NRAS mutasyon analizinin, özellikle FVPK olgularının ne kadarını ortaya çıkarılabileceği sorgulanmıştır.

Pyrosekanslama yöntemi ile yapılan DNA dizi analizinde 6 olguda (%10.1) BRAF^{V600E} mutasyonu saptanmıştır. Olgularımızı alt tiplerine ayırarak mutasyon oranlarını incelediğimizde, FVPK'lı olgularda bu oranın %6.9, diğer varyantlarda % 18.7 olduğu

belirlenmiştir. %6.9'luk oran, literatürde FVPK'da BRAF^{V600E} mutasyonu için bildirilen %5-15'lik oran ile uyumlu niteliktedir (6). Ancak %18.7'lik oran diğer varyantlar için belirlenen, coğrafik bölge, etnik köken ve aşırı iyot tüketimine bağlı olarak %30-80 arasında değişen mutasyon oranlarının altında kalmaktadır (3, 32, 47, 55, 56, 100, 101, 102). Foliküler varyant dışı papiller karsinom olgularımızdan 4'ü onkositik varyant papiller karsinomlardır ve tamamı foliküler gelişim paterni sergilemektedir. Hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır. Bu olgular foliküler varyant dışı papiller karsinom grubundan çıkarıldığında mutasyon oranı yükselmekte, yalnızca papiller gelişim sergileyen olgular (8 klasik varyant, 1 Warthin benzeri varyant) dikkate alındığında %33 ile mutasyon saptanma oranının beklenen değerlere ulaştığı görülmektedir.

Foliküler varyant papiller karsinomda nispeten düşük olmakla birlikte literatürle benzer oranlar belirlenmesine karşın, diğer varyantlarda daha düşük oranda BRAF^{V600E} mutasyonu saptanmasında, guatr açısından endemik bir bölge olan ülkemizde tümör patogeneze etki eden epidemiyolojik farklılıklar olabileceği akla gelmektedir. Nitekim, Kim ve ark.'ı makalelerinde iyot tüketiminin çok fazla olduğu Kore'de tiroid kanserlerinin %95'ini papiller karsinomun oluşturduğunu (Batı ülkelerinde yaklaşık %80-90) ve BRAF^{V600E} mutasyon oranının %80'in üzerinde olduğunu (Batı ülkelerinde yaklaşık %30-50), dolayısıyla tümörlerin moleküler patogeneze oluşturan farklılıkların coğrafik bölge, etnisite ve iyot tüketimi ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (3).

Daha yüksek oranda mutasyon göstermesi beklenen klasik varyant papiller karsinomlar, çalışmamızda yalnızca 8 olgu ile temsil edilmektedir, sayının küçük olması da elde edilen mutasyon oranının yanıltıcı olabileceğini düşündürmektedir.

BRAF^{V600E} mutasyonunun, literatüre göre olgularımızda daha düşük oranda bulunması, teknik nedenlere de bağlı olabilir. Bu testlerin sitolojik ve histolojik materyallerde eşdeğer sonuçlar verdiği bildirilmesine karşın, çalışmada sitolojik materyalin kullanılmış olmasının sonuçlar üzerinde olumsuz bir etki yaratıp yaratmadığının anlaşılabilmesi için aynı testin, olgulara ait tiroidektomi spesimenleri üzerinde de çalışılması gerektiği düşünülmüştür.

BRAF geninde 40'tan fazla mutasyon tanımlanmış olup, bunların %90'ını V600E nokta mutasyonu oluşturmaktadır (50). Çalışmamızda bu mutasyon yanı sıra 2 olguda G464E, 2 olguda ise G469A mutasyonları belirlenmiştir, ancak literatürde bu mutasyonların klinik olarak anlamlı olduğuna dair herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Bu konu üzerinde yapılan araştırmalar derinleştikçe bu mutasyonların önemine dair bulguların da artacağı aşıkardır.

İnce iğne aspirasyonlarının yaklaşık %15-30'unu oluşturan indetermine kategoride (29, 53, 55, 103), papiller karsinom açısından spesifisitesi oldukça yüksek (%97-100) olan BRAF mutasyonunun (35, 54, 55, 102), preoperatif incelemeye olası katkısını araştırmak ve sitomorfolojik parametreler ile ilişkisini değerlendirmek amacı ile yaptığımız çalışmada nükleer yarıklanma ve psödoinklüzyonunun BRAF^{V600E} mutasyonunu ile anlamlı bir ilişki gösterdiği belirlendi. Mutasyon saptanan olguların tamamı MK kategorisinde tanı almıştı. Sonuçta; BRAF^{V600E} mutasyon oranı düşük (6/43, %13.9) ve malignite oranı yüksek (%86) bir MK kategorisine sahip olduğumuzdan ve bu kategoride tanı alan olgulara doğrudan cerrahi tedavi uygulandığından, ayrıca sitolojik atipinin fokal veya belirsiz olduğu, ek testlere daha çok gerek duyulan AUS/FLUS ve FN/FNK kategorilerinde yer alan olguların hiçbirinde mutasyon belirlenmemesinden dolayı mutasyon analizinin tanıya belirgin katkı sağlamadığı sonucuna varılmıştır.

İndetermine kategori ve BRAF^{V600E} mutasyonu ilişkisini değerlendiren çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen (3-5, 28, 29, 53, 67, 77, 104-107), BRAF^{V600E} mutasyonu ile sitomorfolojik bulguların ilişkisini araştıran az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunlardan biri olan Kleiman ve ark.'ının çalışması elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Bu çalışmada sitolojik atipinin (yarıklanma, psödoinklüzyon, oval nükleus) saptandığı nodüllerde BRAF^{V600E} mutasyonunun 6.7 kat daha fazla görüldüğünü, multivaryans lojistik regresyon analizinde psödoinklüzyon ve oval nükleusun mutasyonu öngörmede bağımsız risk faktörleri olduğu, sitolojik atipi varlığında preoperatif mutasyon analizinin tanıya katkısı olmadığını bildirilmiştir (54). Aynı çalışmada BRAF testinin AUS/FLUS ve FN/FNK kategorilerinde maligniteyi belirlemeye yönelik sensitivitesi %3.2, MK kategorisinde ise %42 olarak bildirilmiş, aradaki farkın AUS/FLUS ve FN/FNK kategorilerinde malign tanı alan olguların büyük bölümünün FVPPK oluşu ile açıklamışlardır (54). Aynı şekilde Colanta ve ark.'ı da makalelerinde BRAF mutasyonunun indetermine kategoride değerlendirilen İİA'larda tanı doğruluğunu anlamlı derecede arttırmadığını dile getirmişlerdir (55). Xing M.'nin derlemesinde de aynı görüş paylaşılmaktadır (50).

Ohori ve ark.'ı makalelerinde literatürde daha önce yayınlanan çalışmaların bir kısmında AUS/FLUS ve FN/FNK kategorilerinde BRAF mutasyon oranının düşük (<%3), bir kısmında ise daha yüksek (>%10) olarak belirlendiğini, aradaki farkın Bethesda Sistemi veya benzer sınıflamalar kullanılarak yapılan değerlendirmelerde sitolojik kriterlerin uygulama varyasyonlarından, yorum farklılıklarından kaynaklabileceğini ileri sürmüşlerdir (107). Kendi serilerinde AUS/FLUS ve FN/FNK kategorilerinde BRAF^{V600E} ve BRAF^{K601E} mutasyonlarını

tanı doğruluğunu arttırabilecek oranda yüksek bulmuş, olgularının çoğunun FVPK tanısı aldığını, bu olgularda genellikle BRAF^{K601E} mutasyonunun saptandığını, BRAF^{V600E} mutasyonunun ise klasik ve tall cell varyantta görüldüğünü bildirmişlerdir (107).

BRAF^{V600E} mutasyon analizinin sensitivitesinin düşük oluşu, indetermine kategoride kullanımını kısıtladığından son yıllarda sensitiviteyi arttırabilmek amacı ile başka mutasyonları da içeren genetik tarama panelleri oluşturulmuştur (54). Nikiforov ve ark.'ı BRAF^{V600E} yanı sıra NRAS kodon 61, HRAS kodon 61, KRAS 12/13 nokta mutasyonları, RET/PTC1, RET/PTC3 ve PAX8/PPAR γ yeniden düzenlenmelerini içeren mutasyon panelinin sensitivitesinin %62, spesifisitesinin %99.7, pozitif prediktif değerinin %97 olduğunu, sitolojik değerlendirmeye eklendiğinde tanı doğruluğunu belirgin oranda arttırdığını bildirmişlerdir (28). Aynı ekibin indetermine kategoride tanı alan 1056 olguya prospektif olarak aynı mutasyon panelini uyguladıkları bir sonraki çalışmada mutasyonlu olgularda malignite riski AUS/FLUS kategorisinde %88, FN/FNK kategorisinde %87, MK kategorisinde %95, mutasyon saptanmayan olgularda ise bu risk sırasıyla %6, %14 ve %28 olarak belirlenmiş, tanısal değeri bir kez daha vurgulanmıştır (77).

Moses ve ark.'ı da benzer bir paneli (BRAF, NRAS, KRAS, RET/PTC1, RET/PTC3, TRK1 analizi) kullanarak yaptıkları çalışmada panelin tanıya katkısının %12 oranında olduğunu, ancak genetik testin negatif prediktif değerinin düşük olması nedeni ile tanısal tiroidektomi ihtiyacının ortadan kalkmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca literatürde moleküler testlerin tanı doğruluğuna etkisine dair bildirilen oranların oldukça geniş bir dağılım göstermesini enstitülerde farklı sitolojik sınıflamalar kullanılmasına, kategorilere göre belirlenen malignite oranlarının farklı oluşuna, nodülün örneklenme şekline, İİA materyalinin saklanma koşullarına, uygulanan genetik mutasyon sayısına bağlı olarak değiştiğini ileri sürmüşlerdir (5). Kleiman ve ark.'ı da 4 mikro-RNA'dan (miR-222, miR-328, miR-197, miR-21) oluşan bir panel geliştirmiş, sensitivitesini %100, spesifisitesini %86 olarak bildirmişlerdir (54).

Ancak birçok laboratuvarında indetermine kategoride tanı alan tüm İİA materyallerinde bu kompleks panellerin prospektif olarak analizi hem teknik, hem de maliyet açısından uygulanabilir olamadığından ve bizim de dahil olduğumuz çalışmaların bir bölümünde sadece BRAF^{V600E} mutasyonunun da tanı doğruluğunu anlamlı derecede arttırmadığı sonucuna varıldığından, günümüzde sitolojik değerlendirmenin hala en önemli tanısal uygulama olduğu düşüncesindeyiz.

AUS/FLUS kategorisinde yer alan olgulara uygulanan NRAS mutasyon analizinde bir olguda (%8) kodon 61 nokta mutasyonu saptanmıştır. Tiroid karsinomları yanı sıra benign foliküler lezyonlar ve hiperplastik nodüllerde de görülebilen RAS mutasyonlarının malignite riski ile kuvvetli bir ilişki gösterdiği bilinmektedir (28, 59, 108).

Nikiforov ve ark.'nın serisinde mutasyon saptanan bir nodülde malignite ihtimali %87.5 -bu oranın %62.5'ini papiller karsinom, %25'ini foliküler karsinom oluşturmakta- olarak bildirilmiştir. Zhu ve ark.ı da RAS mutasyonlarının FVPK olgularında, foliküler varyant dışı papiller karsinom olgularına göre oldukça anlamlı derecede yüksek oranda görüldüğünü bildirmişlerdir. Lee SR ve ark.'ı 59 FVPK içeren çalışmalarında RAS mutasyonları arasında en sık rastlanan mutasyonunun NRAS mutasyonunu olduğunu (%33), bunların da büyük bölümünün (%72) kodon 61'de gerçekleştiği yayınlamışlardır (109).Gupta ve ark.'ının yayınladığı çok güncel bir makalede RAS mutasyonlarının büyük bölümünün FVPK, daha az oranda foliküler karsinom olgularında gözlendiğini, ancak medüller karsinom ve anaplastik tiroid karsinomunda da görülebileceği bildirilmiştir. Aynı çalışmada belirlenen dikkat çekici bir bulgu da mutasyon saptanan foliküler paternli lezyonların %93'ünün indetermine kategoride tanı almış olmasıdır (108).

İndetermine grupta tanı alan olguların büyük bölümünü FVPK oluşturduğundan ve NRAS mutasyonunun malignite ve FVPK ile ilişkisi net olarak ortaya çıkarıldığından, özellikle indetermine grupta malignite oranı yüksek olan merkezlerde klinik olarak da riskli grupta yer alan seçilmiş olgularda NRAS mutasyon analizinin oldukça sınırlı da olsa tanıya katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

VII- SONUÇLAR

- 98 olgudan oluşan çalışma grubumuzda yer alan ve tiroidektomi sonucu benign tanı alan hastaların 27'si kadın (%35), 7'si erkek (%35), malign veya MPBİDT tanısı alan hastaların ise 51'i kadın (%65), 13'ü erkektir (%65). Cinsiyet dağılımı değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak her iki grupta da kadın hasta sayısının erkek hastaların dört katı olduğu, ancak benign ve malign tanılarının her iki cinsiyette de aynı oranda görüldüğü belirlenmiştir ($p=0.974$).
- Benign grupta tanı alan hastaların yaş ortalaması 43,17, malign veya MPBİDT tanısı alan hastaların ise 45,16 olarak belirlenmiş; yaş ortalamaları açısından benign ve malign grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.609$).
- Dört gruba ayırarak değerlendirmeye aldığımız tümör çaplarının, benign ve malign grup arasında belirgin bir farklılık göstermediği, genel ortalamaya baktığımızda ise tümör çaplarının her iki grupta da birbirine yakın değerlerde (19 ve 17 mm) olduğu gözlenmiştir. ($p=0,455$).
- Otuzdört'ü AUS/FLUS, 21'i FN/FNK, 43'ü MK kategorisinde yer alan olguların, histopatolojik olarak 62'sinin malign (61 papiller karsinom, 1 medüller karsinom), 2'sinin MPBİDT, 34'ünün benign olarak tanı aldığı saptanmıştır. Malignite oranları literatürde bildirilen oranlara kıyasla yüksek; AUS/FLUS kategorisi için %37,5, FN/FNK kategorisi için %62, MK kategorisi için %86 olarak belirlenmiştir. Bu kategorilerin, literatürle uyumlu olarak artan bir risk skalası oluşturduğu görülmüş; malignite ile ilişkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.00$).
- Malignite oranlarının literatürde bildirilen oranlara göre yüksek oluşunun nedenleri, İstanbul Tıp Fakültesinin bir referans merkezi olması; histolojik takipleri bulunan ve çalışmaya dahil edilen hasta popülasyonunun klinik ve radyolojik olarak yüksek risk grubunda oluşu, İİA tekniğine bağlı olarak, büyük bölümü kan ve fibrin tabakaları ile örtülü, yetersizlik sınırında (49/98, %50) ve hiposellüler nitelikli (9/98, %9,1) örneklerde karşılaşılan değerlendirme güçlüğü, tanıda indetermine kategoriler arasında bir kayma oluşu, yanlış pozitif tanılardan korunmak amacıyla teknik zorluklar da

taşıyan olgulara bir alt kategoride tanı verilmesi ve histopatolojik değerlendirmede yaşanan gözlemciler arası farklılıklar olabileceği düşünülmüştür.

- Papiller karsinom tanısı alan 61 olgunun 44'ü (%72) foliküler varyant, 17'si (%28) diğer varyantlar (9'u klasik varyant, 4'ü onkositik varyant, 1'i Warthin benzeri varyant, 1'i solid varyant, 1'i makrofoliküler varyant, 1'i anaplastik tipe transformasyon gösteren papiller karsinom) olarak tiplendirilmişti. Yüksek foliküler varyant oranı indetermine kategoride tanı alan örneklerin değerlendirildiği diğer serilerin sonuçları ile uyumludur ve papiller karsinomun sitolojik değerlendirmesinde tanı güçlüğüne en sık FVPK'da yaşandığını ve bu olguların genellikle indetermine kategoride tanı aldığını doğrular niteliktedir.
- Çalışma grubunda yer alan malign olguların büyük bir kısmını FVPK'ların oluşturması, bu tümörün sitolojik ve histolojik tanı güçlüğü taşıması, diğer foliküler paternli lezyonlardan ayrımı için tanımlanan sitomorfolojik kriterlerin yorumlanmasında enstitüler ve araştırmacılar arası değişkenliğin yüksek oluşu, kesin tanı için histopatolojik değerlendirmeye ihtiyaç duyulması ve benzer güçlüklerin burada da mevcut olması, malignite oranlarının beklenenden yüksek bulunmasına katkıda bulunmuş olabilir diye düşünülmüştür.
- Sitomorfolojik kriterlerin malign ve benign olgularda görülme oranları; hipokromazi için %75 (48/64) ve %59 (20/34), oval nükleus için %77 (49/64) ve %59 (20/34), nükleer yarıklanma için %61 (39/64) ve %21 (7/34), nükleer üst üste yığılma için %70 (45/64) ve %38 (13/34), nükleer köşelenme için %25 (16/64) ve %6 (2/34), psödoinklüzyon için %17 (11/64) ve %0 (0/34), nükleusların genelinde gözlenen nükleer irileşme için %78 (50/64) ve %65 (22/34), izole iri nükleus varlığı için %12 (8/64) ve %21 (7/34), nükleol için %28 (18/64) ve %35 (12/34), kolloid varlığı için %28 (18/64) ve %32 (11/34), mikrofoliküler patern varlığı için %39 (25/64) ve %47 (16/34) olarak belirlenmiştir.
- Sitomorfolojik parametrelerin benign-malign ayırımıındaki olası rolünü araştırmak amacıyla yapılan istatistiksel analizde, literatür ile uyumlu olarak nükleer yarıklanma ($p=0,000$), nükleer üst üste yığılma ($p=0,002$), nükleer köşelenme ($p=0,016$) ve psödoinklüzyon varlığı ($p=0,007$) ile malignite arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Sensitivitesi en yüksek olan parametrenin nükleer üst üste yığılma (%70), spesifisitesi en yüksek olan parametrenin ise psödoinklüzyon (%100) olduğu belirlenmiştir.

- İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu dört parametrenin her birine ‘1’ değeri verilerek oluşturulan skor skalasında toplam skoru sadece 1 olan olguların bile malign olma olasılığının, skoru 0 olan olgulara göre anlamlılık gösterecek derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,0001$). Skorun 3 olması halinde en az MK (spesifisite %85), 4 olması halinde ise malign tanısı (spesifisite %97) verilebileceği, indetermine kategoride yer alan olgularda skora sisteminin kullanılmasının tanı doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırabileceği sonucuna varılmıştır.
- Multivaryans lojistik regresyon analizinde ise nükleer yarıklanma ve üst üste yığılmanın maligniteyi öngörmeye bağımsız risk faktörleri oldukları belirlendiğinden (Odds oranları sırası ile 3,2 (%95 CI=1,1-9,2) ve 2,9 (%95 CI=1,1-7,8), sadece bu kriterlerden birinin saptanması durumunda bile patologun malignite ihtimalinin var olduğunu bilerek değerlendirmeyi derinleştirmesi gerektiği düşünülmüştür.
- Olgularımızın büyük bölümünü (%72) oluşturan FVPK ile çalışmada değerlendirilen sitomorfolojik parametreler karşılaştırılmış, sadece literatür ile uyumlu olarak hücresellik oranı göz önüne alınmaksızın dahi, mikrofoliküler patern varlığının FVPK ile anlamlı ilişki gösterdiği belirlenmiştir ($p=0,027$).
- Bu çalışmada maligniteyi öngörmeye anlamlı bulunan sitomorfolojik kriterler, indetermine grup temelinde tanımlanmıştır ve yalnızca %10 hücrede görülmeleri yeterli kabul edilmiştir. Aynı kriterlerin, yanlış negatif ve yanlış pozitif tanıları en aza indirmede etkili olup olmadığının araştırılması için, benzer bir çalışmayı tüm İİA’ları kapsayan bir seride tekrarlanmanın yararlı olacağı düşünülmüştür.
- BRAF mutasyon analiz sonuçları değerlendirildiğinde malign grupta yer alan olguların %10.1’inde (6/61) BRAF^{V600E} mutasyonu saptanmıştır. FVPK’lı olgularda bu oranın %6.9, diğer varyantlarda % 18.7, yalnızca papiller gelişim sergileyen olgular (8 klasik varyant, 1 Warthin benzeri varyant) dikkate alındığında ise %33 olduğu belirlenmiştir.

- BRAF^{V600E} mutasyonunun, literatüre göre olgularımızda daha düşük oranda bulunması, olgularımızın büyük bölümünü yüksek oranda mutasyon göstermesi beklenen (%30-70) klasik varyant papiller karsinomlar yerine, düşük mutasyon oranlarına sahip (%5-15) FVPK'ların oluşturmalarına bağlı olabilir. Bir başka neden de literatürde mutasyon analizlerinin sitolojik ve histolojik materyallerde eşdeğer sonuçlar verdiği bildirilmesine karşın, çalışmada sitolojik materyallerin kullanılmış olması olabilir. Bu olasılığın kesin olarak ekarte edilebilmesi için aynı testin, olgulara ait tiroidektomi spesimenleri üzerinde de çalışılması gerekmektedir.
- BRAF mutasyonunun sitomorfolojik parametreler ile ilişkisini değerlendirmek amacı ile yaptığımız istatistiksel analizde nükleer yarıklanma ve psödoinklüzyonunun BRAF^{V600E} mutasyonunu ile anlamlı bir ilişki gösterdiği saptanmıştır. (p=0,038, p=0,019). Ayrıca inklüzyon varlığının BRAF^{V600E} mutasyonunu öngörmeye bağımsız risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (p=0,035, odds oranı=6,9, %95 CI=1,1-41). Dolayısıyla inklüzyon varlığının hem sitolojik değerlendirmede malignite riskini öngörmeye, hem de BRAF mutasyon analizinde pozitif mutasyona işaret eden en önemli sitolojik parametre olduğu belirlenmiştir.
- BRAF^{V600E} mutasyonu belirlenen olguların 6'sı da MK kategorisinde tanı almasına rağmen, sitolojik tanı kategorisi ile mutasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamış; bu durumun pozitif olgu sayısının azlığı ve tanı kategorilerinin üç gruba ayrılmış olması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.
- Bu seride yer alan olgularda rutin inceleme sırasında, sitolojik değerlendirme yanı sıra BRAF mutasyon analizi de çalışılmış olsaydı, MK kategorisinde yer alan mutasyon saptanmış 6 olguya direkt papiller karsinom tanısı verilecek; ancak geride kalan 37 MK tanılı olgu için malignite oranı yine yüksek (%83) olacaktı. Sonuç olarak; BRAF^{V600E} mutasyon oranı düşük ve malignite oranı yüksek bir MK kategorisine sahip olduğumuzdan ve bu kategoride tanı alan olgulara doğrudan cerrahi tedavi uygulandığından, ayrıca sitolojik atipinin fokal veya belirsiz olduğu AUS/FLUS ve FN/FNK kategorisinde yer alan olguların hiçbirinde mutasyon belirlenmediğinden, mutasyon analizinin tanıya belirgin katkı sağlamadığı düşünülmüştür.

- AUS/FLUS kategorisinde bir FVPK olgusunda (%8), NRAS kodon 61 mutasyonu saptanmıştır. İndetermine grupta tanı alan olguların büyük bölümünü FVPK oluşturduğundan ve NRAS mutasyonunun malignite ve FVPK ile ilişkisi net olarak ortaya çıkarıldığından, özellikle indetermine grupta malignite oranı yüksek olan merkezlerde klinik olarak da riskli grupta yer alan seçilmiş olgularda NRAS mutasyonunun analizinin sınırlı da olsa tanıya katkı sağlayabilir.
- Literatürde son yıllarda giderek yaygınlaşan, gerek teknik, gerekse maliyet açısından uygulanabilirliği güç olsa da, tiroid kanserlerinde gözlenen başka mutasyonları da içeren genetik tarama panellerinin kullanımının indetermine kategoride tanı doğruluğunu arttırabileceği görüşünün, bu konu üzerinde yapılan araştırmalar derinleştikçe kuvvet kazanacağı, ancak günümüzde sitolojik değerlendirmenin hala en önemli tanısal uygulama olduğu düşüncesindeyiz.

VIII- KAYNAKLAR

1. DeMay R. Thyroid. In: DeMay R. The Art & Science of Cytopathology, 2th edition. Volume 2. Chicago:ASCP;2012, p.839-963.
2. Walts AE, Mirocha J, Bose S. Follicular lesion of undetermined significance in thyroid FNA revisited. Diagn Cytopathol. 2013 Jul 27.
3. Kim SW, Lee JI, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, Shin JH, Kim HK, Jang HW, Chung JH. BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Aug;95(8):3693-700.
4. Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. J Chin Med Assoc. 2010 Mar;73(3):113-28.
5. Moses W, Weng J, Sansano I, Peng M, Khanafshar E, Ljung BM, Duh QY, Clark OH, Kebebew E. Molecular testing for somatic mutations improves the accuracy of thyroid fine-needle aspiration biopsy. World J Surg. 2010 Nov;34(11):2589-94.
6. Rosai J, Tallini G. Thyroid Gland. In: Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10th edition. Volume 1. Philadelphia:Mosby/Elsevier Inc;2011, p.487-583.
7. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. Mod Pathol. 2011 Apr;24 Suppl 2:S34-43.
8. DeLellis RA, Williams ED. Thyroid and parathyroid tumours. In: Lellis D, Lloyd R, Heitz PU, Eng C edit. WHO Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon:IARC;2004, p.51-66.
9. Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, Nikiforov YE. RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Dec;94(12):4735-41.
10. Khan A, Nose V, Nikiforov YE. Pathology of Thyroid Gland and Recent Developments in the Molecular Biology of the Thyroid. In: Lloyd RV edit. Endocrine Pathology: Differential Diagnosis and Molecular Advances, 2th edition. New York:Springer;2010, p.181-260.
11. Kato MA, Fahey TJ 3rd. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. Surg Clin North Am. 2009 Oct;89(5):1139-55.
12. Maitra A, Abbas AK. The Endocrine System. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th edition. Philadelphia:Saunders/Elsevier Inc;2010, p.1164-1183.

13. Baloch ZW, LiVolsi VA. The Thyroid Gland. In: Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ, LiVolsi, Wick MR. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, 4th edition. Volume 2. Philadelphia:Elsevier Inc;2006, p.2119-2148.
14. Ali SZ, Cibas ES edit. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria and Explanatory Notes. New York:Springer Press;2010.
15. Cibas ES. Thyroid. In: Cibas ES, Ducatman BS. Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates, 3th edition. Philadelphia:Saunders/Elsevier Inc;2009, p.255-284.
16. Kurian EM, Dawlett M, Wang J, Gong Y, Guo M. The triage efficacy of fine needle aspiration biopsy for follicular variant of papillary thyroid carcinoma using the Bethesda reporting guidelines. *Diagn Cytopathol*. 2012 May;40 Suppl 1:E69-73.
17. Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf J, Shaha A, Tuttle M, Fagin JA, Ghossein RA. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Mod Pathol*. 2010 Sep;23(9):1191-200.
18. Chung D, Ghossein RA, Lin O. Macrofollicular variant of papillary carcinoma: a potential thyroid FNA pitfall. *Diagn Cytopathol*. 2007 Sep;35(9):560-4.
19. Goellner JR, Johnson DA. Cytology of cystic papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytol*. 1982 Nov-Dec;26(6):797-808.
20. Moreira AL, Waisman J, Cangiarella JF. Aspiration cytology of the oncocytic variant of papillary adenocarcinoma of the thyroid gland. *Acta Cytol*. 2004 Mar-Apr;48(2):137-41.
21. Baloch ZW, LiVolsi VA. Warthin-like papillary carcinoma of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Aug;124(8):1192-5.
22. Baloch Z, Livolsi VA, Tondon R. Aggressive variants of follicular cell derived thyroid carcinoma; the so called 'Real Thyroid Carcinomas'. *J Clin Pathol*. 2013 Sep;66(9):733-43.
23. Casey MB, Sebo TJ, Carney JA. Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland: cytologic features in 29 cases. *Am J Surg Pathol*. 2004 Jul;28(7):859-67.
24. Cibas ES, Ali SZ; NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol*. 2009 Nov;132(5):658-65.
25. Maruta J, Hashimoto H, Suehisa Y, Yamashita H, Noguchi S, Aratake Y, Ohno E, Kobayashi TK. Improving the diagnostic accuracy of thyroid follicular neoplasms: cytological features in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2011 Jan;39(1):28-34.

26. Goldstein RE, Netterville JL, Burkey B, Johnson JE. Implications of follicular neoplasms, atypia, and lesions suspicious for malignancy diagnosed by fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Ann Surg*. 2002 May;235(5):656-62.
27. Ozluk Y, Pehlivan E, Gulluoglu MG, Poyanli A, Salmaslioglu A, Colak N, Kapran Y, Yilmazbayhan D. The use of the Bethesda terminology in thyroid fine-needle aspiration results in a lower rate of surgery for nonmalignant nodules: a report from a reference center in Turkey. *Int J Surg Pathol*. 2011 Dec;19(6):761-71.
28. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jun;94(6):2092-8.
29. Tomei S, Marchetti I, Zavaglia K, Lessi F, Apollo A, Aretini P, Di Coscio G, Bevilacqua G, Mazzanti C A molecular computational model improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules. *BMC Cancer*. 2012 Sep 7;12:396.
30. Mahajan A, Lin X, Nayar R. Thyroid Bethesda reporting category, 'suspicious for papillary thyroid carcinoma', pitfalls and clues to optimize the use of this category. *Cytopathology*. 2013 Apr;24(2):85-91.
31. Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med*. 1993 Feb 15;118(4):282-9.
32. Kang G, Cho EY, Shin JH, Chung JH, Kim JW, Oh YL. Role of BRAFV600E mutation analysis and second cytologic review of fine-needle aspiration for evaluating thyroid nodule. *Cancer Cytopathol*. 2012 Feb 25;120(1):44-51.
33. Harvey AM, Truong LD, Mody DR. Diagnostic pitfalls of Hashimoto's/lymphocytic thyroiditis on fine-needle aspirations and strategies to avoid overdiagnosis. *Acta Cytol*. 2012;56(4):352-60.
34. Hassell LA, Gillies EM, Dunn ST. Cytologic and molecular diagnosis of thyroid cancers: is it time for routine reflex testing? *Cancer Cytopathol*. 2012 Feb 25;120(1):7-17.
35. Rodrigues HG, de Pontes AA, Adan LF. Use of molecular markers in samples obtained from preoperative aspiration of thyroid. *Endocr J*. 2012;59(5):417-24.
36. Monaco SE, Pantanowitz L, Khalbuss WE, Benkovich VA, Ozolek J, Nikiforova MN, Simons JP, Nikiforov YE. Cytomorphological and molecular genetic findings in pediatric thyroid fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol*. 2012 Oct 25;120(5):342-50.
37. Berri RN, Lloyd LR. Defining the role of fine-needle aspiration of thyroid nodules in male patients: is it necessary? *Am J Surg*. 2008 Mar;195(3):396-8; discussion 398-400.

38. Yeh MW, Demircan O, Ituarte P, Clark OH. False-negative fine-needle aspiration cytology results delay treatment and adversely affect outcome in patients with thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2004 Mar;14(3):207-15.
39. Nasuti JF, Gupta PK, Baloch ZW. Diagnostic value and cost-effectiveness of on-site evaluation of fine-needle aspiration specimens: review of 5,688 cases. *Diagn Cytopathol*. 2002 Jul;27(1):1-4.
40. Raab SS, Vrbin CM, Grzybicki DM, Sudilovsky D, Balassanian R, Zarbo RJ, Meier FA. Errors in thyroid gland fine-needle aspiration. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jun;125(6):873-82.
41. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Lombardi CP, Pontecorvi A, Vellone VG, Zannoni GF, Larocca LM, Fadda G. BRAF (V600E) mutation analysis on liquid-based cytology-processed aspiration biopsies predicts bilaterality and lymph node involvement in papillary thyroid microcarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2013 Jun;121(6):291-7.
42. Lee JS, Choi HS, Park IA, Ryu HS. Liquid-based fine needle aspiration biopsy of papillary thyroid carcinoma: logistic regression analysis with conventional and new cytomorphologic features. *Acta Cytol*. 2013;57(3):233-40.
43. Crippa S, Mazzucchelli L, Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for reporting thyroid fine-needle aspiration specimens. *Am J Clin Pathol*. 2010 Aug;134(2):343-4; author reply 345.
44. Baloch ZW, Cibas ES, Clark DP, Layfield LJ, Ljung BM, Pitman MB, Abati A. The National Cancer Institute Thyroid fine needle aspiration state of the science conference: a summation. *Cytojournal*. 2008 Apr 7;5:6.
45. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May;135(5):569-77.
46. Mehta V, Nikiforov YE, Ferris RL. Use of molecular biomarkers in FNA specimens to personalize treatment for thyroid surgery. *Head Neck*. 2012 Sep 13.[Epub ahead of print]
47. Li X, Abdel-Mageed AB, Kandil E. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2012;5(4):310-5.
48. Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J*. 2000 Oct 16;19(20):5429-39.
49. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):855-67.
50. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007 Dec;28(7):742-62.

51. Stanojevic B, Dzodic R, Saenko V, Milovanovic Z, Krstevski V, Radlovic P, Buta M, Rulic B, Todorovic L, Dimitrijevic B, Yamashita S. Unilateral follicular variant of papillary thyroid carcinoma with unique KRAS mutation in struma ovarii in bilateral ovarian teratoma: a rare case report. *BMC Cancer*. 2012 Jun 8;12:224.
52. Schmidt J, Derr V, Heinrich MC, Crum CP, Fletcher JA, Corless CL, Nosé V. BRAF in papillary thyroid carcinoma of ovary (struma ovarii). *Am J Surg Pathol*. 2007 Sep;31(9):1337-43.
53. Adeniran AJ, Hui P, Chhieng DC, Prasad ML, Schofield K, Theoharis C. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance. *Acta Cytol*. 2011;55(6):570-5.
54. Kleiman DA, Sporn MJ, Beninato T, Crowley MJ, Nguyen A, Uccelli A, Scognamiglio T, Zarnegar R, Fahey TJ 3rd. Preoperative BRAF(V600E) mutation screening is unlikely to alter initial surgical treatment of patients with indeterminate thyroid nodules: a prospective case series of 960 patients. *Cancer*. 2013 Apr 15;119(8):1495-502.
55. Colanta A, Lin O, Tafe L, Ghossein R, Nafa K, Mitchell T, Ladanyi M, Arcila M. BRAF mutation analysis of fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma: impact on diagnosis and prognosis. *Acta Cytol*. 2011;55(6):563-9.
56. Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2012 Sep;91(5):274-86.
57. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufaro AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6373-9.
58. Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Nov 25;1756(2):115-25.
59. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;88(6):2745-52.
60. Theoharis C, Roman S, Sosa JA. The molecular diagnosis and management of thyroid neoplasms. *Curr Opin Oncol*. 2012 Jan;24(1):35-41.
61. Faquin WC. The thyroid gland: recurring problems in histologic and cytologic evaluation. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Apr;132(4):622-32.
62. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 May 28;321(1):86-93.

63. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2002 Jan;26(1):41-4.
64. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol*. 2012;56(4):333-9.
65. Rago T, Fiore E, Scutari M, Santini F, Di Coscio G, Romani R, Piaggi P, Ugolini C, Basolo F, Miccoli P, Pinchera A, Vitti P. Male sex, single nodularity, and young age are associated with the risk of finding a papillary thyroid cancer on fine-needle aspiration cytology in a large series of patients with nodular thyroid disease. *Eur J Endocrinol*. 2010 Apr;162(4):763-70.
66. Virk RK, Van Dyke AL, Finkelstein A, Prasad A, Gibson J, Hui P, Theoharis CG, Carling T, Roman SA, Sosa JA, Udelsman R, Prasad ML. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a genotype-phenotype correlation. *Mod Pathol*. 2013 Jan;26(1):62-70.
67. Filicori F, Keutgen XM, Buitrago D, AlDailami H, Crowley M, Fahey TJ 3rd, Zarnegar R. Risk stratification of indeterminate thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens based on mutation analysis. *Surgery*. 2011 Dec;150(6):1085-91.
68. Wu HH, Jones JN, Grzybicki DM, Elsheikh TM. Sensitive cytologic criteria for the identification of follicular variant of papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol*. 2003 Nov;29(5):262-6.
69. Deveci MS, Deveci G, LiVolsi VA, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular lesions of the thyroid. Diagnosis and follow-Up. *Cytojournal*. 2006 Apr 7;3:9.
70. Baloch ZW, Livolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol*. 2002 Jan;117(1):143-50.
71. Baloch ZW, Gupta PK, Yu GH, Sack MJ, LiVolsi VA. Follicular variant of papillary carcinoma. Cytologic and histologic correlation. *Am J Clin Pathol*. 1999 Feb;111(2):216-22.
72. Raber W, Kaserer K, Niederle B, Vierhapper H. Risk factors for malignancy of thyroid nodules initially identified as follicular neoplasia by fine-needle aspiration: results of a prospective study of one hundred twenty patients. *Thyroid*. 2000 Aug;10(8):709-12.
73. Miller B, Burkey S, Lindberg G, Snyder WH 3rd, Nwariaku FE. Prevalence of malignancy within cytologically indeterminate thyroid nodules. *Am J Surg*. 2004 Nov;188(5):459-62.
74. Renshaw AA. Sensitivity of fine-needle aspiration for papillary carcinoma of the thyroid correlates with tumor size. *Diagn Cytopathol*. 2011 Jul;39(7):471-4.
75. Jo VY, Renshaw AA, Krane JF. Relative sensitivity of thyroid fine-needle aspiration by tumor type and size. *Diagn Cytopathol*. 2013 Oct;41(10):871-5.

76. Yang J, Schnadig V, Logrono R, Wasserman PG. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer*. 2007 Oct 25;111(5):306-15.
77. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, Yip L, Seethala RR, Tublin ME, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforova MN. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Nov;96(11):3390-7.
78. Jean-Gilles J, Fischer AH, Luu MH, Owens CL. Clinical and pathologic features and clinical impact of false negative thyroid fine-needle aspirations. *Cancer Cytopathol*. 2012 Oct 25;120(5):326-33.
79. Argon A, Uyaroğlu MA, Nart D, Ertan Y, Veral A. Tiroidin malign tümörleri arasında papiller karsinom foliküler varyantın yeri ve sitohistolojik korelasyonu. *Türk Patoloji Dergisi* 2011;27.(Suppl):249.
80. Faquin WC, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular patterned lesions of the thyroid: Diagnosis, management, and follow-up according to National Cancer Institute (NCI) recommendations. *Diagn Cytopathol*. 2010 Oct;38(10):731-9.
81. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol*. 2012;56(4):333-9.
82. Theoharis CG, Schofield KM, Hammers L, Udelsman R, Chhieng DC. The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1215-23.
83. Renshaw AA. Subclassification of atypical cells of undetermined significance in direct smears of fine-needle aspirations of the thyroid: distinct patterns and associated risk of malignancy. *Cancer Cytopathol*. 2011 Oct 25;119(5):322-7.
84. Onder S, Firat P, Ates D. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: an institutional experience of the outcome of indeterminate categories. *Cytopathology*. 2013 Sep 2. [Epub ahead of print]
85. Firat P, Cochand-Priollet B. The Bethesda system for reporting thyroid fine needle aspiration cytology: a study comparing the results of two centers from two different countries. *Ann Pathol*. 2012 Dec;32(6):e29-34, 415-20.
86. Elsheikh TM, Asa SL, Chan JK, DeLellis RA, Heffess CS, LiVolsi VA, Wenig BM. Interobserver and intraobserver variation among experts in the diagnosis of thyroid follicular lesions with borderline nuclear features of papillary carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008 Nov;130(5):736-44.

87. Rosai J. The encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: back to the drawing board. *Endocr Pathol*. 2010 Mar;21(1):7-11.
88. Cibas ES, Baloch ZW, Fellegara G, Livolsi VA, Raab SS, Rosai J, Diggans J, Friedman L, Kennedy GC, Kloos RT, Lanman RB, Mandel SJ, Sindy N, Steward DL, Zeiger MA, Haugen BR, Alexander EK. A prospective assessment defining the limitations of thyroid nodule pathologic evaluation. *Ann Intern Med*. 2013 Sep 3;159(5):325-32.
89. Tysome JR, Chandra A, Chang F, Puwanarajah P, Elliott M, Carroll P, Powrie J, Hubbard JG, Clarke SE, Jeannon JP, Simo R. Improving prediction of malignancy of cytologically indeterminate thyroid nodules. *Br J Surg*. 2009 Dec;96(12):1400-5.
90. Wu HH, Rose C, Elsheikh TM. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: An experience of 1,382 cases in a community practice setting with the implication for risk of neoplasm and risk of malignancy. *Diagn Cytopathol*. 2012 May;40(5):399-403.
91. Nishigami K, Liu Z, Taniguchi E, Koike E, Ozaki T, Mori I, Kakudo K. Cytological features of well-differentiated tumors of uncertain malignant potential: Indeterminate cytology and WDT-UMP. *Endocr J*. 2012 Jun 30;59(6):483-7.
92. Das DK, Sharma PN. Diagnosis of papillary thyroid carcinoma in fine needle aspiration smears: factors that affect decision making. *Acta Cytol*. 2009 Sep-Oct;53(5):497-506.
93. Zhang Y, Fraser JL, Wang HH. Morphologic predictors of papillary carcinoma on fine-needle aspiration of thyroid with ThinPrep preparations. *Diagn Cytopathol*. 2001 Jun;24(6):378-83.
94. Shih SR, Li HY, Hsiao YL, Chang TC. Prognostic significance of cytologic features in fine-needle aspiration cytology samples of papillary thyroid carcinoma: preliminary report. *Thyroid*. 2006 Aug;16(8):775-80.
95. Yehuda M, Payne RJ, Seaberg RM, MacMillan C, Freeman JL. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: atypical cytopathological features. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 May;133(5):477-80.
96. Weber D, Brainard J, Chen L. Atypical epithelial cells, cannot exclude papillary carcinoma, in fine needle aspiration of the thyroid. *Acta Cytol*. 2008 May-Jun;52(3):320-4.
97. Kefeli M, Akpolat I, Yildirim A, Sunter AT, Kandemir B. Morphometric analysis in cytologic evaluation of papillary thyroid carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol*. 2010 Aug;32(4):234-8.
98. Das DK. Intranuclear cytoplasmic inclusions in fine-needle aspiration smears of papillary thyroid carcinoma: a study of its morphological forms, association with nuclear grooves, and mode of formation. *Diagn Cytopathol*. 2005 May;32(5):264-8.

99. Fischer AH, Bond JA, Taysavang P, Battles OE, Wynford-Thomas D. Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure. *Am J Pathol.* 1998 Nov;153(5):1443-50.
100. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, Kim M, Tufaro A, Ladenson P, Zeiger M, Tufano R. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jun 20;27(18):2977-82.
101. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, Sidransky D, Westra WH. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 15;10(8):2761-5.
102. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):245-62.
103. Cañadas-Garre M, Becerra-Massare P, López de la Torre-Casares M, Villar-del Moral J, Céspedes-Mas S, Vélchez-Joya R, Muros-de Fuentes T, García-Calvente C, Piédrola-Maroto G, López-Nevot MA, Montes-Ramírez R, Llamas-Elvira JM. Reduction of false-negative papillary thyroid carcinomas by the routine analysis of BRAF(T1799A) mutation on fine-needle aspiration biopsy specimens: a prospective study of 814 thyroid FNAB patients. *Ann Surg.* 2012 May;255(5):986-92.
104. Bentz BG, Miller BT, Holden JA, Rowe LR, Bentz JS. B-Raf V600E mutational analysis of fine needle aspirates correlates with diagnosis of thyroid nodules. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 May;140(5):709-14.
105. Ohori NP, Nikiforova MN, Schoedel KE, LeBeau SO, Hodak SP, Seethala RR, Carty SE, Ogilvie JB, Yip L, Nikiforov YE. Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of "follicular lesion of undetermined significance/atypia of undetermined significance". *Cancer Cytopathol.* 2010 Feb 25;118(1):17-23.
106. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal.* 2006 Apr 10;3:10.
107. Ohori NP, Singhal R, Nikiforova MN, Yip L, Schoedel KE, Coyne C, McCoy KL, LeBeau SO, Hodak SP, Carty SE, Nikiforov YE. BRAF mutation detection in indeterminate thyroid cytology specimens: underlying cytologic, molecular, and pathologic characteristics of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2013 Apr;121(4):197-205.
108. Gupta N, Dasyam AK, Carty SE, Nikiforova MN, Ohori NP, Armstrong M, Yip L, LeBeau SO, McCoy KL, Coyne C, Stang MT, Johnson J, Ferris RL, Seethala R, Nikiforov YE, Hodak SP. RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers. *Clin Endocrinol Metab.* 2013 May;98(5):E914-22.

109. Lee SR, Jung CK, Kim TE, Bae JS, Jung SL, Choi YJ, Kang CS. Molecular Genotyping of Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma Correlates with Diagnostic Category of Fine-Needle Aspiration Cytology: Values of RAS Mutation Testing. *Thyroid*. 2013 Jul 25. [Epub ahead of print]





