

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**



TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**Patolojik Tanısı “Belirsiz Sitoloji” Olan Tiroit Nodüllerinde Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı
Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi**

DR. GİZEM KÖK KILIÇ

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. EMİN KARACA**

İZMİR

2022

ÖN SÖZ

Bu çalışmanın planlanmasından, son kısmına değin her aşamada sabır ve anlayışla yanımda olan, herhangi bir sorun anında benimle tüm tecrübelerini paylaşan, her daim işlerin en kolay şekilde çözülmesine vesile olan, çalışmaktan her zaman keyif aldığım, uzmanlık eğitimim boyunca sayısız şey öğrendiğim değerli hocam Doç. Dr. Emin Karaca'ya

Sadece bilgi ve tecrübelerini değil, aynı zamanda desteklerini de esirgemeyen; iyi bir uzmanlık eğitimi almamız için büyük emek harcayan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Haluk Akın olmak üzere; Prof. Dr. Ferda Özkınay'a, Prof. Dr. Özgür Çoğulu'ya, Prof. Dr. Hüseyin Onay'a, Doç. Dr. Asude Durmaz'a, Doç. Dr. Burak Durmaz'a, Doç. Dr. Ayça Aykut'a, Uzm. Dr. Erhan Parıltay'a, Uzm. Dr. Aslı Ece Solmaz'a, Doç. Dr. Tahir Atık'e, Doç. Dr. Esra Işık'a

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum, her alanda bana esin kaynağı olan Prof. Dr. Özer Makay'a; değerli vaktini ayırarak, tezime çok önemli dokunuşlar yapan Prof. Dr. Süreyya Özbek'e; tezin son anına kadar alanındaki tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Yeşim Ertan ve Prof. Dr. Deniz Nart'a; sabırla her sorunuma çözüm arayan Uzm. Dr. Ali Mızrak'a, Uzm. Dr. Hatice Özışık'a, Uzm. Su Özgür'e; bu tezin ortaya çıkmasında buraya sığdıramadığım sayısız değerli katkıları olan hocalarım Doç. Dr. Mehmet Erdoğan'a, Prof. Dr. Sadık Tamsel'e ve Doç. Dr. Murat Özdemir'e

Eğitim yolculuğumu keyifle paylaştığım ve her alanda çok şey paylaştığım sevgili arkadaşlarım; Dr. Duygu Arıcan'a, Uzm. Dr. Hilmi Bolat'a, Uzm. Dr. Emine İpek Ceylan'a, Uzm. Dr. Tuba Sözen Türk'e, Uzm. Dr. Zehra Cengisiz'e, Uzm. Dr. Elif Uzay'a, Uzm. Dr. Semih Aşıkovalı'ya, Dr. Anıl Kalyoncu'ya, Dr. Mert Pekerbaş'a, Dr. Burak Aşçıoğlu'na, Dr. Vedat Sivri'ye, Dr. Çağlar Arısoy'a, Dr. Bilgesu Ak'a, Dr. Özge Güngör'e, Dr. Ömer Alpay'a, Dr. Alper Baysal'a, Dr. Burcu Topçu'ya, Dr. Elif Kubar'a, Dr. Zeki Sakallı'ya, Dr. Burak Tokaç'a, Dr. Vedat Kavak'a

Hayata gözlerimi açtığım ilk andan şu ana dek ellerinden gelen her fedakarlığı yapan, benim ilk öğretmenlerim canım annem ve babam'a; en iyi arkadaşım olan ve neye ihtiyacım olduğunu benden bile daha iyi bilen biricik kardeşim İrem'e;

Her koşulda beni destekleyen ve hayatıma her zaman çok güzel dokunuşlar yapan sevgili eşim Aykut'a

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gizem KÖK KILIÇ

İzmir, 2022

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Genetik Bir Hastalık Olarak Kanser ve Patofizyolojisi.....	3
2.2 Tiroit Bezi.....	5
2.2.1 Tiroit Bezinin Evrimsel Özellikleri.....	6
2.2.2 Embriyolojisi ve Histolojisi.....	6
2.2.2.1 Embriyolojisi	6
2.2.2.2 Embriyogenezde Görevli Moleküler Yolaklar.....	7
2.2.2.3 Histolojisi.....	9
2.2.3 Tiroit Hormonları ve Biyosentezi.....	10
2.2.3.1 Tiroit hormon biyosentezi.....	11
2.3 Tiroit Nodülü ve Tiroit Kanseri.....	14
2.3.1 Epidemiyolojisi.....	14
2.3.2 Etiyolojisi.....	15
2.3.3 Klinik Özellikleri, Tanı ve Tedavisi.....	17
2.4 Tiroit Neoplazmlarındaki Genetik Mekanizmalar.....	26
2.5 Tiroit Nodülüne Yaklaşımda Genetik Belirteçlerin Rolü.....	32
2.6 Germline ve Somatik Varyantlara Yaklaşım.....	34
2.7 DNA ve RNA Temelli Sekanslama Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	35
2.8 Tiroit Nodülünün Moleküler İncelemesinde Tercih Edilen Güncel Yöntemlerin Karşılaştırılması	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1 Örneklem Grubunun Seçilmesi.....	39

3.2	Genetik İnceleme.....	40
3.2.1	Genetik İnceleme.....	43
3.2.2	DNA Konsantrasyonunun Ölçümü.....	44
3.2.3	Yeni Nesil Dizileme (Kütüphane Hazırlığı ve Sekanslama).....	44
3.3	Verilerin Analizi.....	54
3.4	İstatistiksel Analiz.....	56
4.	BULGULAR.....	57
4.1	Çalışma Grubuna Seçilen Örneklerin Verileri.....	57
4.2	Genetik Analiz Sonuçları ve Doku Patoloji Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	58
4.3	Bulguların İstatistiksel Karşılaştırılması.....	90
5.	TARTIŞMA.....	92
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
7.	KAYNAKÇA.....	101
8.	EKLER	
8.1	Etik Kurul Onay Belgesi	
8.2	Gönüllü Onam Formu	
8.3	Veri Toplama Formu	
8.4	Tez Çalışması Orijinallik Raporu	

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Diferansiye tiroit foliküler hücrelerinden eksprese edilen transkripsiyon faktörleri.....	8
Tablo 2: Sendromik non-medüller tiroit karsinomu ile ilişkili genler.....	16
Tablo 3: Tiroit nodülünün ultrasonografik özellikleri.....	18
Tablo 4: ATA kılavuzuna göre sonografik özelliklere göre öneriler.....	19
Tablo 5: Bethesda sınıflaması ve karşılık gelen malignensi riski oranları.....	20
Tablo 6: Tiroit tümörlerinin 2017 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması.....	23
Tablo 7: Foliküler hücre kökenli tiroit tümörlerinin 2022 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması.....	24
Tablo 8: Papiller tiroit karsinom alt grupları, DSÖ 2022.....	25
Tablo 9: Mutasyonlar ve en çok ilişkilendirildikleri histolojik tipler.....	34
Tablo 10: Tiroit nodül ince iğne aspirasyon biyopsilerinin moleküler değerlendirilmesi için kullanılan tiroit spesifik paneller ile Archer Variantplex Solid Tümör Panelinin karşılaştırılması	
Tablo 11: Çalışmaya dâhil olma ve dışlanma kriterleri.....	37
Tablo 12: Archer VariantPlex Solid Tümör Paneli içeriği.....	37
Tablo 13: Reaktifler ve kullanılan volümler (reaksiyon başına).....	45
Tablo 14: Fragmentasyon basamağı	46
Tablo 15: Uç tamir (end-repair) basamağı.....	46
Tablo 16: Birinci ligasyon basamağı.....	47
Tablo 17: İkinci ligasyon basamağı.....	49
Tablo 18: Ligasyon elution (ayırıştırma) basamağı.....	50
Tablo 19: Birinci PCR döngüsü.....	50
Tablo 20: İkinci PCR döngüsü.....	52
Tablo 21: Nextseq yükleme protokolü.....	54
Tablo 22: Varyant çağırma için kullanılan değişkenler.....	55
Tablo 23: Örneklem verileri ve elde edilen DNA miktarı	57
Tablo 24: Saptanan varyantlar ve özellikleri.....	58
Tablo 25: Saptanan varyantlar ve nodül patolojilerinin karşılaştırılması.....	59
Tablo 26: Hasta 1'e ait veriler	61
Tablo 27: Hasta 2'ye ait veriler.....	62
Tablo 28: Hasta 3'e ait veriler.....	63
Tablo 29: Hasta 4'e ait veriler.....	65
Tablo 30: Hasta 5'e ait veriler.....	66

Tablo 31: Hasta 6'ya ait veriler.....	68
Tablo 32: Hasta 7'ye ait veriler.....	70
Tablo 33: Hasta 8'e ait veriler.....	71
Tablo 34: Hasta 9'a ait veriler.....	72
Tablo 35: Hasta 10'a ait veriler.....	74
Tablo 36: Hasta 11'a ait veriler.....	75
Tablo 37: Hasta 12'a ait veriler.....	77
Tablo 38: Hasta 13'e ait veriler.....	78
Tablo 39: Hasta 14'e ait veriler.....	80
Tablo 40: Hasta 15'e ait veriler.....	81
Tablo 41: Hasta 16'a ait veriler.....	83
Tablo 42: Hasta 17'a ait veriler.....	84
Tablo 43: Hasta 18'e ait veriler.....	85
Tablo 44: Hasta 19'a ait veriler.....	87
Tablo 45: Hasta 20'ye ait veriler.....	89
Tablo 46: Genetik analiz verilerinin bethesda gruplarına göre saptanma yüzdesi.....	90
Tablo 47: Genetik analiz verilerinin patoloji sonuçları ile karşılaştırılması.....	90
Tablo 48: Testin malign ve benign nodüllerde varyant saptama dağılımı.....	91
Tablo 49: Testlerin sensitivite, spesivite, PPV ve NPV oranlarının karşılaştırılması.....	91

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Tiroit folikül hücresi ve tiroit hormon sentezi.....	12
Şekil 2: T3'ün nükleusta gen transkripsiyonunu başlatması	13
Şekil 3: Mitojenik olarak görev yapan 3 yolak	27
Şekil 4: Tirositin çok basamaklı karsinogenez teorisine göre evrimi.....	28
Şekil 5: Karsinogenez mekanizmalarının karşılaştırılması	30
Şekil 6: Fetal hücre karsinogenezi	30
Şekil 7: Tiroit karsinogenezi teoremi	31
Şekil 8: Kütüphane hazırlığı iş akışı.....	45
Şekil 9: İnversiyon sonucunda <i>PIK3CA</i> 'da saptanan değişiklikler.....	69

KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG: Amerikan Tıbbi Genetik Ve Genomik Koleji

AF: Allel Frekansı

AKT: Protein Kinaz B

AMP: Moleküler Patoloji Derneği

AO: Allelin Okuma Sayısı

ATA: Amerikan Tiroid Derneği

AUS: Önemi Bilinmeyen Atipi

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CNV: Kopya Sayısı Değişiklikleri

CREB: Camp Response Element Bağlanma Proteini

DAG: Diaçil Gliserol

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

DTC: Diferansiye Tiroit Kanseri

ETA: Avrupa Tiroid Derneği

FAP: Familial Adenomatöz Polipozis

FDA: Birleşik Devletler Gıda Ve İlaç Dairesi

FLUS: Önemi Bilinmeyen Foliküler Lezyon

FNMTK: Ailesel Non-Medüller Tiroit Karsinomları

FTC: Foliküler Tiroid Karsinomu

FVPTC: Foliküler Varyant PTC

GİST: Gastrointestinal Stromal Tümör

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1

İİAB: İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi

İndel: Küçük İnseriyon-Delesyon

MAF: Minör Allel Frekansı

MEN: Multipl Endokrin Neoplazi

MTC: Medüller Tiroit Kanseri

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NIFTP: Non-İnvaziv Foliküler Tiroid Neoplazm PTC

NMTK: Non-Medüller Tiroit Karsinomları

NPV: Negatif Prediktif Değer

PI3K: Fosfoinozitol 3 Kinaz

PPV: Pozitif Prediktif Değer

PTC: Papiller Tiroit Kanseri

RNA: Ribonükleik Asit

Rt3: Revers-T3

RXR: Retinoid X Reseptörü

SNP: Tek Nükleotit Değişiklikleri

T3: Triiyodotironin

T4: Tiroksin

TBG: Tiroksin Bağlayıcı Globülin

TSG: Tümör Baskılayıcı Gen

TCGA: Tümör Kanseri Genom Atlas

TG: Tiroglobin

TH: Tiroit Hormonları

TN: Tiroit Nodülleri

TPO: Tiroid Peroksidaz

TRE: T3 Responding Eleman

TRH: Tirotropin Salgılayıcı Hormon

TSH: Tiroit Stimüle Edici Hormon

TSHR: TSH Reseptörü

TTF: Tiroit Transkripsiyon Faktörleri

UAO: Değişen Allelin Özgün Okuma Sayısı

USG: Ultrasonografi

ÖZET

Patolojik Tanısı “Belirsiz Sitoloji” Olan Tiroit Nodüllerinde Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi

Amaç: Tiroit nodülleri toplumda yaygın görülen bir sorunu temsil eder. Saptanan tiroit nodüllerine yaklaşımda en önemli aşama malignite riskinin tespiti. Bunun için hastaya ait risk faktörleri, fizik muayene, ultrasonografi gibi nodüle ait ipuçlarının toplanması gereklidir. İİAB, nodüllerin sitopatolojik incelemesine olanak sağlar. Sitopatolojik olarak belirsiz grupta kalan nodüllere yaklaşım klinik pratikteki önemli zorluklardan birini oluşturur. Bu örneklerin moleküler profillemesi son dönemde öne çıkan seçeneklerdendir. Çalışmamızda belirsiz sitolojiye sahip nodüllerin moleküler analizi yapılarak; klinik pratikte malign-benign ayırımına katkı sağlaması ve klinik yönetime yardımcı olacak belirteçlerin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza 20 adet belirsiz sitolojiye sahip tiroit nodül aspirasyon örneği dahil edildi. Örnekler ameliyat kararı verilmiş hastalara aitti ve cerrahi patoloji sonucu mevcuttu. Örneklerin moleküler profillemesinde, 67 geni içeren bir yeni nesil dizileme paneli kullanıldı. Analiz sonuçları cerrahi patolojik veriler altın standart kabul edilerek kıyaslandı. Kullanılan yöntemin sensitivite, spesivite, PPV ve NPV değerleri belirlendi.

Bulgular: Analiz sonucunda 20 örnekten 10 tanesinde 6 farklı gene (*BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *TERT*, *PIK3CA*, *TP53*) ait Tier 1 veya Tier 2 varyant saptandı. Çalışmaya dahil edilen 15 örneğin cerrahi patoloji sonucu malign, 5 örneğin ise benign idi. Malign patolojiye sahip örneklerin 10 tanesi tiroidin papiller karsinomu, 5 tanesi ise tiroidin papiller mikrokarsinomu idi. Bir hastaya lenf nodu metastazı eşlik etmekteydi (Evre IVA), bir hastanın tümör çapı 4 cm’den büyüktü (Evre III) ve bir hastanın ise 2.2 cm idi (Evre II). Varyant saptanan 9 hastanın patoloji sonucu malign, bir hastanın ise benign idi. Varyant saptanan hastaların yaş ortalaması 56 iken, varyant saptanmayan grubun 46 idi. Testte NPV: %40, PPV: %90, Spesivite: %60, Sensitivite: %80 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Tüm örneklerle ait aspirasyon materyalinden elde edilen DNA çalışma için yeterli olmuştur. Elde edilen moleküler belirteçler ile en az 9 hastada İİAB girişimi tekrarı gerekmeden yönetim doğru şekilde yapılabilirdi. Çalışmada kullanılan test dahil etme testi (rule-in) olarak, özellikle 45 yaş üstü hastalarda, yararlı olabilir. Çalışma belirsiz sitolojiye sahip nodüllerin yönetiminde giderek geçerlilik kazanan moleküler testlerin, klinik pratikteki faydasının altını çizmektedir. Ülkemizdeki ilk çalışma olarak sonraki çalışmalara öncülük etmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İİAB; Tiroit Nodülü; Tiroit Kanseri; NGS

ABSTRACT

Next Generation Sequence-Based Targeted Somatic Mutation Analysis in Thyroid Nodules with Pathologically Diagnosed as “Indeterminate Cytology”

Objective: Thyroid nodules represent a common problem in the population. The most crucial step following the detection of a thyroid nodule is to estimate the malignancy risk. For this, it is essential to collect clues about the nodule by investigating the risk factors of the patient, performing a physical examination, and ultrasonography. FNAB allows the examine the nodule's cytopathological characters. The approach to the nodules with indeterminate cytology is still challenging in daily practice. Molecular profiling has recently become one of the promising options. In our study; somatic mutation analysis was performed on nodules with indeterminate cytology. It aims to help identify nodule characters as malign or benign and search for markers that will help the clinical management.

Materials and Methods: Aspiration samples from 20 thyroid nodules with indeterminate cytology were included in our study. The specimens belonged to patients who had undergone surgery, and because of that, surgical pathology results were available. A next-generation sequencing panel containing 67 genes was used for molecular profiling of the samples. The results were compared with the pathology of surgery material data, which is accepted as the gold standard. Sensitivity, specificity, PPV, and NPV were calculated.

Results: The study detected variants of 6 different genes (*BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *TERT*, *PIK3CA*, *TP53*) in 10 of 20 samples. Surgical pathology results of 15 samples were malignant and 5 samples were benign. The malignant pathology consisted of 10 PTCs and 5 PMCs. One patient had lymph node metastasis (Stage IVA), one patient had a tumor of 4.2 cm (Stage III), and one had a tumor of 2.2 cm (Stage II). There were nine malignant and one benign surgical pathology in the patient group with variant. The mean age of the samples with variants was 56, and 46 in the non-variant group. The test was calculated as NPV: 40%, PPV: 90%, specificity: 60%, sensitivity: 80%.

Conclusion: All samples were able to obtain a sufficient amount of DNA for the study. According to the detected molecular markers, at least 9 patients could have been managed correctly without the need for a repeat FNAB. This study underlines the practical clinical utility of molecular tests in the management of nodules with indeterminate cytology. Hence it is the first study about the molecular markers in thyroid nodules in our country, it is aimed to lead the following studies.

Key Words: FNAB; Thyroid nodules; Thyroid cancer, NGS

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroit nodülleri (TN), toplumda sık rastlanan tiroit bezine ait bir hastalık grubunu oluşturur. Bu nodüllerin %10-15'ine tiroit kanseri eşlik etmektedir [1], [2]. İnce iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB), nodüllerin sitolojik incelenmesine olanak sağlar. Bethesda sınıflamasına göre nodüllerin %20-30 kadarı belirsiz (indeterminate) sitoloji (Kategori 3,4) grubunda yer alır [3]. Histopatolojik açıdan arada kalınan nodüller için; takip, biyopsi tekrarı ya da tanısal cerrahi gibi farklı seçenekler ortaya çıkmaktadır.

İİAB; invaziv, alanında yetkin klinisyen ve tıbbi patoloji uzmanı gerektiren bir işlemdir. Ayrıca işlem tekrarı her zaman bilgi verici olmayabilir. Tanısal cerrahi, kesin patolojik sonuca ulaşmak için yapılabilir. Ancak, özellikle kategori 3 ve 4 olan olgular için malignite riskinin göreceli düşük olması, tiroit dokusunun gereksiz rezeksiyonunu ve ek cerrahi maliyeti beraberinde getirmektedir. Malign patolojik tanılı hastalarda ise tamamlama cerrahisi, genellikle ikinci bir ameliyat stresi anlamına gelmektedir.

Şüpheli ve belirsiz sitolojiye sahip nodüllere klinik yaklaşımda yardımcı olacak belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu nodüllerin oldukça heterojen olması bir karar algoritması oluşturmayı zorlaştırmaktadır. Bu nodüller için çoğu kez ikinci bir invaziv işlem önerilmekte bazı benign olan nodüllere ise cerrahi yapılmaktadır. Malign nodüllerin cerrahisinde ise ek bir aşama olan tamamlama cerrahisi gerekmektedir. Bu anlamda, moleküler belirteçler cerrahi prosedür seçimine yardımcı ve klinik prognoz hakkında bilgi vericidir [4], [5]. Güncel tiroit kanser tedavisinde büyük yer kaplamasa da moleküler değişiklikleri hedef alan tedaviler pek çok kanser için oldukça popülerdir. Yakın gelecekte bu tedavilerin daha çok gündeme geleceğini söylemek mümkündür. Hedef belirteçlerin belirlenmesi bu tedavilerin temelini oluşturmaktadır.

Son dönemde, belirsiz sitoloji tanılı nodüllerin moleküler genetik açıdan incelenmesinin önemi gündeme gelmiştir ve güncel kılavuzlarda yer bulmuştur. Yapılan çalışmalar, bazı moleküler belirteçlerin, malign-benign nodül ayırımına katkı sağladığını ortaya koymuştur [6], [5], [7], [8], [9], [10].

Bu çalışmada, tiroit ultrasonografisi ve klinik değerlendirmeler doğrultusunda İİAB kararı verilen, sitopatolojik olarak malign ya da benign olarak adlandırılmayan, belirsiz tiroit nodüllerinde moleküler düzeydeki değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede sitopatolojik olarak belirsiz ve/veya foliküler neoplazi kuşkusu içeren nodüllerin karakteri hakkında bilgi verici değişikliklerin tanıya ne kadar yardımcı olduğu tartışılmıştır. Örneklerdeki

somatik değişiklikler, deoksiribonükleik asit (DNA) temelli olarak 67 geni içeren hedefe yönelik bir panel ile taranmıştır. Bulunan somatik değişiklerin, nodüllerin karakteri hakkında bilgi vericilik düzeyi ve malignite ayırımındaki önemi değerlendirilmiştir.

Nodüllerdeki moleküler değişikliklerin değerlendirilmesi, 2015 Amerikan Tiroid Derneği (ATA) ve 2017 Avrupa Tiroid Derneği (ETA) kılavuzlarında yer bulmuştur ve tanıya katkı sağlaması açısından umut vadetmektedir [2]. Bu anlamda bu nodüllerin moleküler profillemesine yönelik yapılan çalışmalar değerlidir. Bu anlamda literatüre katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

Çalışmamızda, belirsiz sitoloji saptanan İİAB örneklerine somatik mutasyon analizi yaparak; bu nodüllerdeki malign-benign ayırımına katkı sağlamak, gereksiz cerrahilerin önüne geçmeye yardımcı olmak veya cerrahiyi daha radikal hale getimeyi düşünmek, tümör agresifliği hakkında klinisyene bilgi vermek, hastanın gelecek takiplerini bu belirteçlerin verdiği ipuçlarını göz önüne alarak yapmak gibi hasta konfor ve sağ kalımını artırabilecek avantajlar sağlayacağı düşünölmüştür. Bazı moleküler belirteçler için hedefe yönelik tedaviler Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır [2]. Ek olarak, bu çalışma; daha önce bildirilmeyen bir somatik mutasyonun benign-malign ayırımına etkisini açığa çıkarmaya yardımcı olabilecek ve literatüre katkı sağlayabilecek şekilde planlanmıştır. Çalışma, ileriye yönelik maliyet etkin bir moleküler test oluşturulmasına da katkı sunmaktadır.

Bu araştırma, sensitivitesi ve spesifisitesi yüksek, tarama sağlayabilen ve maliyet etkin bir panel oluşturabilmek için ön çalışma değeri taşımaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Genetik Bir Hastalık Olarak Kanser ve Patofizyolojisi

Çok hücreli organizmaların sorunu olan kanser, temelde hücrelerin kontrolsüz olarak büyüme, çoğalma ve bulunmaması gereken dokuyu işgal etme yetisi kazanması olarak tanımlanabilir. Canlıların tek hücreli formdan çok hücreli organizasyona geçmesiyle, hücrelerin uyum içinde yaşayabilmesi elzem hale gelmiştir. Bu uyumun korunabilmesi için hücrelerin büyüme ve çoğalması; hem internal hem de eksternal faktörlerle kontrol altında tutulur. Bu kontrolün bozulduğu herhangi bir basamak, kanser gelişimi için potansiyel bir sebep olarak karşımıza çıkar.

Kanser, iskemik hastalıkların ardından dünya çapında en sık mortalite sebebidir. 2060 yılı itibariyle mortalitenin en sık sebebi olacağı öngörülmektedir [11]. Bir toplum sorunu olarak ele alındığında; uygun tarama, tanı, tedavi ve takip sağlayacak belirteçlerin önemi her geçen gün önem kazanmaktadır. Bu belirteçlere ulaşabilmenin en önemli yolu kanser patofizyolojisine hakim olmaktan geçmektedir.

Doğal bir süreç olarak, yaklaşık 10^{13} hücre içeren insan organizmasında, her gün on binlerce DNA hasarı meydana gelir. Spontan DNA hasarının hücre başına günlük 10^4 - 10^5 olduğu tahmin edilmektedir [12]. Endojen ve ekzojen mutajenlerin oluşturduğu DNA hasarı, tamir mekanizmalarınca hücre bölünmeden önce genellikle düzeltilir. Düzeltilemeyen hasarlar ise birikerek hücrenin yaşlanmasına, apoptozuna ya da kanserleşmesine yol açabilir. Biriken DNA hasarı, kanser oluşumunda büyük role sahiptir. Bu nedenle bu hasarın birikmesinin hızlanmasına sebep olan durumlar, kansere de yatkınlık oluşturabilir. DNA tamir mekanizmalarındaki defektler bunun en çarpıcı örneğidir ve pek çok herediter kanser sendromunda, bu genlerden birinde germline kalıtılan bir mutasyon saptanmaktadır. Bu aileler, topluma göre artmış kanser riski taşırlar ve bu durumu sonraki nesillere aktarabilirler. Ancak şu unutulmamalıdır ki, herediter kanser sendromuna sebep olan her bir gen için değişik oranda risk artışı mevcuttur ve sendroma sahip bir kişide ömür boyunca hiç kanser gelişmeyebilir. Ayrıca bu kişinin ne zaman veya hangi tipte bir kanserle karşı karşıya kalacağının cevabı yoktur. Genetik geçişin en belirgin olduğu bu grupta dahi, kanser gelişimi için gerekli mutasyon eşik değerinin aşılmasına ihtiyaç vardır ve çevresel faktörlerce bu süre artıp, azalabilir. Bazı kanserlerde çevresel faktörlerin etkisi daha baskındır

(örneğin; sigara-akciğer kanseri). Kanser, çevresel faktörlerle genetik faktörlerin etkileşimine bağlı ortaya çıkan multifaktöriyel bir genetik hastalıktır.

Kanser hücresi oluşmasını moleküler genetik düzeyde anlamak için tümör baskılayıcı genler (TSG) ile onkogenlerin rolleri üzerinde durmak gerekir. Normal hücre biyolojisinde büyüme ve proliferasyonu sağlayan proto-onkogenler, kanserli hücrelerde aşırı çoğalma ve büyümeye yol açabilirler. Bu genleri normalden daha fazla aktif hale getiren herhangi bir genetik değişiklik onkogenlerin kanserleşmede merkezi bir rol üstlenmesine sebep olabilir. Bu genetik değişikliğe sebep olan mekanizmalar içerisinde nokta mutasyonlar (*RAS*, *EGFR*), translokasyonlar (*BCR-ABL*), gen amplifikasyonları (*MET*, *HER2*) yer alır. Somatik mutasyonlar olarak da adlandırılan bu değişiklikler, germline mutasyonların aksine ebeveynlerden kalıtılmazlar ve tüm hücrelerde ortak olarak bulunmazlar. Bu değişiklikler, zaman içerisinde genomda meydana gelen ve spontan oldukları kabul edilen değişikliklerdir. Kimi zaman endojen mutajenlerle, kimi zaman viral enfeksiyon ya da X ışınları gibi ekzojen uyaranlarla indüklenirler. Bazı onkogenlerdeki patojenik varyantlar, germline olarak da aktarılabilir. Bunlar değişik klinik çıktıların haricinde, ortak olarak bazı tümörler için yatkınlık oluştururlar. Bu gruba örnek olarak *Ret* onkogeninin germline mutasyonlarının sebep olduğu MEN (Multipl Endokrin Neoplazi) 2A-2B, *Kit* onkogeni ilişkili GİST (Gastrointestinal Stromal Tümör), *Met* onkogeninin germline mutasyonlarının yol açtığı herediter papiller renal kanserler verilebilir [13].

Onkogenlerin keşfini takiben, kansere moleküler bakış derinliği artmıştır. Biyolojik sistemlerdeki en temel kurallardan biri olan karşıt mekanizmaların birbirini dengelemesi gerekliliği, onkogenlerin dışında bir başka grubun daha olması gerektiğini varsaymaktaydı. Hücre büyümesini indükleyenler kadar, büyümeyi baskılayan ve bu şekilde kontrol altında tutan bir grubun varlığı elzemdi. *Rb* ve *Tp53* gibi genlerin keşfi ile tümör baskılayıcı genlerin kanser patogenezindeki önemi su götürmez bir hal aldı. TSG'ler genomun bekçileridir ve normal bir hücrede daima proto-onkogenlerin aktivitesini kontrol altında tutarlar. Onkogenlerin tek alleldeki değişimi ile kanser fenotipi ortaya çıkarabilmesinin aksine, TSG'lerin genellikle biallelik kayıpları bu etkiye sebep olur. TSG'lerin kanser hücrelerinde heterozigosite kaybına sıklıkla uğraması da bunun göstergelerinden biridir. İlk kez Knudson'ın ortaya attığı "çift vuruş hipotezi", retinablastom adı verilen göz tümörlerinin ortaya çıkması için iki *Rb* geninin de bir şekilde etkisiz hale gelmesi gerektiğini savunur. Knudson yaptığı gözlemlere dayanarak ailesel retinablastomlu vakaların tek allel kaybı (tek vuruş), sporadik vakaların ise iki allel kaybı (çift vuruş) gerektirdiğini söylemiştir.

Bu gözleme göre, ailesel vakalardaki olgular, hatalı olan bir alleli doğuştan taşıdıkları için, diğer allelin ortadan kalkması tümör gelişimi için yeterli olmaktadır [13]. Gerçekten de birçok herediter kanser sendromunda, kişiler germline olarak TSG'lerden birini etkiyecek bir mutasyonunu allelelerinden birinde taşırlar. Örneğin; Familial Adenomatöz Polipozis Koli'de APC, Ailesel Retinablastom'da Rb, Li-Fraumeni Sendromunda ise Tp53 genine ait hatalı bir kopya kişinin tüm hücrelerinde mevcuttur. Bu germline taşınan varyant bazen ebeveynlerden kalıtılır, bazen de ilk kez o kişide ortaya çıkmış (de-novo) olabilir.

Yukarıda bahsedildiği üzere, kanserleşme hücre genomunun bütünlüğü ile direkt olarak ilişkilidir. Bu durum günümüzde kanserin genetik bilimi olmadan anlaşılabilmesini imkânsız kılmıştır.

2.2. Tiroit Bezi

İki lob ve ortada bağlantıyı sağlayan ince bir isthmustan oluşan tiroit bezi, ismini kalkana benzerliğinden almış olsa da, daha çok bir kelebeği andırmaktadır. Bu iki lobun dışında sıklıkla üçüncü ve daha küçük bir parça, isthmustan kranial yöne doğru çıkıntı şeklinde kendini gösterir ve piramidal lob ismini alır. Piramidal lob, erken gelişim döneminde ön barsak endoderminden farklılaşan medyan primordial tiroit dokusunun geçici bağlantı yaptığı embriyonik tiroglossal kanala ait kalıntıdır. Tiroit bezi, boynun ön kısmında, trakea'nın ön komşuluğunda, karotid arter ile juguler venin medialinde yerleşmiştir. Bu büyük venlerin embriyolojik dönemde bezin pozisyonlanmasında büyük önemi olduğu düşünülmektedir. Yüzeysel yerleşimi nedeni ile kolayca muayene edilebilir veya biyopsi alınabilir. Bir yetişkinde ortalama ağırlığı 15-20 gramdır [14], [15].

Tiroit bezi, vücut homeostazında önemli görevler üstlenen endokrin bir organdır. Tiroit bezi farklı endokrin fonksiyona sahip olan iki hormon sentezi gerçekleştirir. Bunlar tiroit hormonları (TH) ve kalsitonindir. TH olan Triiyodotironin (T3) ve Tiroksin (T4) ise metabolizma hızının regülasyonunu pek çok biyolojik sürece etki ederek sağlarlar. Bu hormonların görevleri ayrıntılı olarak "tiroit hormonları ve sentezi" bölümünde tartışılmıştır.

2.2.1 Tiroit Bezinin Evrimsel Özellikleri

Iyodine organik bileşenler evrimsel olarak hep değerli olmuştur. Hayvanlar alemindeki pek çok tür tiroit hormonu ve iyotlu bileşenleri bulundursa da, foliküler tiroit doku formasyonu vertebralılara özgüdür [14]. TH'lerin artan oranda pek çok biyolojik süreci etkilemesi, iyodun efektif şekilde saklanması ve kullanılmasını sağlamak üzere, vertebralılarda tiroit foliküllerinin evrimleşmesini gerekli kıldığı hipotezini düşündürmektedir [16]. Tiroit dokusu içerisindeki iyot yeniden kazanımı, diyetle alınan iyot miktarının 3-5 katına ulaşır [17]. Memeli tiroit bezi, diğer vertebralılardan farklı olarak parafoliküler C hücrelerini içerir. Ultimobrankial cisimlerin tiroit primordimu ile füzyonunu gerektiren bu süreç, memelilerde tiroit bezine ikinci endokrin özelliğini kazandırır.

Iyodinasyon bazı vertebrasız hayvanlarda da gerçekleşir. Bu türler, tiroid peroksidaz (TPO) sentezleme kapasitesine sahip olsalar da TH öncüsü olan tiroglobin (TG) sentezi yapamazlar, TG sentezi vertebralılara özgüdür. TG geninin evrimsel geçişte, vertebralılarda bir duplikasyon sonucu oluştuğu düşünülmektedir [14].

Tiroit bezinin şekli de türler arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Pek çok memelide, iki lob isthmus ile birbirine bağlanırken, kıkırdaklı balıklar ve bazı memelilerde tiroit tek parçadır. Amfibi ve kuşlarda ise isthmus bulunmaz ve tiroit iki bağımsız parça olarak varlığını sürdürür.

2.2.2 Embriyolojisi ve Histolojisi

2.2.2.1 Embriyolojisi

Embriyoda gelişen ilk endokrin bez olan tiroit bezi, endodermal kökenlidir. İki ayrı endokrin fonksiyon için iki ayrı endodermal prekürsör gereklidir. Faringeal taban endoderminden köken alan hücreler, TH (T3-T4) sentez üniteleri olan tiroit folikülerini oluştururlar. Bu üniteler içindeki farklılaşmış hücreler epitelyaldir ve “tirosit” adını alır. Ultimobrankial cisim endoderminden köken alan ve tiroitteki bir diğer hücre grubunu oluşturan parafoliküler C hücreler ise, nöroendokrin karakter sergilerler ve kalsitonin sentezini üstlenirler. Daha önceleri parafoliküler C hücrelerinin nöral krest kökenli olduğu düşünülse de, güncel olarak dördüncü

faringeal poşun ventralindeki ultimobrankial cisimden geliştikleri ve endodermal orijine sahip oldukları kabul edilmektedir [18]. Foliküler tiroit dokusunu çevreleyen ve aralarına separasyon yapan stromal dokunun büyük kısmı, nöral krestten köken alan ektomezankimal fibroblastlardan oluşur. Tiroit dokusu içerisinde kanserle ilişkili rolleri bakımında ilgi çekici olan makrofaj, mast hücreleri gibi başka hücre grupları da mevcuttur [16].

Gelişimin ilk kısmı fertilizasyonun 20-22. gününde tiroit anlaşılmaya başlar. Bu yapı farinks tabanının orta hattındaki endodermal bir kalınlaşmadan köken alır. Tiroit bezi gelişimin 24. gününde, kaudal yönde göç hareketine başlar ve hyoid kemiğin önüne geçer. Bu süreçte tiroglossal kanal denilen yapı sayesinde, tiroit bezi dil ile bir süre bağlantılı kalır. Tiroglossal kanal sonraki dönemde (embriyonun 30-40. günleri arasında) foramen çekum adını alarak, rutimente hal alır. Tiroit dokusunun migrasyonu embriyonun 45-50. gününe dek devam eder. Trakeanın ikinci ve üçüncü kıvrımda hizasının ventralinde nihai konumuna alan tiroit bezi, her iki taraftan genişleyerek bilobed şekline kavuşur. Embriyonun 60. gününde ultimobrankial cisim füzyonu gerçekleşir ve nihayet 70. gününde folikülogenez başlar [19], [20].

Tiroit farklılaşmasında kritik önemde olan folikülogenez, migrasyon tamamlandıktan sonra başlar. Bu andan sonra, tiroit hücre differansiasyonun göstergesi olan, *tiroglobulin (Tg)*, *tiroperoksidaz (Tpo)*, *TSH reseptörü (Tshr)*, ve *sodyum (Na) iyodin (I) simport NIS (Slc5a5)* genleri tiroit hücrelerinde eksprese olmaya başlar [18]. Foliküler hücrelerin farklılaşması tamamlanmadan, embriyoda tiroit hormon sentezi başlamayacağı için, bu ana dek embriyo tamamen annenin tiroit hormon kaynaklarına bağımlıdır. Tiroit dokusunun gelişmesi geç fetal dönemden erişkinliğe dek tiroit stimüle edici hormon (TSH) kontrolündedir ancak TSH erken dönemdeki organogenezi veya yeni folikül oluşumunu sağlamaz. Bu sürecin lokal doku faktörlerince sağlandığı düşünülmektedir [16].

2.2.2.2 Embriyogeneizde Görevli Moleküler Yolaklar

Tiroit gelişiminde görev alan transkripsiyon faktörleri ve sinyal moleküllerinin zaman içerisinde ortaya konması, tiroit embriyogeneizindeki moleküler mekanizmaların ve genetik temelin daha iyi anlaşılabilmesini sağlamıştır. En başa dönecek olursak, yukarıda tartışıldığı üzere, tiroide ait primordial yapılar ön barsak endoderminden köken almıştır. Endodermin doğru şekilde oluşması, hücrelerin farklılaşmasındaki ilk kritik basamağı oluşturur. Ventral ön barsak endoderminin, tiroit hattına özelleşmesinde, Wnt/ β -catenin, BMP ve Nodal/TGF- β sinyallerinin

büyük rollere sahip olduğu anlaşılmıştır [21]. Yapılan bir çalışmada embriyonik kök hücrelerin Fgf2 ve Bmp4 ile muamele edilmesinin, tiroit hücre özelleşmesini sağladığı gözlenmiştir [16].

Diferansiye haldeki foliküler hücreler 4 farklı transkripsiyon faktörü eksprese eder. Bunlar Nkx2-1 (tiroit transkripsiyon faktör 1, Ttf1 veya T/ebp), Foxe1 (tiroit transkripsiyon faktör 2, Ttf2), Pax8 ve Hhex olarak adlandırılmıştır (Tablo 1). Aynı zamanda tiroit transkripsiyon faktörleri (TTF) olarak adlandırılırlar ve *Tg*, *Tpo*, *Tshr* gibi tiroit spesifik genlerin promoter bölgesine bağlanırlar [18].

Nkx2-1 (Nk2 Homeobox 1), sadece tiroit değil akciğer gibi başka organogenezler için de önem arz eden bir transkripsiyon faktörüdür. Erken embriyonik dönemde tiroit prekürsör hücrelerinin hayatta kalmasını, daha sonraki süreçte ise normal tiroit doku mimarisinin ve fonksiyonunun korunmasını sağlar. Pax8 (Paired Box 8), Nkx2 ile benzer görevler üstlenir ve tiroit doku diferansiasyonunun devamlılığını sağlar. Foxe1(Forkhead Box E1), tiroit migrasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Hhex (Hematopoietically-Expressed Homeobox), ilk kez hematopoetik hücrelerde tanımlanan bir transkripsiyon faktörüdür. Fare çalışmaları Hhex genindeki defektlerde geniş bir fenotipik spektrumun ortaya çıktığını göstermiştir. Hhex geni, tiroit özelleşmesine doğrudan katkı sunmasa da, Pax8 ve Foxe1 ekspresyonunun devamlılığını sağlar ve bu nedenle tiroit organogenezinin doğru gerçekleşmesi için gereklidir [18].

Pax8 ve Nkx2-1 koekspresyonu tiroit progenitörlerinin diğer endodermal hücre hatlarından ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu dört transkripsiyon faktörü, embriyonik başka dokularda da eksprese olmalarına karşın, dört faktörün koeksprese olduğu tek yer tiroit anlayıdır ve bu transkripsiyon faktörlerinden herhangi birini kodlayan gendeki delesyonlar, tiroit dokusunun agenezisi ya da ağır hipoplazisi ile sonuçlanacaktır. [16].

Tablo 1: Diferansiye tiroit foliküler hücresinden eksprese edilen transkripsiyon faktörleri

TTF	Görev		İlişkili Oldukları Nadir Sendromlar
	<i>Tiroit taslağı</i>	<i>Folikül hücresi</i>	
Nkx2-1 (Ttf1)	Sağ kalım	Farklılaşma	Beyin-akciğer-tiroit sendromu (OD)
Pax8	Sağ kalım	Farklılaşma	Tiroit disgenезisi (OD)
Foxe1 (Ttf2)	Migrasyon Sağ kalım	Hormon sentezi	Bamforth-Lazarus sendromu (OR) Non-meduller Tiroid Kanseri (OD)*
Hhex	Sağ kalım	Bilinmiyor	-

**Foxe1 'in dozaj bağımlı bir gen olduğu ve bu nedenle hem fonksiyon kayıplarının hem de fonksiyon kazançlarının klinikle ilişkilendirilmiş olması nedeniyle düşünülmektedir. Gendeki non-koding enhancer bölgesine ait bir polimorfizm yakın zamanda tiroit kanserine yatkınlıkla ilişkili saptanmıştır [16]*

TTF: Tiroit transkripsiyon faktörü, OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif

Yukarıda bahsedilen transkripsiyon faktörlerinden başka, yeni yeni tespit edilen pek çok düzenleyici faktör bulunmaktadır. Tiroit farklılaşmasında rol alan bu faktörlerden bazıları şunlardır:

1. Embriyonik dönemde ön barsak gelişiminde önemli roller üstlenen Hox ailesinin içerisinde bulunan *Hoxa3* (ve paralogları *Hoxb3* ve *Hoxd3*) ve *Hoxa5* geni tarafından kodlanan transkripsiyon faktörleri
2. *Nkx* ve *Fox* ailesinin içerisindeki diğer transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler olan *Nkx2-6*, *Nkx2-5*, *Nkx2-3* ve *Foxa2*
3. Krüppel-benzeri çinko parmak proteini ailesine ait olan *Glis3*; *Sox9*; *Eya1* [18].

Bu düzenleyici faktörlerden *Foxa2*'nin tiroit prekürsör gelişimi için ekspresyonunun azalması gerekirken, ekspresyonunun artması parafoliküler C hücre oluşumunu ve farklılaşmasını artırır. *Foxa2*'nin medüller tiroid karsinomda ekspresyon seviyesinin değişmesi prognozla ilişkilendirilmiştir. *Glis3*, parafoliküler hücrede ekspresyonu olmayıp, foliküler hücreye özel ekspresyonu vardır. TSH tarafından tiroit hormon sentezi indüksiyonu yapılabilmesi için gereklidir. Na-Iyot simportunu sağlayan proteini kodlayan *Slc5a5* geninin promoterına bağlanarak, ekspresyonunu artırır. Shh yolağının düzenlenmesine katıldığına dair kanıtlar mevcuttur. *GLIS3-PAX8* füzyonu, nadir bir tiroit tümörü olan hyalinize trabeküler tiroit tümörü ile ilişkilidir [18].

2.2.2.3 Histolojisi

Tiroit bezi, kapsülden başlayan septalar ile lobüllere ayrılmıştır. Lobüller mikroskop altında her biri içerisinde 20 ila 40 arasında değişen sayıda folikül içerirler. Tiroit folikülleri, bezin hem yapısal hem de fonksiyonel birimleri olup sferik şekildedir, ortasında tiroglobulin içeren kolloid bulunduran yapılar kübik epitelle çevrelenmiştir. Tiroit foliküler hücresi polarizedir, bir

bazal ve bir apikal membrana sahiptir. Bu yapı, folikül formasyonunun oluşmasını sağlar. Bu folikül hücrelerinin arasındaki stromada parafoliküler C hücreleri konumlanmıştır [22].

2.2.3 Tiroit Hormonları ve Biyosentezi

Tirozin rezidülerinden üretilen tiroit hormonlarının iki ana tipi vardır. Triiyodotironin (T3) ve Tiroksin (T4). Folikül hücresinden salgılanan tiroit hormonlarının; büyük kısmını T4, ufak bir kısmını ise T3 ve inaktif form olan revers-T3 (rT3) oluşturmaktadır (Şekil 1). T4, periferde daha aktif form olan T3'e dönüşür. T3 daha potent olmakla birlikte, T4 hormonu da aktif bir formdur. Vücutta esas olarak metabolizma hızını düzenlerler. Tiroit hormonlarının görevleri aşağıdaki gibi listelenebilir [22]:

1. Hücrelerin büyüme, gelişme ve farklılaşmasında rol alır.
2. Bazal metabolizma hızını ve vücut ısını düzenler.
3. Kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde rol alır.
4. Çocuklarda santral sinir sistemi gelişimini sağlar.
5. Kolesterol ve trigliserid yıkımına yardım eder.
6. Elektrolit dengesini sağlar.
7. Mitokondrial metabolizmayı ve oksidatif fosforilasyonu artırır.
8. Hücrelerin oksijen tüketimini artırır.
9. İnsan davranışları ve psikolojisi üzerine etkileri vardır.
10. Barsak motilitesini hızlandırır.
11. Beta adrenerjik uyarıyı artırır, reseptörlerin katekolamin sensitivitesini düzenler.
12. Karbonhidrat metabolizmasını hızlandırır.
13. Fertilite ve ovulasyon üzerine etkilere sahiptir.

Tiroit hormon sentezinin en önemli düzenleyicilerinden biri TSH'dir. TSH ön hipofiz hormonlarından biridir. TSH, foliküler hücreler üzerindeki uyarıcı etkisini TSH-Reseptörleri (TSHR) üzerinden gerçekleştirir. TSHR, bir G proteini kenetli yedi membran proteinidir ve hücre üzerindeki etkilerini siklik adenozin monofosfat (cAMP) üzerinden gösterir. Bu reseptörlere karşı geliştirilen antikolar Graves hastalığının gelişmesine yol açar. Hipotalamustan salgılanan TRH (tirotropin salgılayıcı hormon) tarafından üretimi artırılır. Tiroit hormon sentezinin uyarılmasını

sağlayan TRH-TSH aksı, tiroit hormonlarınca negatif feedback ile baskılanır. Hipofiz bezi ya da hipotalamus hasarları sekonder hipotiroidizme yol açabilir. Nadir olarak TSH salgılayan hipofiz adenomları ise sekonder hipertiroidiye neden olur.

2.2.3.1 Tiroit hormon biyosentezi

Folikül hücresi, tiroit hormon sentezini gerçekleştirmek ve daha sonra kana hormon akışını gerçekleştirebilmek için polarize şekildedir. Bu hücrelerin bazolateral kutbu kan akışı ile komşuluk sağlarken, apikal yüzey ise foliküler lümenine bakar. Foliküler lümeninde bulunan kolloid tiroglobinden oluşmuştur. Tiroglobin tiroit hormonlarının ana maddesidir ve tiroit hormonuna dönüşmesi bir dizi kimyasal reaksiyon gerektirir. Tiroit hormon sentezi için aşağıdaki basamaklar gereklidir [17], [23].

1. Tiroglobulin sentezi

Tiroglobulin, foliküler hücrelerin granüllü endoplasmik retikulumlarında sentezlenir, golgide paketlenir ve ekzositozla folikül lümenine verilir. Bu öncü protein iyot içermez.

2. İnorganik iyodun, kandan folikül epitel hücresine alınması

Tuzaklanma olarak da adlandırılan bu basamakta, kandan inorganik iyodun bazolateral yüzeyinde bulunan Na-I simport (NIS) taşıyıcısı ile alınır. NIS, hücre içindeki membran potansiyelinin korunması için $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ pompasının fonksiyonuna bağımlıdır. Hücreye alınan inorganik iyot Pendrin (*SLC26A4*) transporterı ile folikül lümenine verilir.

3. Tiroglobulinin iyodinizasyonu

Başlıca tiroit peroksidaz (TPO) ile gerçekleşen bu reaksiyonun üç alt basamağı vardır.

- Oksidasyon: NADPH oksidaz ile oluşturulan hidrojen peroksit (H_2O_2) yardımı ile TPO iyotu iyodine (I_2) dönüştürür. Tiroit folikül hücreleri iki tip NADPH oksidaza sahiptir. Dual oksidaz 1 (DUOX1) and dual oksidaz 2 (DUOX2).
- Organifikasyon: Tiroglobulinin üzerinde bulunan tirozin rezidülerine iyodine (I_2) eklenir. Monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) oluşur.

- c. Eşleme (Coupling) reaksiyonu: Oluşturulan iyodinize tirozin rezidüleri T3 ve T4 oluşturmak için eşlenir.

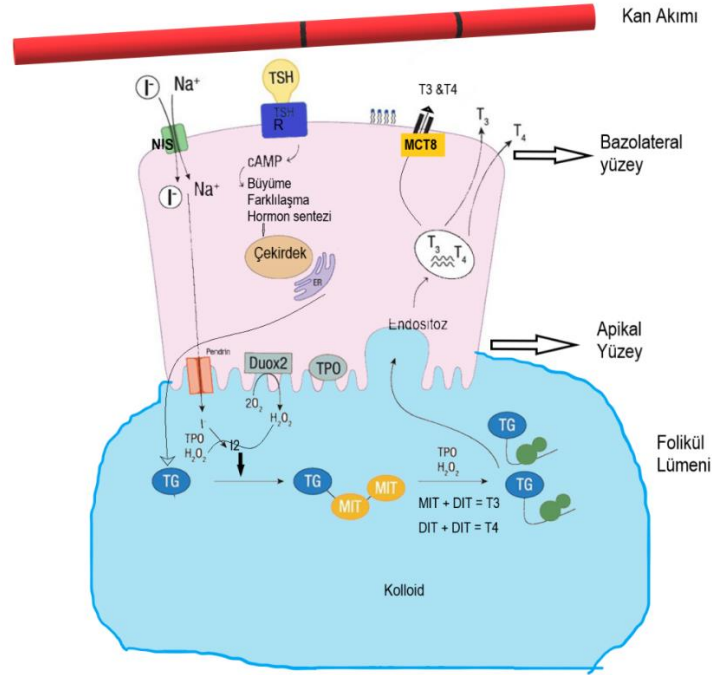


4. Saklama

Oluşturulan T3 ve T4 tiroglobine bağlı tutularak folikül lümeninde saklanır.

5. Salınım

İyodinize tiroglobinler endositozla folikül epitel hücrelerine alınır. Lizozom endozom ile birleşir ve endolizozomal enzimlerin proteolitik aktiviteleri sayesinde tiroglobin yıkılarak MIT, DIT, T4 ve T3 oluşur. Oluşan tiroit hormonun %80'i T4, %20'si T3'tür. Bu oran iyot alımı yetersiz olursa T3 lehine artar. MCT8 transporterı sayesinde kapillere salınım gerçekleşir. MIT ve DIT içerisindeki iyot, deiyodinazlarla koparılarak geri kazanılır.

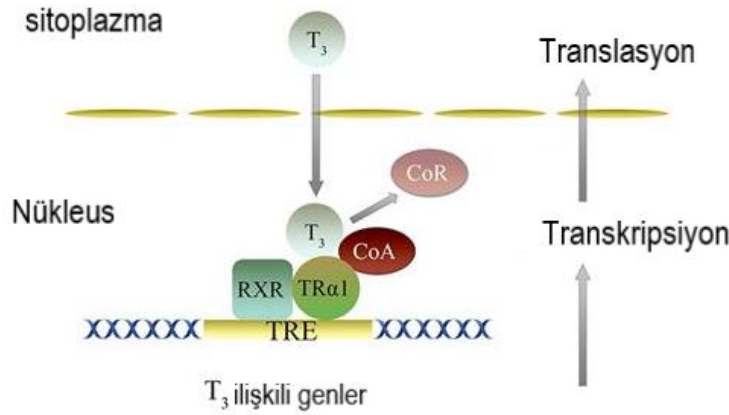


Şekil 1: Tiroit folikül hücresi ve tiroit hormon sentez [24]

Kana verilen tiroit hormonları, plazmada bulunan tiroit bağlayıcı proteinler olan tiroksin bağlayıcı globülin (TBG), transtretin (prealbümin) ve albümin ile taşınır. Bu proteinlere sıkı bağlanan tiroit hormonları, bu nedenle uzun yarı ömre sahiptir [17].

Daha aktif forma dönüşebilmesi sebebiyle prohormon olarak da adlandırılan T4'ün T3'e dönüşümünü deiyonidazlar olarak adlandırılan bir enzim grubu üstlenir. Tip 1 deiyodinaz (D1), T4'ün T3 ve rT3'e dönüşümünü artırır. Daha çok rT3'e dönüşüm yaptığı için, tiroit hormonlarının ortadan kaldırılmasını sağlayan bir enzim gibi iş görmektedir. Tip 2 deiyodinaz (D2), T4'den T3 konversiyonunu esas üstlenen enzimdir. Tip 3 deiyodinaz (D3), T4'ü rT3'e; T3 'ü ise 3,3' deiyodotironine çevirerek inaktive eder. D3, tiroit hormonlarının ana inaktivatörü olarak görev alır [25].

Tiroit hormonları etkilerini THR üzerinden gösterir. THR'ler nükleer reseptör süperailisi içerisinde yer alırlar. Şu ana kadar iki farklı THR tanımlanmıştır. THR α ve THR β , sırasıyla *THRA* ve *THRB* genleri tarafından sentezlenirler. Bu genlerin pek çok farklı isoformu bulunmaktadır ve doku spesifik oldukları düşünülmektedir [26]. T3, genellikle Retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer halde bulunan THR'ye bağlanarak transkripsiyon aktivasyonunu başlatır. THR bazen homodimer ya da monomer halde de bulunabilirler. THR, T3 responding eleman (TRE) olarak adlandırılan ve hedef gen promoterında bulunan tekrar dizilerine bağlanarak, genin koaktivatörlerle ilişkisini sağlarlar (Şekil 2). TRE'ler aralarında 4 nükleotit bulunduran AGGTCA dizilerinin -AGGTCAnnnnAGGTCA- tekrarından oluşur [27].



Şekil 2: T3'ün nükleusta gen transkripsiyonunu başlatması [28]

Tirotropin salgılayıcı hormon (TRH), Tiroit responding eleman (TRE), Retinoik asit X reseptörü (RXR), Tiroit hormon reseptörü A1 (TRα1)

2.3 Tiroit Nodülü ve Tiroit Kanseri

Tiroit nodülü, tiroit bezi içinde radyolojik olarak çevredeki parankimden farklı olan ayrı bir lezyon olarak tanımlanabilir. Oldukça heterojen bir grubu temsil eder. Bir nodül soliter, çoklu, kistik veya katı olabilir; fonksiyonel olabilir veya olmayabilir. En temel şekilde tanımlanacak olursa, tiroit dokusunun çıkıntılaştığı, solid ya da kistik özellik sergileyebilen ve çoğunlukla tiroit dokusunun normalden fazla büyümesiyle ortaya çıkmış lezyonlardır. Toplumda çok sık görülürler. Tiroit nodüllerinin klinik önemi; tiroidin fonksiyonel durumuna etkisi, lokal boyun semptomuna sebep olup olmaması ve patolojik olarak malignite potansiyelinin değerlendirilmesi gerekliliğinden kaynaklanır. Sık görülse de, büyük bir kısmı benignidir.

2.3.1 Epidemiyolojisi

Tiroid nodülleri toplumda sık görülür. Toplumda palpabl nodül sıklığı yaklaşık %5 olsa da çok daha fazla nodül klinik olarak sessizdir. Kadınlarda yaklaşık 4 kat daha sık görülür. Yaşla artmakla birlikte, insidental olarak tiroit ultrasonografisinde %70'e varan oranlarda nodül saptanmaktadır [29]. Bir çok yayın, palpasyon ile %2-6, USG ile %19-35, otopsi verisinde %8-65 arasında tiroitte nodül saptama oranı vermektedir [30]. İyot eksikliğinin endemik olduğu bölgelerde bu oranlar artmaktadır. İyotun hem eksikliği hem de fazlalığı tiroit nodül riskini artırmaktadır [31]. Nodüllerin büyük bir kısmı benignidir. Tiroit nodüllerinin %10-15 kadarı malign özelliktedir [32].

En sık görülen endokrin malignensi olan tiroit kanserinin insidansı son 30 senede oldukça artmıştır. Yapılan bir çalışmada 1975'ten 2009'a kadarki süreçte insidans 4.9'dan 14.3'e yükselerek yaklaşık 3 kat artmıştır, oysa mortalite oranları sabit kalmıştır [33]. Daha küçük (<2 cm) papiller kanserin tespit edilebilmesi bu artışın esas sebebidir. Mortalite oranlarındaki benzerlik; birçok araştırmacının, tiroit kanser sıklığının artışının gerçek bir artış olmaktan ziyade tanı sensitivitesini artıran yöntemlerin sayesinde olduğunu ve insanın hayatı boyunca hiç semptom yaratmayacak kanserleri de ortaya koyma kabiliyetine bağlamaktadır. Tiroit kanserinin agresif tedavi edildiği ikilemi, potansiyel zararın, yararı geçtiği yönündeki tartışmalar sürmektedir. Rölatif olarak stabil bir kanser olmasının yanında bazı faktörler kötü prognozla ilişkilidir. Bunlar; >45 yaş, erkek cinsiyet, büyük tümör boyutu, histolojisi, ileri evre, lenfatik invazyon, uzak metastaz ve cerrahi ya da radyoterapiye ulaşılamaması olarak sıralanabilir [33].

Tiroit kanserleri foliküler hücrelerden ya da parafoliküler C hücrelerinden köken alabilir. Foliküler hücrelerden köken alan kanserler diferansiye tiroit kanser (DTC) ve anaplastik tiroit kanserini içerir. Parafoliküler C hücreler ise, medüller tiroit kanserlerine (MTC) sebep olur. MTC'ler tüm tiroit kanserlerinin yaklaşık %5-10 kadarını oluşturur. Büyük çoğunluk foliküler hücre kökenlidir. Foliküler hücre kökenli kanserlerin %85 kadarı prognozu iyi olan diferansiye tiroit kanserlerdir. %10-15 kadarı ise daha agresif bir karakter sergiler [34]. Papiller tiroit kanseri (PTC) kadınlarda erkeklere göre 3 kat daha sıktır. Tiroit kanserinin tanı yaşı ortalaması 50'dir [35].

2.3.2 Etiyolojisi

Tiroit nodül etiyojisi geniş bir skalayı kapsar. İyonize radyasyon hem benign hem de malign nodüller için risk faktörüdür. Sigara veya alkol tüketimi, obezite, metabolik sendrom, IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü 1) seviyesindeki yükselmeler ve uterin miyom olması diğer risk faktörleridir. Oral kontraseptif veya statin kullanımı nodül riskini azaltabilir. Solid nodüllerin yaklaşık %23'üne multinodüler guatr eşlik eder [36].

Tiroit kanseri etiyojisinde radyasyon maruziyeti öne çıkmaktadır. Atom bombası ve Çernobil faciası ile tiroit kanseri artışı dökümanite edilmiştir. Ayrıca çocukluk çağında düşük doz radyasyona maruz kalan kişilerde de artmış tiroit kanseri riski bulunur.

Kadınlarda tiroit neoplazilerinin erkeklere göre belirgin olarak daha fazla görülmesinin sebebi hala tam açıklanamasa da, kadın seks steroid hormonlarının nükleer alfa ve beta östrojen reseptörlerinin farklı ekspresyonu üzerinden tiroit kanser histolojisini etkilediği varsayılmaktadır. Tiroit ilişkili proliferatif hastalıkların gebelikte artması ve tiroit kanser riskinin menapozdan sonra azalması da östrojenin etkisine işaret etmektedir. Tiroit kanseri hücre serilerinde, östrodiolün reaktif oksijen radikali miktarını artırdığı ayrıca kanser hücrelerindeki adhezyon, invazyon ve migrasyon yeteneğine katkı sağladığı gösterilmiştir [37].

Tablo 2: Sendromik non-medüller tiroit karsinomu ile ilişkili genler

Sendrom	Gen
Cowden	<i>PTEN</i>
FAP- Gardner	<i>APC</i>
Carney	<i>PRKAR1A</i>
Werner	<i>WRN</i>
McCune-Albright	<i>GNAS1</i>
Dicer1 sendromu	<i>DICER1</i>
Ataksi Telanjiektazi	<i>ATM</i>
Li- Fraumeni	<i>TP53</i>

FAP: familyal adenomatöz polipozis

Medüller tiroit karsinomların ailesel formları iyi bilinmektedir. Medüller tiroit karsinomunun gelişmesinde *RET* geni temel bir rol üstlenir.

Non-medüller tiroit karsinomları (NMTK) genellikle herediter değildir. Ancak birinci derece yakınlarında NMTK saptanan kişilerde risk %3-10 olarak değişmektedir [35]. Tiroit epiteli kökenli kanserlerdeki ailesel risk, pek çok kanserin üzerindedir; örneğin meme ya da kolon kanserine göre 5-10 kat daha fazla riski barındırır. Non-medüller tiroit karsinomların ailesel (FNMTK) olan formlarının, sporadik formlara göre; daha multifokal seyrettiği, daha genç yaşta başladığı, sık nüksün ve kötü prognozun eşlik ettiği bildirilmiştir [38]. Ailesel formlarda, belirgin bir çevresel faktör yokluğunda, hastanın; iki ya da daha fazla birinci derece yakını etkilenmiştir. Ailesel formlar; sendromik ya da non-sendromik olabilir. Sendromik formlar ailesel formların daha küçük bir kısmını oluşturur. Sendromik formlar tablo 2’de özetlenmiştir [38], [35]. Bunun yanında çoğunluğu oluşturan non sendromik grup için bağlantı analizleri, tüm genom analizleri ve tüm ekzom analizlerinden yararlanılarak pek çok veri elde edilmiştir. Non-sendromik NMTK oldukça kompleks ve heterojen bir genetik temele sahiptir. Hem monogenik ve hem de poligenetik kalıtım modeline uyabilirler [39].

2.3.3 Klinik Özellikleri, Tanı ve Tedavisi

Klinik veren tiroit nodülleri, disfaji, ses kısıklığı gibi en çok bası semptomları nedeniyle kendini belli ederler. Ağrı nadirdir ve genellikle benign bir nodülde kanama, tiroidit ya da malignite şüphesi uyandırır, bazen medüller tiroit kanserinde künt bir ağrı eşlik edebilir. Bunun dışında büyüyen tiroit dokusunun eşlik etmesi kozmetik nedenlerle de hasta başvurusuna sebep olabilir. Ancak günümüzde, tiroit nodülleri artan oranda insidental olarak saptanmaktadır. Boyun ultrasonografide (USG) yaklaşık her iki kişiden birinde nodül saptanırsa da bunların %5'inden daha azı maligndir [35].

Bir nodül saptandıktan sonra yapılması gereken en önemli iş, malignite riskini belirlemektir. Bunun için hastanın öyküsü alınmalı, fizik muayenesi dikkatlice yapılmalı, tiroit fonksiyon testleri gerçekleştirilmelidir. Nodülün ne zaman ortaya çıktığı, karakterinde takip sürecinde değişme olup olmadığı sorgulanmalıdır. Hastadan başta tiroit USG olmak üzere gerekli görüntüleme yöntemleri istenmelidir. Tüm bu özellikler ışığında gerekliyse sitolojik değerlendirme yapılmalıdır [32]. Sitolojik inceleme gereken vakalarda en sık tercih edilen yöntem ince iğne aspirasyon biyopsisidir.

Hasta öyküsü nodülün karakterini tahmin etmede önemli ipuçları sağlar. Hastanın çocuk ya da ileri yaşta olması (<20 yaş, >70 yaş), erkek cinsiyette olması, çocukluk çağında baş boyun bölgesinde radyasyona maruziyet öyküsü, kemik iliği transplantasyonu için tüm vücut radyasyona maruz kalması veya diğer sebeplerle radyasyona maruziyet öyküsü, nodülün hızlı büyüme göstermesi, aile öyküsünde tiroit kanseri bulunması, tiroit kanserine yatkınlık oluşturan herediter durumlardan birine sahip olması (FAP, Werner sendromu gibi) malignite riskini artıran durumlardır [29].

Dikkatli bir fizik muayene yapılmalıdır. Boyun muayenesinde ele gelen lenf nodu olması, nodülün sert ve fikse karakterde olması maligniteyi düşündüren özelliklerdir.

Laboratuvar incelemeleri, TSH ile başlamalıdır. TSH düşüklüğü hipertiroidizmi gösterir ve radyoizotop incelemesini gerektirir. Tiroit nodülleri nadiren tirotoksik bu nedenle TSH düşüklüğü malignite riskini azaltır. Yüksek TSH ise, hipotiroidizmin göstergesidir ve sıklıkla Hashimoto tiroiditi ile birlitedir. Kalsitonin ise aile öyküsü ya da sitolojik özellikleri nedeniyle medüller tiroit kanseri düşünülen seçilmiş vakalarda istenmelidir [40].

Tiroit USG, tiroid nodülünün sensitif şekilde değerlendirilebilmesine olanak sağlar ve nodül incelenmesi için ilk seçenek görüntüleme yöntemidir. Tespit edilen tüm tiroit nodülleri ultrasonografi ile incelenmelidir [32]. Yine de tiroit USG malignite tanısı koyamaz. Tiroit nodülünün benign ya da malign olduğunu düşündüren USG özellikleri Tablo 3'te özetlenmiştir [41]. Bu özelliklerin içerisinde maligniteye en spesifik olan mikrokalsifikasyonlardır.

Tablo 3: Tiroit nodülünün ultrasonografik özellikleri

Benign Karakter	Malign Karakter
Normal ya da hiperekoik sinyal	Hipoekoik sinyal
İyi ayırt edilebilen duvar (Halo işareti)	Düzensiz sınırlı duvar
İnce duvarlı bir kist	Selülarite artışı
Yumurta kabuğu ya da amorf kalsifikasyon	Punktat mikrokalsifikasyonlar
Gölgelenme	Gölgelenme olmaması
Zamanla boyutta küçülme	İnvazyon varlığı
Lenfoadenopatinin olmaması	1 cm üzerinde lenf nodu varlığı
Doppler ile düşük intranodal kan akımı	Doppler ile yüksek intranodal kan akımı

EU-TIRADS (European Thyroid Imaging and Reporting Data System), tiroid USG raporlarının standardize edilebilmesi için oluşturulmuş bir sınıflamadır [42]. Sınıflama 5 kategori içermektedir:

- EU-TIRADS 1: Nodül yok
- EU-TIRADS 2: Benign
- EU-TIRADS 3: Düşük malignite riski
- EU-TIRADS 4: Orta malignite riski
- EU-TIRADS 5: Yüksek malignite riski

Radyoizotop görüntüleme, anatomik değerlendirme yapan ultrasonografiden farklı olarak tiroidin fonksiyonel durumunun değerlendirilmesine izin verir. Algoritmde ilk değerlendirmede, TSH'nin baskılı olduğu durumda nodülün hiperfonksiyone olup olmadığını anlamak için yapılmalıdır. Bunun dışında sıklıkla kullanılmaz.

Sıcak-soğuk nodül ayırımında Teknezyum 99m perteknetat veya Iyot 123 ve 131 kullanılabilir. Nodüllerin %80-85'i soğuk karakterde iken, %5 kadarı sıcak karakter sergiler. Soğuk nodüllerde malignite oranı %10 kadarken, sıcak nodüllerde %1 kadardır [43]. Intratorasik yerleşimli, retrosternal tiroit varlığından şüphelenilen vakalarda ayrıca kitlesel servikal lenf nodu varlığında bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntülemeyen yararlanılabilir.

İİAB, nodüllerin malign benign ayırımı için kullanılan, maliyet etkin bir işlemdir. Ultrason kılavuzluğu ile yapılması tanısal olmayan örnekleme riskini azaltmaktadır. Elde edilen materyalin tanısal oranı sitopatoloğun tecrübesi ile orantılıdır. İlk değerlendirmeden geçen bir nodül için İİAB endikasyonları şunlardır [44]:

1. Yüksek riskli 1 cm ve üstü nodüller
2. Orta riskli 2 cm ve üstü nodüller
3. Düşük riskli 2 cm ve üstü nodüller + boyutun büyümesi / riskli hasta öyküsü
4. Yüksek riskli 0.5-1 cm arasındaki nodüller

0.5 cm'den küçük nodüllere, sonografik özelliklerden bağımsız olarak takip önerilmektedir. 4 numaralı kriteri sağlayan nodüllerde ise İİAB uygulanabilir ya da takip edilebilir. Benign özellikte, saf kistik karakterdeki nodüllere veya tiroid bezinde hiç nodül saptanmadığı durumlarda İİAB gerekmez [2].

ATA tarafından 2015 yılında yayınlanan kılavuza göre USG paternleri baz alınarak hesaplanan malignite riskleri şu şekildedir (Tablo 4) [2]:

Tablo 4: ATA kılavuzunda sonografik özelliklere göre öneriler

Şüphe	Sonografik Özellik	Risk%	Biyopsi
Yüksek	1-Solid hipoeoik 2-Parsiyel kistik nodülde solid hipoeoik komponent + düzensiz sınır/ mikrokalsifikasyon/ uzunluk>genişlik/ ekstratrioidal uzanım/ yumuşak doku bileşeni ile kenar kalsifikasyonları	>70-90	≥1 cm ise önerilir
Orta	Düzenli sınırlı hipoeoik nodül	10-20	≥1 cm ise önerilir

	Mikrokalsifikasyon, ekstratrioidal uzanım veya uzunluk>genişlik yok		
Düşük	1-İzoekoik/hiperekoik solid nodül 2-Parsiyel kistik nodül (ekzantrik solid komponenti olan) Mikrokalsifikasyon, düzensiz sınır, ekstratrioidal uzanım veya uzunluk>genişlik yok	5-10	≥1.5 cm ise önerilir
Çok düşük	1-Spongiyöz 2-Herhangi bir şüpheli özellik içermeye parsiyel kistik nodül	<3	≥2 cm ise yapılabilir, takip bir seçenektir.
Benign	Saf kistik nodül	<1	Yapma

İİAB sitoloji inceleme sonuçları Bethesda sınıflamasına göre 6 gruba ayırır [45] (Tablo 5).

Tablo 5: Bethesda sınıflaması ve karşılık gelen malignensi riski oranları

Bethesda Sınıfı	Malignensi Riski	Genel Yaklaşım
I. Non-diagnostik	%1-4	İİAB tekrarı
II. Benign	%0-3	Klinik takip
III. AUS-FLUS	%5-15	İİAB tekrarı
IV. Foliküler neoplazi / şüphesi	%15-30	Cerrahi lobektomi
V. Malignensi şüphesi	%60-75	Tiroidektomi- lobektomi
VI. Malign	%97-99	Tiroidektomi- lobektomi

AUS: Önemi bilinmeyen atipi, FLUS: Önemi bilinmeyen foliküler lezyon, İİAB: ince iğne aspirasyon biyopsisi

ATA 2015 kılavuzu, non-diagnostik sonuç verilen nodüllere İİAB tekrarını önermektedir. Bu gruptaki nodüllerin büyük kısmı benignidir. Ancak tekrar biyopsisinde non-diagnostik sonuç alan ve sonografide şüpheli görüntü sergileyen nodüllerin malignite riski yükselmektedir. Kılavuz, bu nodüllere cerrahi seçeneği de hatırlatmaktadır. Ayrıca, çoklu gen panelleri ya da *BRAF* geni ile mutasyonu taraması klinik yaklaşıma yardımcı olabilir. Genetik testlerin kötü yayma şartlarına

bağlı sonuç verilemeyen durumlarda yararlı olabileceği, ancak yetersiz hücre nedeniyle non-diagnostik sonuç verilen durumlarda ise fayda sağlaması ihtimalinin düşük olacağı belirtilmektedir [2].

İİAB sonrası, benign sitolojik sonuçtaki nodüllere ek inceleme önerilmez.

Malign sitoloji saptanan nodüller için cerrahi eksizyon önerilir. Cerrahi yerine alternatif bir yol şu durumlarda düşünülebilir:

1. Çok düşük riskli tümör
2. Komorbiditeler nedeniyle yüksek cerrahi riske sahip hasta
3. Beklenen yaşam ömrü kısa olan hastalar
4. Hastanın tiroit cerrahisinden önce daha öncelikli başka medikal ya da cerrahi tedavilere ihtiyaç duyması

İndeterminate (belirsiz) olarak adlandırılan nodüller 3 Bethesda grubunu içerir. Bunlar grup III, IV ve V'dir. Bu grupta en yüksek risk bulunduran, "malignensi şüphesi" olarak adlandırılan grup V'dir. Bu grup malign grup gibi değerlendirildiğinden, bazı kaynaklar belirsiz sitoloji grubunda sadece grup III ve grup IV'ü katar. Bu iki grup klinik açıdan yaklaşımı en zor olan gruptur. Nodüllerin yaklaşık %20 kadarı belirsiz grup içerisinde yer alır ve malignite riski; grup III için %5-15, grup IV için %15-30 ve grup V için %50-75 kadar verilmektedir [46]. Bu gruplar için ATA kılavuzu önerileri aşağıda özetlenmiştir.

Malignensi şüphesi (grup V) bulunan nodüllere yaklaşım, malign sitoloji saptanan nodüllere benzerdir. Daha önceki çalışmalarda yapılan moleküler testlerin pozitif prediktif değer (PPV) veya negatif prediktif değer (NPV) oranları baz alındığında, bu grubun malignite riskinin tahmininde moleküler testler; sitolojik sonuca ek, önemli bir değişiklik yapmamaktadır. Bu nedenle önerilmemektedir [2].

Sitolojisi AUS/FLUS olan nodüllerde klinik ve sonografik endişe uyandıran özellikler dikkate alınarak, direk takip ya da cerrahi karar verilmeden önce; biyopsi tekrarı veya moleküler testler ile yeniden risk araştırması yapılabilir. Biyopsi tekrarı ve/veya moleküler testlerin sonucu hala yetersiz bilgi içeriyorsa takip ya da cerrahi kararı hasta kararı, klinik ve sonografik özellikler baz alınarak verilebilir. Tekrar İİAB yapılan bu grup nodüllerde, %10-30 arasında sitolojik sonuç tekrar AUS/FLUS gelmektedir. Patolojik olarak AUS/FLUS grubundan yer alan örneklerde, normalden daha fazla nükleer atipi ve hücre mimarisinde atipikleşme mevcuttur ancak bu

değişiklikler malignite riskinin yüksek olduğu gruba girecek kadar fazla değildir. Yapılan çalışmalarda bu gruptan cerrahiye gidenlerin malign patolojiye sahip olma yüzdesi medyanı %16 olup, % 6-48 arasında değişmektedir [2].

Foliküler neoplazm / Foliküler neoplazi şüphesi olan grup IV nodüllerde uzun dönem yaklaşım cerrahinin tercih edilmesidir. Yine de bu grupta hemen cerrahiye yönelmek yerine, moleküler testlerden faydalanılabilir. Moleküler testlerden faydalanılamıyorsa, bu grup kesin tanı için cerrahiye yönlendirilmelidir [2].

Tiroit tümörlerinin sınıflandırması, malignite ayırımının zorluğu ve histolojik özelliklerin overlap olması nedeniyle bazı zorluklar içerir. Nükleer yapının foliküler patern ile ortak çizgide ilerleyebilmesi, neoplazmların farklı derecelerde invaziv karakter sergilemesi sınıflamanın yeniden gözden geçirilmesine sebep olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) güncel olarak 2017'nin ardından 2022 sınıflamasını kamuoyu ile paylaşmıştır. Bu sınıflamada tümörler metastaz ve rekürrens riskine göre; ihmal edilebilir risk ($<0.1\%$) olan benign, düşük risk ($<1\%$) olan borderline tümörler ve yüksek risk olan malign tümörler olarak 3 gruba bölünmüştür [47], [48].

Tablo 6: Tiroit tümörlerinin 2017 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması*

Foliküler adenom
Hyalinize trabeküler adenom
Diğer kapsüllü foliküler patern tiroid tümörleri • <i>Non-invazif foliküler tiroid neoplazm (Papiller nükleer özellikler +)</i> (NIFTP)
Papiller tiroid karsinomu (PTC) • <i>Papiller karsinom</i> • <i>Foliküler varyant PTC (FVPTC)</i> • <i>Enkapsüle varyant PTC</i> • <i>Papiller mikrokarsinom</i> • <i>Tall cell varyant PTC</i> • <i>Onkositik varyant PTC</i>
Foliküler tiroid karsinomu (FTC) • <i>Minimal invazif FTC (MIFTC)</i> • <i>Kapsüllü anjiyoinvazif FTC (AIFTC)</i> • <i>Yaygın invazif FTC (WIFTC)</i>
Hurtle (Onkositik) hücreli tümörler
Kötü diferansiye tiroid karsinomu
Anaplastik tiroid karsinomu
Skvamöz hücreli karsinom
Medüller tiroid karsinomu (MTC)
Miks medüller ve foliküler tiroid karsinom
Mukoepidermoid karsinom
Sklerozan mukoepidermoid karsinom (eozinofili+)
Müsinöz karsinom
Ektopik Timoma
İğsi epitelyal tümör (Timus benzeri diferansiasyon+)
İntratiroidal timik karsinom ...

*Tablo sadeleştirilmiştir.

Tablo 7: Foliküler hücre kökenli tiroit tümörlerinin 2022 DSÖ sınıflaması*

Foliküler Hücre Kökenli
<i>Benign</i>
Foliküler Adenom
Foliküler Nodüler Hastalık
Papiller Yapıya Sahip Foliküler Adenom
Tiroidin Onkositik Adenomu
<i>Düşük Riskli Neoplazmlar</i>
Non-invaziv foliküler tiroid neoplazm PTC (NIFTP)
Belirsiz malign potansiyele sahip tiroit neoplazmları
Hyalinize trabeküler adenom
<i>Malign</i>
Foliküler Tiroit Karsinomu (FTC)
İnvaziv Enkapsüle Papiller tiroid karsinomu
Papiller tiroid karsinomu (PTC)
Onkositik Karsinom
Foliküler Kökenli Yüksek Grade Tümörler • Diferansiye Yüksek Grade • Az Diferansiye Yüksek Grade
Anaplastik Foliküler Hücre Kökenli Tiroit Karsinomu
C Hücre Kökenli
Medüller Tiroit Karsinomu

*Tablo sadeleştirilmiştir, sadece foliküler ve C hücre kökenli karsinomlar dâhil edilmiştir [48].

Tiroit kanserlerinin yaklaşık %80 kadarını papiller tiroit kanserleri oluşturur. En sık 20-40 yaşlarında gözlenir. Papiller karsinomlar enkapsüle ya da komşu parankim invazyonu yapmış olabilir. Tipik özelliği, kenara itilmiş halde kromatin bulunduran şeffaf görünümlü nükleuslarının (Orphan Annie nükleus) varlığıdır. Foliküler ve medüller karsinomlardan farklı olarak Psammom cismi denilen konstrikt kalsifiye yapılar bulundurabilir.

DSÖ 2017 sınıflamasında bulunan PTC alt tipleri 2022’de revize edilmiştir. 2017’deki sınıflamadaki bazı alt tiplerin özellikleri şu şekildedir: “Tall cell varyant”, kolumnar hücrelerle örtülü papiller yapılarla döşeli foliküllerden oluşur. Daha invaziv bir tiptir ve metastaz eğilimleri fazladır. PTC’lerin %10 kadarını “Enkapsüle varyant PTC” oluşturur. Nadiren invazyon yapan, prognozun çok iyi olduğu bir PTC tipidir. Papiller karsinomun nükleus özelliklerini sergileyen ancak tamamen foliküler yapıda bulan tipe “Foliküler varyant PTC” denilmektedir. Bu sınıflamanın 2022 revizyonu Tablo 8’deki gibidir [48].

Tablo 8: Papiller tiroit karsinom alt grupları, DSÖ 2022

Alt tip	Alt tipin temsili yüzdesi	Moleküler Profil
İnfiltratif Foliküler	≥ %90 neoplastik folikül	- BRAF V600E ve K601E, NRAS*, CTNNB1*mutasyonları - RET translokasyonu, NTRK ve ALK füzyonları
Tall cell	≥ %30	BRAF V600E, TERT promoter ve TP53 mutasyonları
Kolumnar hücreli	-	- BRAF V600E, RAS*, TERT promoter* ve TP53* mutasyonları - BRAF füzyonu, aktive edici BRAF delesyonu, CDKN2A kaybı ve kopya sayısı değişiklikleri (kromozom 1q’da tekrarlayan kazançlar)
Hobnail	≥ %30	- BRAF V600E, TP53, TERT promoter, PIK3CA mutasyonları - Nadiren, RET yeniden düzenlenmeleri, CTNNB1, EGFR, ATK1, ATM, ARID2, ve NOTCH1
Solid	>%50 solid trabeküler büyüme	- CCD6::RET ve NCOA4::RET yeniden düzenlenmeleri, (radyasyon ile indüklenen tümörlerden sonra) ve BRAF V600E* - ETV6::NTRK3 füzyonu

Diffüz Sklerozan	%100 diffüz (unilateral ya da bilateral)	• RET yeniden düzenlenmeleri (NCOA4::RET radyasyondan etkilenen vakalarda), BRAF V600E mutasyonları (vakaların %20'si) ve ALK yeniden düzenlenmeleri (vakaların %10'u) • Yüksek LOH (3p24, 9p21, 17q21, 21q22, ve 22q13)
Warthin Benzeri	-	• BRAF V600E mutasyonu
Onkositik	-	• BRAF V600E mutasyonu • GRIM-19 (germline) ve RET yeniden düzenlenmeleri *

LOH: Heterozigosite kaybı, * Nadir moleküler değişiklikler

TSH süpresyonu ile giden soliter sıcak nodül ya da toksik multinodüler guatr radyoaktif iyot ile tedavi edilir. Anti-tiroit ilaçlar da tedavite eklenebilir. Bu vakalarda cerrahi; genç hastada, çok büyük ya da şüpheli görüntüleme karakterine sahip lezyonlarda tercih edilebilir.

İİAB sonucu malign ya da şüpheli malign olan durumlarda genellikle total tiroidektomi uygulanır. Total tiroidektomi, yüksek riskli klinik göstergelerin varlığında veya moleküler markırların maligniteyi düşündürdüğü durumlarda da düşünülebilir [29].

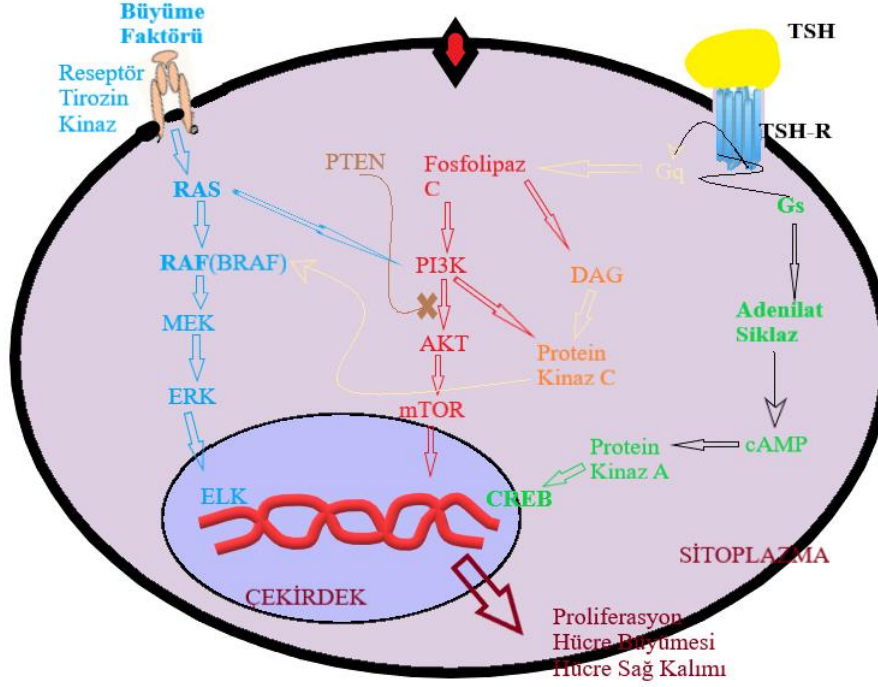
2.4 Tiroit Neoplazmlarındaki Genetik Mekanizmalar

Geçtiğimiz yüzyıl içerisinde tiroit neoplazmlarındaki mekanizmaların anlaşılmasında baş döndürücü ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu keşifler klinik uygulama ve tedavi yaklaşımlarını direkt olarak etkilemiştir. Diferansiye tiroit karsinomlarının büyük bir kısmında (>%96) saptanabilir bir moleküler değişiklik bulunur. Genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi ile kanser oluşumu tetiklenir. Bu değişiklikler başta PIK3-AKT ve MAPK gibi yolaklarda değişiklikler yaparak; hücrenin homeostaz, proliferasyon, diferansiasyon, migrasyon ve apoptoz mekanizmalarındaki düzenlenmelerini bozar [49].

Tiroit bezinde 3 ayrı mitojenik yolağın (Şekil 3) anlaşılması kanser patogenezi ve genetiği açısından gereklidir [50].

1. Hormon reseptör- Adenilat siklaz- Protein kinaz A yolağı

2. Hormon reseptör- Tirozin kinaz protein yolağı
3. Hormon reseptör- Fosfolipaz C yolağı



Şekil 3: Mitojenik olarak görev yapan 3 yolak

DAG: diaçil gliserol, PI3K: Fosfoinozitol 3 Kinaz, AKT: Protein Kinaz B, mTOR: Memeli rapamisin hedefi, TSHR: TSH reseptörü CREB (cAMP response element bağlanma proteini)

Büyüme faktörleri ile uyarılan reseptör tirozin kinaz RAS-RAF-MEK-ERK üzerinden çekirdeği etkileyebilir bu yolak MAPK yolağı olarak adlandırılır. RAS, PI3K üzerinden AKT-mTOR yolağını da uyarabilir. Fosfolipaz C- PI3K-AKT üzerinden çekirdeğin uyarıldığı yolak PI3K-AKT-mTOR yolağı olarak bilinir. TSH'nin hedefi olan TSH-R, G proteini ile kenetli bir membran proteinidir. Gs üzerinden aktive edilen Protein kinaz A, CREB'in fosforilasyonuna yol açar ve çekirdekte hedef gen ekspresyonu gerçekleşir. PTEN ise mTOR yolağı üzerine inhibitör etki gösteren bir tümör süpresör proteindir.

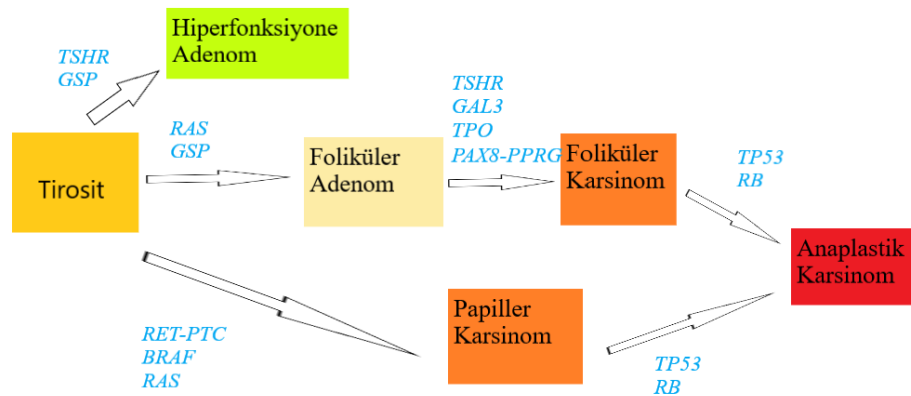
Foliküler tiroit kansinomunda MAPK ve PI3K yolağında aktivasyon saptanırken, PTC'de baskın olarak MAPK yolak aktivasyonu gözlenmektedir. Anaplastik tiroit kansinomunda ise MAPK, PI3K ve ayrıca beta-katenin yolak aktivasyonu gözlenir. *BRAF-V600E* pozitifliği

invazivlik ve tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir. PI3K yolağındaki değişikliklerin ise FTC’de invazyon ve tümör progresyonu ile ilişkili olduğu ve özellikle AKT ekspresyon artışının metastatik potansiyelin artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [37].

Tiroit kanserinin gelişimi ile ilgili iki ayrı model ortaya atılmıştır.

1. Çok basamaklı (multistep) karsinogenez teorisi
2. Fetal hücre karsinogenez teorisi (Kanser kök hücre teorisi)

Çok basamaklı karsinogenez teorisine göre, pek çok kanser tek bir hücrenin kalıtılabilen genetik aberasyonları neticesinde gelişmiştir. Klonal bir yapı mevcuttur. İlk olarak kolon kanseri patogenezi için kullanılmıştır. Bu teoriye göre foliküler adenomlardan foliküler karsinomlar gelişirken, tiroisit kökenli progenitörlerden ise papiller karsinom gelişir. Bu diferansiye grubun daha fazla mutasyonla dediferansiye hale gelmesi anaplastik karsinom ile sonuçlanır (Şekil 4) [50].



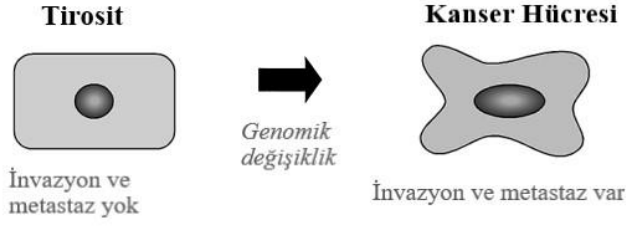
Şekil 4: Tiroitin çok basamaklı karsinogenez teorisine göre evrimi

Fetal hücre karsinogenez hipotezi, ilkinin aksine kanserleşmenin iyi diferansiye bir dokuda rastgele biriken mutasyonlarla değil, fetal tiroit hücre kalıntılarından geliştiğini iddia eder. Kanser hücrelerinin kök hücre ile benzer karakteri, ayrıca bazı genomik değişikliklerin anaplastik karsinomda hiç gözlenmemesi (örneğin *RET* yeniden düzenlenmeleri sadece papiller tiroit karsinomda görülürken hiç anaplastik tipte görülmez) hipotezin ortaya atılma sebepleridir [50]. Bu

iki farklı hipotez Şekil 5’de özetlenmiştir. İlk kez Takano tarafından ortaya atılan teoride, onkofetal fibronektin (OnfFN) adındaki fetal dokuya özgü proteinin sadece anaplastik ve papiller karsinoma sınırlı olarak eksprese olmasının üzerinde durulur. Fetal dokuların büyük kısmında eksprese edilen bu proteinin, papiller ve anaplastik karsinoma sınırlı ekspresyonu; bu tip karsinomların fetal hayattaki kalıntı kanser hücrelerinden geliştiği fikrini düşündürmüştür. Selim bir karakter sergileyen mikropapiller karsinomalar, normal foliküler hücrelerden oldukça farklı morfolojik özelliklere sahiptir ve bu yavaş bölünme eğilimindeki hücrelerin bu farklı karakteri kazanmak için gereken bölünme sayısına ulaşmasının zorluğunu dile getirir. Ancak fetal hücre karsinogenezi, fetal dönemde zaten kanserojen potansiyele sahip hücrelerin olduğunu ve bölünmeye ihtiyaç duymadan önce zaten kanserojen özellikler sergilediğini söyler. Ek olarak, kanser hücrelerindeki ekspresyon profillerinin benzer olmasının çok basamaklı karsinogenez ile açıklanamadığını ekler. Fetal hücre hipotezine göre genomik değişiklikler ekspresyon karakterinde major bir rol oynamaz, sadece *RET/PTC* gibi alterasyonların olması fetal hücrenin diferansiasyonunu engeller, yani ekspresyon profili fetal hücreye aittir. [51].

Gen ekspresyon profiline göre en az 3 ayrı fetal kanser hücre öncülü vardır: Tiroblast, Protirosit, Tiroit kök hücresi. Bu öncüller sırasıyla papiller tiroit karsinomu, foliküler tiroit karsinomu ve anaplastik tiroit karsinomuna dönüşürler. Protirositler, Tiroblastlardan daha fazla farklılaşmışlardır ve onfFN eksprese etmezler. Tiroit kök hücreleri ise tamamen farklılaşmamış karakter sergilerler ve önceki iki grubun aksine Tg eksprese etmezler (Şekil 6). [51] Tiroit kanser kök hücrelerinin varlığı in vitro ve farede in vivo olarak gösterilmiştir. *CD133*, *CD44* ve *ALDH* (Aldehit dehidrogenaz) geni gibi markerlar bu hücreleri saptamak için kullanılabilir [37].

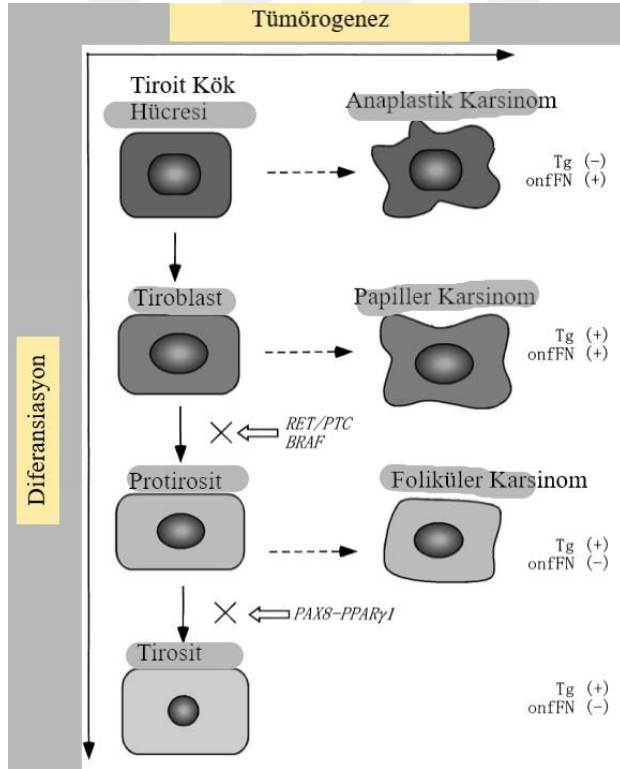
Çok Basamaklı Karsinogenez



Fetal Hücre Karsinogenez



Şekil 5: Karsinogenez mekanizmalarının karşılaştırılması [51]

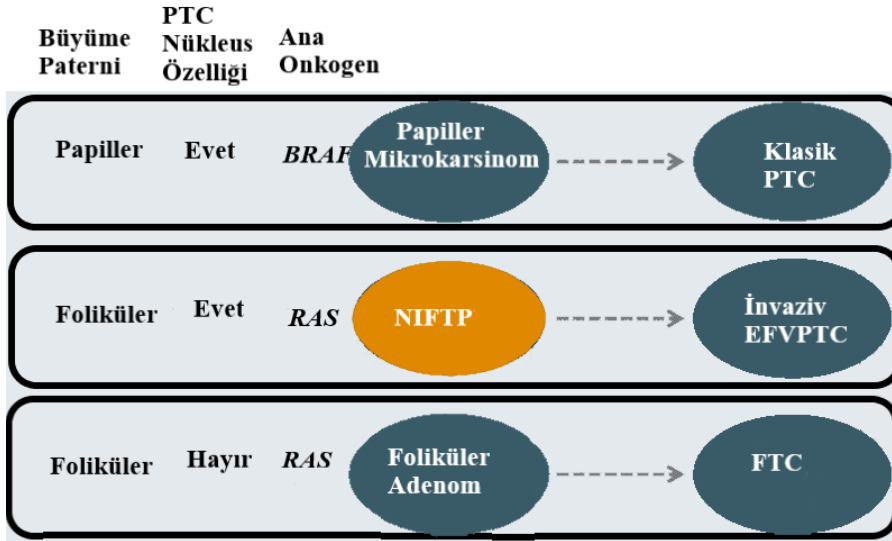


Şekil 6: Fetal hücre karsinogenezi [51]

Yapılan çalışmalarda *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarının birlikte letal ATC'ye sebep olabileceği ancak tek başlarına bu andiferansiye etkiye yol açmadıkları belirtilmiştir [52].

Foliküler adenomlar, folikül hücresinden köken alan soliter kitlelerdir. Sınıflandırmaları foliküllerin varlığına, hacmine veya selülarite baz alınarak yapılır. Adenomların patogenezinde TSHR hiperfonksiyonu suçlanmıştır. cAMP'nin kronik uyarımına sebep olan herhangi bir somatik mutasyon büyüme avantajı yakalayan hücrelerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu yolak, tiroit adenomlarının büyük bir kısmının sebebidir [53].

Non-invaziv papiller benzeri nükleus özellikleri olan foliküler tiroit neoplazmi (NIFTP), kanser olarak kabul edilmeyen premalign bir lezyondur. Bu terim ilk kez Nikiforov ve arkadaşları tarafından noninvaziv enkapsüle foliküler varyant PTC (EFVPTC) için önerilmiştir [54]. NIFTP, tipik foliküler büyüme paterni ve tipik papiller nükleus özellikleri gösterir. İnvaziv EFVPTC'den farklı olarak invaziv değildir. Klonal bir mutasyon profili gösterir, bu anlamda hiperplastik bir lezyondan çok neoplazilere uyar. İnvazyon olmadığı sürece kötü sonuç riski çok azdır [54]. Bu lezyonlarda moleküler testlerin negatif olması ya da sadece *RAS* veya *RAS* grubu mutasyon pozitifliği içermesi önemli bir ayrıntıdır. *BRAF-V600E* bulunması NIFTP tanısını dışlamaktadır [55].



Şekil 7: Tiroit karsinogenez teoremi [54]

PTC: papiller tiroit karsinom, NIFTP: Non-invaziv papiller benzeri nükleus özellikleri olan foliküler tiroit neoplazmi, EFVPTC: noninvaziv enkapsüle foliküler varyant PTC, FTC: Foliküler tiroit karsinom

2.5 Tiroit Nodülüne Yaklaşımında Genetik Belirteçlerin Rolü

Moleküler testlerin ulaşılabilirliğinin artması, yeni nesil dizileme teknolojilerinin dizilemeyi daha hızlı ve ucuz hale getirmesi ile moleküler verilerin toplanmasını ve daha iyi yorumlanabilir hale gelmesini sağlamıştır. Tiroit kanser sınıflaması seneler içerisinde pek çok kez şekil değiştirmiştir. Günümüzde moleküler testlerin sınıflamaları etkilediği ve kendine yer bulduğu görülmektedir. Histolojik olarak ayırımın objektif olarak yapılamadığı durumlarda moleküler testler kullanılabilir. Aslında, moleküler değişikliklerin sınıflamaya en kabaca etkisi *BRAF-V600E* ile *RAS* mutasyonlarının birlikte görülmemesi (“*mutually exclusive*” mutasyon) gözleminde çıkmıştır. *BRAF-V600E*- benzeri grupta MAPK yolak aktivasyonu hakimdir ve *BRAF*, *RET*, *NTRK* füzyonları sıktır.

RAS-benzeri grupta *H/N/K-RAS*, *BRAF-K601E*, *EIF1AX* mutasyonları ve *PPARG* füzyonu sıktır.

Ayrıca üçüncü bir grup olarak non-*BRAF*, non-*RAS* olarak adlandırılan grup daha çok foliküler paterne sahiptir ve *DICER1*, *EIF1AX*, *EZH1*, *IDH1*, *SPOP*, *PAX8/PPARG* gibi değişikliklerle birlikte görülebilir. Bu grup daha az lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir.

Tiroit kanserlerinde moleküler belirteçlerin rolü tanı, risk tespiti ve tedavi hedefi olarak üç ana gruba ayrılabilir. Tiroit karsinomlarında sık saptanan değişiklikler ve kliniğe yansımaları şu şekildedir:

1. *RET* bir tirozin kinaz reseptörüdür ve *RET/PTC* füzyonları MAPK yolağında kontrolsüz aktivasyon oluşturur. Özellikle radyasyon maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir. Tümör Kanser Genom Atlas (TCGA) projesinde tüm etnik gruplardaki PTC içerisinde oranı %6.8 olarak saptanmıştır [56]. *RET/PTC* füzyonları tipik olarak gençlerde sıktır ve lenf nodu metastazı çoğunlukla eşlik eder. *RET/PTC1* genellikle iyi prognozla ilişkilidir [57]. *RET/PTC3* ise daha agresif seyir izler. Ayrıca bazı benign lezyonlarda da (adenom, Hashimoto tiroiditi) saptanabilir [49].
2. *BRAF*, PTC ile en fazla ilişkilendirilen genidir ve TCGA’ya göre PTC’lerin, %67’si *BRAF-V600E* olmak üzere; %73’ünde *BRAF* mutasyon pozitifliği saptanmaktadır [56]. *BRAF-V600E*, pek çok çalışmada invazivlik ve lenf nodu metastazı yapma yeteneği ile ilişkilendirilmiştir [57]. *BRAF-V600E*, indeterminate gruptaki nodüllerde %23 pozitif saptanmıştır [49].

3. *RAS*, *BRAF*'ın üzerinde bulunan ve hem MAPK hem de PI3K-AKT yolağını aktive edebilen bir proteindir. Hem malign hem de benign foliküler adenomlarda saptanabilmesi klinik açıdan tek başına anlamlılık değerini düşürmektedir. Özellikle foliküler varyant ve NIFTP ile ilişkilendirilmiştir [56]. Bilateral kanser riski *RAS* pozitifliği ile artar. *RAS* ve *BRAF* mutasyon pozitifliği birlikteliği beklenmez. *RAS* ile ilgili çok fazla çelişkili veri mevcuttur. Bazı yayınlar *RAS* pozitifliğinin interminate nodüllerde agresiflikle ilişkili kabul edilip total tiroidektomi yapılması gerektiğini söylemektedir. Ayrıca bu nodül grubunda tanısal anlamda yararlı bir gösterge olduğunu savunmaktadır. Bazı diğer yayınlar ise *RAS* ile agresiflik bağlantısı bulamadıklarını ayrıca benign tümörlere de *RAS* pozitifliğinin eşlik etmesi nedeniyle tanısal değerinin düştük olduğunu söylemektedir [49]. Tüm *RAS* isoformları içerisinde (N/H/K-*RAS*) *NRAS* mutasyonlarının daha onkojenik olduğu bildirilmiştir. *NRAS-G61A* mutasyonunun transgenik farelerde foliküler hücrelerde; foliküler hiperplazi, adenom ve karsinom gibi değişen skalada progresif lezyon oluşturduğu saptanmıştır. FTC veya PTC olan alanlarda yüksek *RAS* pozitifliği, ayrıca kromozom instabilitesine yol açtığını gösteren kanıtlar olması *RAS*'ın dediferansiasyon sürecine katıldığını düşündürmüştür. *RAS*'ın adenomdan karsinoma geçişi aktive edebileceği düşüncesi nedeniyle *RAS* pozitifliği saptanan olgularda cerrahi müdahale uygun görülmektedir [58]. Foliküler adenom ve karsinom ayırımında TFF3 adı verilen proteinin ekspresyonu yarar sağlayabilmektedir [51].
4. PTC'lerin %10'unda bulunan *TERT* promoterini etkileyen mutasyonlar, telomeraz revers transkriptaz aktivitesini artırarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekler. Agresif karakterle ilişkilendirilmiştir [56]. Dediferansiye karsinomlara sıklıkla eşlik eder.

NIFTP tanısında moleküler belirteçlere bakılması zorunlu değildir. Ancak yapılan çalışmalar bu grup tümörlerde *BRAF-V600E* pozitifliğinin beklenmedik bir durum olduğunu göstermiştir [55]. *RAS* pozitifliği veya *RAS*'a eşlik eden diğer mutasyon pozitifliği sıktır. Ayrıca NIFTP'lerde %22'ye varan oranda *PAX8/PPARG* mutasyonu saptanmıştır. Histopatolojik kriterleri içinde papilla bulundurmaması gereklidir. Gerçek ve iyi yapılanmış papillaların histopatolojik olarak bulunması durumunda *BRAF-V600E* pozitifliği riski ihmal edilemez. Bu anlamda %1 dahi gerçek papillanın eşlik ettiği bir tümör NIFTP tanısı alamaz. Daha önce yapılan ve NIFTP düşünülen ancak *BRAF-V600E* pozitifliği saptanan vakaların ileri incelemesi gözden kaçan papilla formasyonu, invazyon ya da eşlik eden PTC varlığını ortaya koymuştur [55]. Bu

durum moleküler belirteçlerin patolojik incelemelerin spesivitesini artırdığını göstermektedir ve bu anlamda değerlidir.

BRAF-V600E ile *RAS* ekspresyon profiline göre PTC'ler *BRAF-V600E* benzeri ve *RAS* benzeri olarak gruplandırılabilir. Eski sınıflamada (2017 DSÖ) klasik ve tall-cell PTC varyantları *BRAF-V600E* benzeri grupta iken, FVPTC ve NIFTP *RAS*-benzeri grupta yer alır [56].

PAX8/PPARG, t(2;3)(q13;p25) sonucu oluşur ve foliküler tiroit karsinomuna eşlik eder. *RAS* ile birlikteliğinin nadir olması nedeniyle kanser oluşumunda iki farklı mekanizmayı temsil ettikleri düşünülmektedir [57].

Tablo 9: Mutasyonlar ve en çok ilişkilendirildikleri histolojik tipler [59]

Mutasyon	Foliküler Adenom	NIFTP	eFVPTC	Foliküler Karsinom	Klasik PTC	Anaplastik Karsinom
<i>BRAF-V600E</i>					+++	++
<i>BRAF-K601E</i>		+	+++	+		
<i>NRAS</i>	++	++	+++	++		
<i>HRAS</i>	++	++	++	+		
<i>KRAS</i>	++	+	++	+		
<i>PTEN</i>	++			+		+
<i>TSHR</i>	+					
<i>GNAS</i>	++					

2.6 Germline ve Somatik Varyantlara Yaklaşım

Germline varyant; kişinin üreme hücrelerindeki genomun etkilendiği, bu sebeple sonraki kuşaklara aktarılabilen ve kişinin tüm vücut hücrelerinde saptanabilen değişikliklerdir. Heterozigot ya da homozigot olarak adlandırılırlar ve analizlerde allelik oranları sırasıyla yaklaşık 0.5 ya da 1 olarak saptanır. Somatik varyant ise, tek bir vücut hücresinde gelişen ve bu nedenle kalıtsal olarak aktarılamayan değişikliklerdir. Somatik varyant analizinde tümör yükü ve klonal durumla bağlantılı olarak allelik oranlar çok değişken olabilir.

Bir varyantın germline ya da somatik olması; kişinin güncel tedavisi ve ailedeki diğer kişilerin kanser riskleri ile birebir ilişkilidir. Örneğin; germline *BRCA* mutasyonu varlığı, somatik duruma kıyasla, PARP inhibitörleri için daha fazla sayıda kanserde FDA onayı almış durumdadır. Yine germline bir varyantın tespiti, benzer riskleri taşıma ihtimalini değerlendirmek açısından ailedeki diğer bireylerin de taranmasını gerektirir. Somatik varyantlar için böyle bir gereklilik söz konusu değildir.

Bir dokudan yapılan genetik inceleme hem somatik hem de germline varyantları saptayabilir. Ancak ikisi arasında kesin ayrımı yapamaz. Dokudan çalışılan bir varyantın germline olduğunu ispat etmek için genellikle normal dokudan da genetik analiz çalışılması gereklidir. NCCN (National Comprehensive Cancer Network), güncel olarak sadece *BRCA1/2*'de saptanan her varyant için allelik orandan bağımsız olarak germline doğrulama testi önermektedir [60].

Allelik oran, her zaman somatik-germline ayrımı yapmayı sağlamaz. Örneğin bazı indel varyantlar, kullanılan dizileme yöntemine bağlı olarak allelik orandaki %40-60 sınırının altında kalabilmektedir. Homopolimer bölgeler, allelik oranda dengesizlik sebebi olabilir. Ya da tümör yükü fazla olan bir örnekte somatik mutasyon oranı %50'ye ulaşabilir [61].

Kurucu bir mutasyon varlığı, değişikliğin germline olduğu yönünde oldukça iyi bir belirteçtir. Ayrıca, bir organ tipinin tümörögenezi ile çok da uyuşmayan varyantların germline olma ihtimali daima akılda tutulmalıdır [61].

2.7 DNA ve RNA Temelli Sekanslama Yöntemlerinin Karşılaştırılması

DNA temelli yöntemler, ribonükleik asit (RNA) temelli yöntemlere göre daha yaygın kullanılmaktadır. RNA, DNA'ya nazaran daha az stabil bir moleküldür. Bu anlamda saklanması daha özel koşullar gerektirmektedir.

DNA izolasyondan sonra direk sekanslanabilirken, RNA izolasyon aşamasından sonra genellikle revers transkriptaz denilen enzimle komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilme aşamasını içerir.

Dizileme fragmanlarının boyunun avantaj ve dezavantajları DNA sekanslama ile benzerdir. Kısa okumalar (50-100 bp) daha doğru sonuçlar verirken, uzun okumalar tekrar bölgeleri gibi zor hizalanan alanların daha iyi analiz edilebilmesi avantajını beraberinde getirir.

RNA sekanslamada ilgilenilen RNA'nın (mRNA, pre-mRNA, non-koding RNA) ayrıştırılması uygun yöntemle yapılmalıdır. Bu boya göre, polyA kuyruğu seçimi ile ya da ribo-deplesyon yöntemi ile yapılabilir.

RNA sekanslama, tek nükleotit değişikliklerini saptamanın yanında DNA'dan farklı olarak; füzyonların, gen ekspresyon, alternatif splicing ve post-transkripsiyonel değişikliklerin ve ayrıca alelik imbalans durumunun saptanmasında da kullanılabilir.

Gen füzyon saptamasında RNA temelli yöntemler bir adım daha avantajlıdır. DNA temelli yöntemlerle de yeniden düzenlenmeler saptanabilir. Ancak RNA-seq oluşan ürünlerdeki aberan türleri de saptayabilir ve fonksiyonellik açısından daha fazla bilgi verir. Ayrıca non-genomik füzyonlar hakkında ("trans-splicing" ya da "read-through" gibi mekanizmalarla oluşan füzyon transkriptleri için) DNA temelli yöntemler bilgi veremez [62]. RNA temelli yöntemler ise, genlerin promoter bölge değişikliklerini saptayamazlar [62].

2.8 Tiroit Nodülünün Moleküler İncelemesinde Tercih Edilen Güncel Yöntemlerin Karşılaştırılması

Güncel olarak Birleşik Devletlerde kullanılan tiroit spesifik paneller üç ayrı platformda toplanabilir [46]:

- 1- Afirma Gene Sequencing Classifier & Xpression Atlas (GSC & XA; Veracyte, South San Francisco, CA, USA)
- 2- ThyroSeq version 3 (TSv3; CBLPath, Rye Brook, NY, USA)
- 3- ThyGeNEXT / ThyraMIR (Interpace Diagnostics, Parsippany, NJ, USA)

Bu platformlar ile çalışmada kullanılan yöntem Tablo 10'da karşılaştırılmıştır.

Tablo 10: Tiroit nodül ince iğne aspirasyon biyopsilerinin moleküler değerlendirilmesi için kullanılan tiroit spesifik paneller ile Archer Variantplex Solid Tümör Panelinin karşılaştırılması [46], [63]

Platform	Afirma GSC	ThyroSeq v3	ThyGenXT/ThyraM IR	Archer Variantplex
Methot	Yeni Nesil RNA dizileme	Yeni Nesil DNA ve RNA dizileme	Yeni Nesil DNA ve RNA dizileme/miRNA ekspresyon analizi	Yeni Nesil DNA dizileme
Saptanan moleküler varyantlar	10,196 mRNA paneli; opsiyonel olarak sunulan <i>Xpression Atlas</i> 593 gen içermektedir (905 varyant ve 235 füzyon)	112 DNA ve mRNA paneli (>12,000 varyant ve 150 gen füzyonu)	10 gen, 37 füzyon, 10 miRNA	67 gen
TERT testi	Hayır	Evet	Evet	Evet
Gereken örnek	2 adet nükleik asit stabilizasyonu sağlayan tüpte toplanan İİAB materyali	1 adet nükleik asit stabilizasyonu sağlayan tüpte toplanan İİAB materyali	1 adet nükleik asit stabilizasyonu sağlayan tüpte toplanan İİAB materyali	Arşivlenmiş İİAB lamları kullanılmıştır. Ek bir material gerek duyulmamıştır

GSC, Gene Sequencing Classifier (Gen Dizileme Sınıflandırıcı); mRNA, mesajcı RNA; miRNA, mikroRNA; İİAB, İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi; NPV, Negatif Prediktif Değer; PPV, Pozitif Prediktif Değer

Bu testlerden Afirma GSC ve ThyroSeq v3 klinik olarak validasyona sahiptir. ThyGeNEXT / ThyraMIR testlerine ait klinik sonuçlar ise sınırlıdır [46].

Yukarıdaki yöntemlere göre moleküler test negatifliğinde geriye kalan malignensi riski % 5'in altındadır. Bu yöntemler en güncel platformlar olup, Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bir alt versiyon platformlar kullanılarak nodül takipleri 3 sene süresinde prospektif yapılmıştır. Çalışma sonucunda bu sürede yanlış negatif saptanan 4 nodül (%5.8) üst versiyonlar ile tekrar test edilmiş ve nodüllerin birinde *BRAF-V600E* diğerinde ise *TP53/EIF1AX* mutasyonları saptanmıştır. Ancak bu mutasyonlar alt versiyonlar tarafında da kapsamaktadır dolayısı ile çalışma hatası olabileceği düşünülmüştür. Güncel versiyonlar yanlış negatiflikler için ek bir katkı sunmamıştır [64]. Bu çalışmada Afirma GEC ve ThyroSeq v2 kullanılmış ve iki test arasında anlamlı fark saptanmamıştır [64]. Test maliyetleri bu anlamda test seçimi esnasında önemli hale gelmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Örneklem Grubunun Seçilmesi

Çalışmaya dahil edilecek tiroid nodülü aspiratları, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı arşivi içerisinde 2019-2021 tarihleri arasında incelenen örneklerden, retrospektif ve rastgele olarak seçilmiştir. Örnek seçiminin tamamı, moleküler değerlendirmenin tarafsızlığını korumak adına, analizi yapan kişiden bağımsız olarak gerçekleştirilmiştir.

Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan çalışma onayı alınmıştır (Onay kararı: 21-5T/100, ektedir). Proje (no: TGA-2021-22916), Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Genel Müdürlüğü tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

Örnek seçiminde aranan kriterler aşağıda açıklanmıştır (Tablo 11).

- 1- Sitopatolojik sonucun belirsiz olması: Sitopatolojik olarak Bethesda 2017 sınıflamasına göre grup III ve IV olan örnekler çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışmaya alınan her örnek, uzman patolog hekim tarafından tekrar değerlendirilmiş ve belirsiz sitolojiye sahip olduğu doğrulanmıştır.
- 2- Cerrahi tanısının olması: Sensitivite, spesivite, NPV, PPV değerlendirmesi dokunun kesin patolojik tanısına göre yapılmıştır. Kesin patolojik tanı, tanısal cerrahi uygulanmasını gerektirmektedir. Bu nedenle İİAB örneğinde sitopatolojik olarak AUS/FLUS saptanan ve cerrahi rezeksiyona giden grup örneklemi oluşturmaktadır. Kesin patolojik sonuç, moleküler risk analizi yapan ekipten analiz süresince gizli tutulmuştur. Çalışma tek kör olarak planlanmış ve yürütülmüştür.
- 3- Yetişkin yaş grubu: Tiroit kanseri pediatrik ve yetişkin yaş grubunda pek çok açıdan ayrılmaktadır. Pediatrik yaş grubunda gen füzyonları daha sık görülürken, yetişkin yaş grubunda daha çok nokta mutasyonlar, sürücü mutasyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle pediatrik grup çalışmaya dâhil edilmemiştir.
- 4- Yeterli hücre sayısı olması: Lam yaymaları, patolog tarafından değerlendirilmiş ve yeterli hücre sayısı olmayan örnekler çalışmaya dâhil edilmemiştir.

Tablo 11: Çalışmaya dâhil olma ve dışlanma kriterleri

Çalışmaya Dâhil Olma Kriterleri	Çalışmadan Dışlanma Kriterleri
Bethesda Sınıf III-IV tiroit aspiratı	Bethesda Sınıf I-II-V-VI tiroit aspiratı
Cerrahi kesin tanısı var	Cerrahi kesin tanısı yok
Yetişkin grup	Pediyatrik grup
Lamda yeterli hücre bulunması	Yetersiz hücre nedeniyle sonuç verilemeyen grup

Örneklerin rastgele seçimi, biyoistatistik uzmanı tarafından düzenlenmiştir. Bunun için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalında araştırma kriterlerini sağlayan 30 hastaya ait ince iğne aspirasyon biyopsisi örnekleri bulunmuştur. Bu hastaların içerisinde güc analizine göre hesaplanan minimum örneklem sayısı dikkate alınarak Excel’de 0 ile 30 arasında tekrarsız 20 sayı üretilerek, üretilen sayılar ile eşleştirilen hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Excel’de rastgele tekrarsız olarak üretilen sayı serisi aşağıda sunulmuştur.

12 3 4 5 6 8 9 12 13 14 17 21 22 23 25 27 28 29 30

3.2 Genetik İnceleme

Örnekler Archer VariantPlex Solid Tümör Paneli kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu panel 67 gendeki 660 bölgeyi hedeflemektedir. Tek nükleotit değişiklikleri (SNP) ve küçük insersiyon-delesyon (indel) analizlerinin yanında genlerdeki kopya sayısı değişikliklerini (CNV) de analiz edilebilmektedir. Panel içeriği Tablo 12’de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 12: Archer VariantPlex Solid Tümör Panel içeriği

GEN	Numara	Ekzon No	SNP&Indel	CNV
<i>ABL1</i>	NM_005157	4,5,6,7	Evet	Evet
<i>AKT1</i>	NM_005163	3,6	Evet	Hayır
<i>ALK</i>	NM_004304	21,22,23,25	Evet	Evet
<i>APC</i>	NM_000038	16	Evet	Evet
<i>ATM</i>	NM_000051	8,9,12,17,26,34,35,36,39,50,54,55,56,59,61,63	Evet	Evet

<i>AURKA</i>	NM_003600	2,5,6,7,8	Evet	Evet
<i>BRAF</i>	NM_004333	11,15	Evet	Hayır
<i>CCND1</i>	NM_053056	-	Hayır	Evet
<i>CCNE1</i>	NM_001238	3,4,5,6,7,8,10,12	Evet	Evet
<i>CDH1</i>	NM_004360	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16	Evet	Evet
<i>CDK4</i>	NM_000075	2,3,4,5,6,7	Evet	Evet
<i>CDKN2A</i>	NM_000077	1,2,3	Evet	Evet
<i>CSF1R</i>	NM_005211	7,22	Evet	Hayır
<i>CTNNB1</i>	NM_001904	3	Evet	Hayır
<i>DDR2</i>	NM_006182	12,13,14,15,16,17,18	Evet	Evet
<i>EGFR</i>	NM_005228	3,7,15,18,19,20,21	Evet	Evet
<i>ERBB2</i>	NM_004448	10,19,20,21,24	Evet	Evet
<i>ERBB3</i>	NM_001982	2,3,7,8	Evet	Evet
<i>ERBB4</i>	NM_005235	3,4,6,7,8,9,15,23	Evet	Evet
<i>ESR1</i>	NM_000125	8	Evet	Hayır
<i>EZH2</i>	NM_004456	16	Evet	Hayır
<i>FBXW7</i>	NM_018315	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	Evet	Evet
<i>FGFR1</i>	NM_015850	4,7,8,13,15,17	Evet	Evet
<i>FGFR2</i>	NM_000141	7,9,12,14	Evet	Evet
<i>FGFR3</i>	NM_000142	7,8,9,14,15,16,18	Evet	Evet
<i>FLT3</i>	NM_004119	11,14,16,20	Evet	Evet
<i>FOXL2</i>	NM_023067	1	Evet	Hayır
<i>GNAI1</i>	NM_002067	5	Evet	Hayır
<i>GNAQ</i>	NM_002072	4,5	Evet	Hayır
<i>GNAS</i>	NM_000516	6,7,8,9	Evet	Evet
<i>H3F3A</i>	NM_002107	2	Evet	Hayır
<i>HNF1A</i>	NM_000545	3,4	Evet	Hayır

<i>HRAS</i>	NM_005343	2,3	Evet	Hayır
<i>IDH1</i>	NM_005896	3,4	Evet	Hayır
<i>IDH2</i>	NM_002168	4	Evet	Hayır
<i>JAK2</i>	NM_004972	11,13,14,16,19	Evet	Evet
<i>JAK3</i>	NM_000215	4,13,16	Evet	Evet
<i>KDR</i>	NM_002253	6,7,11,19,21,26,27,30	Evet	Evet
<i>KIT</i>	NM_000222	2,8,9,10,11,13,14,15,17,18	Evet	Evet
<i>KRAS</i>	NM_004985	2,3,4,5	Evet	Evet
<i>MAP2K1</i>	NM_002755	2,3	Evet	Hayır
<i>MDM2</i>	NM_002392	2,3,4,6,8*,10	Hayır	Evet
<i>MET</i>	NM_000245	2,11,14,16,19,21	Evet	Evet
<i>MYC</i>	NM_002467	-	Hayır	Evet
<i>MYCN</i>	NM_005378	-	Hayır	Evet
<i>MLH1</i>	NM_000249	12	Evet	Hayır
<i>MPL</i>	NM_005373	10	Evet	Hayır
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	25,26,27,34	Evet	Evet
<i>NPM1</i>	NM_002520	11	Evet	Hayır
<i>NRAS</i>	NM_002524	2,3,4,5	Evet	Evet
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	12,14,15,18,23	Evet	Evet
<i>PIK3CA</i>	NM_006218	2,5,7,8,10,14,19,21	Evet	Evet
<i>PIK3R1</i>	NM_181504	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	Evet	Evet
<i>PTEN</i>	NM_000314	1,2,3,4,5,6,7,8,9	Evet	Evet
<i>PTPN11</i>	NM_002834	3,13	Evet	Hayır
<i>RB1</i>	NM_000321	4,6,10,11,14,17,18,20,21,22*	Evet	Evet
<i>RET</i>	NM_020630	10,11,13,14,15,16	Evet	Evet
<i>RHOA</i>	NM_001664	2,3	Evet	Hayır
<i>ROS1</i>	NM_002944	38	Evet	Hayır

<i>SMAD4</i>	NM_005359	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	Evet	Evet
<i>SMARCB1</i>	NM_003073	2,4,5,9	Evet	Evet
<i>SMO</i>	NM_005631	3,5,6,9,11	Evet	Evet
<i>SRC</i>	NM_005417	14	Evet	Hayır
<i>STK11</i>	NM_000455	1,2,3,4,5,6,7,8,9	Evet	Evet
<i>TERT</i>	NM_198253	Promoter, 1	Evet	Hayır
<i>TP53</i>	NM_000546	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	Evet	Evet
<i>VHL</i>	NM_000551	1,2,3	Evet	Evet

* Asterisks, kısmi SNV&Indel kapsayıcılığını göstermektedir.

3.2.1 DNA İzolasyonu

İİAB yayma lamaları, üzerinde lamel kapalı şekilde tarafımıza teslim edildi. Örnekler, lamelin lamdan ayrılabilmesi için 24-72 saat ksilen içeren şalede bekletildi. Lamel ayrıldıktan sonra, lam üzerinde kalan materyal bir blade kullanılarak kazındı ve uygun tüp içerisine aktarıldı.

DNA izolasyonunda DNeasy Blood Tissue Kit (Qiagen) kullanıldı. Çalışmada hayvan dokularından total DNA pürifikasyonu protokolü (Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues) izlenmiştir.

Protokol aşamaları aşağıda özetlenmiştir:

1. Materyal 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı.
2. Uygun şekilde etiketlendi.
3. 1200 µl ksilen eklendi ve yüksek hızda vortekslendi.
4. En yüksek hız ayarında, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüjlendi.
5. Süpernatant atıldı.
6. Ksileni uzaklaştırmak için pellet üzerine 1200 µl etanol eklendi ve nazikçe vortekslendi.
7. En yüksek hız ayarında, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
8. Adım 5-7 tekrarlandı.
9. Tüpün kapağı açılarak 37 °C'de etanol buharlaşana kadar 10-15 dakika 37°C'de inkübe edildi.
10. 180 µl Buffer ATL eklendi.

11. 20 µl proteinaz K eklenerek ve vortekslendi.
12. Thermal mikser yardımı ile, 56°C’de doku tamamen eriyene kadar inkübe edildi (ortalama 3-5 saat) .
13. 15 sn vortekslendi.
14. 200 µl Buffer AL eklenerek hızlıca vortekslendi.
15. 200 µl %90-100’lük etanol eklenerek hızlıca vortekslendi.
16. Toplama tüpünün içine konulan DNeasy Mini spin column içerisine elde edilen karışım pipetaj ile alındı.
17. Bir dakika santrifüj edildi ($\geq 6000 \times g$ (8000 rpm)).
18. DNeasy Mini spin column yeni bir 2 ml toplama tüpüne alındı.
19. 500 µl Buffer AW1 eklenerek bir dakika santrifüj edildi ($\geq 6000 \times g$ (8000 rpm)).
20. DNeasy Mini spin column yeni bir 2 ml toplama tüpüne alındı.
21. 500 µl Buffer AW2 eklenerek üç dakika santrifüj edildi (20,000 $\times g$ (14,000 rpm))
22. DNeasy Mini spin column yeni bir 1.5-2 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak, 50 µl Buffer AE eklendi ve 1 dakika inkübe edildi.
23. Son ürün, $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) hızında 1 dakika santrifüj edildi.
24. Elde edilen ürün konsantrasyon ölçülerek -20’de muhafaza edildi.

3.2.2 DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

Elde edilen materyal konsantrasyonu Qubit florometre (ThermoFisher Scientific) ile ölçülmüştür.

3.2.3 Yeni Nesil Dizileme (Kütüphane Hazırlığı ve Sekanslama)

Archer VariantPlex Solid Tümör Panelinin kütüphane hazırlığı süresince, ürünün protokolüne sadık kalınmıştır. Kütüphane hazırlığı ve sekanslama basamaklarından aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

Kütüphane hazırlığı ilk olarak barkodlama ile başlar. Moleküler barkodlama ve örnek düzeyinde barkodlama aynı basamakta yapılır. Örnek barkodlaması örnek havuzu yapmayı ve

örneklerin eş zamanlı sekanslanmasını olanaklı hale getirir. Data daha sonra yazılımlarla de-multipleksing işlemi yapılarak ayrıştırılır. İş akışı Şekil 8’de özetlenmiştir.



Şekil 8: Kütüphane hazırlığı iş akışı

Tablo 13: Reaktifler ve kullanılan volümler (reaksiyon başına)

<i>Protokol Referansı</i>	<i>Protokol Aşaması</i>	<i>Reaktif</i>	<i>Gerekli Volüm (Reaksiyon Başına)</i>
A	Ligation Step 2 Elution	5mM NaOH	36µL
B	Birinci PCR	VariantPlex® Solid Tumor GSP1	4µL
C	Birinci PCR	10mM Tris-HCl pH 8.0	38µL
D	Birinci PCR	Purified PCR1 eluate	36µL
E	İkinci PCR	VariantPlex® Solid Tumor GSP2	4µL

Basamak 1 - Fragmentasyon Aşaması

1. Buz üzerine DNA fragmentasyon reaksiyon tüpleri konuldu.
2. Final volümü 50 µL olacak şekilde 10nMTris-HCL pH 8.0 ile dilüe edilen izole DNA eklendi.

3. Karıştırılarak tablo 14'deki programa göre PCR cihazında inkübe edildi.
4. Program sonlandıktan sonra kısa süreli karıştırılarak, tekrar buz üzerine alındı.

Tablo 14: Fragmentasyon Basamağı

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman/dk</i>
1	4	1
2	37	12
3	72	24
4	4	Bekleme

Basamak 2 - Uç Tamir Aşaması

1. Buz üzerine uç tamir reaksiyon tüpleri konuldu.
2. Fragmentasyon reaksiyon tüpü içerisindeki 50 µL DNA ürününün tamamı kullanıldı.
3. Karıştırılarak tekrar buz üzerine alındı ve Tablo 15'deki programa göre inkübe edildi.
4. Program sonlandıktan sonra kısa süreli karıştırılarak, tekrar buz üzerine alındı.

Tablo 15: Uç Tamir (End-Repair) Basamağı

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman/dk</i>
1	25	30
2	4	Bekleme

Uç tamirden sonra temizlik aşaması yapılmıştır:

1. AMPure XP iyice vortekslenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Her örnek için 125µL (2.5 katı) AMPure XP eklendi.
3. Homojenize etmek için iyice vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
5. Tüp kısa süre alt üst edildi.

6. Tüpler magnet üzerine yerleştirilip 4 dk beklenerek pelletin tamamen çökmesi beklendi.
7. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
8. Magnet üzerindeki tüpler %70'lik etanol ile iki kez yıkandı, her yıkamada 200 µL etanol kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 sn beklenerek daha sonra etanol atıldı.
9. Son yıkamadan sonra görünen tüm süpernatant bir pipet ile atıldı ve kapak açık kalacak şekilde 3-5 dk kurumaya bırakıldı.
10. Örneğe 20µL 10mM Tris-HCl pH 8.0 eklenerek süspansiyon haline getirildi.
11. Magnet üzerine alınan örnekler 2 dk tutuldu.

Basamak 3 - Birinci Ligasyon

1. Buz üzerine Ligasyon step 1 reaksiyon tüpleri konuldu.
2. En son temizleme yapılan DNA örneğinden 20µL eklendi.
3. Karıştırılarak tekrar buz üzerine konuldu.
4. Tablo 16'daki programa göre inkübe edildi.
5. Program sonlandıktan sonra kısa süreli karıştırılarak tekrar buz üzerine alındı.

Tablo 16: Birinci Ligasyon Basamağı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman/dk
1	37	15
2	4	Bekleme

Birinci Ligasyon basamağından sonra temizlik aşaması gereklidir:

1. AMPure iyce vortekslenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Her örnek için 50µL (2.5 katı) AMPure eklendi.
3. Homojenize etmek için iyice vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

5. Tüp kısa süre alt üst edildi.
6. Tüpler magnet üzerine yerleştirilip 4 dk beklenerek pelletin tamamen çökmesi sağlandı.
7. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
8. Magnet üzerindeki tüpler %70'lik etanol ile iki kez yıkandı, her yıkamada 200 µL etanol kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 sn beklenerek daha sonra etanol atıldı.
9. Son yıkamadan sonra görünen tüm süpernatant bir pipet ile atıldı ve kapak açık kalacak şekilde 3-5 dk kurumaya bırakıldı.
10. Örneğe 42µL 10mM Tris-HCl pH 8.0 eklendi ve süspansiyon haline getirildi.
11. Magnet üzerine alınan örnekler 2 dk tutuldu.

Basamak 4 - Moleküler Barkod Adaptörleri (MBC) Ekleme

1. MBC adaptör tüpleri harf ve numara ile işaretlendi.
2. Hangi örneğe hangi MBC adaptörünün kullanıldığı kaydedildi.
3. Buz üzerine MBC Adaptör reaksiyon tüpleri konuldu.
4. Birinci ligasyon sonrası temizleme yapılan DNA örneğinden 40µL eklendi.
5. Karıştırılarak hızla ikinci ligasyon basamağına geçildi.

Basamak 5 - İkinci Ligasyon

1. Buz üzerine Ligasyon step 2 reaksiyon tüpleri konuldu.
2. MBC Adaptörü eklenen DNA örneğinden 20µL eklendi.
3. Karıştırılarak tekrar buz üzerine konuldu.
4. Tablo 17'deki programa göre inkübe edildi.
5. Program sonlandıktan sonra kısa süreli karıştırılarak tekrar buz üzerine alındı

Tablo 17: İkinci Ligasyon Basamağı

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman/dk</i>
1	22	5
2	4	Bekleme

İkinci Ligasyon basamağından sonra temizlik aşamasına geçilir:

1. Ligasyon Cleanup Beads iyice vortekslenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Her örnek için yeni bir 0.2 ml'lik tüpe 50µL Ligasyon Cleanup Beads eklendi.
3. Tüpler magnet üzerine yerleştirilip 1 dk beklenerek pelletin tamamen çökmesi sağlandı.
4. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
5. Ligation Cleanup Bufferdan 50µL her tüpe eklenerek tekrar süspansiyon oluşturuldu.
6. İkinci ligasyon sonrası oluşan 50µL örnek, Ligasyon Cleanup Beads içeren tüpe eklendi.
7. Vortekslenerek oda sıcaklığında 5 dk beklendi, bu işlem iki kez tekrarlandı.
8. Tüpler magnetlerin üzerine yerleştirildi ve 1 dk tüm pellet çökene dek beklendi.
9. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
10. Ligasyon Cleanup Buffer 200µL eklendi, vortekslendi, magnetin üzerinde 1 dk bekletildi ve sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
11. Ultra pure water 200µL eklenerek vortekslendi, magnetin üzerine konuldu ve süpernatant atıldı.
12. Süpernatantın tamamının atıldığından emin olundu.
13. Tablo 18'e göre örnekler inkübe edildi.
14. İşlem bitince örnekler magnetin üzerine taşındı ve birinci PCR hazırlanırken tamamen çökmesi beklendi.

Tablo 18: Ligasyon Elution (Ayrıştırma) Basamağı

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman/dk</i>
1	75	10
2	4	Bekleme

Basamak 6 - Birinci PCR

1. Birinci PCR HS/HGC reaksiyon tüpleri buz üzerine dizildi, numara ile işaretlendi.
2. Her birinci PCR tüpüne GSP1 miksi eklendi, alt üst edildi ve buza konuldu.
3. Basamak 5'te elde edilen hacmin tamamı uygun numaradaki birinci PCR tüpüne konuldu, karıştırıldı ve buza kondu.
4. Tablo 19'daki programa göre inkübe edildi.
5. Program sonlandıktan sonra kısa süreli karıştırılarak tekrar buz üzerine alındı.

Tablo 19: Birinci PCR Döngüsü

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman</i>	<i>Döngü</i>
1	95	3 dk	1
2	95	30 sn	18
3	65	3 dk	18
4	72	3 dk	1
5	4	Bekleme	1

Birinci PCR sonrası temizleme yapılmalıdır:

1. AMPure XP beads iyice vorteksenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Her örnek için 32µL (0.8 katı) AMPure XP eklendi.
3. Homojenize etmek için iyice vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

5. Tüp kısa süre alt üst edildi.
6. Tüpler magnet üzerine yerleştirilip 4 dk beklendi ve pelletin tamamen çökmesi sağlandı.
7. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
8. Magnet üzerindeki tüpler %70'lik etanol ile iki kez yıkandı, her yıkamada 200 µL etanol kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 sn beklenerek daha sonra etanol atıldı.
9. Son yıkamadan sonra görünen tüm süpernatant bir pipet ile atıldı ve kapak açık kalacak şekilde 3-5 dk kurumaya bırakıldı.
10. 10mM Tris-HCl pH 8.0 eklenerek, süspansiyon haline getirildi.
11. Magnet üzerine alınan örnekler 2 dk tutuldu.
12. İkinci PCR aşamasına geçildi.

Basamak 7: İkinci PCR

1. İkinci PCR HS/HGC reaksiyon tüpleri buz üzerine dizilir, soldan sağa doğru numara ile işaretlendi.
2. Buz üzerinde, pürifiye edilen birinci PCR içeriği, ikinci PCR reaksiyon tüpleri içerisine eklendi.
3. Her ikinci PCR tüpüne GSP2 (Product insert E'de belirtilen kadar) miksi eklenerek, karışım alt üst edildi ve buza konuldu.
4. Tablo 20'deki programa göre inkübe edildi.
5. Program sonlandıktan sonra kısa süreli karıştırılarak tekrar buz üzerine alındı.

Tablo 20: İkinci PCR Döngüsü

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Zaman</i>	<i>Döngü</i>
1	95	3 dk	1
2	95	30 sn	20
3	65	3 dk	20
4	72	3 dk	1
5	4	Bekleme	1

İkinci PCR sonrası temizleme yapılmalıdır

1. AMPure XP beads iyice vortekslenerek süspansiyon haline getirildi.
2. Her örnek için 32µL (0.8 katı) AMPure XP eklendi.
3. Homojenize etmek için iyice vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
5. Tüp kısa süre alt üst edildi.
6. Tüpler magnet üzerine yerleştirilip 4 dk beklendi ve pelletin tamamen çökmesi sağlandı.
7. Alttaki pellet kaldırılmadan süpernatant pipet ile atıldı.
8. Magnet üzerindeki tüpler %70'lik etanol ile iki kez yıkandı, her yıkamada 200 µL etanol kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 sn beklenerek etanol atıldı.
9. Son yıkamadan sonra görünen tüm süpernatant bir pipet ile atıldı ve kapak açık kalacak şekilde 3-5 dk kurumaya bırakıldı.
10. 10mM Tris-HCl pH 8.0 eklenerek süspansiyon haline getirildi.
11. Magnet üzerine alınan örnekler 2 dk tutuldu.
12. Yeni bir 0.2 ml PCR tüpüne 18 µL örnek transfer edildi.

Ürün kalite kontrolü ve normalizasyon sonrası sekanslamaya hazır hale getirilmiştir.

6. Kalite Kontrolü, Normalizasyon ve Sekanslama

Kalite kontrolü:

KAPA Universal Library Quantification Kit ile konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. Önerilen optimal ortalama fragman uzunluğu 250 bp kadardır. Archer kütüphanesi çok yoğun olduğu için KAPA PCR öncesinde örnekler 1:20,000-1:250,000 oranında dilüye edilerek ölçüm yapılmıştır.

Normalizasyon:

Eşmolar konsantrasyona sahip olan poollar oluşturulması hedeflenmiştir.

Sekanslama:

Nextseq 550 (Illumina) cihazı kullanılmıştır.

Nextseq cihazına örneklerin yükleme protokolüne %20'lik PhiX ile başlanır. Takip edilen aşamalar şu şekildedir:

1. PhiX 20pM olacak şekilde dilüe edildi.
2. Barkodlanan kütüphanelerin havuzu 4 nM olacak şekilde başlandı.
3. Kütüphane havuzu 10µL 4nM ile 10µL 0.2N NaOH, 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne alınarak karıştırıldı.
4. Vortekslendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
5. Karışıma 10µL 200mM Tris pH 7.0 eklendi ve kısa süreli vortekslendi.
6. Buzlu HT1 buffer 970µL eklendi ve kısa süreli vortekslendi.
7. Bu durumda 40 pM kütüphane oluşturulmuş oldu.
8. Tablo 21'de özetlenen miktarlara göre HT1 buffer ve PhiX, yeni bir 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne alınarak karıştırıldı.
9. PhiX %20'lik içindeki ürünün tamamı (1.3 ml), Nextseq kartuşuna yerleştirildi.

Tablo 21: Nextseq Yükleme Protokolü

1	Kütüphane Havuzunun Denatürasyonu	Hacim (µL)		
	Kütüphane havuzu 4nM	10	10	10
	NaOH 0.2 N	10	10	10
	5 dk inkübasyon			
2	40 pM Konsantrasyona Nötralizasyon ve Dilüsyon			
	Kütüphane havuzu + NaOH	20	20	20
	200mM Tris pH 7.0	10	10	10
	Hyb Buffer	970	970	970
3	Kütüphanenin İstenilen Konsantrasyona (pM) Dilüe Edilmesi	1.4	1.6	1.8
	40 pM kütüphane	46	52	58
	20 pM denatüre PhiX	23	26	29
	Hyb Buffer	1231	1222	1213
5	Kartuşa Yüklenecek Final Havuz Volümü	1300	1300	1300

3.3 Verilerin Analizi

Elde edilen veri, önce demultipleksing işlemine tabi tutulmuştur ve oluşan FASTQ dosyaları Acher Analysis V5.1 ile işlenmiştir. Bu süreç, verilerin tüm sekonder analizini (okumaların temizlenmesi, duplikasyonların silinmesi, hata düzeltimi, hizalama, variant çağırma) ve bazı tersiyer analizini (anotasyon ve protein etki predikasyonu) kapsamaktadır. Bu sayede veriler analiz edilmeye hazır hale gelmiştir.

Analiz aşamasına filtre yapılarak varyantlar çağırılmıştır. Filtrelemede; allel frekansı (AF), GnomAD minör allel frekansı (MAF), değişen allelin okuma sayısı (AO), değişen allele ait özgün okuma sayısı (UAO) ve varyantın yarattığı sonuç değişkenleri kullanılmıştır. Bu değerler Tablo 22’de özetlenmiştir. Analizde öncelikle Filtre 1’e göre yapılmıştır. Bu filtre kodlayan gen elemanlarına yönelik olarak tasarlanmıştır. Filtre 2’de ise tüm gen elemanları ayırt edilmeden testin kapsama gücüne göre daha düşük MAF değeri ile çağırılmıştır.

Tablo 22: Varyant çağırma da kullanılan değişkenler

Değişken	Değer (Filtre 1)	Değer (Filtre 2)
Allel Frekansı (AF)	≥ 0.027	≥ 0.027
GnomAD Minör Allel Frekansı (MAF)	≤ 0.05	≤ 0.01
Değişen Allel ait Okuma Sayısı (AO)	≥ 5	≥ 5
Değişen Allele ait Özgün Okuma Sayısı (UAO)	≥ 3	≥ 3
Sonuç	Kodlayıcı bölge varyantı Uzaticı/ Sonlandırıcı Çerçeve kaydırıcı İnframe del-dup Prematür terminal kodon Missense varyant Splice alıcı/verici varyantlar Başlama kaybı (Start loss) Sonlanma kaybı (Stop loss) Sonlanma kazancı (Stop gain) Transkript ablasyonu Transkript amplifikasyonu	Tüm sonuçlara sahip varyantlar

Filtreleme sonucu kalan varyantlar Moleküler Patoloji Derneği (Association for Molecular Pathology, AMP) ve Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) önerilerine göre Tier, I-II-III-IV olarak sınıflandırılmıştır. Tier I ve II varyantlar seçilmiştir. Varyantların değerlendirilmesinde Cosmic, OnkoKB, VARSOME ve Franklin gibi veritabanlarından yararlanılmıştır. Daha sonra bu varyantlarla ilgili literatür taraması yapılarak, nodülle ilgili bir risk yorumu yapılmıştır. Germline olduğu düşünülen varyantlar ise ayrıca tartışılmıştır.

Sonuçlar, son basamakta, örneklerin cerrahi sonrası doku patoloji sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Gold standart kabul edilen cerrahi sonrası elde edilmiş dokuların kesin patoloji sonuçları ile İİAB örneklerinin yukarıda ayrıntıları belirtilen şekilde tamamlanan moleküler analizi karşılaştırılarak maligniteyi saptama başarısı değerlendirilmiştir. ROC eğrisi, AUC, sensitivite, spesifisite, PPV, NPV değerleri hesaplanmıştır. Hastalara ait tanımlayıcı özellikler; sayı ve yüzde, ortalama±standart sapma / Medyan (IQR) değerleri hesaplanarak çalışmaya eklenmiştir.

3.4 İstatistiksel Analiz

Araştırmanın örneklem büyüklüğü PASS V11 kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre 0,50 eğri altı alanına (AUC) karşı 0,80 AUC elde edebilmek için ulaşılması gereken minimum örneklem büyüklüğü 20 birey olarak hesaplanmıştır. İstatistik analizler için IBM SPSS V25 kullanılmıştır. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı özellikler sunulurken ortalama ve standart sapma; kategorik değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri kullanılmıştır. Kategorik verilerin analizinde Ki kare testi uygulanmıştır. ROC analizi ile duyarlılık, seçicilik, PPV ve NPV değerleri sunulmuştur.



4.BULGULAR

4.1 Çalışma Grubuna Seçilen Örneklerin Verileri

Seçilen örneklerin yaş ortalaması $51,0 \pm 14,6$ idi. Anlamlı varyant saptanan 10 hastanın yaş ortalaması $56,0 \pm 10,5$ iken, varyant saptanmayan 10 hastanın ise $46,0 \pm 19,7$ idi. Genetik veri sonuçları ile kesin patolojik sonucu uyumlu olarak saptanan 13 örneğin yaş ortalaması $56,9 \pm 9,6$ idi. Örneklemdeki cinsiyet gruplarında; 16 kadın (%80) ve 4 (%20) erkek vardı. Örnek konstrasyonları minimum $3,36 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ve maksimum $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ idi. Örneklerin konsantrasyon ortalaması $9,13 \text{ ng}/\mu\text{L}$ olarak hesaplandı. Örneklerin 5 tanesi Bethesda IV (%25) iken; 15 tanesi Bethesda III (%75) idi. Veriler Tablo 23'te sunulmuştur.

Tablo 23: Örneklem verileri ve elde edilen DNA miktarı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	İİAB Patolojisi	Elde edilen DNA miktarı (ng/ μL)
1	E	59	Foliküler Neoplazi Kuşkusu (Bethesda IV)	15
2	K	48	Foliküler Neoplazi Kuşkusu (Bethesda IV)	11.2
3	K	62	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	25
4	E	18	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	25
5	E	45	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	10
6	K	41	Foliküler Neoplazi Kuşkusu (Bethesda IV)	12
7	K	48	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	9.6
8	K	64	Foliküler Neoplazi Kuşkusu (Bethesda IV)	7.9
9	K	62	Foliküler Neoplazi Kuşkusu (Bethesda IV)	6.1
10	K	21	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	6.3
11	K	60	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	7
12	K	69	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	6.94
13	K	42	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	6.2
14	K	50	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	6.2
15	K	37	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	7.6

16	E	76	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	5
17	K	53	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	4.8
18	K	52	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	3.5
19	K	58	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	3.36
20	K	59	Önemi Belirsiz Atipi (Bethesda III)	4

4.2 Genetik Analiz Sonuçları ve Doku Patoloji Sonuçlarının Karşılaştırılması

Genetik analiz sonucu saptanan varyantlar ve özellikleri Tablo 24’de sunulmuştur. Tablo 25’de ise genetik varyantlar ile nodül patolojileri birlikte sunulmuştur.

Tablo 24: Saptanan varyantlar ve özellikleri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Filtre 1	Filtre 2	Allelik Oran (AF%)	Varyant Yorum
1	E	59	N	<i>TERT</i> (c.-124C>T)	31	Tier 1
2	K	48	<i>NRAS</i> (p.Gln61Arg)		36	Tier 1
3	K	62	N			
4	E	18	N			
5	E	45	N			
6	K	41	<i>PIK3CA</i> ’da inversiyon [<i>PIK3CA</i> :c.40C>A (p.His14Asn), <i>PIK3CA</i> :c.42C>G (p.His14Gln), <i>PIK3CA</i> :c.44T>G (p.Leu15Trp)]		4	Tier 2
7	K	48	N			
8	K	64	N			
9	K	62	<i>NRAS</i> (p.Gln61Arg)		11.8	Tier 1
10	K	21	N			
11	K	60	<i>TP53</i> : c.568C>A (p.Pro190Thr)		5	Tier 1

			TP53: c.132G>A (p.Met44Ile)			
12	K	69	BRAF-K601E (c.1921A>G)		14	Tier 1
13	K	42	ATM:c.5882A>G (p.Tyr1961Cys)		48	Germline (VUS)
14	K	50	PTEN: c.144C>A (p.Asn48Lys)		7.3	Tier 1
15	K	37	N			
16	E	76	N			
17	K	53	BRAF-V600E (c.1799T>A)		13.8	Tier 1
18	K	52	MET:c.341A>T (p.Asp114Val)		40	Germline (VUS)
19	K	58	BRAF-V600E (c.1799T>A)		33	Tier 1
20	K	59	PIK3CA-E545A (c.1634A>C)		3.4	Tier 2

VUS: önemi bilinmeyen varyant, Tier 1: Klinik önemi yüksek varyant, Tier 2: Potansiyel klinik önemi olan varyant

Tablo 25: Saptanan varyantlar ve nodül patolojilerinin karşılaştırılması

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	İİAB	Genetik	Cerrahi Patoloji		Genetik ile Uyum
					Nodül İçi	Nodül Dışı	
1	E	59	Bethesda IV	TERT	Sol PMC, FV	Sağ PMC, FV	+
2	K	48	Bethesda IV	NRAS	PTC, OV	FNH	+
3	K	62	Bethesda III	N	PTC, KK	FNH	-
4	E	18	Bethesda III	N	PTC, KK	NORMAL	-
5	E	45	Bethesda III	N	PMC, FV	PMC, FV	-
6	K	41	Bethesda IV	PIK3CA İnversiyon	PTC, FV	Lenfositik Tiroidit	+
7	K	48	Bethesda III	N	FNH	FNH	+
8	K	64	Bethesda IV	N	FNH	FNH	+
9	K	62	Bethesda IV	NRAS	PTC, OV	FNH	+

10	K	21	Bethesda III	N	PTC, OV	FNH	-
11	K	60	Bethesda III	TP53	PTC, FV + PMC, K	PTC, FV	+
12	K	69	Bethesda III	BRAF-K601E	PTC, FV	PMC, FV	+
13	K	42	Bethesda III	ATM- G	PMC, FV	PMC, FV	-
14	K	50	Bethesda III	PTEN	PMC, FV	FNH	+
15	K	37	Bethesda III	N	PMC,K+Lenf Nodu Metastazı	Kronik Tiroidit	-
16	E	76	Bethesda III	N	FNH	PMC, FV	++
17	K	53	Bethesda III	BRAF-V600E	Sol PMC, K	Sağ PMC, K	+
18	K	52	Bethesda III	MET- G	Adenomatoid nodül	Sol PMC, FV	++
19	K	58	Bethesda III	BRAF-V600E	PTC, Tall cell	Sol PMC, FV	+
20	K	59	Bethesda III	PIK3CA	FNH	Sol, PMC, K	-*

PTC: Papiller Tiroit Karsinom, PMC: Papiller Mikrokarsinom, FV: Foliküler Varyant, OV: Onkositik Varyant, K: Klasik tip, KK: Kapsüllü Klasik tip, FNH: Foliküler Nodüler Hastalık, G: Germline varyant, +: Uyumlu moleküler analiz, -: Uyumsuz moleküler analiz, *İİAB alınmayan kısımda malignite pozitifliği

HASTA 1: 59 yaş erkek hastaya, 3 sene önce tiroit ultrasonografik görüntülemesinde şüpheli nodül saptanması üzerine İİAB önerilmişti. İİAB gerçekleştirilen hastanın patoloji sonucu foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) olarak raporlanmıştı. Total tiroidektomi yapılan hastanın patoloji sonucunda sağ ve sol lob; tiroidin papiller karsinomu, foliküler varyant saptanmıştı (Tablo 26). Cerrahiden 5 ay sonra yapılan tiroit ultrasonografisinde; belirgin damarlanması olan küçük rezidü tiroid dokuları ve sol taraf supraklaviküler düzeyde görünümü kuşkulu küçük lenf nodu izlenmişti.

Tablo 26: Hasta 1'e ait veriler

İİAB öncesi USG	Sağ lob orta zonda 8x5 mm, düzensiz kenarlı, hipoekoik, solid nodül Sağ lob orta zon anteromedialde 5 mm, hipoekoik, solid nodül Sağ lob alt polde 8 mm, izoekoik, solid nodül Sol lob alt polde, içinde kaba kalsifikasyonlar ve mikrokalsifikasyon olan, düzensiz şekilli ve hafif düzensiz kenarlı 14x9x12 mm, hafif hipoekoik, solid nodül Sol lob alt polde alt uca yakın 6 mm ve 5 mm, mikst ekoda iki nodül
İİAB Alınan Nodül	Sol lob alt poldeki 14x9x12 mm çaplı nodül
İİAB Sitopatoloji	Foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) (<i>Sellüler yaymalarda çok sayıda mikrofolliküler yanaşma gösteren gruplar yanı sıra daha büyük, daha çok tirositten oluşmuş plakalar dikkati çekmiştir. Tirositlerin nükleuslarında hiperkromazi, oluklanma ve geniş eozinofilik sitoplazma yanı sıra yer yer üst üste binme söz konusudur.</i>)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ ve sol lob; tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant Mikroskobi: Tümör 1: Sağ lob, 0,2 cm, tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant Tümör 2: Sol lob, 1 cm, tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok (1. ve 2. tümör)</i> <i>Tümörde kapsül varlığı: Yok (1. ve 2. tümör)</i> <i>Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı (1. ve 2. tümör)</i> <i>Tiroid dışı Yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid içi yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Folliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,3 cm uzaklıkta (1. tümör), 0,1 cm uzaklıkta (2. Tümör)</i>
Genetik	<i>TERT: c.-124C>T (%31)</i>

Hastanın mevcut olan tek İİAB örneği çalışmamıza dahil edildi. Bu örnek cerrahi rezeksiyondan 6 ay öncesine aitti. Hastanın arşiv örneğinden 15 ng DNA elde edildi. Çalışma istenilen kalite skorlarına ulaşarak tamamlandı. Hastanın ilk analizi Filtre-1 kullanılarak gerçekleştirildi ancak anlamlı bir varyant saptanmadı. Filtre-2 kullanılarak yapılan analizde *TERT* geni promoter bölge mutasyonu (*TERT*: c.-124C>T) tespit edildi. Okuma derinliği 916 ve varyantın allelik fraksiyonu 0.3111 (alternatif okuma: 285) idi. Bölge kodlayıcı gen bölgesine ait olmadığı için ilk filtreden kaçmıştı. Analizde anlamlı bir kopya sayısı değişikliği saptanmadı.

HASTA 2: 48 yaş kadın hasta, 2019 yılında boyununda şişlik fark etmesi üzerine doktora başvurmuştu. Yapılan tiroit ultrasonografisinde nodül tespit edilen hastaya İİAB uygulanmıştı. Sonucun önemi belirsiz atipi (Bethesda III) gelmesi nedeniyle tekrar İİAB yapılan hastanın patoloji raporu foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) olarak raporlanmıştı. Foliküler neoplazi kuşkusu nedeniyle total tiroidektomi yapılan hastanın cerrahi patoloji sonucu sol lob tiroidin papiller karsinomu ve sağ lob foliküler nodüler hastalık olarak sonuçlanmıştı (Tablo 27). Hastanın ilk İİAB materyaline ulaşamadığı için, ikinci İİAB materyali çalışmaya dahil edildi. Hastanın arşiv materyalinden 11.2 ng DNA elde edildi. Çalışma istenilen kalite skorlarına ulaştı. Analiz sonucunda *NRAS*:c.182A>G (NP_002515.1: p.Gln61Arg) varyantı 0.3633 allelik oranda saptandı. Okuma derinliği 501'di.

Tablo 27: Hasta 2'ye ait veriler

İİAB öncesi USG	Dış merkezde yapılmış
İİAB Alınan Nodül	Sol lobdan alınmış
İİAB Sitopatoloji	Foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) (<i>Hiposellüler yaymalarda çoğu alanda mikrofolliküler yanaşma gösteren nükleuslarda irerme, membran düzensizliği ve groove yapıları izlenen onkositik morfolojide tiroisit hücre grupları izlenmiştir.</i>)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob; tiroidin papiller karsinomu, onkositik ve foliküler varyant Sağ lob; foliküler nodüler hastalık Mikroskopi:

	Tümör 1: 1,2 cm, sol lob, tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant Tümör 2: 0,3 cm, sol lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant <i>Lenfovasküler İnvazyon:</i> Yok (1. ve 2. tümör) <i>Tümörde kapsül varlığı:</i> Var (1. ve 2. tümör) <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu:</i> Var (2. tümör) <i>Tümör Sınırları:</i> Düzgün sınırlı (1. ve 2. tümör) <i>Tiroid dışı Yayılım:</i> Yok <i>Nekroz:</i> Yok <i>Multisentrisite:</i> Var, sol lob <i>Tiroid içi yayılım:</i> Yok <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu:</i> Folliküler nodüler hastalık <i>Cerrahi Sınırlar:</i> 0,1 cm uzaklıkta (1. tümör), 0,2 cm uzaklıkta (2. tümör) İmmunohistokimyasal incelemeler: <i>Siklin D1:</i> 1,2 cm çaptaki tümörde %90 <i>PAX-8:</i> 1,2 cm çaptaki tümörde (+) <i>Galektin 3:</i> 1,2 cm çaptaki tümörde (+) <i>Mezotel:</i> 1,2 cm çaptaki tümörde (+) <i>Sitokeratin 19:</i> pozitif
Genetik	NRAS:c.182A>G (NP_002515.1: p.Gln61Arg) (%36)

HASTA 3: 61 yaş kadın hasta, boyunda şişlik nedeniyle tetkik edilirken tiroit ultrasonografisinde şüpheli nodüller saptanması üzerine İİAB yapılmıştı. Patoloji sonucunda önemi belirsiz atipi saptanmış ve olguda total tiroidektomi gerçekleştirilmişti. Patoloji sonucu solda tiroidin papiller karsinomu, kapsüllü klasik tip ve sağda folliküler nodüler hastalık olarak yorumlanmıştı. Hastanın İİAB materyalinden 25 ng DNA elde edildi. Çalışma kalite kontrolünden geçti. Filtre-1 ve Filtre-2 ye göre varyantlar çağırıldı. Hastada anlamlı bir varyant değişikliği saptanmadı.

Tablo 28: Hasta 3'e ait veriler

İİAB öncesi	Sağ lob orta-alt zon arasında arka bölümde 11x10 mm, bunun üst komşuluğunda
USG	10 mm hafif hiperekoik solid nodül,

	Sağ lob orta zonda 8 mm izoekoik solid nodül, Sağ lob üst ve orta zonda en büyüğü 6 mm, izoekoik, mikst ekoda birkaç nodül İsthmus sağ yarı üst bölümde 9 mm, izoekoik, solid nodül Sol lob orta ve alt zonda anterolateralde yerleşimli çevresinde ince hipoekoik halo bulunan 28x14x14 mm boyutlarında izoekoik görünümde düzgün kenarlı solid nodül Sol lob alt pol medial bölümde 12x7 mm kistik ağırlıklı mikst ekoda nodül Sol lob orta zon medial bölümde 9 mm uzunluğunda izoekoik solid nodül Sol üst ve orta zonda en büyüğü 8 mm boyutunda izoekoik mikst ekoda nodüller
İİAB Alınan Nodül	Sol lob 28x14x14 mm boyutlarında izoekoik nodül
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) <i>(Sitomorfolojik bulgular kistik dejenerasyon gösteren follikül nodüler hastalık ile uyumlu olmakla birlikte, tiroisitlerin bir kısmında hafif irerme varlığı nedeniyle olgunun sitoloji tekrarı önerilir.)</i>
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob; tiroidin papiller karsinomu, kapsüllü klasik tip Sağ lob; folliküler nodüler hastalık Mikroskobi: <i>Tümör 1:</i> 1,5 cm, sol lob, tiroidin papiller karsinomu, kapsüllü klasik tip <i>Lenfovasküler İnvazyon:</i> Yok <i>Tümörde kapsül varlığı:</i> Var <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu:</i> Yok <i>Tümör Sınırları:</i> Düzgün sınırlı <i>Tiroid dışı Yayılım:</i> Yok <i>Nekroz:</i> Yok <i>Multisentrisite:</i> Yok <i>Tiroid içi yayılım:</i> Yok <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu:</i> Folliküler nodüler hastalık <i>Cerrahi Sınırlar:</i> 0,1 cm uzaklıkta <i>İmmunhistokimyasal İncelemeler</i>

	<i>BRAF-V600E: negatif</i> <i>Cyclin D1: 1,5 cm çaptaki tümörde %70</i> <i>Sitokeratin 19: 1,5 cm çaptaki tümörde negatif</i> <i>Mezotelyal Hücre: 1,5 cm çaptaki tümörde fokal pozitif</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Galektin 3: 1,5 cm çaptaki tümörde fokal pozitif</i>
Genetik	-

HASTA 4: 18 yaş erkek hasta, boyunda şişlik şikayeti nedeniyle dış merkeze başvurmuştu. USG ile sol tiroitte nodül saptanan hastaya İİAB önerilmiş ve merkezimizde değerlendirilen İİAB pataloji sonucu önemi belirsiz atipi olarak yorumlanmıştı. Lobektomi gerçekleştirilen hastanın patoloji sonucunda tiroidin papiller karsinomu, kapsüllü klasik tip saptanmıştı (Tablo 29). Hastanın arşiv materyalinden 25 ng DNA izole edilerek çalışmaya alındı. Kalite skorlarını geçen çalışma analiz edildi ancak analizde anlamlı bir varyant saptanmadı.

Tablo 29: Hasta 4'e ait veriler

İİAB öncesi USG	Dış merkezde yapılmış
İİAB Alınan Nodül	Soldan alınmış, ek bilgi yok
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) <i>(Hematoksilen eozin boyalı yayma prepartlarda yer yer yangısal atipinin varlığı dikkati çekmiştir.)</i>
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob; tiroidin papiller karsinomu, kapsüllü klasik tip Sağ lob; folliküler nodüler hastalık Mikroskobi: <i>Tümör 1:</i> 1,5 cm, sol lob, tiroidin papiller karsinomu, kapsüllü klasik tip <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde kapsül varlığı: Var</i> <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu: Yok</i>

	<i>Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı</i> <i>Tiroid dışı Yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid içi yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Ek özellik yok</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i> <i>İmmunHistokimyasal İncelemeler</i> <i>BRAF-V600E: negatif</i> <i>Cyclin D1: %40</i> <i>Sitokeratin 19: pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: pozitif</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Galektin 3: negatif</i>
Genetik	-

HASTA 5: 44 yaş erkek hasta, kilo alamama nedeniyle tetkik edilirken, endokrinoloji polikliniğinde kalsiyum yüksekliği saptanması üzerine boyun USG istenmiş. USG’de bilateral bezde multiple sayıda EU-TİRADS 3 nodül, sağ lob-istmus EU-TİRADS 4 nodül saptanması üzerine İİAB önerilmiş. İİAB sonucu sonucu önemi belirsiz atipi (Bethesda III) olarak raporlanmış. Total tiroidektomi uygulanan olgunun patolojinde bilateral lokalizasyonda tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant saptanmıştı (Tablo 30).

Tablo 30: Hasta 5’e ait veriler

İİAB öncesi USG	Sol lobta en büyüğü orta zonda 17x14 mm, birinde kaba kalsifikasyon izlenen, Sağ lobda en büyüğü orta zonda 16x14 mm, bazılarının yakın komşuluk nedeni ile sınırları birbirinde net ayrılamayan multiple sayıda, keskin kenarlı, izo-hiperekojen EU-TİRADS 3 nodül Sağ lob-istmus bileşkesinde 11x6 mm çapında içinde iki adet ekojen odak izlenen hafif hipoekoik EU-TİRADS 4 nodül
----------------------------	---

İİAB Alınan Nodül	Sağ isthmus bileşkesindeki nodül (EU-TİRADs 4)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (Tiroisit gruplarında izlenen nükleer irileşme ve kenar düzensizliği nedeniyle yukarıdaki tanıya gidilmiştir.)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob; tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant Mikroskobi: Tümör 1: 0,4 cm, sağ lob; tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant Tümör 2: 0,7 cm, isthmus; tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant Tümör 3: 0,7 cm, sol lob; tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde kapsül varlığı: Var (1. Ve 3. Tümör)</i> <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu: Var (1. Ve 3. Tümör)</i> <i>Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı (2. Tümör)</i> <i>Tiroid dışı Yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid içi yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Folliküler nodüler hastalık + lenfositik tiroidit</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta (1.,2. ve 3. tümör)</i> İmmunhistokimyasal İncelemeler <i>Cyclin D1: 1.tümörde %10</i> <i>Galektin 3: 1.tümörde negatif</i> <i>TTF1: pozitif</i> <i>PAX-8: 1.tümörde pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: 1.tümörde negatif</i> <i>Mezotelyal Hücre: 1.tümörde negatif</i>
Genetik	-

Hastanın İİAB arşiv materyalinden 10 ng DNA elde edildi. Örnek çalışması sorunsuz olarak tamamlandı ve kalite skorlarını geçti. Filtre 1 ve 2'ye göre çağırılan varyantlar analiz edildiğinde anlamlı bir varyant bulunamadı.

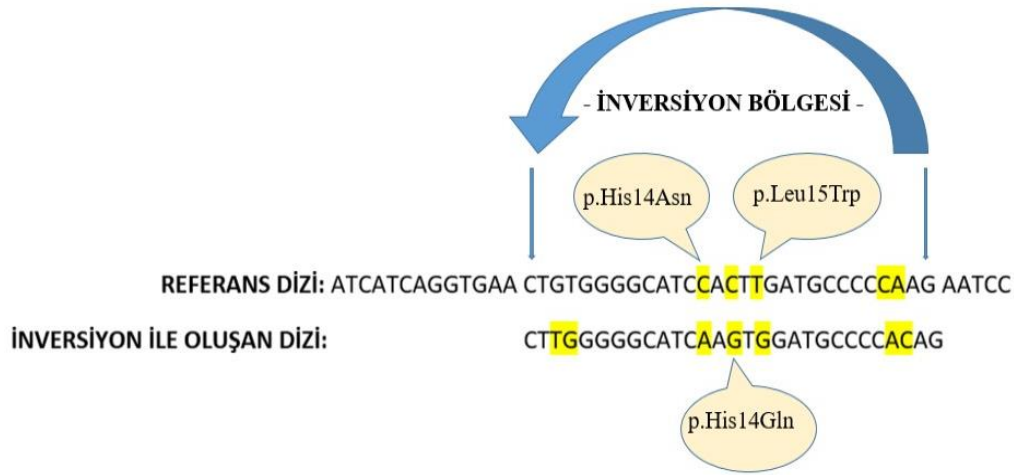
HASTA 6: 40 yaş kadın hasta, multinodüler guatr nedeniyle takip edilirken, kronik tiroidit zeminindeki sol loba ait nodülden İİAB önerilmişti. Hastanın patoloji sonucu foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) olarak raporlanmıştı. Total tiroidektomi gerçekleştirilen hastanın patoloji sonucu sol lob, tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant, sağ lob ise lenfositik tiroidit olarak raporlanmıştı (Tablo 31).

Tablo 31: Hasta 6'ya ait veriler

İİAB öncesi USG	Dış merkezde yapılmış
İİAB Alınan Nodül	Sol lob 8x10.5x24 mm'lik nodülden alınmış
İİAB Sitopatoloji	Foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) <i>(Hücre bloğunda çok sayıda mikrofolliküler yanaşma gösteren yer yer nükleer membran düzensizliği seçilen hücreler izlendi. Kesin tanı için histopatolojik korelasyon gereklidir.)</i>
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob; tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant Sağ lob; lenfositik tiroidit Mikroskobi: Tümör 1: 2,2 cm, sol lob; tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde kapsül varlığı: Var</i> <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu: Yok</i> <i>Tiroid dışı Yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid içi yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Lenfositik tiroidit</i>

	<i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i> İmmunhistokimyasal incelemeler: Sitokeratin 19: fokal (+) Mezotelyal hücre: negatif Galektin 3: negatif
Genetik	<i>PIK3CA:c.40C>A(p.His14Asn),</i> <i>PIK3CA:c.42C>G(p.His14Gln),</i> <i>PIK3CA:c.44T>G (p.Leu15Trp)</i>

Hastanın İİAB arşiv materyalinden 12 ng DNA elde edildi. Kalite skorlarını geçen çalışma analiz edildi. Filtre-1 sonucunda çağırılan varyantların içerisinde birbirine çok yakın konumlanan, allelik fraksiyonları birbirine benzer ve yaklaşık 0.04 saptanan, *PIK3CA*'ya ait varyantlar dikkati çekti [(*PIK3CA*:c.40C>A (p.His14Asn), *PIK3CA*:c.42C>G (p.His14Gln), *PIK3CA*:c.44T>G (p.Leu15Trp)] . Okuma derinliği 200'dü. Bu varyant kümesinin bölgenin inversiyonu sonucunda oluştuğu düşünüldü (Şekil 9).



Şekil 9: İnversiyon sonucunda *PIK3CA*'da saptanan değişiklikler, referans diziyle uyumsuz kısımlar sarı ile gösterilmiştir

HASTA 7: 10 senedir guatr nedeniyle takip edilen 48 yaş kadın hastaya, son USG'de sağda 35 mm solid nodül olması nedeniyle İİAB yapılması planlanmış. İİAB sonucu sonucu önemi belirsiz atipi (Bethesda III) olarak raporlanmış. Total tiroidektomi uygulanan hastanın

patoloji sonucu folliküler nodüler hastalık + lenfositik tiroidit olarak tespit edilmişti (Tablo 32).

Tablo 32: Hasta 7'ye ait veriler

İİAB öncesi USG	Multinodular guatr Sağ lob üst yarıda 5x2 mm, Sağ lob alt yarısını arkada büyük ölçüde kaplayan 37x25 mm ve bunun ön komşuluğunda 14x4 mm, kistik bileşenli, heterojen, izoekoik, solid nodüller Dominant nodül medialinde 10x6 mm, kaba kalsifik odakları olan, kistik bileşenli, hipoeikoik, solid nodül Dominant nodülün kaudal komşuluğunda 7x5 mm, izoekoik, solid nodül İsthmusta 14x8 mm, kistik bileşenli, heterojen izoekoik, solid nodül Sol lobda ise üst yarıda 8x4, lob ortası 8x4 mm boyutlu (kistik bileşenleri olan hafif hipoeikoik) solid nodül ile alt 1/3 'te 7x3 mm boyutlu (izoekoik) solid nodül
İİAB Alınan Nodül	1- Sağ lob alt yarımındaki 37x25 mm solid nodül (EU-TIRADS 3) 2- Sağ lob üst yarımındaki 5x2 mm solid nodül
İİAB Sitopatoloji	1- Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) 2- Önemi belirsiz atipi (Bethesda III)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ lob; folliküler nodüler hastalık + lenfositik tiroidit Sol lob; folliküler nodüler hastalık + lenfositik tiroidit
Genetik	-

Hastanın İİAB arşiv materyalinden 9.6 ng DNA elde edilerek çalışmaya alındı. Kalite skorları iyi olan çalışmanın analizi gerçekleştirildi. Filtre 1 ve 2'ye göre çağırılan varyantlar analiz edildiğinde anlamlı bir varyant bulunamadı. Ayrıca hastada herhangi bir kopya sayısı değişikliği saptanmadı.

HASTA 8: 64 yaş kadın hasta, boyunda şişlik ve ağrı yakınmaları nedeniyle ileri inceleme yapılırken 2018 yılında çekilen boyun USG'de nodüller saptanması üzerine takibe alınmış. 2019 yılında çekilen USG'de sol lobda EU-TIRADS 5 özellikte nodül saptanmış. İİAB önerilen hastanın sitopatoloji sonucu benign olarak raporlanmış. 5 ay sonra çekilen

kontrol USG’de tiroid sol lobda malignite kuşkulu solid nodül izlenmesi üzerine tekrar İİAB gerçekleştirilmiş. İkinci biyopside hücrelerin onkositik karakterde görünmesi ve patoloji sonucunun foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) olması nedeniyle hasta total tiroidektomi önerilmişti. Total tiroidektomi uygulanan hastanın patolojik değerlendirmesinde folliküler nodüler hastalık saptanmıştı (Tablo 33).

Tablo 33: Hasta 8’e ait veriler

İİAB öncesi USG	Sağ lob alt polde, içinde birkaç ekojenik odak bulunan, hipoekoik, solid nodül Sol lob orta zon arka bölüm lateral tarafta yerleşimli bez konturları dışına da hafif uzanım gösteren, içinde kaba kalsifikasyonlar bulunan, düzensiz kenarlı, düzensiz şekilli, hipoekoik görünümde olması nedeniyle malignite kuşkulu 20x11x14 mm boyutlarında solid nodül Sol alt polde 5 mm kistik nodül
İİAB Alınan Nodül	Sol lob 20x11x14 mm boyutlarında solid nodül
İİAB Sitopatoloji	Foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) (Hücreler onkositik karakterdedir.)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ lob; folliküler nodüler hastalık Sol lob; folliküler nodüler hastalık İmmünohistokimyasal İncelemeler CD31: endotel hücrelerinde(+) CD34: negatif CyclinD1: %5 Sitokeratin19: pozitif Mezotelyal Hücre: negatif PAX-8: pozitif Galektin 3: negatif
Genetik	-

Hastanın ikinci İİAB arşiv materyalinden 7.9 ng DNA elde edildi. Örnek çalışmaya alındı. Kalite skorları iyi şekilde tamamlanan çalışmanın analizi gerçekleştirildi. Filtre 1 ve

2'ye göre çağırılan varyantlar analiz edildiğinde anlamlı bir varyant bulunamadı. Ayrıca hastada herhangi bir kopya sayısı değişikliği saptanmadı.

HASTA 9: 62 yaş kadın hasta multinodüler guatr nedeni ile 5 senedir takip edilmekteymiş. 2019 yılında yapılan tiroit ultrasonografisinde sağ taraftaki hipoekoik nodülden (kategori: EU- TIRADS 4) İİAB önerilmişti. Ocak 2020'de İİAB gerçekleştirilen hastanın patoloji sonucu foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) olarak raporlanmış, Mart 2020'deki rebiyopside ise önemi belirsiz atipi (Bethesda III) saptanmıştı. Ayrıca hastanın daha önce 2 kez benign sitoloji sonucu verilmiş İİAB sonuçları mevcuttu. Hastada foliküler neoplazi kuşkusu ve daha önce önemi belirsiz atipi saptanması nedeniyle total tiroidektomi kararı verilmişti. Hastanın cerrahi patoloji sonucu; sağ lobda tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant; sol lobda folliküler nodüler hastalık olarak raporlanmıştı (Tablo 34).

Tablo 34: Hasta 9'a ait veriler

İİAB öncesi USG	Sağ lob alt yarıda, 18x10x13 mm, oval, hipoekoik, düzgün sınırlı; bunun kaudalinde 3 mm, izoekoik solid nodüller Sol lob alt yarıda 4 mm hafif hipoekoik solid nodül
İİAB Alınan Nodül	Sağ lob alt yarıdaki 18x10x13 mm solid nodül (EU-TIRADS 4)
İİAB Sitopatoloji	Foliküler neoplazi kuşkusu (Bethesda IV) (Hücreler onkositik karakterdedir.)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ lob; tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant Sol lob; folliküler nodüler hastalık Mikroskopi: Tümör: 1,3 cm, sağ lob tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant Lenfovasküler İnvazyon: Yok Tümörde Kapsül Varlığı: Var Tümörde Kapsül İnvazyonu: Var Tiroid dışı yayılım: Yok Nekroz: Yok Multisentrisite: Yok

	<i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Folliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i> <i>İmmünohistokimyasal İncelemeler</i> <i>Cyclin D1: %80</i> <i>Galektin 3: negatif</i> <i>Mezotelyal Hücre: fokal pozitif</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: negatif</i> <i>Calcitonin: negatif</i> <i>CEA--monoklonal: negatif</i> <i>Kromogranin A: negatif</i> <i>Tiroglobulin: pozitif</i>
Genetik	NRAS: c.182A>G (NP_002515.1: p.Gln61Arg) (%11)

Hastanın Ocak 2020'ye ait İİAB örneği çalışmamıza dahil edildi. Hastanın arşiv materyalinden 6.2 ng DNA elde edilerek çalışmaya alındı. Çalışma istenilen kalite sonuçlarına ulaştı. Analiz sonucunda NRAS: c.182A>G (NP_002515.1: p.Gln61Arg) varyantı 0.1187 allelik fraksiyonda saptandı. Okuma derinliği 625'di. Analizde anlamlı bir kopya sayısı değişikliği saptanmadı.

HASTA 10: 21 yaş kadın hastada ilk kez 3 sene önce tiroid nodülü saptanmıştı. 2019'da yapılan USG'de 9 mm ve 15 mm çaplı, birbirine komşu iki nodülün; düzgün sınırlı, hipoekojen kolloid kristaller içeren EU-TIRADS 2 özelliklere sahip olduğu belirlenmişti. Takip edilen hastada, 2021 yılı USG'de sol lobda orta derecede malignite riski telkin eden (EU-TIRADS 4) nodüller tespit edilmiş ve İİAB önerilmişti. İİAB sonucunda önemi belirsiz atipi (Bethesda III) saptanan hasta için cerrahi kararı verilmiş. İlk olarak sol lobektomi planlanan hastanın frozen materyalinin sonucu malign gelince total tiroidektomi yapılmış. Hastanın patoloji sonucunda sol lobda tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant saptanmıştı (Tablo 35).

Tablo 35: Hasta 10'a ait veriler

İİAB öncesi USG	Sol kaudal yarıda 9x7x11 mm ve hemen kaudalinde bitişik ve lob alt ucuna kadar uzanan 17x10x20 mm boyutlu, içlerinde ve çeperlerinde "kuyruklu yıldız" artefaktı olan, küçük ve orta boy kistik açıklıkları olan hipoekoik solid nodül (EU-TIRADS 4)
İİAB Alınan Nodül	Sol kaudal 17x10x20 mm boyutlu (EU-TIRADS 4) nodül
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (Tiroisit gruplarında izlenen nükleer irileşme ve kenar düzensizliği nedeniyle yukarıdaki tanıya gidilmiştir.)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob; tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant Sağ lob; folliküler nodüler hastalık Mikroskopi: Tümör 1: 1,4 cm, sol lob tiroidin papiller karsinomu, onkositik varyant Tümör 2: 0,9 cm, sol lob tiroidin papiller mikrokarsinomu, onkositik varyant Lenfovasküler İnvazyon: Yok Tümörde Kapsül Varlığı: Var (1. tümör) Tümörde Kapsül İnvazyonu: Yok Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı (2. tümör) Tiroid dışı yayılım: Yok Nekroz: Yok Multisentrisite: Yok Tiroid İçi Yayılım: Yok Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Özellik yok Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta (1. ve 2. tümör) İmmunhistokimyasal İncelemeler Cyclin D1: 1. tümörde %80 Galektin 3: 1. ve 2. tümörde fokal pozitif Mezotelyal Hücre: 1. ve 2. tümörde fokal pozitif Sitokeratin 19: 2. tümörde pozitif Sitokeratin 19: 1. tümörde fokal pozitif

	<i>PAX-8: pozitif</i>
Genetik	-

Hastanın ikinci İİAB arşiv materyalinden 6.3 ng DNA elde edildi. Kalite skorları iyi şekilde tamamlanan çalışmanın analizi gerçekleştirildi. Filtre 1 ve 2'ye göre çağırılan varyantlar analiz edildiğinde anlamlı bir varyant bulunamadı. Kopya sayısı değişikliği saptanmadı.

HASTA 11: 59 yaş kadın hasta, 3 sene önce boyunda şişlik şikayeti ile nodül saptanmış. 2020 yılında yapılan USG'de sağ lob orta zonda EU-TIRADS 5 nodül görülmesi üzerine histopatolojik tanı önerilmiş. İİAB sonucu önemi belirsiz atipi (Bethesda III) saptanan hasta için cerrahi kararı verilmiş. Sağ lobektomi yapılan hastanın intraoperatif olarak frozen materyalinde tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant saptanması üzerine total tiroidektomi yapılmış. Sol loba ait patoloji sonucu tiroidin papiller mikrokarsinomu olarak raporlanmış (Tablo 36).

Tablo 36: Hasta 11'a ait veriler

İİAB öncesi USG	Sağ lob orta zonda 10x8x17 mm çapında irregüler konturlu, içerisinde fokal mikrokalsifikasyon odağı izlenen solid hipoeoik nodül (EU-TIRADS 5)
İİAB Alınan Nodül	Sağ lob sınırları düzensiz mikrokalsifik nodül (EU-TIRADS 5)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (<i>Yayma preparatlar son derece hiposellüler nitelikte olup, bir miktar sitoliz bulguları gösteren tirositlerde izlenen hücresel atipi nedeniyle olguda sitoloji tekrarı gereklidir.</i>)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ lob: tiroidin papiller karsinomu, foliküler varyant Sol lob: tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant <i>Mikroskopi:</i> <i>Tümör 1: 1,5 cm, sağ lob tiroidin papiller karsinomu, foliküler varyant</i> <i>Tümör 2: 0,2 cm, sağ lob tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip</i> <i>Tümör 3: 0,1 cm, sol lob</i>

	<i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Var (1. Tümör)</i> <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu: Var (1. Tümör)</i> <i>Tümör Sınırları: İnfiltratif (2. tümör)</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Var (Sağ lob)</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Özellik yok</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,2 cm uzaklıkta (1. tümör), 0,1 cm uzaklıkta (2. tümör)</i> <i>İmmunhistokimyasal İncelemeler</i> <i>Cyclin D1 : %60</i> <i>Galektin 3: fokal pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: pozitif</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: fokal pozitif</i>
Genetik	<i>TP53:c.568C>A (p.Pro190Thr)</i> <i>TP53:c.132G>A (p.Met44Ile) (%5)</i>

Hastanın İİAB arşiv materyalinden 7 ng DNA elde edildi. Kalite skorlarını geçen çalışma analiz edildi. Filtre-1 ile çağırılan varyantların içerisinde *TP53:c.568C>A* (p.Pro190Thr) saptandı. Allelik oranı 0.0439, okuma derinliği 342 idi. Buna ek *TP53:c.132G>A* (p.Met44Ile) varyantı da yakın allelik orana sahip şekilde (Allelik oran: 0.05, Okuma derinliği: 236) mevcuttu. Aynı hücre klonuna ait olduğu düşünülen bu iki değişiklik raporlandı. Hastada anlamlı bir kopya sayısı değişikliği saptanmadı.

HASTA 12: 68 yaş kadın hasta, 6 senedir guatrı nedeniyle takip edilmekteyken; 2019 yılında yapılan USG’de solda EU-TIRADS 5, sağda EU-TIRADS 4 özellikte nodül saptanması üzerine İİAB önerilmiş. Biyopsi sonucunda önemi belirsiz atipi (Bethesda III) saptanmış. 3 ay sonra re-biyopsi uygulanan hastanın sitopatolojik sonucu tekrar önemi belirsiz atipi (Bethesda III) gelmiş. Total tiroidektomi kararı alınan hastanın cerrahi patoloji sonucunda

sağda tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant, solda tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant saptanmış (Tablo 37).

Tablo 37: Hasta 12'a ait veriler

İİAB öncesi	Solda 41 mm çaplı EU-TIRADS 5 nodül
USG	Sağda 6 mm çaplı EU-TIRADS 4E nodül
İİAB Alınan Nodül	Sol lob 4,3 cm ölçülen izoekoik nodül (EU-TIRADS 5)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (<i>Sitomorfolojik bulgularda olağan tiroisit grupları arasında bir adet tiroisit grubunda oldukça iri hiperkromatik nükleuslu, nükleer membranları düzensiz hücreler izlenmiştir. Olgunun sitoloji kontrolü uygun olur.</i>)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob: tiroidin papiller karsinomu, foliküler varyant Sağ lob: tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant <i>Mikroskobi:</i> <i>Tümör 1: 4,2 cm, sol lob, tiroidin papiller karsinomu, foliküler varyant</i> <i>Tümör 2: 0,2 cm, sağ lob tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i> <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Var (1. Tümör)</i> <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu: Var (1. Tümör)</i> <i>Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı (2. tümör)</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta (1. tümör), 0,2 cm uzaklıkta (2. tümör)</i>
Genetik	BRAF:c.1921A>G (p.Lys601Glu) (%14)

Hastanın ilk İİAB materyali çalışmaya dahil edildi. 6.94 ng DNA elde edildi. Başarılı bir şekilde tamamlanan çalışma sonucunda, Filtre-1 ile çağırılan varyantlarda

BRAF:c.1921A>G (p.Lys601Glu) saptandı. Allelik oranı 0.1418, Okuma derinliği 973'dü. Filtre-2 ile çağırılan varyantlarda ek anlamlı varyant saptanmadı.

HASTA 13:4 sene önce boyunda şişlik şikayeti ile nodülleri saptanan 42 yaşında kadın hastanın, 2018 yılında şüpheli bir ultrasonografik bulgusu olmayıp, yapılan İİAB sonucu benign imiş. 2019 yılındaki boyun USG'sinde nodülleri sağda ve solda EU-TIRADS 3 özellikteymiş. 2020 yılındaki USG'de şüpheli özellikler nedeniyle İİAB önerilmiş. Sağdaki isthmus yakınında bulunan nodül (EU-TIRADS 4) ve sağ lobdaki (EU-TIRADS 3) nodülden biyopsi yapılmış. Sağ isthmus biyopsi sonucu önemi belirsiz atipi olarak ve sağ lob biyopsi sonucu benign sitoloji olarak raporlanmış. 1 sene sonraki sonografik incelemede de EU-TIRADS 4 özellikli nodüller gözlenmesi üzerine tekrar sağ ve sol lobdaki nodüllerden İİAB gerçekleştirilmiş ve sonucu önemi belirsiz atipi (Bethesda III) olarak gelmiş. Total tiroidektomi gerçekleştirilen hastanın patolojisinde sağ ve solda tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant saptanmış (Tablo 38).

Tablo 38: Hasta 13'e ait veriler

İİAB öncesi USG	Solda 18 mm, 11 mm ve 5 mm çaplı, solid, izoekojen EU-TIRADS 3 Sağda 10 mm, 7 mm ve 14 mm çaplı, solid, izoekojen yer yer kaba kalsifikasyonları olan EU-TIRADS 3 Sağ isthmus 8 mm çaplı solid hipoejojen EU-TIRADS 4 özelliklerde nodüller
İİAB Alınan Nodül	1- Sol lob 2 cm'lik nodül 2- Sağ isthmus 8 mm'lik nodül
İİAB Sitopatoloji	1- Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) 2- Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (Gönderilen sağ ve sol tiroid materyalinde belirgin hücresellğe sahip preparatlarda, tiroositlerde izlenen nükleer irerme ve kenar düzensizliği nedeniyle yukarıdaki tanıya gidilmiştir.)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol lob: tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant Sağ lob: tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant Mikroskobi: Tümör 1: 1 cm, sol lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant

	<i>Tümör 2: 0,5 cm, sağ lob tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i> <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta (1. ve 2. tümör)</i> <i>İmmunhistokimyasal İncelemeler</i> <i>CD31: Endotelde pozitif</i> <i>Cyclin D1: 1. tümörde %70 pozitif</i> <i>Galektin 3: 1. tümörde negatif</i> <i>Kromogranin A: Sol lobta 0,2 cm çaptaki nodülde negatif</i> <i>PAX-8: 1. tümörde pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: 1. tümörde negatif</i> <i>Calcitonin: Sol lobta 0,2 cm çaptaki nodülde negatif</i> <i>CEA--monoklonal: Sol lobta 0,2 cm çaptaki nodülde negatif</i> <i>CD34: Endotelde pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: 1. tümörde negatif</i>
Genetik	-

Hastanın üçüncü İİAB arşiv materyalinden 6.94 ng DNA elde edilerek çalışmaya alındı. Çalışma istenilen kalite skorlarına ulaştı. Filtre-1 ile çağırılan varyantların içinde allelik oranı 0.48, okuma derinliği 2814 olan ATM:c.5882A>G (p.Tyr1961Cys) saptandı. Bu varyantın germline olduğu düşünüldü ancak doğrulama yapılamadı. Varyant ACMG kriterlerine göre (PM2-PP3) “önemi bilinmeyen varyant (VUS)” sınıfında idi. Filtre-2 ile çağırılan varyantlarda ek anlamlı varyant saptanmadı.

HASTA 14: 49 yaş kadın hasta, boyunda ele gelen kitle olması şikayeti ile tetkik edilirken, nodül saptanmış. 2019 yılında yapılan USG’de nodüllerin yüksek kuşkulu olarak raporlanması ile İİAB önerilmiş. Biyopsi sonucu önemi belirsiz atipi olarak raporlanmış. 2 ay sonra yapılan USG’de gözlenen solid ve mikst nodüller genel olarak düşük malignite riski telkin eden US özelliklerde (EU-TIRADS 3) değerlendirilmiş. 3 ay sonra tekrar İİAB yapılan hastanın sonucu tekrar önemi belirsiz atipi gelmiş. Total tiroidektomi yapılan hastanın patoloji sonucunda sağda tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant saptanmış (Tablo 39).

Tablo 39: Hasta 14’e ait veriler

İİAB öncesi USG	Solda 7 mm ve 4 mm çaplı süngerimsi kistik EU-TIRADS 2 Sağda 7 mm süngerimsi kistik EU-TIRADS 2 Sağda alt polde 10x8x8 mm boyutlu, daha çok kolloidal kristaller ve bazıları da küçük kaba kalsifik odaklar olarak değerlendirilen hiperekojen odaklar içeren, izoekoik solid- multiloküle kistik bileşenli EU-TIRADS 3 nodül
İİAB Alınan Nodül	Sağ altta 10x8x8 mm boyutlu EU-TIRADS 3 nodül
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (<i>Kolloidal zeminde nükleer irerme, nükleer membran düzensizliği ve üst üste binme gösteren az sayıda tirosit grubu izlenmiştir.</i>)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ lob: tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant <i>Mikroskobi:</i> <i>Tümör 1: 0,9 cm, sağ lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i> <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör Sınırları: Düzgün sınırlı</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i>

	<i>İmmunhistokimyasal İncelemeler</i> <i>Cyclin D1: %20</i> <i>Galektin 3: negatif</i> <i>Sitokeratin 19: fokal (+)</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: seyrek (+)</i>
Genetik	<i>PTEN: c.144C>A (p.Asn48Lys) (%7)</i>

Hastanın ikinci İİAB arşiv materyalinden 6.2 ng DNA elde edildi. Kalite skorları istenilen sınırlarda olan çalışma analiz edildi. Filtre-1'e göre varyantlar çağırıldı. *PTEN: c.144C>A (p.Asn48Lys)* varyantı 0.0732 allelik oranı ve 1775 okuma derinliğine sahip olarak saptandı.

HASTA 15:36 yaş kadın hastada ilk nodülleri 2010 senesinde saptanmış. 2019'da USG'de hipoekoik, lobüle ve düzensiz kenarlı ön-arka boyutu genişliğinden büyük ve mikrokalsifikasyon lehine ekojenik odaklar içermesi özellikleriyle malignite kuşkulu en büyük boyutu 13x11 mm ölçülen solid nodülden İİAB önerilmiş ve 2 kez İİAB patoloji sonucu önemi belirsiz atipi gelmişti. Total tiroidektomi planlanan hastanın cerrahi patoloji sonucunda sağ ve sol lobda kronik tiroidit, isthmusda ise tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip ve sağ santral boyun lenf nodülü disseksiyonunda metastaz (1/7) saptanmıştı (Tablo 40).

Tablo 40: Hasta 15'e ait veriler

İİAB öncesi USG	İsthmus hipoekoik, lobüle ve düzensiz kenarlı, ön-arka boyutu genişliğinden büyük ve mikrokalsifikasyon lehine ekojenik odaklar içermesi özellikleriyle malignite kuşkulu en büyük boyutu 13x11 mm ölçülen solid nodül (EU-TIRADS 5)
İİAB Alınan Nodül	İsthmus en büyük nodül (EU- TIRADS 5)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III)

	<i>(Sitomorfolojik bulgular tiroidit ile uyumlu olmakla birlikte follikül epitel hücrelerinin bir kısmında nükleer irerme ve membran düzensizliği dikkati çekmiştir. Olgunun sitolojik kontrolü önerilir.)</i>
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	İsthmus, tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip Sağ santral boyun lenf nodülü disseksiyonunda metastaz (1/7) <i>Mikroskobi:</i> <i>Tümör 1: 0,9 cm, isthmus, tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip</i> <i>Lenfatik İnvazyon: Var</i> <i>Vasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör Sınırları: İnfiltratif</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Kronik tiroidit</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,4 cm uzaklıkta</i>
Genetik	-

Hastanın ilk İİAB ait arşiv materyali çalışmaya dahil edildi. 7.6 ng DNA elde edildi ve çalışma başarılı şekilde tamamlandı. Hastanın varyantları Filtre-1 ve Filtre-2'ye göre çağırılarak analiz edildi ancak anlamlı bir varyant saptanmadı.

HASTA 16: Hipotiroidi nedeniyle tetkik edilen 75 yaş erkek hastada 10 sene önce tiroid nodülü saptanmış. Daha önce yapılan İİAB sonuçlarında iki kez tanısal olmayan sitoloji ve bir kez de benign sitoloji raporları mevcut. Hastanın en son yapılan İİAB'nin sitomorfolojik incelemesinde önemi belirsiz atipi/folliküler lezyon tanısı raporlanmış. Hastaya total tiroidektomi uygulanmış. Cerrahi patoloji sonucunda solda tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant, sağ lobda ise folliküler nodüler hastalık tanısı konulmuş (Tablo 41).

Tablo 41: Hasta 16'a ait veriler

İİAB öncesi USG	Sol lobda alt uca yakın konumlu ve medialden laterale sıralı olarak 11x8 mm (küçük kistik odakları olan izoeoik solid), anterolateralinde 19x12 mm (izoeoik ağırlıklı solid), anterolateralinde 14x9 mm boyutlu (multipl küçük kistik odakları olan izoeoik solid) nodüller
İİAB Alınan Nodül	Tiroid bezi sol inferior dominant solid nodül (EU- TIRADS 3)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) <i>(Foliküler nodüler hastalığı destekleyen bulgular yanı sıra bir odakta izlenen diskayotik değişiklikler olması nedeniyle yukarıdaki tanıya gidilmiştir.)</i>
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol, tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant <i>Mikroskobi:</i> <i>Tümör 1: 0,2 cm, sol lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i> <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Perinöral İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Var</i> <i>Tümörde Kapsül İnvazyonu: Yok</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i>
Genetik	-

İİAB sonucu önemi bilinmeyen atipi olan materyal çalışmaya dahil edildi. 5 ng DNA elde edildi. Çalışma istenilen kalite düzeyinde olarak tamamlandı. Hastanın varyantları Filtre-1 ve Filtre-2'ye göre çağırılarak analiz edildi ancak anlamlı bir varyant saptanmadı.

Nodül lokalizasyonları dikkatle değerlendirildiğinde, İİAB alınan kısmın benign olduğu ve mikrokarsinom saptanan nodülün İİAB alınan nodülden başka bir nodül olduğu tespit edildi. Bu nedenle hasta benign grupta tartışılacaktır.

HASTA 17: 53 yaş kadın hasta, 2014 yılından beri multinodüler guatr ile takip edilmekteymiş. 2019 yılında USG incelemesinde kuşkulu nodülü bulunması üzerine İİAB önerisi almış. İİAB yapılan hastanın sonucu önemi belirsiz atipi gelmiş. Total tiroidektomi yapılmış ve patoloji sonucunda sağ ve sol lobda tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip saptanmış (Tablo 42).

Tablo 42: Hasta 17'a ait veriler

İİAB öncesi USG	Sol lobda orta zon medial bölümde yerleşimli ön-arka boyutu genişliğinden büyük, hipoekoik görünümde ve hafif düzensiz kenarlı olması nedeniyle kuşkulu 6x8x6 mm boyutlarında solid nodül
İİAB Alınan Nodül	Sol lob 6x8x6 mm boyutlarında solid nodül
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol ve sağ, tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip <i>Mikroskopi:</i> <i>Tümör 1: 0,8 cm, sağ lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip</i> <i>Tümör 2: 0,7 cm, sol lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip</i> <i>Lenfatik İnvazyon: Var (1. tümör)</i> <i>Vasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Perinöral İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör sınırları: İnfiltratif (1. ve 2. tümör)</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta (1. tümör); 0,2 cm uzaklıkta (2. tümör)</i> İmmunhistokimyasal İncelemeler Cyclin D1 : %50

	Galektin 3: pozitif Sitokeratin 19: pozitif PAX-8: pozitif Mezotelyal Hücre: pozitif
Genetik	<i>BRAF</i> :c.1799T>A (p.Val600Glu) (%13)

İİAB sonucu önemi bilinmeyen atipi olan materyal çalışmaya dahil edildi. 4.8 ng DNA elde edildi. Çalışma istenilen kalite düzeyinde olarak tamamlandı. Hastanın Filtre-1 ile elenmesinden sonra yapılan analizde 0.1381 allelik oranda ve 536 okuma derinliğine sahip *BRAF*:c.1799T>A (p.Val600Glu) varyantı saptandı. Filtre-2 de ek anlamlı varyant gözlenmedi.

HASTA 18: 53 yaş kadın hastada, 3 sene önce insidental olarak tiroid nodülü tespit edilmiş. 2020’de yapılan USG’de sol lobdaki mikst (EU-TIRADS3) nodül ve yanında 15 mm’lik posterolateral konumlu nodül, izoekoik yapısına rağmen, hafif düzensiz konturları nedeni ile kuşku uyandırmış ve EU-TIRADS5 olarak değerlendirilmiş ve İİAB önerilmiştir. Önemi belirsiz atipi saptanan hastaya, sitoloji kontrolü önerilmiş. Hastadan bir sene sonra yapılan İİAB sonucu, tekrar önemi belirsiz atipi olarak gelmiş. Sol hemitiroidektomi yapılan hastanın sonucu tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant olarak raporlanmıştı (Tablo 43).

Tablo 43: Hasta 18’e ait veriler

İİAB öncesi USG	Lob üst yarı alt kısım posterolateral kontura oturmuş, yaklaşık 15x9x13 mm boyutlu hafif düzensiz ve ondüle kenarlı, izoekoik yapısına rağmen, hafif düzensiz konturları nedeni ile kuşku uyandırmış (EU-TIRADS5) nodül Sol lob periferik yerleşimli, bazıları reverberasyon artefaktı veren bir dizi hiperekojen noktasal odak -kolloid kristal??- içeren izoekoik, tama yakın solid nodül (EU-TIRADS3)
İİAB Alınan Nodül	Sol lob inferior 15 mm’lik nodül (EU-TIRADS5)

İİAB	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III)
Sitopatoloji	(Kanamalı yaymalarda bir kısmı mikrofolliküler yavaşma gösteren tiroisit gruplarının varlığı ve yapısal atipi nedeniyle tekrar sitoloji kontrolü önerilir)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant Mikroskopi: <i>Tümör 1: 0,3 cm, sol lob, tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i> <i>Lenfovasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör sınırları: Düzgün sınırlı</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i> İmmunhistokimyasal İncelemeler <i>Cyclin D1: 1,5 cm çaptaki nodülde %15 (+)</i> <i>Galektin 3: 1,5 cm çaptaki nodülde negatif</i> <i>Mezotelyal Hücre: 1,5 cm çaptaki nodülde negatif</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: 1,5 cm çaptaki nodülde negatif</i> <i>Galektin 3: 0,3 cm çaptaki tümörde fokal pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: 0,3 cm çaptaki tümörde pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: 0,3 cm çaptaki tümörde negatif</i> <i>Not: Sol lobda izlenen 1,5 cm çaptaki nodülün tamamı takibe alınarak incelenmiştir. Morfolojik ve immunohistokimyasal bulgularla bu nodül adenomatoid nodül lehine değerlendirilmiştir.</i>
Genetik	-

Hastanın ilk kez önemi bilinmeyen atipi saptanmış olan İİAB materyali çalışmaya dahil edildi. 3.5 ng DNA elde edildi. İyi kalitede olan çalışma analizinde anlamlı bir varyant

saptanmadı ancak germline olduğu düşünölen (allelık oran:0.4 okuma derinliği:987) *MET* (NM_001127500.3):c.341A>T (p.Asp114Val) varyantı saptandı. Varyant ACMG kriterlerine göre (PM2-PP3) “önemi bilinmeyen varyant (VUS)” sınıfında idi. Filtre-2 ile çağırılan varyantlarda ek anlamlı varyant saptanmadı.

Hastada papiller mikrokarsinom saptanmış olsa da, İİAB alınan nodöl adenomatoid karakterde benign bir nodöl olarak değeriendirilmiştir. Bu nedenle hasta benign grupta tartışılmıştır.

HASTA 19: 2016 yılında meme kanseri nedeniyle opere olan 57 yaş kadın hastanın takiplerinde tiroid nodölü saptanmış. 2020’de yapılan USG’de yüksek riskli olarak değeriendirilen olguya, sağ nodölden İİAB yapılmış. Önemi belirsiz atipi saptanan hastaya sitoloji tekrarı önerilmiş. Tekrarlanan İİAB sonucunda kuşku lu sitoloji saptanınca, hastada total tiroidektomi uygulanmış. Sağda papiller karsinom, tall cell varyant; solda papiller mikrokarsinom, foliküler varyant tespit edilmiş (Tablo 44).

Tablo 44: Hasta 19’a ait veriler

İİAB öncesi USG	Sağ lob ortasında anteromedial konumlu, 12x13x10 mm boyutlu, düzensiz şekil ve sınıra sahip, ön-arka çapı fazla solid nodöl yüksek malignite riski telkin eden ultrasonografik özelliklere sahip (EU-TIRADS5) nodöl
İİAB Alınan Nodöl	Sağ lob 12x13x10 mm boyutlu nodöl (EU-TIRADS5)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III) (<i>Seyrek lenfositin bulunduğu zeminde izlenen çok sayıda onkositik plakarlarda nükleer membran düzensizliği ve bir kısmında inklüzyon benzeri yapıların mevcut olduğunun bildirilmesi nedeniyle olguya sitoloji kontrolü önerilir</i>)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sağ tiroidin papiller karsinomu, tall cell varyant Sol tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant <i>Mikroskobi:</i> <i>Tümör 1: 1,5 cm, sağ lob, tiroidin papiller karsinomu, tall cell varyant</i> <i>Tümör 2:0,4 cm, sağ lob tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i>

	<i>Tümör 3:0,3 cm, sol lob tiroidin papiller mikrokarsinomu, foliküler varyant</i> <i>Lenfatik İnvazyon: Var (1. tümör),</i> <i>Vasküler İnvazyon: Yok</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör sınırları: İnfiltratif (1., 2. ve 3. tümör)</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Var (sağ ve sol lob)</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: : Cerrahi sınıra dayanmış (1. ve 3. tümör), 0,3 cm uzaklıkta (2. tümör)</i> İmmunHistokimyasal İncelemeler <i>Cyclin D1: 1. tümörde %95</i> <i>Galektin 3: pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: pozitif</i> <i>PAX-8: pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: pozitif</i> <i>BRAF-V600E: 1. tümörde pozitif</i>
Genetik	<i>BRAF: c.1799T>A (p.Val600Glu) (%33)</i>

Önemi belirsiz atipi saptanan İİAB materyali çalışmaya dahil edildi. 3.36 ng DNA elde edildi. Çalışma istenilen kaliteye ulaşıldı. Filtre-1 ile yapılan analizde 0.333 allelik oranda ve 837 okuma derinliğine sahip *BRAF: c.1799T>A (p.Val600Glu)* varyantı saptandı. Filtre-2 de ek anlamlı varyant gözlenmedi.

HASTA 20: Multinodüler guatr ile takip edilen 56 yaş kadın hastanın, boyun USG’de sol lob üst 1/3’te tanımlanan hipoekoik, düzensiz sınır ve şekilli solid yapı saptanmış ve yüksek malignite kuşkusu uyandırdığı için ileri tetkiki önerilmiş. İİAB ile önemi belirsiz atipi saptanan hastaya yaklaşık 6 ay aralıklı olarak 2 kez daha İİAB gerçekleştirilmiş (sırasıyla benign ve kuşkulu sitoloji). Total tiroidektomi uygulanan hastanın patolojisinde sol lobda tiroidin

papiller mikrokarsinomu, klasik tip ve sağda folliküler nodüler hastalık saptanmış (Tablo 45). Hastanın çalışmamıza katılan İİAB, sağ taraftan alınan ve cerrahi sonrası benign olduğu bildirilen bir nodüle ait olduğu için, olgunun cerrahi sonucu benign olarak tartışılacaktır.

Tablo 45: Hasta 20'ye ait veriler

İİAB öncesi USG	Sağ lob ortasında 5x3 mm (küçük kistik odakları olan hafif hipoekoik solid), alt yarıda topluca 27x14 mm boyutlu bir küme oluşturan, birbirlerine bitişik, kranyalden kaudale, büyüklüğü 10x7, 10x4 12x8 mm boyutlu olan (içlerinde nadir küçük kistik odakları da olan) izoekoik solid nodüller
İİAB Alınan Nodül	Sağ lob 27x14 mm boyutlu bir küme oluşturan nodüller (EU-TIRADS3)
İİAB Sitopatoloji	Önemi belirsiz atipi (Bethesda III)
Cerrahi Eksizyon Patolojisi	Sol tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip <i>Mikroskopi:</i> <i>Tümör 1: 0,6 cm, sol lob, tiroidin papiller karsinomu, klasik tip</i> <i>Lenfovasküler İnvazyon: Var</i> <i>Tümörde Kapsül Varlığı: Yok</i> <i>Tümör sınırları: İnfiltratif</i> <i>Tiroid dışı yayılım: Yok</i> <i>Nekroz: Yok</i> <i>Multisentrisite: Yok</i> <i>Tiroid İçi Yayılım: Yok</i> <i>Tümör Dışı Tiroid Dokusu: Foliküler nodüler hastalık</i> <i>Cerrahi Sınırlar: 0,1 cm uzaklıkta</i> İmmunhistokimyasal İncelemeler <i>Cyclin D1: fokal %70</i> <i>Galektin 3: pozitif</i> <i>Sitokeratin 19: pozitif</i> <i>Mezotelyal Hücre: pozitif</i> <i>PAX-8: pozitif</i>

Genetik	<i>PIK3CA</i> (NM_006218.4):c.1634A>C (p.Glu545Ala) (%3)
----------------	--

Önemi belirsiz atipi saptanan İİAB materyali çalışmaya dahil edildi ve 4 ng DNA izole edildi. İyi kalitede olan çalışma Filtre-1 ve 2 kullanılarak analiz edildi. *PIK3CA*(NM_006218.4):c.1634A>C (p.Glu545Ala) varyantı 0.0314 allelik orana sahip olarak saptandı. Okuma derinliği 191'di.

4.3. Bulguların İstatistiksel Karşılaştırılması

Bethesda gruplarına göre varyant varlığı dağılımı değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,121$).

Tablo 46: Genetik analiz verilerinin Bethesda gruplarına göre saptanma yüzdesi

	Varyant var	Varyant yok	Toplam	Test istatistiği; p değeri
	n (%)	n (%)	n (%)	
Bethesda III	6 (40,0)	9 (60,0)	15 (100)	$X^2=2,40$ $p=0,121$
Bethesda IV	4 (80,0)	1 (20,0)	5 (100)	
Toplam	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (100)	

X^2 : Ki kare test statistiği; $p<0,05$ Anlamlılık düzeyi

Testin malign ve benign nodüllerde varyant saptama dağılımı istatistiksel olarak benzer saptanmıştır ($p=0,121$).

Tablo 47: Genetik analiz verilerinin patoloji sonuçları ile karşılaştırılması

	Varyant var	Varyant yok	Toplam	Uyum1	Uyum
	n (%)	n (%)	n (%)	(%)	(%)
Bethesda III-Benign	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (100)	75,0	80,0
Bethesda IV-Benign	-	1 (100)	1 (100)	100	
Bethesda III-Malign	5 (45,5)	6 (54,5)	11(100)	45,5	60,0
Bethesda IV-Malign	4 (100)	-	4 (100)	100	
Toplam	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (100)		

Uyum 1: Bethesda grubuna göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir

Uyum 2: Bethesda grubundan bağımsız tüm benign ve malign nodüller değerlendirilmiştir

Tablo 48: Testin malign ve benign nodüllerde varyant saptama dağılımı

	Anlamlı Varyant Var n (%)	Anlamlı Varyant Yok n (%)	Toplam n (%)	Test istatistiği; p değeri
Malign Nodül	9 (60,0)	6 (40,0)	15 (100)	$X^2=2,40$ $p=0,121$
Benign Nodül	1 (20,0)	4 (80,0)	5 (100)	
Toplam	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (100)	

X^2 : Ki kare test istatistiği; $p<0,05$ Anlamlılık düzeyi

Tablo 49: Testlerin sensitivite, spesivite, PPV ve NPV oranlarının karşılaştırılması

Platform	Afirma GSC	ThyroSeq v3	ThyGenXT/ ThyraMIR	Archer VariantPlex Solid Tümör
NPV	%96	%97	%95	%40
PPV	%47	%66	%74	%90
Sensitivite	%91	%94	%93	%60
Spesifite	%68	%82	%90	%80

5.TARTIŞMA

Tiroit bezine ait neoplazmlar, endokrin sisteme ait malignitelerin içerisindeki en büyük gruptur [48]. Benzer şekilde tiroit bezinin nodülleri, endokrinoloji poliklinik başvurularının önemli bir sebebidir. Tiroit bezi nodüllerinin yönetimi, nodülün malignite riskine göre yapılmaktadır [3]. Bu nedenle nodülün karakterinin tüm ayrıntılarıyla belirlenmesi çok önemlidir. Son zamanlarda tiroit nodüllerinin moleküler profillemesi popüler bir konu haline gelmiştir. Birleşik Devletlerde moleküler testler pratik uygulamaya entegre edilmiş olsa da pek çok ülkede bu testler yaygın şekilde uygulanamamaktadır [65]. Ülkemizde de ilk kez bu çalışmada belirsiz sitolojiye sahip tiroit nodüllerinin moleküler genetik analizi bir NGS paneli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda sitopatoloji sonucu belirsiz olan 20 adet tiroit İİAB örneği çalışılmıştır. Bu 20 hastadan 10 tanesinde Tier 1/2 varyant saptanmıştır. Çalışmamızda 10 örnekte saptanan somatik varyantlar; *NRAS-Q61R* (2), *BRAF-V600E* (2), *BRAF-K601E* (1), *PIK3CA* (2), *TP53* (1), *TERT* (1), *PTEN* (1) şeklindedir.

Sitolojisi belirsiz olan Bethesda Grup III ve IV nodüllerinin malignite riskleri 2015 yılında yayınlanan ATA kılavuzuna göre sırasıyla %5-15 (medyan %14) ve % 15-30 (medyan %25) olarak verilmiştir [2]. Ancak bu grupların risk verileri yayınlar arasında farklılıklar gösterir. Örneğin Çin’de yapılan bir çalışmada belirsiz sitolojiye sahip nodüllerin malignite oranı %71 olup, Birleşik Devletlerdeki %10-40 olan orandan oldukça yüksektir [65]. Özellikle üçüncü basamak sağlık hizmeti sunan merkezlerde bu grup nodüllerdeki malignite oranları %52’ye ulaşmaktadır [66]. Çalışmamızda 20 örneğin; 5 tanesinin cerrahi patoloji sonucu benign (% 25), 15 tanesinin ise malign (%75). Bizim çalışmamızda, nodüllerdeki malign yüzdenin fazla olmasının birkaç sebebi vardır. Bunlardan biri; cerrahi kararda Bethesda sınıflamasının yanında USG ve hasta özelliklerinin de baz alınmasıdır. Bu anlamda ameliyat kararı alınan nodüllerin çoğunluğunu klinisyen tarafından yüksek malignite şüphesi uyandıran grup oluşturmaktadır. Bir diğer önemli neden ise, bu dönemin pandemiye denk gelmesi ve ameliyat sayılarının azaltılmasıdır. Yüksek risk barındırmayan hastalar, ameliyat için beklemeyi tercih etmiş olabilir.

Son yayınlanan kılavuzlara göre belirsiz sitolojiye sahip nodüller yönetiminde İİAB tekrarı veya moleküler test ile yeniden risk araştırması iki ayrı seçenek olarak aynı basamakta önerilmiştir [2]. Tekrar İİAB yapılan bu grup nodüllerde, %10-30 arasında sitolojik sonuç tekrar AUS/FLUS gelmektedir [67]. Hasta isteği, maliyet etkinliği ve ulaşılabilirlik göz önüne alınarak

tercih yapılması, ayrıca hasta yönetimini değiştirmeyecek bir uygulamadan uzak durulması önerilmektedir [3]. Çalışmamızda, 20 örnekten 10 tanesinde kriterlere uyan bir somatik varyant saptanmıştır. Eğer bu analiz sitopatolojik incelemeden sonra rutin pratikte yapılsaydı, 10 örnekten 9 tanesi tek bir İİAB sonucunda cerrahiye doğru bir seçim olarak yönlendirilmiş olacaktı. Cerrahi patolojisi malign olmayan 1 örnekte ise, *PIK3CA-E545A* varyantı daha önce pek çok farklı kanserde iyi tanımlanmış bir onkogenik değişiklik olduğu için %5 allelik oranının altında kalmasına karşın değerlendirmeye alınmıştır. Bu varyant oldukça küçük bir klonu temsil ediyor olabilir. *PIK3CA-E545A* mutasyonu ilk kez Kribriiform-morular varyant PTC'de bildirilmiş olup, tiroit karsinomunda çok sık bildirilen bir değişiklik değildir [68]. TCGA tarafından yapılan çalışmada papiller tiroit karsinomlarının %97'sinde bir moleküler alterasyon saptanmıştır ve bunların %90'ını iyi bilinen nokta mutasyonlar veya gen füzyonları oluşturmaktadır [1]. Bizim çalışmamızda 6 malign örnekte kriterlere uygun bir varyant saptanamamıştır (Tablo 47). Bunun en önemli sebeplerinden biri; panelin gen füzyonlarını ve diğer gen yeniden düzenlenmelerini saptayamamasıdır. Çalışma dizaynının sadece DNA temelli yapılmasının nedenlerinden biri, maliyetin azaltılmasının yanında, arşiv materyallerinin kullanılması ve taze örnek elde edilme şansının olmamasıdır. Uygun koşullarda saklanmamış dokulardan RNA eldesi, DNA'ya göre çok daha zordur ve nükleik asit degradasyonu önemli bir sorunu oluşturur [69]. Çalışmamızın verileri, ek bir girişim gerekmeksizin elde edilen materyalden sağlanmıştır.

Sitopatolojik değerlendirmeden arta kalan aspirat spesmenleri, moleküler analiz için potansiyel bir nükleik asit kaynağıdır, ancak elde edilen nükleik asitin kalitesi ve miktarı nedeniyle bir takım zorluklara sahiptir [69]. Tiroit İİAB örneklerini kullanan daha önceki bir çalışmada ortalama olarak 1.08 µg/ml DNA elde edilmiştir ve elde edilen DNA miktarları Bethesda grupları arasında anlamlı farklılık göstermemiştir [70]. Başka bir çalışmada ise, İİAB örneklerinden 0.17 ile 4,4 µg/ml arasında değişen oranlarda DNA elde edilmiştir [71]. Bizim çalışmamızda ortalama 9,13 ng/µL (min.3.36 ng/µl- max.25 ng/µl) DNA elde edilmiştir ve örneklerin tamamı çalışmayı başarılı şekilde tamamlamıştır.

Tiroit kanserinin tanı yaşı ortalaması 50'dir [35]. Tiroit neoplazmlarındaki genetik sürücü mutasyonlar yaşa bağlı olarak gruplaşmalar göstermektedir [72]. Tirozin kinaz reseptörlerini içeren translokasyonlar pediatrik yaş grubunda genetik etiyolojinin başını çeker, *BRAF* ve *RAS*'ın nokta mutasyonları yetişkin gruptaki etiyolojide ilk sırada yer alır [73]. Pediatrik grupta en sık saptanan moleküler değişiklik *RET/PTC* translokasyonu iken, yetişkinlerde *BRAF-V600E* mutasyonudur

[74]. Çalışmamızda varyant saptanan hastaların yaş ortalaması 56, varyant saptanmayan hastalarinki 46 idi. Bu ortalama farklılıkları birkaç nedenden kaynaklanabilir. Bunlardan ilki, genç popülasyondaki genetik etiyoloji ile yaşlı popülasyondaki genetik etiyolojinin farklı olmasıdır. Özellikle genç popülasyonda genomik yeniden düzenlenmelerin daha sık olması, bunları saptama kapasitesine sahip olmayan, çalışmamızda kullanılan panel tarafından kaçırılmış olabilir. İkincisi, genç popülasyonda malignitenin daha az olması ve bu nedenle driver mutasyon eşlik etmesinin beklenmemesidir. Ancak ikincisi daha az olasıdır, çünkü bizim örneklemimizde genç olan hastalar malign patolojiye sahiptir ve bunlarda Archer VariantPlex Solid Tümör Paneli ile anlamlı bir genetik değişiklik saptanmamıştır. Daha ayrıntılı bakılacak olursa, örneklem içerisinde 45 yaş altında 6 hasta vardır ve yaşları 18, 21, 37, 41, 42 ve 45'dir. Bu 6 hastadan 5 tanesinin genetik sonucu patoloji sonucu hakkında bilgi vermemektedir (uyumsuz). 1 hasta ise (41 yaş), %4'lük *PIK3CA* inversiyonuna sahiptir ve uyuma sahip tüm varyantların içerisinde Tier 2 olan tek varyant olup; allelik oranı en düşük olanıdır. Tüm bu verilere bakıldığında, çalışmada verilerin uyumsuz olduğu 7 hastanın 5 tanesi 45 yaş altındadır. Geriye kalan uyumsuz iki hastanın biri 62 ve diğeri 59 yaşındadır. Ellidokuz yaşındaki hastada, uyumsuzluk %3'lük allelik fraksiyona sahip *PIK3CA* varyantının saptanmış olması nedeniyledir. Varyant Tier 2 bir varyanttır, klinik önemi kesin değildir. Allelik oranın düşük olması nedeniyle çok küçük bir klona ait onkogenik değişiklik olabileceği gibi, kanserleşmeye sebep olmamış da olabilir. AF'si %5'in altında kalan *PIK3CA* varyantları çalışmamızda raporlanmamış olsaydı, uyumsuz olan 7 hastanın 6 tanesi 45 yaş altı olacaktı. Bu da genç yaş grubunda çalışılan testin gücünün düşük olduğunu ortaya koymaktadır.

Tüm dünyada tiroit nodüllerini değerlendirmek için öne çıkan birkaç platform mevcuttur. Bunların içerisinde çalışmaların fazla olması nedeniyle bir adım öne çıkan Afirma (en üst versiyonu GSC) ve Thyroseq (en üst versiyonu v3) örnek olarak verilebilir [75]. ATA kılavuzu önerilerine göre, nodülün moleküler analizinin yapılacağı test yüksek PPV ve spesiviteye sahip (rule-in test, dahil etme testi) ya da yüksek NPV ve sensitivite sahip (rule-out test, dışlama testi) olmasının gerekliliği bildirilmiştir [2]. Kılavuzlarda mevcut olan hiçbir moleküler test altın standart olarak işaret edilmemiştir [65]. Bir metaanalizde Afirma GSC'nin 472 nodüldeki sensitivitesi %96.6 (%95 CI = %89.7–98.9), spesivitesi %52.9 (CI = 23.4–80.5), PPV'si %63 ve NPV'si %96 olarak; Thyroseq v3'ün 550 nodül üzerindeki sensitivitesi % 95.1 (%91.1–97.4), spesivitesi % 49.6 (%29.3–70.1), PPV'si %70 ve NPV'si %92 olarak hesaplanmıştır [75]. Aynı çalışmada her iki test arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır [75]. Bir çalışma; Çin'de Afirma ya da

Thyroseq'in uygulanamaması nedeniyle, kendi tasarladıkları RNA ve RNA/DNA temelli testlerin sonuçlarını paylaşmıştır. RNA ve RNA/DNA temelli bu testlerde sırasıyla PPV %81.6 ve %84.4; NPV %66.7 ve %61.5 olarak bulunmuştur [65]. Bizim çalışmamızda ise NPV %40, PPV %90, sensitivite %60, spesivite %80 olarak bulunmuştur. NPV ve sensitivite oranlarının diğer testlere göre düşük olması, kullanılan panelin dışlama testinden (rule-out) ziyade, yüksek PPV ve spesivite oranları baz alınarak bir rule-in test gibi değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Tiroit kanserinde saptanan moleküler temeller, daha önce, büyük çapta dokunun mimarisine bağlı olarak yapılmış olan sınıflandırmayı da etkilemiştir. DSÖ, tiroit kanserlerinin sınıflamasını 2022 yılında güncelleyerek, sınıflamanın 5. versiyonunda moleküler karakterlerden özellikle yararlanmış, hatta bazı grupları moleküler kökenleri nedeniyle tamamen ayırmıştır [48]. Örneğin foliküler varyant PTC (FVPTC), son güncelleme ile ayrı gruplara bölünmüştür [48]. Enkapsüle olan FVPTC'lerin RAS-like moleküler karakter sergilemesi ve foliküler karsinomlardan sadece nükleer özelliklere göre ayrılıyor olması, malign kategorisinde başka bir tip ana başlık (invaziv enkapsüle foliküler varyant papiller karsinom, IEFVTP) olarak yer bulmasını sağlamıştır. Ayrıca NIFTP, malign gruptaki foliküler neoplazmlardan ayrılarak düşük riskli neoplazm alt başlığına dâhil edilmiştir [48]. Bizim çalışmamızdaki *NRAS-Q61R* pozitif, eski sınıflamaya göre foliküler varyant PTC patolojisine sahip iki hastaya ait tümörde de kapsül vardı. Birinde kapsül invazyonu yokken, diğer tümörde kapsül invazeydi. Bu olgular 2022 sınıflamasına göre IEFVTP ve NIFTP olarak isimlendirilmektedir. Bu tümörlerin artık PTC'den ziyade FTC'ye yakın olduğu kabul edilmektedir.

NRAS-Q61R, foliküler paterndeki tiroit tümörlerinde gözlenen önemli bir sürücü mutasyondur [76]. En sık gözlenen *NRAS* mutasyonları 61. kodonu etkileyen mutasyonlardır [58]. Hem foliküler adenomlarda hem de foliküler karsinomlarda gözlenmiş olmaları, malignite ayırımını kesin olarak sağlamasa da bize çok önemli ipuçları verir. Klonal oluşumu gösterdiği için, poliklonal oldukları kabul edilen hiperplastik nodüllerden ayırımı sağlar. Daha önceki çalışmalarda, *NRAS* pozitif foliküler lezyonların, *NRAS* negatiflere göre daha fazla karsinom geliştirdiği saptanmıştır [76] [77]. Özellikle *NRAS*'ın 61. kodon mutasyonlarının uzak metastaz riski ile ilişkili olduğu da önceki çalışmalarda gösterilmiştir [77]. *RAS* mutasyonları içerisinde; *NRAS* ve *HRAS* mutasyon pozitifliği saptanan nodüller yüksek malignensi riskli kabul edilmekteyken, *KRAS* mutasyon pozitifliği daha düşük malignensi riski ile ilişkilendirilmiştir [78]. ATA 2015 Kılavuzuna göre, nodülde *NRAS* pozitifliği onu malignite kuşkusu (Bethesda V) kategorisine taşımaktadır [2]. Bu

nedenle *NRAS-Q61R* pozitifliği saptanan 2 olguda belirsiz sitoloji yerini kuşku sitolojiye bırakmıştır. Bu iki hasta, eğer ilk İİAB örneklerinden moleküler test yaptırmış olsalardı, İİAB tekrarı gerekmezdi cerrahi kararı alınabilirdi.

NRAS-Q61R pozitifliği saptanan iki olguda da PTC, onkositik varyant tespit edilmiş olması dikkat çekicidir. Bizim 20 vakamız içerisinde PTC, onkositik varyant tanısı olan 3 örnek mevcuttur ve 2 tanesinde *NRAS-Q61R* pozitifliği saptanmıştır (%66). Literatürde onkositik varyanta sahip FTC ve PTC’de *RAS* mutasyonları bildirilse de, PTC klasik ve solid olan onkositik alt tiplerinin daha çok *BRAF-V600E* –benzeri grupta yer aldığı bilinmektedir [79]. Bizim hastalarımızın patolojik alt tipi 2022 DSÖ sınıflamasına göre PTC’den ayrılmaktadır. Bu nedenle *BRAF-V600E*-benzeri grup içerisinde olması beklenmez. Ancak bir çalışmada onkositik varyant FTC/FTA’larda da *NRAS-Q61R* veya herhangi bir *RAS* pozitifliği saptamadıkları bildirilmiştir [80]. Bu anlamda bizim verilerimiz literatürden bir miktar ayrılmaktadır. Ancak 2019 yılında NIFTP grubundaki onkositik varyantlara özel yapılan bir çalışmada %33’lük bir *RAS* (*N/H/KRAS*) onkogenik sürücü mutasyonu saptanmıştır ve bunların %13’lük kısmını *NRAS-Q61R* ve *Q61K* oluşturmaktadır [81]. Bu anlamda farklılığın NIFTP ya da EFVPTC’nin *RAS* benzeri bir genetik profil sergilemesi olduğu söylenebilir. Literatürde benzer bir olgu olarak; *TERT* ile *NRAS-Q61R* mutasyon birlikteliği olan FTC, onkositik varyant mevcuttur [82]. Bu olgu *TERT* eşlik etmesinin de etkisi ile kapsül ve vasküler invazyon göstermiş ve ilerleyen dönemlerde de yaygın metastazlar ortaya çıkarmıştır.

BRAF-V600E ile *NRAS-Q61R* değişikliklerinin birlikte aynı hücrede bulunamayacağı kabul edilmektedir [83]. Yapılan çalışmalarda bu iki driver mutasyonun bir arada olmasının, hücrenin hayatta kalma avantajını yok ettiği ve tümörögenizde hücrenin elenmesine sebep olduğunu göstermiştir [83]. Aslında sadece *NRAS-Q61R* değil, *RAS*’a driver özelliği kazandıran diğer mutasyonlarla da *BRAF-V600E*’nin birlikte bulunmadığı kabul edilmektedir. Bu nedenle *BRAF-V600E*-like ve *RAS*-like olmak üzere iki ayrı tümör karakteri olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir. Gerçektende yapılan in-vitro çalışmalarda bu iki mutasyon tipini taşıyan hücrelerin birbirinden ayrı karakteristik büyüme paterni gösterdiği ortaya konmuştur [83]. *BRAF-V600E*, hücrenin normal şekilde apoptozunu tamamlamasını engellemektedir [84]. *BRAF-V600E*, saptanması halinde nodülün mevcut Bethesda grubuna bakılmaksızın, malign kategoride (Bethesda VI) kabul edilmesi gerektiği bildirilmiştir [78], [2]. Çalışmamızda 2 hastada *BRAF-V600E* pozitifliği saptanmıştır. Cerrahi patolojileri birinde tiroidin klasik tip papiller mikrokarsinomu

diğerinde tall cell varyant PTC olarak sonuçlanmıştı. İkisi de *BRAF-V600E*-benzeri tiroid tümörü patolojisine sahiptir. Bu iki hasta için de, cerrahi karar ilk İİAB sonrası verilmesi mümkün olabilirdi.

BRAF-K601E, *BRAF-V600E*’den sonraki ikinci en sık görülen *BRAF* mutasyonu olsa da, onun aksine daha çok foliküler patern tiroit kanserleri ile özellikle de enkapsüle FVPTC ile ilişkilendirilmiştir [85]. Foliküler varyant PTC, yeni DSÖ sınıflamasında moleküler temellerine göre ayrılmıştır. İnfiltratif (kapsülsüz) FVPTC, papiller tiroit karsinomun bir alt tipi olarak kalmış; invaziv enkapsüle FVPTC ise FTC’ye daha yakın moleküler temeli olması nedeniyle PTC’den ayrılmıştır. İnfiltratif (kapsülsüz) FVPTC, *BRAF-V600E*-benzeri gruba dâhildir ancak *BRAF-K601E* pozitifliği de beklenir. İnvaziv enkapsüle FVPTC *RAS*-benzeri gruba dâhildir ve *BRAF-K601E* pozitifliği %10 kadarında saptanabilir [48]. *BRAF-K601E*, daha az agresiflikle ilişkilendirilmiştir [85]. Çalışmamızda 1 hastada *BRAF-K601E* pozitifliği saptanmıştır. Hastanın patoloji sonucu tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant şeklindeydi. Tümörün mikroskopik özelliklerine göre yeniden değerlendirildiğinde DSÖ 2022 sınıflamasına göre invaziv enkapsüle FVPTC içerisinde yer almaktadır. Hastanın özellikleri ve moleküler profillemesi literatür ile uyumludur. Bu hastaya da, ilk İİAB sırasında moleküler profillemeye yapılmış olsaydı İİAB tekrarına gerek kalmadan cerrahi önermek mümkün olabilirdi.

PTEN, PI3K/AKT yolağının inhibitörü olan önemli bir tümör süpresördür. Germline mutasyonlarının herediter tiroid kanseri yatkınlığı yaptığı bilinmektedir. *PTEN* kaybının foliküler varyant PTC ile ilişkili olduğu, 2015’de Beg ve ark. tarafından yapılan geniş çaplı bir çalışma ile araştırılmış ve ortaya konulmuştur [86]. *PTEN* promoter bölge metilasyonuna, foliküler tümör formasyonunda sıkça karşılaşılır [87]. *PTEN* her ne kadar tiroit kanserinin merkezindeki mekanizmaların düzenleyicisi de olsa, intergenik mutasyonları nadir olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda bir olguda *PTEN N48K* mutasyonu saptanmıştır. *PTEN N48K* daha önce başka kanserlerde patojenik olarak tanımlanmış ve onkojenik olduğu bilinen bir mutasyondur. Bildiğimiz kadarıyla *PTEN N48K* daha önce tiroit kanserinde bildirilmemiştir. *PTEN N48K* mutasyonu olan hastanın cerrahi patolojisiinde; tiroidin papiller mikrokarsinomu (folliküler varyant) saptanmıştır.

TERT (NM_198253.3):c.-124C>T; iyi bilinen ve tamamen malign tiroid nodüllerinde bulunan bir mutasyondur [88]. Kötü prognoz ve agresif seyif ile ilişkisi bilinmektedir. Az diferansiye/ anaplastik tiroit karsinomu grubunda yüksek oranda saptanırken, iyi diferansiye tiroit karsinomunda daha az görülür [88]. *BRAFV600E* veya *TP53* mutasyonları eşlik edebilir.

Çalışmamızda 1 hastada *TERT* promoter bölge mutasyonu saptandı. Bu mutasyon kodlayıcı bölgeye ait olmadığı için Filtre-1 ile yapılan ilk analizden kaçmıştır. Filtre-2'nin kodlamayan bölgeleri de analize çağırması ile saptanmıştır. Cerrahi patolojisi, sağ ve sol tiroidin papiller mikrokarsinomu, folliküler varyant olarak sonuçlanmıştır. Bu hastanın cerrahi patolojisi *TERT*'in eşlik ettiği agresif davranış paternine uymasa da, hastanın 1 ay sonraki kontrol USG'sinde iyi kanlanan rezidü tiroit dokusu ve sol supraklavikular bölgede şüpheli lenf nodu tespit edilmiştir. Supraklavikular lenf noduyla ilişkili ek bilgilere ne yazık ki ulaşamamıştır.

TP53, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gendir ve tiroit kanserlerinde kötü prognoz ve kötü diferansiasyonla ilişkilendirilmiştir [13]. Çalışmamızda 1 hastada *TP53* mutasyonu saptandı. Bu hastanın cerrahi patoloji sonucunda sağda; tiroidin papiller karsinomu, folliküler varyant, solda; tiroidin papiller mikrokarsinomu, klasik tip saptanmıştır. Bu hasta izlemlerinde herhangi bir problem yaşamamıştır. Yinede, hasta mikroskobisinde kapsül invazyonu olması ve multisentrisite gibi nispeten invaziv karakterlerin olduğu söylenebilir. Ayrıca hastada *TP53* mutasyonunun %5 gibi rölatif olarak düşük bir allelik oranda bulunması da prognozun seyrine etki etmiş olabilir.

PIK3CA, iyi diferansiye tiroit kanserlerinden çok anaplastik tiroit karsinomunda karşılaşılan bir değişikliktir (%0.5 vs %18) [89]. Genellikle kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve *BRAF-V600E*'ye eşlik edebilir. *PIK3CA-E545K*, özellikle anaplastik tiroit karsinomunda en sık karşılaşılan *PIK3CA* mutasyonudur [89]. Daha önceki bir çalışmada yetişkin grupta, *PIK3CA* mutasyonunu; iyi diferansiye tiroit kanserlerinde en çok foliküler varyant papiller tiroit karsinomu ile ilişkilendirmiştir [90]. Daha önce, bazı *PIK3CA*'ya ait SNP'lerin *PIK3CA*'da amplifikasyon oluşmasını zorlaştırdığı ve bu nedenle FTC oluşumunu önleyebileceği fikri ortaya atılmış; *PIK3CA* ve FTC ilişkisi tartışılmıştır [91]. PTC'de *PIK3CA* mutasyonları sık beklenen değişiklikler değildir, genellikle eşlik eden değişiklikler olarak bulunurlar. Çalışmamızda 2 hastada ise *PIK3CA* mutasyonu saptandı. Olgulardan biri malign karakter taşırken, diğeri benigndi. Bizim olgularımızda saptanan *PIK3CA* varyantları %5'in altında allelik oranda saptanmışlardı. *PIK3CA*'daki varyantlar; onkogenik mutasyonların sık görüldüğü ekzon 2'de konumlanması ve Tier 2 olarak sınıflandırılması nedeniyle değerlendirilmeye alınmıştır. *PIK3CA*'daki varyantlar yukarıdaki tüm varyantlar içerisinde çalışmamızdaki klinik anlamı en belirsiz olan gruptur.

İki örnekte germline olduğu düşünülen ve ACMG kriterlerine göre VUS olan varyant saptanmıştır (*ATM* ve *MET*). *MET* (NM_001127500.3):c.341A>T (p.Asp114Val) varyantı,

rs773659883 numarası ile kayıtlı, daha önce CLINVAR veritabanında 2 kez VUS olarak bildirilmiş bir varyanttır. Papiler renal karsinoma yatkınlık yapan genin non-medüller tiroit kanserine yatkınlık yaptığına dair literatürde önemli bir kanıt yoktur. Bu anlamda insidental bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. ATM:c.5882A>G (p.Tyr1961Cys) varyantı, rs56399311numarası ile kayıtlıdır. Daha önce CLINVAR veritabanında pek çok kez VUS olarak bildirilmiştir. Birçok kanser olgusunda bildirilen varyant, tiroid kanserine de yatkınlık yapabilecek etiyolojiye sahip olsa da, tiroit kanseri ile birlikteliği literatürde yoktur. Varyantla ilgili fonksiyonel çalışma ve segregasyon analizi yapılması yorumun daha doğru yapılabilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmadaki en önemli kısıtlılık örneklem sayısının küçük olmasıdır. Ayrıca, benign örnek grubu oran olarak azdır. Bunlar çalışmanın PPV, NPV, spesivite, sensitivite sonuçlarını etkilemiştir. Burada maliyet etkinliği adına, non-spesifik ve DNA bazlı yeni nesil dizileme tekniği kullanan bir panel kullanılmıştır. Özellikle genç hasta popülasyonunda genomdaki yeniden düzenlenmelerin ve ekspresyon profillemesinin de kapsanması, testin gücünü artıracaktır. Sadece RNA temelli çalışılan testler ise, *TERT* geninin promoter bölgesi gibi, kodlamayan kısımlardaki değişiklikleri kapsamazlar. Çalışmamızda 67 gen hedeflenmiştir ancak 6 farklı gene ait değişiklik saptanmıştır. Tiroit için daha spesifik genlerin yer aldığı bir panel oluşturulması maliyet etkinliğini artırabilir ve analizi kolaylaştırabilir. Yine de, çalışmada kullanılan panelin özellikle 45 yaş üzeri grupta çok daha verimli olacağı söylenebilir.

Moleküler testler, tüm dünyada hastaların takip ve tedavisinde gittikçe önem kazanmaktadır. Tiroit nodül yönetimi için de umut vadeci bir seçenektir. Genetik alanındaki gelişmelerin artması ile moleküler analizlerle gelecek pratikte daha sık karşılaşılabilecektir. Çalışmamız, ülkemizdeki ilk tiroit nodül arşiv materyal moleküler analizini gerçekleştirerek bu alanın önemi öne çıkarmayı amaçlamıştır. Bu alanda daha fazla ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 2018-2019 yılları arasında sitoloji sonucu belirsiz (Bethesda III veya IV) olan 20 İİAB yayma örneği; DNA temelli, 67 geni içeren bir hedefe yönelik NGS paneli ile analiz edilmiştir. Örneklerin tamamının cerrahi patoloji sonuçları mevcut olup, altın standart kabul edilen bu sonuçlar analiz verileri ile kıyaslanmıştır. Çalışmamız ülkemizde ilk kez tiroit nodüllerindeki genetik değişiklikleri bir NGS paneli ile araştırmış ve malignite ayırım gücünü hesaplamıştır. Ayrıca İİAB arşiv materyallerinin DNA temelli genetik analizler için uygun olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda 10 örnekte varyant (*NRAS-Q61R* (2), *BRAF-V600E* (2), *BRAF-K601E* (1), *PIK3CA* (2), *TP53* (1), *TERT* (1), *PTEN* (1))saptanmıştır. Testin malign ve benign nodüllerde varyant saptama dağılımı istatistiksel olarak benzer saptanmıştır ($p=0,121$). Testin NPV'si %40, PPV'si %90, sensitivitesi %60 ve spesivitesi %80 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre test; bir dahil etme testi (rule-in test) olarak hizmet görebilir. Ancak dışlama testi (rule-out test) için düşük NPV ve sensitivite oranına sahiptir. RNA temelli bazı parametrelerin eklenmesi ile testin sensitivite ve NPV değerlerinin artırılabilceği düşünülmektedir.

Bu çalışma ülkemizde ilk kez belirsiz sitolojiye sahip tiroit nodüllerinin kapsamlı bir moleküler profillemesini gerçekleştirmiştir. Testin genomik yeniden düzenlemeleri saptayamaması en büyük dezavantajı olarak görünmektedir. Arşiv materyalinden çalışılabilmenin mümkün olması ve nispeten diğer testlere göre maliyet etkin olması avantajlarındandır. Genetik etiyolojinin yaştan etkilenmesi nedeniyle 45 yaş üstü popülasyona daha uygun bir test olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmadaki en önemli kısıtlılıklar; küçük bir örneklem grubu ile çalışılması ve genomik yeniden düzenlenmelerin araştırılamamış olmasıdır. Daha büyük örneklem ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, tiroit spesifik bir panelin oluşturulması testin gücünü artıracak ve hasta yönetimine daha fazla katkı sağlayacaktır.

Moleküler profillemeye, tiroit nodülleri hakkında değerli bilgiler elde edilmesini sağlar. Gelecek pratikte, tiroit neoplazmları için daha fazla yer edineceğini düşündüğümüz bu uygulamaların ülkemizde de yaygınlaşması, hasta yönetimine pek çok fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bu alanda maliyet etkin bir testin oluşturulabilmesi için çalışmamız öncü bir çalışma olmuştur.

7. KAYNAKÇA

- [1] Nikiforov YE. ROLE OF MOLECULAR MARKERS IN THYROID NODULE MANAGEMENT: THEN AND NOW. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* 2017;23:979–88. <https://doi.org/10.4158/EP171805.RA>.
- [2] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26:1–133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.
- [3] Khan TM, Zeiger MA. Thyroid Nodule Molecular Testing: Is It Ready for Prime Time? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.590128>.
- [4] Kumar N, Gupta R, Gupta S. Molecular testing in diagnosis of indeterminate thyroid cytology: Trends and drivers. *Diagn Cytopathol* 2020;48:1144–51. <https://doi.org/10.1002/dc.24522>.
- [5] Romei C, Elisei R. A Narrative Review of Genetic Alterations in Primary Thyroid Epithelial Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22041726>.
- [6] Rivas AM, Nassar A, Zhang J, Casler JD, Chindris AM, Smallridge R, et al. ThyroSeq(®)V2.0 Molecular Testing: A Cost-Effective Approach for the Evaluation of Indeterminate Thyroid Nodules. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* 2018;24:780–8. <https://doi.org/10.4158/EP-2018-0212>.
- [7] Nikiforova MN, Mercurio S, Wald AI, Barbi de Moura M, Callenberg K, Santana-Santos L, et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer* 2018;124:1682–90. <https://doi.org/10.1002/cncr.31245>.
- [8] Le Mercier M, D’Haene N, De Nève N, Blanchard O, Degand C, Rorive S, et al. Next-generation sequencing improves the diagnosis of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology. *Histopathology* 2015;66:215–24. <https://doi.org/10.1111/his.12461>.

- [9] Bellevicine C, Sgariglia R, Malapelle U, Vigliar E, Nacchio M, Ciancia G, et al. Young investigator challenge: Can the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 be used for next-generation sequencing of thyroid FNA samples? *Cancer Cytopathol* 2016;124:776–84. <https://doi.org/10.1002/cncy.21780>.
- [10] Song Y, Xu G, Ma T, Zhu Y, Yu H, Yu W, et al. Utility of a multigene testing for preoperative evaluation of indeterminate thyroid nodules: A prospective blinded single center study in China. *Cancer Med* 2020;9:8397–405. <https://doi.org/10.1002/cam4.3450>.
- [11] Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* 2019;9:217–22. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>.
- [12] De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004;19:169–85. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh025>.
- [13] Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. W.W. Norton; 2013.
- [14] Nilsson M, Fagman H. Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy. *Curr Top Dev Biol* 2013;106:123–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416021-7.00004-3>.
- [15] Alexander LF, Patel NJ, Caserta MP, Robbin ML. Thyroid Ultrasound: Diffuse and Nodular Disease. *Radiol Clin North Am* 2020;58:1041–57. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2020.07.003>.
- [16] Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development* 2017;144:2123–40. <https://doi.org/10.1242/dev.145615>.
- [17] Mondal S, Raja K, Schweizer U, Mugesh G. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016;55:7606–30. <https://doi.org/10.1002/anie.201601116>.
- [18] López-Márquez A, Carrasco-López C, Fernández-Méndez C, Santisteban P. Unraveling the Complex Interplay Between Transcription Factors and Signaling Molecules in Thyroid Differentiation and Function, From Embryos to Adults. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:654569. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.654569>.

- [19] De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 2004;25:722–46. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0028>.
- [20] Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders/Elsevier; 2008.
- [21] Posabella A, Alber AB, Undeutsch HJ, Drosier RA, Hollenberg AN, Ikonomidou L, et al. Derivation of Thyroid Follicular Cells From Pluripotent Stem Cells: Insights From Development and Implications for Regenerative Medicine. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:666565. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.666565>.
- [22] Khan YS, Farhana A. *Histology, Thyroid Gland.*, Treasure Island (FL): 2022.
- [23] Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. *Physiology, Thyroid Hormone.*, Treasure Island (FL): 2022.
- [24] Barbaro D, Orrù B, Unfer V. Iodine and Myo-Inositol: A Novel Promising Combination for Iodine Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:457. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00457>.
- [25] Stathatos N. Thyroid physiology. *Med Clin North Am* 2012;96:165–73. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2012.01.007>.
- [26] Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:582–91. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.143>.
- [27] Velasco LFR, Togashi M, Walfish PG, Pessanha RP, Moura FN, Barra GB, et al. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem* 2007;282:12458–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610700200>.
- [28] Talhada D, Santos CRA, Gonçalves I, Ruscher K. Thyroid Hormones in the Brain and Their Impact in Recovery Mechanisms After Stroke. *Front Neurol* 2019;10:1103. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01103>.
- [29] Wong R, Farrell SG, Grossmann M. Thyroid nodules: diagnosis and management. *Med J Aust* 2018;209:92–8. <https://doi.org/10.5694/mja17.01204>.

- [30] Dean DS, Gharib H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:901–11. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.09.019>.
- [31] Lou X, Wang X, Wang Z, Mao G, Zhu W, Wang Y, et al. The Effect of Iodine Status on the Risk of Thyroid Nodules: A Cross-Sectional Study in Zhejiang, China. *Int J Endocrinol* 2020;2020:3760375. <https://doi.org/10.1155/2020/3760375>.
- [32] Pemayun TGD. Current Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. *Acta Med Indones* 2016;48:247–57.
- [33] Olson E, Wintheiser G, Wolfe KM, Droessler J, Silberstein PT. Epidemiology of Thyroid Cancer: A Review of the National Cancer Database, 2000-2013. *Cureus* 2019;11:e4127. <https://doi.org/10.7759/cureus.4127>.
- [34] Shah JP. Thyroid carcinoma: epidemiology, histology, and diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol* 2015;13:3–6.
- [35] Lebastchi AH, Callender GG. Thyroid cancer. *Curr Probl Cancer* 2014;38:48–74. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2014.04.001>.
- [36] Zamora EA, Khare S, Cassaro S. *Thyroid Nodule.*, Treasure Island (FL): 2022.
- [37] Veschi V, Verona F, Lo Iacono M, D'Accardo C, Porcelli G, Turdo A, et al. Cancer Stem Cells in Thyroid Tumors: From the Origin to Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00566>.
- [38] Diquigiovanni C, Bonora E. Genetics of Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma (FNMTTC). *Cancers (Basel)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/cancers13092178>.
- [39] Sánchez-Ares M, Cameselle-García S, Abdulkader-Nallib I, Rodríguez-Carnero G, Beiras-Sarasquete C, Puñal-Rodríguez JA, et al. Susceptibility Genes and Chromosomal Regions Associated With Non-Syndromic Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma: Some Pathogenetic and Diagnostic Keys. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:829103. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.829103>.
- [40] Townsend CM, Sabiston DC, Ulusoy AN, Topgül K. *Sabiston textbook of surgery: modern cerrahi prati{\u{g}}in biyolojik temeli*. Nobel T{\i}p Kitabevleri; 2010.

- [41] Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA* 2018;319:914–24.
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.0898>.
- [42] Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J* 2017;6:225–37.
<https://doi.org/10.1159/000478927>.
- [43] Bomeli SR, LeBeau SO, Ferris RL. Evaluation of a thyroid nodule. *Otolaryngol Clin North Am* 2010;43:229–38, vii. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.01.002>.
- [44] Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS, AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY, AND ASSOCIAZIONE MEDICI ENDOCRINOLOGI MEDICAL GUIDELINES FOR CLINICAL PRACTICE FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THYROID NODULES--2016 UPDATE. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* 2016;22:622–39.
<https://doi.org/10.4158/EP161208.GL>.
- [45] Alshaikh S, Harb Z, Aljufairi E, Almahari SA. Classification of thyroid fine-needle aspiration cytology into Bethesda categories: An institutional experience and review of the literature. *Cytojournal* 2018;15:4.
https://doi.org/10.4103/cytojournal.cytojournal_32_17.
- [46] Patel SG, Carty SE, Lee AJ. Molecular Testing for Thyroid Nodules Including Its Interpretation and Use in Clinical Practice. *Ann Surg Oncol* 2021;28:8884–91.
<https://doi.org/10.1245/s10434-021-10307-4>.
- [47] Bai Y, Kakudo K, Jung CK. Updates in the Pathologic Classification of Thyroid Neoplasms: A Review of the World Health Organization Classification. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea)* 2020;35:696–715. <https://doi.org/10.3803/EnM.2020.807>.
- [48] Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol* 2022;33:27–63.
<https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>.

- [49] Niciporuka R, Nazarovs J, Ozolins A, Narbutis Z, Miklasevics E, Gardovskis J. Can We Predict Differentiated Thyroid Cancer Behavior? Role of Genetic and Molecular Markers. *Medicina (Kaunas)* 2021;57. <https://doi.org/10.3390/medicina57101131>.
- [50] Parameswaran R, Brooks S, Sadler GP. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers. *Int J Surg* 2010;8:186–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2010.01.005>.
- [51] Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: a hypothesis for better understanding of gene expression profile and genomic alternation in thyroid carcinoma. *Endocr J* 2004;51:509–15. <https://doi.org/10.1507/endocrj.51.509>.
- [52] Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep* 2020;47:4587–629. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05435-1>.
- [53] Kuzey GM. Temel patoloji. Güneş Kitabevi; 2007.
- [54] Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LDR, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol* 2016;2:1023–9. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0386>.
- [55] Rosario PW, Mourão GF. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP): a review for clinicians. *Endocr Relat Cancer* 2019;26:R259–66. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0048>.
- [56] Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:102. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00102>.
- [57] Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc* 2008;21 Suppl 2:S37-43. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.10>.
- [58] Marotta V, Bifulco M, Vitale M. Significance of RAS Mutations in Thyroid Benign Nodules and Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/cancers13153785>.

- [59] Poller DN, Glaysher S. Molecular pathology and thyroid FNA. *Cytopathology* 2017;28:475–81. <https://doi.org/10.1111/cyt.12492>.
- [60] Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15:9–20. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0003>.
- [61] Forman A, Sotelo J. Tumor-Based Genetic Testing and Familial Cancer Risk. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2020;10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036590>.
- [62] Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet* 2011;12:87–98. <https://doi.org/10.1038/nrg2934>.
- [63] Hanba C, Khariwala SS. What is the Utility of Genetic Testing in Indeterminate Thyroid Nodules? *Laryngoscope* 2021;131:2399–400. <https://doi.org/10.1002/lary.29435>.
- [64] Zhu CY, Donangelo I, Gupta D, Nguyen DT, Ochoa JE, Yeh MW, et al. Outcomes of Indeterminate Thyroid Nodules Managed Nonoperatively after Molecular Testing. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:e1240–7. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa887>.
- [65] Hu C, Jing W, Chang Q, Zhang Z, Liu Z, Cao J, et al. Risk stratification of indeterminate thyroid nodules by novel multigene testing: a study of Asians with a high risk of malignancy. *Mol Oncol* 2022;16:1680–93. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13205>.
- [66] Kannan S. Molecular Markers in the Diagnosis of Thyroid Cancer in Indeterminate Thyroid Nodules. *Indian J Surg Oncol* 2022;13:11–6. <https://doi.org/10.1007/s13193-020-01112-8>.
- [67] O’Conor CJ, Dash RC, Jones CK, Jiang XS. Performance of repeat cytology with reflex ThyroSeq genomic classifier for indeterminate thyroid cytology. *Cancer Cytopathol* 2022. <https://doi.org/10.1002/cncy.22552>.
- [68] Kwon MJ, Rho Y-S, Jeong JC, Shin HS, Lee JS, Cho SJ, et al. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma: a study of 3 cases featuring the PIK3CA mutation. *Hum Pathol* 2015;46:1180–8. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.04.010>.
- [69] Malami SA. Fine-Needle Aspiration Cytology Is an Alternative Source of High Quality

Archival Samples in Biobanking. ISRN Pathol 2011;2011:129785.
<https://doi.org/10.5402/2011/129785>.

- [70] Fu G, Chazen RS, MacMillan C, Witterick IJ. Development of a Molecular Assay for Detection and Quantification of the BRAF Variation in Residual Tissue From Thyroid Nodule Fine-Needle Aspiration Biopsy Specimens. JAMA Netw Open 2021;4:e2127243. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.27243>.
- [71] Hamadou M, Lopez J, Benzerdjeb N, Cugnet-Anceau C, Schnoering G, Besançon J, et al. Feasibility and performance of the Idylla™ NRAS/BRAF cartridge mutation assay on thyroid liquid-based fine-needle aspiration. Diagn Cytopathol 2021;49:1265–71. <https://doi.org/10.1002/dc.24897>.
- [72] Mitsutake N, Saenko V. Molecular pathogenesis of pediatric thyroid carcinoma. J Radiat Res 2021;62:i71–7. <https://doi.org/10.1093/jrr/rraa096>.
- [73] Ricarte-Filho JC, Halada S, O'Neill A, Casado-Medrano V, Laetsch TW, Franco AT, et al. The clinical aspect of NTRK-fusions in pediatric papillary thyroid cancer. Cancer Genet 2022;262–263:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2022.01.002>.
- [74] Galuppini F, Vianello F, Censi S, Barollo S, Bertazza L, Carducci S, et al. Differentiated Thyroid Carcinoma in Pediatric Age: Genetic and Clinical Scenario. Front Endocrinol (Lausanne) 2019;10:552. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00552>.
- [75] Lee E, Terhaar S, McDaniel L, Gorelik D, Gerhard E, Chen C, et al. Diagnostic performance of the second-generation molecular tests in the assessment of indeterminate thyroid nodules: A systematic review and meta-analysis. Am J Otolaryngol 2022;103394. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2022.103394>.
- [76] Bae J-S, Choi SK, Jeon S, Kim Y, Lee S, Lee YS, et al. Impact of NRAS Mutations on the Diagnosis of Follicular Neoplasm of the Thyroid. Int J Endocrinol 2014;2014:289834. <https://doi.org/10.1155/2014/289834>.
- [77] Jang EK, Song DE, Sim SY, Kwon H, Choi YM, Jeon MJ, et al. NRAS Codon 61 Mutation Is Associated with Distant Metastasis in Patients with Follicular Thyroid Carcinoma. Thyroid 2014;24:1275–81. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0053>.

- [78] Cohen DS, Tongson-Ignacio JE, Lolachi CM, Ghaderi VS, Jahan-Parwar B, Thompson LDR. Rethinking Malignancy Risk in Indeterminate Thyroid Nodules with Positive Molecular Studies: Southern California Permanente Experience. *Otolaryngol Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol Neck Surg* 2019;161:419–23. <https://doi.org/10.1177/0194599819842859>.
- [79] Asa SL, Mete O. Oncocytic Change in Thyroid Pathology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.678119>.
- [80] Oishi N, Kondo T, Vuong HG, Nakazawa T, Mochizuki K, Kasai K, et al. Immunohistochemical detection of NRAS(Q61R) protein in follicular-patterned thyroid tumors. *Hum Pathol* 2016;53:51–7. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.02.008>.
- [81] Xu B, Reznik E, Tuttle RM, Knauf J, Fagin JA, Katabi N, et al. Outcome and molecular characteristics of non-invasive encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with oncocytic features. *Endocrine* 2019;64:97–108. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-01848-6>.
- [82] Pani F, Macerola E, Basolo F, Boi F, Scartozzi M, Mariotti S. Aggressive differentiated thyroid cancer with multiple metastases and NRAS and TERT promoter mutations: A case report. *Oncol Lett* 2017;14:2186–90. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6395>.
- [83] Sensi M, Nicolini G, Petti C, Bersani I, Lozupone F, Molla A, et al. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene* 2006;25:3357–64. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209379>.
- [84] Huang G, Chen J, Zhou J, Xiao S, Zeng W, Xia J, et al. Epigenetic modification and BRAF gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Cell Int* 2021;21:687. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02405-w>.
- [85] Afkhami M, Karunamurthy A, Chiosea S, Nikiforova MN, Seethala R, Nikiforov YE, et al. Histopathologic and Clinical Characterization of Thyroid Tumors Carrying the BRAF(K601E) Mutation. *Thyroid* 2016;26:242–7. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0227>.
- [86] Beg S, Siraj AK, Jehan Z, Prabakaran S, Al-Sobhi SS, Al-Dawish M, et al. PTEN loss is associated with follicular variant of Middle Eastern papillary thyroid carcinoma. *Br J*

- Cancer 2015;112:1938–43. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.169>.
- [87] Ngeow J, Eng C. PTEN in Hereditary and Sporadic Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med 2020;10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036087>.
- [88] Panebianco F, Nikitski A V, Nikiforova MN, Nikiforov YE. Spectrum of TERT promoter mutations and mechanisms of activation in thyroid cancer. Cancer Med 2019;8:5831–9. <https://doi.org/10.1002/cam4.2467>.
- [89] Pinto N, Ruicci KM, Khan MI, Shaikh MH, Zeng YFP, Yoo J, et al. Introduction and expression of PIK3CA(E545K) in a papillary thyroid cancer BRAF(V600E) cell line leads to a dedifferentiated aggressive phenotype. J Otolaryngol - Head Neck Surg = Le J d'oto-Rhino-Laryngologie Chir Cervico-Faciale 2022;51:7. <https://doi.org/10.1186/s40463-022-00558-w>.
- [90] Murugan AK, Qasem E, Al-Hindi H, Alzahrani AS. GPCR-mediated PI3K pathway mutations in pediatric and adult thyroid cancer. Oncotarget 2019;10:4107–24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26993>.
- [91] Xing JC, Tufano RP, Murugan AK, Liu D, Wand G, Ladenson PW, et al. Single nucleotide polymorphism rs17849071 G/T in the PIK3CA gene is inversely associated with follicular thyroid cancer and PIK3CA amplification. PLoS One 2012;7:e49192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049192>.

8. EKLER

8.1 Etik Kurul Onay Belgesi

Ege Ün. Evrak Tarih ve Sayısı: 18.05.2021-E.165381



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-99166796-050.06.04-165381
Konu : Onay Kararı 21-5T/100

Doç. Dr. Emin KARACA
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığımız " Patolojik Tanısı "Belirsiz Sitoloji" Olan Tiroit Nodüllerinde Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi " konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz onay kararı ekte sunulmaktadır.

Varsa Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Yazımın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Güzide AKSU
Kurul Başkanı

Ek:İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BS4H3UBCK2

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/ege-universitesi-ebys>

8.2 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

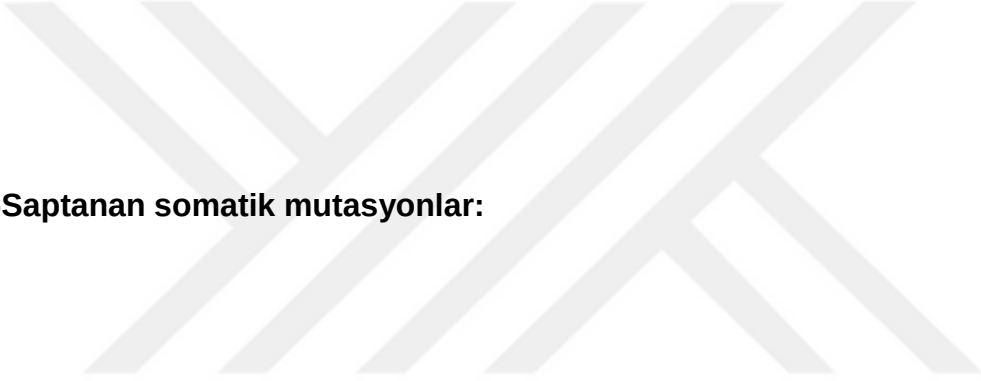
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!! Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.
Bu çalışmanın adı ne? Patolojik Tanısı “Belirsiz Sitoloji” olan Tiroit Nodüllerinde Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi
Bu çalışmanın amacı ne? İnce iğne aspirasyon biyopsisi uygulanan ve patoloji sonucu belirsiz olan nodüllere moleküler profillemeye yaparak tanı ve takibe yardımcı olmaktır.
Size nasıl bir uygulama yapılacaktır? Daha önce ince iğne aspirasyon biyopsisi uygulanan ve patolojik tanısı belirsiz olan arşivdeki örnekler toplanarak, yeni nesil dizileme analizi tabanlı olarak genetik değişiklikler taranacaktır.
Farklı tedaviler için araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı nedir? Bu araştırmada tedavi üzerine bir yöntem planlanmamıştır.
Ne kadar zamanınızı alacaktır? Araştırma süresince özel olarak katılıminıza gerek yoktur.
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı kaçtır? 20
Sizden alınacak biyolojik materyallere ne olacak ve analizler nerede yapılacaktır? (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması), İnce iğne aspirasyon biyopsileri lama yayılarak incelenmekte ve daha sonra arşivde saklanmaktadır. Bu örnekler öncelikle lamdan kazınarak örneklerle ait DNA elde edilecek ve daha sonra EÜTF Tıbbi Genetik AD içerisinde örneklerin analizi yapılacaktır. Örnekler yurtdışına çıkmayacaktır.
Sizden beklenen nedir? Sizin sorumluluklarınız nelerdir? Arşivde bekleyen ince iğne aspirasyon biyopsi örneklerinizin kullanımına izin vermeniz istenmektedir.
Çalışmaya katılmak size ne yarar sağlayacaktır? Bu çalışma yurt içinde bu tarz testlerin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır.
Araştırmaya katılıminın sona erdirilmesini gerektirecek durumlar nelerdir? Örneğin yetersiz ya da uygunsuz olması durumunda katılım iptal edilecektir.
Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar verebilir mi? Hayır. Örnekler daha önce alınmıştır, kişilere herhangi bir girişim uygulanmayacaktır.
Eğer katılmak istemezseniz ne olur? Çalışmamızın güçlenmesi için katılıminız önemlidir, katılmak istemezseniz örneğiniz çalışmaya dahil edilmeyecektir.

Size uygulanabilecek olan alternatif yöntemler nelerdir?												
Bu çalışmada tek bir yöntem belirlenmiştir.												
Bu çalışmaya katıldığım için bana herhangi bir ücret ödenecek mi?												
Hayır												
Bu çalışmaya katıldığım için ben herhangi bir ücret ödeyecek miyim?												
Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.												
Bilgilerin gizliliği: Tüm kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli kalacak, sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.												
Bu çalışmanın sorumlusunun iletişim bilgileri												
1- Adı, soyadı: Doç. Dr. Emin KARACA												
2- Ulaşılabilir telefon numarası:												
3- Görev yeri: EÜTF, Tıbbi Genetik AD.												
Çalışmaya Katılma Onayı:												
Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum. Bilgilendirilmiş gönüllü olurunun imzalı ve tarihli bir kopyasının bana verileceğini biliyorum.												
<table border="1"><thead><tr><th colspan="2">GÖNÜLLÜNÜN</th><th>İMZASI</th></tr></thead><tbody><tr><td>ADI & SOYADI</td><td></td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td>ADRESİ</td><td></td></tr><tr><td>TELEFONU</td><td></td></tr><tr><td>TARİH</td><td></td></tr></tbody></table>	GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI										
ADI & SOYADI												
ADRESİ												
TELEFONU												
TARİH												
<table border="1"><thead><tr><th colspan="2">Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin</th><th>İMZASI</th></tr></thead><tbody><tr><td>ADI & SOYADI</td><td></td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td>ADRESİ</td><td></td></tr><tr><td>TELEFONU</td><td></td></tr><tr><td>TARİH</td><td></td></tr></tbody></table>	Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI										
ADI & SOYADI												
ADRESİ												
TELEFONU												
TARİH												

Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI
ADI & SOYADI	Dr. Gizem KÖK KILIÇ	
ADRESİ	EÜTF Tıbbi Genetik AD.	
TELEFONU		
TARİH		

XXXXXX

8.3 Olgu Rapor Formu

VERİ TOPLAMA / OLGU RAPOR FORMU	
Olgu Numarası:	Tarih:
Protokol Numarası:	
1-İnce iğne aspirasyon biyopsisi patoloji sonucu:	
	
2-Saptanan somatik mutasyonlar:	
3-Cerrahi doku patolojisi sonucu (kesin patolojik tanısı):	
Açıklamalar:	

8.5 Tez Benzeşim Raporu

Ege Üniv. Evrak Tarih ve Sayısı: 26.05.2022-E.706656



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Asistan Bürosu

Sayı :E-71437136-302.14.06-706656
Konu :Dr. Gizem KÖK KILIÇ

DAĞITIM YERLERİNE

İlgi : 23.05.2022 tarihli ve 700073 sayılı yazı.

Anabilim Dalınızda tıpta uzmanlık öğrencisi olarak görev yapmakta olan Dr. Gizem KÖK KILIÇ'ın "Belirsiz Sitoloji olan Tiroid Nodüllerinde Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi" konulu tezi, Tez Çalışması Benzerlik Tespit Yazılım Programı'nda incelenmiş olup tez savunma sınavına girmesi, Dekanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Cemil GÜRGÜN
Dekan V.

Ek:tez

Dağıtım:
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığına
Sayın Doç. Dr. Emin KARACA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSLPA9ZJ02

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/egs-universitesi-ebys>

Patolojik Tanısı “Belirsiz Sitoloji” Olan Tiroit Nodüllerinde Yeni Nesil Dizi Analizi Tabanlı Hedefe Yönelik Somatik Mutasyon Analizi

ORJİNALLİK RAPORU

%3	%2	%1	%0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
2	www.bto.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Zubair W. Baloch, Sylvia L. Asa, Justine A. Barletta, Ronald A. Ghossein et al. "Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms", Endocrine Pathology, 2022 Yayın	<%1
5	Snehal G. Patel, Sally E. Carty, Andrew J. Lee. "Molecular Testing for Thyroid Nodules Including Its Interpretation and Use in Clinical Practice", Annals of Surgical Oncology, 2021 Yayın	<%1
6	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1

7	rial-cyted.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
9	openaccess.acibadem.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
10	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1
11	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
12	discovery.researcher.life İnternet Kaynağı	<% 1
13	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<% 1
14	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<% 1
15	Submitted to Baskent University Öğrenci Ödevi	<% 1
16	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
17	docplayer.net İnternet Kaynağı	<% 1

18	dspace.baskent.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
19	Flávia Sacilotto Donaires Ramos. "Telomere dynamics and hematopoietic differentiation of human DKC1-mutant induced pluripotent stem cells", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2016 Yayın	<% 1
20	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
21	pesquisa.bvsalud.org İnternet Kaynağı	<% 1
22	www.gecekitapligi.com İnternet Kaynağı	<% 1
23	www.turkjem.org İnternet Kaynağı	<% 1
24	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
26	www.kanservakfi.com İnternet Kaynağı	<% 1
27	www.metropolishaber.com İnternet Kaynağı	<% 1